

تبارزایی، تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ویروس زردی بافت مرده باقلا براساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M*

مهسا منصورپور^۱، اکبر دیزجی^{۱*} و علیرضا عباسی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۸)

چکیده

ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus, FBNYV*) از جنس *Nanovirus*، عامل ایجاد خسارت شدید حبوبات در کشورهای شمال آفریقا، جنوب آسیا و اروپا به‌شمار می‌رود. پس از تعیین ترادف نوکلئوتیدی کامل قطعه ژنومی M تعداد ۱۷ جدایه میزبانی و جغرافیایی این ویروس از ایران، تحلیل‌های مختلف مولکولی این ویروس براساس این قطعه ژنومی مربوط به تمام جدایه‌های در دسترس ویروس مورد بررسی قرارگرفت. رسم درخت تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M نشان داد که جدایه‌های FBNYV در دنیا در سه شاخه مجزا، شامل جدایه‌های ایران و آذربایجان به عنوان شاخه‌ای مستقل، قرار می‌گیرند. تخمین فواصل ژنتیکی زیرجمعیت‌های میزبانی ویروس، نشانگر شواهدی از نقش سازگاری میزبانی در انتخاب طبیعی FBNYV بود. وجود جریان ژنی بین زیرجمعیت‌های ایران و آذربایجان و نیز زیرجمعیت‌های اسپانیا و قاره آفریقا نشانگر ارتباط خاستگاه این زیرجمعیت‌ها است. بیشترین تنوع ژنتیکی قطعه ژنومی M ویروس در زیرجمعیت مرکز ایران برآورد شد. همچنین شاخص dN/dS کمتر از یک این قطعه ژنومی ویروس بیانگر اعمال فشار انتخاب منفی بر پروتئین حرکتی FBNYV است. در بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در قطعه ژنومی M این ویروس، وقوع هفت از نه رخداد نوترکیبی در جدایه‌های ایرانی FBNYV ردیابی شد. این اولین گزارش از آلودگی نخودفرنگی به ویروس زردی بافت مرده باقلا از ایران است. همچنین ترادف کامل قطعه ژنومی M جدایه‌های لوبیا و نخودفرنگی این ویروس برای اولین بار در دنیا به- دست آمد.

کلیدواژه: نانوویروس، تنوع نوکلئوتیدی، درخت تبارزایی، انتخاب منفی، سازگاری میزبانی.

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تهران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: adizaji@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

Phylogeny, genetic diversity and population structure of *Faba bean necrotic yellows virus* based on the nucleotide sequence of DNA-M*

M. Mansourpour¹, A. Dizadji^{1*}, and A. Abbasi²

(Received: 20.3.2019; Accepted: 30.9.2019)

Abstract

Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) causes severe yield losses and crop failure in legumes in the north African, south Asian and European countries. Following nucleotide sequencing of DNA-M segment of 17 host and geographical FBNYV isolates in Iran, different molecular analysis were performed based on all available DNA-M sequences of FBNYV. Based on constructed phylogenetic tree using nucleotide sequence of DNA-M component, FBNYV isolates were grouped into three clades, including isolates from Iran and Azerbaijan as a distinct clade. Genetic distance studies of FBNYV host subpopulations revealed some evidences of host adaptation in FBNYV natural selection. High gene flow was found among Iran – Azerbaijan and Spain – Africa subpopulations, indicating the relationship of their origins. Maximum genetic diversity of DNA-M was estimated in the central subpopulation of Iran. The dN/dS (G) value less than 1 represented the negative selection pressure on the movement protein of the virus. Seven out of nine recombination events were detected in DNA-M of Iranian FBNYV isolates. This is the first report of the FBNYV infection on pea from Iran. In the current study, the complete DNA-M nucleotide sequences of French bean and pea isolates of FBNYV were determined for the first time in the world.

Keywords: Host adaptation, *Nanovirus*, Nucleotide diversity, Phylogenetic tree, Negative selection

* Part of PhD. thesis of the first author submitted to University of Tehran.

**Corresponding author's E-mail: adizaji@ut.ac.ir

1. Ph.D. student and Associate Professor, respectively, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.
2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.

مقدمه

رسیده است (Makkouk et al. 2002). سپس این ویروس از مزارع باقلای استان مازندران (Asghari et al. 2009) و مزارع یونجه استان ایلام گزارش شد (Faraji et al. 2012).

ژنوم نانووایروس‌ها از هشت قطعه دی‌ان‌ا حلقوی تک‌لا به اندازه تقریبی یک کیلوباز تشکیل شده که به‌طور مجزا در پیکره‌های ایزومتریک کوچک (با قطر ۱۸ نانومتر) پوشش‌دار می‌شوند. قطعات ژنومی U1، S، R، N، M، C، U2 و U4 هر یک دارای یک چارچوب ژنی بوده و به ترتیب پروتئین‌های مرتبط با چرخه سلولی، پروتئین حرکتی، پروتئین انتقال‌دهنده به هسته، پروتئین آغازکننده همانندسازی، پروتئین پوششی و سه قطعه آخر پروتئین‌هایی با عملکرد نامشخص را رمزگذاری می‌کنند (Franz et al. 1999, Grigoras et al. 2009).

پروتئین حرکتی که توسط قطعه ژنومی M رمزگذاری می‌گردد، در حرکت درون سلولی، بین سلولی و سیستمیک ویروس زردی بافت مرده باقلا و به واسطه تعامل با پروتئین‌های میزبان اهمیت ویژه‌ای دارد (Hull 2014). جهش، نوترکیبی و نوآرایی به عنوان منابع تغییرپذیری ویروس‌های گیاهی با ژنوم چندبخشی مطرح بوده و نقش عمده‌ای در تکامل ویروس‌ها ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات صورت گرفته، نرخ تغییرپذیری و سرعت تکامل در نانووایروس‌ها بالا است به گونه‌ای که نرخ جایگزینی به ازای هر نوکلئوتید در هر سال برای گونه *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) معادل 1.0×10^{-3} تعیین شده است (Grigoras et al. 2010). بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی برای پی‌بردن به روند تغییرات ژنوم و تکامل این ویروس‌ها می‌تواند به پیش‌بینی پویایی بیماری در آینده و شناسایی مکان‌های احتمالی بروز بیمارگرهای جدید کمک کند (Savory et al. 2014). تحلیل نوترکیبی در

خانواده حبوبات (Fabaceae)، با نزدیک به ۲۰۰۰۰ گونه یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند. اعضای این خانواده منبع مهمی از مواد مورد نیاز رژیم غذایی روزانه انسان را تأمین می‌کنند (El-muadhidi et al. 2001). علاوه بر این، حبوبات به دلیل توانایی همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، نقش مهمی در تأمین این عنصر حیاتی در اکوسیستم‌های مختلف ایفا می‌کنند (Majnoon Hoseini 1995). سطح زیرکشت حبوبات در ایران در سال زراعی ۹۶-۹۵، حدود ۷۹۹ هزار هکتار بوده است که این میزان ۷/۲۷٪ درصد از سطوح زیرکشت محصولات زراعی کشور را شامل می‌شود. میزان تولید کل حبوبات کشور نیز حدود ۷۰۰ هزار تن بوده که بیشترین میزان تولید حبوبات مربوط به استان‌های کرمانشاه، لرستان و کردستان می‌باشد (Anonymous 2018).

ویروس زردی بافت مرده باقلا، *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV)، از جنس *Nanovirus* و خانواده *Nanoviridae*، عامل ایجاد خسارت شدید در حبوبات غذایی و علوفه‌ای در آفریقا، آسیا و اروپا است و عمدتاً با سه گونه شته *A. craccivora*، *Aphis fabae* و *Acyrtosiphon pisum* منتقل می‌شود. همه‌گیری این بیماری در سال‌های ۱۹۹۲، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ در مصر و سال ۲۰۰۱ در تونس رخ داده است و در کشورهای مدیترانه‌ای نیز خسارت‌زاترین ویروس باقلا معرفی شده است (Makkouk et al. 2012). در ایران، اولین گزارش از وجود FBNYV در مزارع نخود و عدس استان‌های قزوین، کرمانشاه، کردستان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی توسط مکوک و همکاران در سال ۲۰۰۲ به ثبت

استخراج دی‌ان‌ا کل گیاهی

دی‌ان‌ا کل گیاهی از نمونه‌های علائم دار با استفاده از روش بهینه شده ژانگ و همکاران استخراج شد (Zhang *et al.* 1998). به طور خلاصه، به پودر حاصل از خردکردن ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاهان، ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲%CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% mercaptoethanol) با دمای ۶۰ درجه سلسیوس اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از افزودن ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزواآمیل‌الکل (۲۴:۱) به هر لوله و تکان خوردن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه و با نیروی ۲۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. پس از حذف ته‌نشین و افزودن ایزوپروپانول سرد به روشین (هم حجم) و قرارگرفتن لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ، سانتریفیوژ با شرایط قبلی انجام شد. رسوب در معرض هوا خشک و سوسپانسیون دی‌ان‌ا کل در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C - نگهداری شد.

تکثیر قطعه ژنومی M جدایه‌های FBNYV

تکثیر قطعه ژنومی M جدایه‌های FBNYV از مناطق مختلف جغرافیایی و میزبان‌های متفاوت توسط جفت - آغازگر اختصاصی پشت سر هم (Back-to-Back) FBNYV-MP-F 5'GCTTGCTTGTTATGTTTCCTG G3' (متناظر با بازهای ۴۷۹-۴۵۹) و FBNYV-MP-R 5'CAAGCAAGCATAATACATACCCA3' (مکمل بازهای ۴۶۷-۴۴۵) انجام شد.

طراحی جفت آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) و OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

نانوویروس‌های اروپا نشان داده است که رخدادهای نوترکیبی درون و بین‌گونه‌ای به فراوانی در ویروس‌های متعلق به این جنس رخ می‌دهند و نقطه شکست در بیشتر این رخدادهای در محل آغاز همانندسازی ژنوم (Ori) قرار دارد. همچنین در مطالعات نوآرایی قطعات ژنومی در نانوویروس‌های گزارش شده از اروپا، قطعه ژنومی M به عنوان مستعدترین قطعه در تبادلات ژنتیکی شناخته شده است (Grigoras *et al.* 2010). با توجه به اهمیت پروتئین حرکتی ویروس‌ها در تعامل با پروتئین‌های مختلف میزبان (Hull 2014) و نیز با توجه به تنوع میزبانی ویروس در ایران و کشت انواع مختلف حبوبات در سطح وسیع و در استان‌های مختلف (Anonymous 2018)، در این تحقیق تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی FBNYV براساس قطعه ژنومی M جدایه‌های مختلف میزبانی و جغرافیایی ویروس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

در سال‌های ۹۴ تا ۹۶، نمونه برداری از مزارع باقلا، نخود، عدس، لوبیا و نخودفرنگی واقع در استان‌های عمده کشت این محصولات شامل مناطق شمالی (استان‌های گلستان و مازندران) مناطق مرکزی (استان‌های اصفهان، مرکزی، قزوین و البرز) و مناطق غربی (استان‌های کرمانشاه، لرستان و آذربایجان غربی) از گیاهان دارای علائم ویروسی شامل زردی و بدشکلی برگ‌ها، کوتولگی و نکروز انجام شد و نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ژنومی M جدایه‌های ویروس زردی بافت مرده باقلا در این تحقیق با سایر جدایه‌های ایران و نیز سایر نقاط دنیا با استفاده از نرم افزار SDTv1.2 (Muhire *et al.* 2014) انجام و میزان یکسانی نوکلئوتیدی جدایه‌ها تعیین گردید. رسم درخت تبارزایی با استفاده از نرم افزار MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013)، روش Maximum likelihood، مدل Tamura 3-parameter و ۱۰۰۰ بار تکرار صورت گرفت. ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M گونه *Milk KY070244.1 vetch dwarf virus* (MDV) با رس‌شمار KY070244.1 به عنوان برون گروه مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل تنوع ژنتیکی و نوترکیبی

برای تحلیل‌های ژنتیکی، جدایه‌های این ویروس در قالب زیرجمعیت‌های میزبانی (زیرجمعیت‌های باقلا، نخودفرنگی، نخودایرانی و عدس) و جغرافیایی (زیرجمعیت‌های مرکز، شمال، غرب و شرق ایران، اسپانیا، آذربایجان، آفریقا و سوریه) گروه‌بندی شدند. بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی و جریان ژنی با نرم افزار DnaSP5 (Librado & Rozas 2013) و تحلیل نوترکیبی با نرم افزار RDP4 (Martin *et al.* 2015) صورت گرفت.

نتیجه و بحث

ردیابی FBNYV و تکثیر قطعه ژنومی M جدایه‌های مختلف ویروس

طی بازدیدهای به‌عمل آمده از مزارع حبوبات استان‌های مختلف کشور در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶، در مجموع ۵۵۷ نمونه جمع‌آوری و طول کامل قطعه ژنومی M (رمزکننده پروتئین حرکتی) ۱۷ جدایه FBNYV (جدول ۱) با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی پشت سرهم در

و متناظر با ناحیه حفاظت شده داخل ژن براساس همردیف‌سازی ترادف‌های موجود در بانک ژن صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA polymerase Master Mix Red (Ampliqon, Denmark)، ۰/۱ میلی‌مول dNTPs، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، دو میکرولیتر آماده دی‌ان‌ا کل و آب مقطر انجام شد. برنامه PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت یک دقیقه، و ۳۵ چرخه به صورت یک دقیقه در ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال ۵۷°C و یک دقیقه در دمای ۷۲°C و تنظیم و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بررسی محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز افقی در ژل آگاروز یک درصد و با ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت.

خالص‌سازی قطعات تکثیرشده، همسانه‌سازی و تعیین ترادف

استخراج دی‌ان‌ا قطعات تکثیر یافته از ژل آگاروز با کیت Expin Gel SV (GeneAll, South Korea) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام و پس از الحاق قطعات خالص‌سازی شده در حامل pJET1.2 (Thermo Fisher, United States)، انتقال به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α انجام شد. استخراج پلاسمید بوسیله Miniprep kit (Qiagene, Netherlands) انجام و نمونه‌ها جهت تعیین ترادف دو جهته به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید.

رسم درخت تبارزایی

همردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی قطعه

جدول ۱: تعداد نمونه‌های جمع آوری شده و تعداد جدایه های FBNYV مورد استفاده در این تحقیق جهت تکثیر کامل قطعه ژنومی M به تفکیک میزبان و محل نمونه برداری

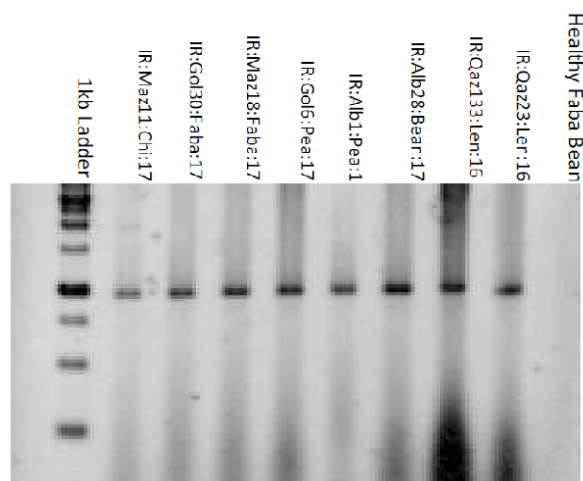
Table 1: The number of collected samples and FBNYV isolates used in this study for complete DNA-M amplification concerning host plants and locations

Location	Host plant	No of infected/collected samples
Mazandaran	Faba bean	1/37
Isfahan	Faba bean	2/54
Golestan	Faba bean	4/72
Isfahan	Chickpea	0/30
Mazandaran	Chickpea	3/35
Lorestan	Chickpea	0/34
Kermanshah	Chickpea	0/76
Western Azerbaijan	Chickpea	0/23
Qazvin	Chickpea	0/16
Qazvin	Lentil	2/36
Markazi	Common/French Bean	0/59
Alborz	French Bean	1/65
Alborz	Pea	1/11
Golestan	Pea	3/9

اندازه مورد انتظار (تقریباً ۱ کیلوباز) تکثیر و در بانک ژن ثبت شد (جدول ۲)، درحالی که در نمونه‌های سالم هیچ قطعه دی‌ان‌ا تکثیر نشد (شکل ۱). علائم بیماری در نمونه‌های آلوده به ویروس زردی بافت مرده باقلا در شامل قاشقی شدن و چروکیده شدن رگبرگ‌ها در برگ‌های انتهایی و زردی و کوتولگی، در نخود ایرانی و عدس زردی و کوتولگی شدید و گاهی قرمزی برگ‌ها، در لوبیا به صورت زردی بین رگبرگی و نکروز و در نخودفرنگی زردی و رنگ‌پریدگی مشاهده شد (شکل ۲). این ویروس تاکنون از میزبان‌های باقلا، نخود، عدس، لوبیا و یونجه در ایران گزارش شده است (Asghari et al. 2009, Faraji et al. 2012, Makkouk et al. 2002) در این تحقیق نیز این ویروس برای اولین بار در ایران از مزارع نخودفرنگی ردیابی شد.

تعیین ترادف، همردیف‌سازی و درصد یکسانی نوکلئوتیدی DNA-M جدایه‌های ویروس

ترادف نوکلئوتیدی کامل قطعه ژنومی M جدایه‌های



شکل ۱: تکثیر ترادف کامل DNA-M ژنوم FBNYV در میزبان‌های مختلف با استفاده از آغازگرهای MP (F,R)، راهک ۱، نشانگر مولکولی 1kb DNA-ladder (Fermentas)، راهک‌های ۲ تا ۹ به ترتیب جدایه‌های FBNYV به دست آمده از میزبان‌های نخود، باقلا، نخودفرنگی، لوبیا و عدس، راهک ۱۰ شاهد (گیاه سالم باقلا).

Fig 1: Amplification of FBNYV-DNA-M of various hosts with specific primers MP (F,R). Lane1, 1kb DNA-ladder (Fermentas); Lanes 2-9, FBNYV isolates originated from Chickpea, faba bean, pea, french bean and lentil; Lane 10, Negative control (healthy Faba bean).

جدول ۲: مشخصات جدایه‌های FBNYV مورد استفاده در این تحقیق

Table 2: Characteristics of FBNYV isolates used in this study.

Isolate	Sampling location	Host plant	DNA-M size (bp)	Accession Number
IR:Gol1:Pea:17	Iran-Golestan	Pea	991	MK560481
IR:Gol6:Pea:17	Iran-Golestan	Pea	991	MK560482
IR:Gol9:Pea:17	Iran-Golestan	Pea	993	MK560483
IR:Alb1:Pea:17	Iran-Alborz	Pea	993	MK560484
IR:Alb28:Bean:17	Iran-Alborz	French Bean	991	MK560485
IR:Maz1:Chi:17	Iran-Mazandaran	Chickpea	992	MK560486
IR:Maz11:Chi:17	Iran-Mazandaran	Chickpea	993	MK560487
IR:Maz14:Chi:17	Iran-Mazandaran	Chickpea	996	MK560488
IR:Qaz133:Len:16	Iran-Qazvin	Lentil	992	MK560489
IR:Qaz23:Len:16	Iran-Qazvin	Lentil	992	MK560490
IR:Ka140:Fab:16	Iran-Isfahan	Faba bean	994	MK560491
IR:Ka142:Fab:16	Iran-Isfahan	Faba bean	993	MK560492
IR:Gol33:Fab:17	Iran-Golestan	Faba bean	993	MK560493
IR:Gol30:Fab:17	Iran-Golestan	Faba bean	996	MK560494
IR:Gol90:Fab:17	Iran-Golestan	Faba bean	994	MK560495
IR:Gol8:Fab:16	Iran-Golestan	Faba bean	993	MK560496
IR:Maz18:Fab:17	Iran-Mazandaran	Faba bean	987	MK560497
IR-Ker-21	Iran-Kermanshah	Chickpea	993	MG827064.1
IR-Lor-1	Iran-Lorestan	Chickpea	993	MG827048.1
IR-Lor-28	Iran-Lorestan	Chickpea	993	MG827056.1
IR:Raz:88:Chi:16	Iran-North Khorasan	Chickpea	994	MH113433.1
IR:Raz:77:Len:16	Iran-North Khorasan	Lentil	994	MH113441.1
IR:Rab:14A1:Len:16	Iran-Kerman	Lentil	994	MH113449.1
Lahic-12	Azerbaijan	Faba bean	993	KC979003.1
Lahic_13.5	Azerbaijan	Faba bean	993	KC979012.1
Lahic_13.5DNA-M*	Azerbaijan	Faba bean	994	KC979018.1
Mu-R7	Spain	Faba bean	996	KC979038.1
Mu-R4	Spain	Faba bean	989	KC979030.1
Mu-29D	Spain	Faba bean	996	KC979022.1
Mor23	Morocco	Faba bean	989	GQ274027.1
TuF01	Tunisia	Faba bean	992	KX431393.1
TuF9	Tunisia	Faba bean	996	KX431399.1
TuF4	Tunisia	Faba bean	989	KX431398.1
TuF12	Tunisia	Faba bean	996	KX431397.1
TuF10	Tunisia	Faba bean	996	KX431396.1
Ev1-93	Egypt	Faba bean	992	AJ132182.1
Syrian	Syria	Faba bean	992	NC003562.1
Sy4	Syria	Faba bean	990	KX431395.1
Sy36	Syria	Faba bean	990	KX431394.1

هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M، مقایسات دوتایی جدایه‌های ایرانی FBNYV نشان داد که جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف و مناطق مختلف جغرافیایی کشور بین ۹۹/۸-۸۱/۴ درصد یکسانی دارند (شکل ۳). بر اساس این قطعه ژنومی ویروس بین جدایه‌های ایران، بیشترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی

FBNYV شناسایی شده در این تحقیق (۱۷ جدایه) تعیین شد که ترادف نوکلئوتیدی این قطعه ژنومی ویروس از میزبان‌های لوبیا و نخودفرنگی برای اولین بار در دنیا تعیین گردید. مشخصات و رس‌شمار مربوط به جدایه‌های حاصل از تحقیق حاضر و سایر جدایه‌های استفاده شده در تحلیل‌های ژنتیکی در جدول ۲ آمده است. براساس



شکل ۲: علائم دیده شده در میزبان‌های مختلف آلوده به FBNYV شامل نخود (A)، باقلا (B)، نخودفرنگی (C)، عدس (D)، لوبیا (E).

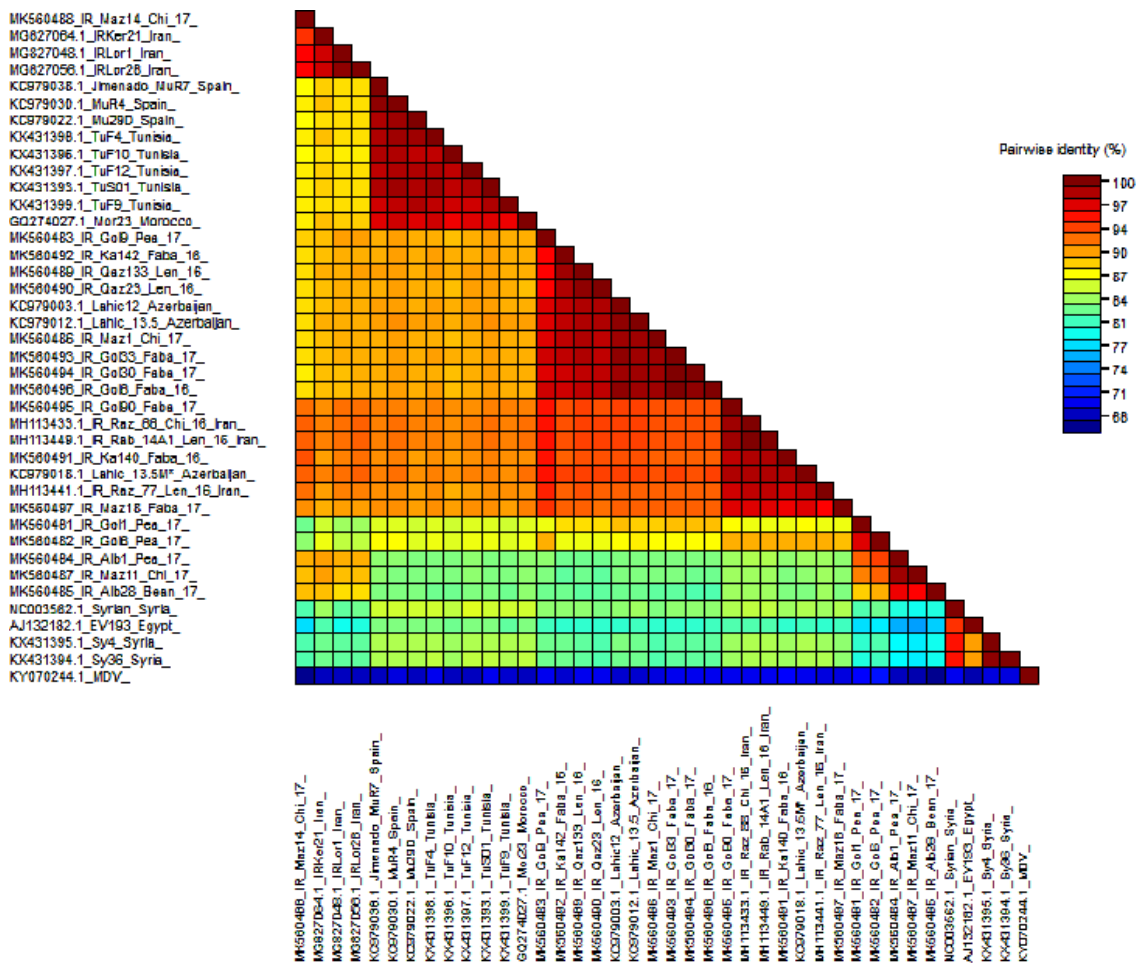
Fig 2: The observed Symptoms in different host plants infected by FBNYV including: Chickpea (A), Faba bean (B), Pea (C), Lentil (D) and French bean (E).

پیش‌بینی شده پرتئین حرکتی در جدایه‌های ایران و آذربایجان را گزارش کرده‌اند (Sokhansanj *et al.* 2018).

درخت تبارزایی و ارتباط تکاملی جدایه‌های FBNYV

در درخت تبارزایی حاصل از همردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی چارچوب ژنی پروتئین حرکتی جدایه‌های این تحقیق و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA6، جدایه‌های ویروس در سه شاخه کاملاً مجزا قرار گرفتند به طوری که تمام جدایه‌های ایرانی FBNYV به همراه دو جدایه کشور آذربایجان (برای جدایه FBNYV-[Az;Lahic13.5] دو ترادف نوکلئوتیدی مجزای مرتبط با قطعه ژنومی M شناسایی شده‌است) در شاخه I، جدایه‌های آفریقا (مراکش و تونس) و اسپانیا در شاخه II و جدایه‌های سوریه و مصر در شاخه III قرار گرفتند (شکل ۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های مختلف FBNYV از مناطق جغرافیایی متفاوت

DNA-M بین جدایه‌های باقلا از استان گلستان (۹۹/۸ درصد) و کمترین درصد یکسانی بین جدایه لوبیا از استان البرز (MK560485) و جدایه باقلا از استان گلستان (MK560494) (۸۱/۴ درصد) تعیین شد. بین جدایه‌های این ویروس در دنیا و براساس قطعه ژنومی M، بیشترین و کمترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی به ترتیب بین جدایه‌های باقلای استان گلستان (۹۹/۸٪) و جدایه‌های نخود ایران (MK560487) و باقلای مصر (AJ132182.1) (۷۵/۳٪) تعیین شد. مقایسه ترادف این قطعه ژنومی ویروس در جدایه‌های ایرانی با ترادف‌های متناظر در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های ایرانی دارای کمترین میزان یکسانی با جدایه مصری ویروس (AJ132182.1) و بیشترین یکسانی با جدایه‌های این ویروس از کشور آذربایجان (KC979012.1, KC979018.1, KC979003.1) هستند. سخن سنج و همکاران نیز درصد بالای یکسانی در ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M و ترادف آمینواسیدی

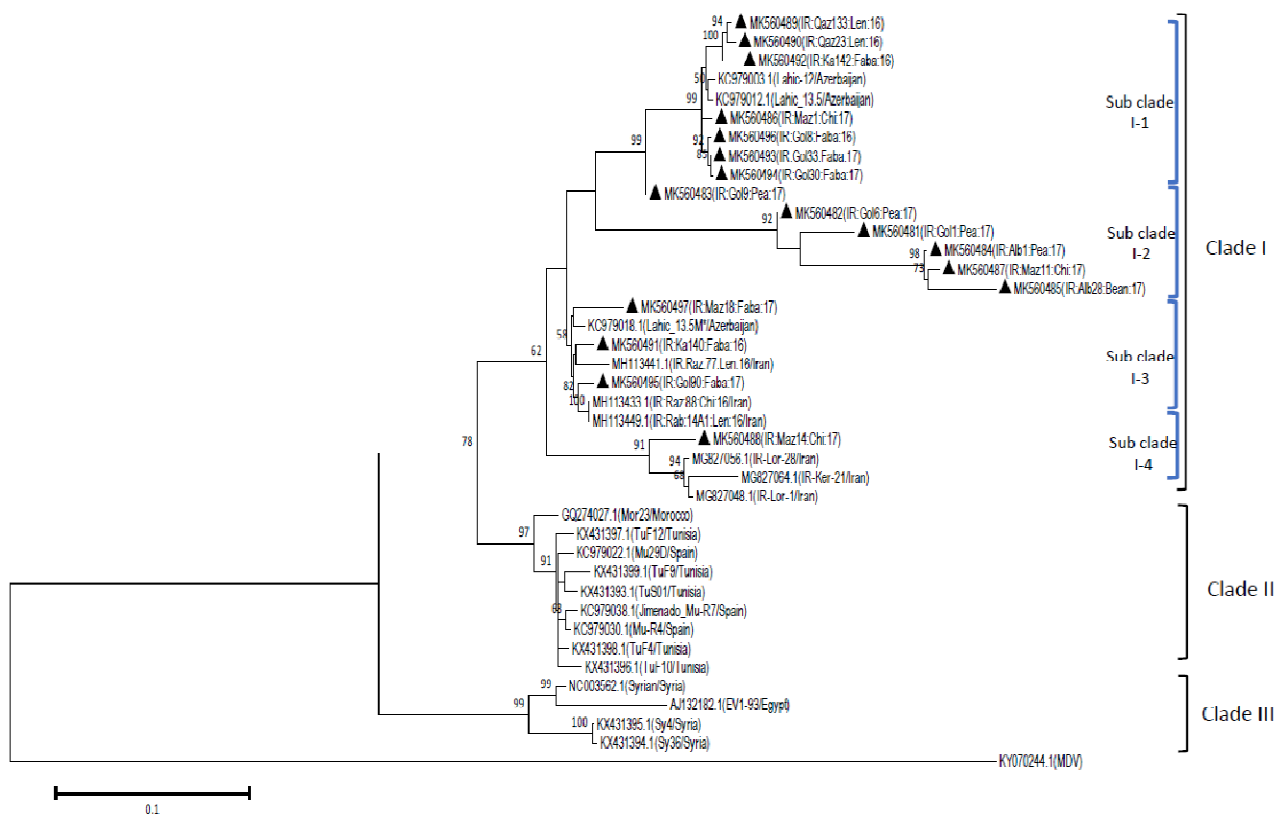


شکل ۳: ماتریکس یکسانی ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M جدایه‌های مختلف ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV) ایران و جهان (به عنوان برون‌گروه در درخت تبارزائی) با استفاده از نرم افزار SDT. رنگ آبی و قرمز به ترتیب، نشان‌دهنده کمینه و بیشینه یکسانی می باشد.

Fig 3: Identity matrix showing nucleotide sequence identities between Iranian and other isolates of FBNYV-DNA-M and MDV (as outgroup in phylogenetic tree) using SDT. Blue and red represent minimum and maximum identities, respectively.

داشتند. در نتیجه با استفاده از داده‌های بررسی شده در این تحقیق، شواهدی از ارتباط بین نوع میزبان و تکامل ویروس مشاهده نشد. بنابراین با توجه به اهمیت سازگاری میزبانی به‌عنوان عامل مهم در تکامل ویروس‌های گیاهی (Elena 2017) انجام مطالعات تکمیلی با نمونه برداری وسیع‌تر از اقلیم‌ها و مناطق جغرافیایی بیشتر مانند استان-های خوزستان و ایلام و نمونه‌برداری از سایر میزبان‌ها (از جمله یونجه و غله‌های هرز میزبان) می‌تواند تصویر

در گروه‌های مجزا قرار می‌گیرند و نشان‌دهنده اثر جغرافیایی در تکامل این ویروس است. شاخه I که شامل جدایه‌های FBNYV از میزبان‌های مختلف بود به چهار زیرگروه تقسیم شد. در زیرگروه I-4 چهار جدایه از میزبان نخود قرار گرفتند، هرچند این زیرگروه شامل همه جدایه‌های نخود نبود اما تنها زیرگروهی بود که جدایه‌های قرارگرفته در آن از یک میزبان بودند. در سه زیرگروه دیگر (I-1, I-2, I-3) جدایه‌هایی از میزبان‌های مختلف وجود



شکل ۴: درخت تبارزایی براساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه M ژنومی جدایه‌های مختلف FBNYV با استفاده از نرم افزار MEGA 6.0، روش Maximum likelihood با ۱۰۰۰ بار تکرار. ترادف قطعه ژنومی M جدایه‌ای از *Milk vetch dwarf virus* به عنوان برون گروه استفاده شده است. جدایه های حاصل از این تحقیق با ▲ مشخص شده اند.

Fig 4: Phylogenetic tree based on DNA-M nucleotide sequence of FBNYV isolates using MEGA 6.0 software, Maximum likelihood method with 1000 bootstrapping. DNA-M sequence of *Milk vetch dwarf virus* isolate has been used as out group. The isolates of this study have been indicated by ▲.

جدایه‌های مختلف این ویروس بر مبنای قطعه ژنومی R (رمزکننده پروتئین آغازگر همانندسازی، Rep)، به دو گروه جغرافیایی South Pacific و Asian تقسیم می‌شوند (Karan et al. 1995).

ویروس زردی باقلا تاکنون تنها از کشورهای شمال شرق آفریقا و جنوب غرب آسیا گزارش شده است و در سال‌های اخیر نیز از اروپا ابتدا از اسپانیا و سپس آذربایجان ردیابی شده است ولی هنوز از سایر نقاط جهان (قاره‌های آمریکا و استرالیا) گزارش نشده است (Kumari et al. 2009, Makkouk & Kumari 2009). با توجه به

روشن‌تری از ارتباط بین نوع میزبان و تکامل FBNYV ارائه کند و ممکن است بر ساختار جمعیت ویروسی اثرگذار باشد. همچنین انجام مطالعات تنوع ژنتیکی در بازه زمانی وسیع‌تر و در سال‌های متوالی به منظور دستیابی به دورنمای تکاملی ویروس ضروری به نظر می‌رسد.

تفکیک جغرافیایی جدایه‌های نانوویروس‌ها در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است به طوری که تحقیقات انجام شده در مورد ویروس تاج‌دسته‌ای موز (*Banana bunchy top virus*, BBTV)، گونه تیپ جنس *Babuvirus* از خانواده *Nanoviridae*، نشان داد که

و بخشی از قطعه ژنومی S) محدود جدایه‌هایی از FBNYV از ایران و آذربایجان مطرح شده است و از آنجا که نتایج تحقیق حاضر و مطالعه صورت گرفته توسط سخن‌سنج و همکاران (Sokhansanj *et al.* 2018) نشان-دهنده شباهت جدایه‌های ایرانی با هر دو جدایه FBNYV-[Az;Lahic12] و [Az;Lahic13.5] بود، لذا فرضیه معرفی جدایه [Az;Lahic13.5] به عنوان گونه تیپ دریای خزر و ایران جای تأمل دارد و پیشنهاد می‌شود به منظور تعیین جدایه تیپ ناحیه دریای خزر و ایران و بررسی تکامل طبیعی این ویروس، تعیین ترادف ژنوم کامل جدایه‌های بیشتری از دو کشور (به‌ویژه از میزبان اصلی) و مطالعات گسترده‌تر در زمینه تبارزایی و مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی انجام شود.

فاصله ژنتیکی درون و بین زیرجمعیت‌ها

بررسی تنوع ژنتیکی زیرجمعیت‌های میزبانی و جغرافیایی FBNYV در ایران و دنیا و نیز فواصل ژنتیکی درون و بین این زیرجمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد. بر اساس نتایج، در چهار زیرجمعیت میزبانی ویروس، بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی درون جمعیتی به ترتیب در زیرجمعیت نخودفرنگی (۰/۱۳۵) و زیرجمعیت باقلا (۰/۰۵۴) تعیین شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم‌تر در جدایه‌های آلوده‌کننده باقلا نسبت به نخودفرنگی می‌باشد (جدول ۳). از آنجایی که ویروس-های گیاهی در میزبان‌های جدید خود (که اخیراً آن‌ها را آلوده کرده‌اند) تنوع ژنتیکی بیشتری دارند (Escriu 2017)، بنابراین احتمال می‌رود از بین میزبان‌های بررسی شده در این تحقیق، نخودفرنگی جدیدترین میزبان این ویروس باشد. به علاوه، فواصل نسبتاً زیاد ژنتیکی (۰/۱۴۰-۰/۱۱۲) میان زیرجمعیت‌های میزبان‌های مختلف ویروس (به جز

قرار گرفتن جدایه‌های آفریقایی و اسپانیایی در یک شاخه در درخت تبارزایی می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه‌ها دارای خاستگاه مشترکی هستند که در تأیید فرضیه ورود این ویروس از کشور مراکش (قاره آفریقا) به اسپانیا (قاره اروپا) می‌باشد (Grigoras *et al.* 2014).

نزدیکی جدایه‌های ایران و آذربایجان FBNYV نیز در تحقیقات پیشین بیان شده است به طوری که در مطالعه سخن‌سنج و همکاران، شباهت بالای ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنومی R,S,C,M,U1,U4 و ترادف آمینواسیدی پیش‌بینی شده پروتئین آن‌ها در سه جدایه نخود از استان‌های کرمانشاه و لرستان با جدایه‌های کشور آذربایجان ارائه شد. همچنین در درخت تبارزایی قطعه ژنومی M، سه جدایه ایرانی به همراه جدایه‌های کشور آذربایجان در یک شاخه قرار گرفتند (Sokhansanj *et al.* 2018). علوی‌نژاد و همکاران نیز با توجه به ترادف بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی (DNA-S) نشان دادند جدایه‌های ایرانی FBNYV بالاترین و پایین‌ترین میزان یکسانی را به ترتیب با جدایه‌های کشور آذربایجان و مصر دارند (Alavinejad *et al.* 2011). لذا قرابت تبارزایی جدایه‌های کشور آذربایجان و ایران در این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی مطابقت دارد. براساس نتایج تحقیقات قبلی و شباهت نوکلئوتیدی قطعات ژنومی N و S جدایه FBNYV-[Az;Lahic13.5] و کرمانشاه (بنانج و همکاران، داده‌های منتشر نشده) و قسمتی از توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنومی S دوجدایه آذربایجان (Az;V277-07, Az;L282-07) (Kumari *et al.* 2009)، جدایه FBNYV-[Az;Lahic13.5] به عنوان تیپ معمولی ناحیه دریای خزر و ایران برای FBNYV پیشنهاد شده است (Grigoras *et al.* 2014). لازم به ذکر است که این فرضیه براساس مقایسات صورت گرفته در بخشی از ژنوم (قطعه ژنومی N

جدول ۳: فاصله ژنتیکی درون و بین زیرجمعیت‌های میزبانی FBNYV براساس قطعه ژنومی M

Table 3: Genetic distances within and between host subpopulations of FBNYV based on DNA-M

Subpopulation	Faba bean	Pea	Chickpea	Lentil
Faba bean	0.054±0.006			
Pea	0.135±0.011	0.115±0.009		
Chickpea	0.112±0.009	0.140±0.011	0.098±0.007	
Lentil	0.055±0.005	0.139±0.011	0.114±0.009	0.065±0.007

جدول ۴: فاصله ژنتیکی درون و بین زیرجمعیت‌های جغرافیایی FBNYV براساس قطعه ژنومی M

Table 4: Genetic distances within and between geographical subpopulations of FBNYV based on DNA-M

Subpopulation	North of Iran	Center of Iran	West of Iran	East of Iran	Spain	Azerbaijan	Africa	Syria
North of Iran	0.109±0.008							
Center of Iran	0.113±0.008	0.137±0.011						
West of Iran	0.121±0.010	0.115±0.009	0.021±0.004					
East of Iran	0.093±0.007	0.110±0.008	0.102±0.011	0.043±0.006				
Spain	0.134±0.010	0.146±0.010	0.135±0.013	0.103±0.010	0.013±0.003			
Azerbaijan	0.080±0.006	0.097±0.007	0.108±0.011	0.061±0.006	0.104±0.011	0.048±0.006		
Africa	0.156±0.010	0.169±0.011	0.158±0.012	0.126±0.010	0.051±0.004	0.128±0.010	0.086±0.007	
Syria	0.235±0.018	0.245±0.018	0.230±0.020	0.201±0.018	0.194±0.017	0.210±0.018	0.178±0.014	0.036±0.005

درون زیرجمعیت عدس می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی فاصله ژنتیکی درون و بین هشت زیرجمعیت جغرافیایی ایران (شمال، مرکز، غرب و شرق) و جهان (اسپانیا، آذربایجان، آفریقا و سوریه) نشان داد که بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی درون زیرجمعیت‌ها به ترتیب مربوط به زیرجمعیت مرکز ایران (۰/۱۳۷) و اسپانیا (۰/۰۱۳) بود. کمترین فاصله ژنتیکی در زیرجمعیت‌های ایران نیز در غرب ایران (۰/۰۲۱) تعیین شد. همچنین دو زیرجمعیت مرکز ایران و سوریه بیشترین فاصله (۰/۲۴۵) و زیرجمعیت‌های اسپانیا و آفریقا کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۵۱) را داشتند (جدول ۴). فاصله اندک ژنتیکی (قربت بیشتر) بین جدایه‌های آفریقا و کشور اسپانیا (شاخه II درخت تبارزایی) را می‌توان در تأیید فرضیه ورود ویروس از کشور مراکش به اسپانیا (Grigoras et al. 2014) دانست به طوری که اولین گزارش FBNYV در اسپانیا در سال ۲۰۰۶ (Ortiz et al. 2006) صورت گرفته است.

بین دو زیرجمعیت باقلا و عدس، (۰/۰۵۵) نشانگر تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی FBNYV بر مبنای DNA-M می‌باشد و از این رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از این ناحیه از ژنوم نانوویروس‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های طبیعی مناسب است. وجود انتخاب در جهت سازگاری با میزبان با مقایسه فاصله ژنتیکی درون و بین زیرجمعیت‌ها تعیین می‌گردد و در صورتی که فاصله بین زیرجمعیت‌ها کمتر یا برابر فاصله درون جمعیت‌ها باشد، انتخاب طبیعی هم‌راستا با سازگاری میزبانی وجود ندارد (Marco & Aranda 2005). بر اساس نتایج این تحقیق، فاصله ژنتیکی بین زیرجمعیت‌های میزبانی FBNYV بیشتر از فاصله ژنتیکی محاسبه شده درون هر یک از زیرجمعیت‌ها است (جدول ۳) که بیانگر وجود شواهدی مبنی بر اهمیت سازگاری میزبانی در انتخاب طبیعی بوده و به عبارت دیگر تمایز زیرجمعیت‌ها براساس میزبان وجود دارد. تنها استثنا در این خصوص کمتر بودن فاصله ژنتیکی بین زیرجمعیت‌های عدس و باقلا از مقدار این شاخص

جدول ۵: پارامترهای ژنتیک جمعیت در زیرجمعیت‌های جغرافیایی FBNYV براساس قطعه ژنومی M. N: تعداد جدایه‌های هر زیرجمعیت، π (Pi): تنوع نوکلئوتیدی (میانگین تعداد اختلاف‌های نوکلئوتیدی در کل موقعیت‌های بررسی شده)، S: تعداد سایت‌های پلی‌مورفیک، ΘW : نرخ جهش محاسبه شده از نقاط پلی‌مورفیک. dS: تنوع نوکلئوتیدی دو به دو در موقعیت‌های هم‌نام، dN: تنوع نوکلئوتیدی دو به دو در موقعیت‌های غیرهم‌نام. ENC: تعداد مؤثر کدون‌ها

Table 5: Population genetic parameters estimated for geographical subpopulations of FBNYV based on DNA-M. N: number of isolates, π (Pi): Nucleotide diversity, the average number of nucleotide differences in total analyzed sites. S: number of segregating sites. ΘW : Mutation rate estimated from segregating sites. dS: The average number of pairwise differences per synonymous sites. dN: The average number of pairwise differences per non-synonymous sites. ENC: effective number of codons.

Subpopulation	N	π (Pi)	S	ΘW	dS(Pis)	dN(Pia)	dN/dS (G)	ENC %
North of Iran	11	0.093	228	0.079±0.005	0.204	0.044	0.21	41.111
Center of Iran	6	0.111	219	0.097±0.006	0.243	0.056	0.23	41.970
West of Iran	3	0.019	29	0.019±0.003	0.061	0.014	0.22	38.981
East of Iran	3	0.041	62	0.041±0.005	0.103	0.011	0.10	38.645
Azerbaijan	3	0.044	66	0.044±0.005	0.099	0.015	0.15	37.246
Spain	3	0.012	18	0.012±0.002	0.016	0.002	0.12	36.022
Africa	7	0.070	214	0.089±0.006	0.131	0.026	0.19	37.869
Syria	3	0.033	49	0.033±0.004	0.034	0.005	0.14	42.054

ویروس زردی بافت مرده باقلا به شته‌های ناقل به عنوان تنها راه انتقال ویروس، یکی از دلایل مهم ثبات ژنتیکی این ویروس می‌باشد.

برای تعیین جهت و درجه فشار انتخاب در ترادف رمزکننده پروتئین حرکتی FBNYV، نسبت بین میزان تنوع نوکلئوتیدی در موقعیت‌های غیرهم‌نام و هم‌نام ($dN/dS, G$) تخمین زده شد. در این مطالعه، تمامی مقادیر G کمتر از یک بودند که نشان‌دهنده وجود انتخاب منفی و تغییرات نوکلئوتیدی در جهت حفظ ترادف پروتئین حاصل می‌باشد. مطالعات فراوانی نشان داده است که ترادف‌های رمزکننده پروتئین در ویروس‌های گیاهی بیشتر تحت انتخاب منفی هستند و حفاظت شدگی بالایی دارند (Nei 1987, Eseriu 2017).

مقدار ENC بیانگر تعداد کدون‌های مؤثر مورد استفاده برای هر اسید آمینه است. این مقدار در زیرجمعیت‌های مختلف بین ۳۶/۰۲-۴۲/۰۵ بود که در وسط بازه تعیین شده (۲۰): تعصب بالا و استفاده از تنها یک کدون برای هر

تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی FBNYV براساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی DNA-M

نتایج بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون زیرجمعیت‌های مختلف ایران (شمال، مرکز، غرب و شرق)، آذربایجان، اسپانیا، آفریقا و سوریه در جدول ۵ آورده شده است. بیشترین و کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی براساس نرخ جهش محاسبه شده از نقاط پلی-مورفیک (ΘW) به ترتیب مربوط به زیرجمعیت مرکز ایران (۰/۰۹۷) و اسپانیا (۰/۰۱۲) بود. میزان تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده برای همه زیرجمعیت‌ها در این تحقیق کمتر از ۰/۱ بود که میزان تنوع کمی را نشان می‌دهد، البته تنوع ژنتیکی حدود ۰/۱ این ویروس در مرکز ایران جالب توجه می‌باشد. به طور کلی پایین بودن تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های ویروسی مرسوم بوده و ثبات ژنتیکی یکی از قوانین حاکم بر جمعیت‌های ویروسی است. تنوع ژنتیکی اندک در مورد بسیاری از ویروس‌های گیاهی به اثبات رسیده است (Matsumura et al. 2016). احتمالاً وابستگی کامل

جدول ۶: F_{ST} محاسبه شده برای زیرجمعیت‌های جغرافیایی FBNYV براساس ترادف نوکلئوتیدی DNA-M

Table 6. F_{ST} values for pairs of FBNYV geographical subpopulations based on DNA-M nucleotide sequence

Subpopulation	Africa	Syria	Spain	Azerbaijan	East of Iran	West of Iran	Center of Iran
Syria	0.69						
Spain	0.07	0.92					
Azerbaijan	0.48	0.81	0.70				
East of Iran	0.49	0.82	0.72	0.22			
West of Iran	0.63	0.87	0.83	0.61	0.64		
Center of Iran	0.31	0.62	0.47	0.04	0.22	0.33	
North of Iran	0.36	0.67	0.53	-0.003	0.19	0.42	-0.081

وجود تنوع ژنتیکی بالاتر زیرجمعیت‌های ایران نسبت به آذربایجان (جدول ۵) و وجود جدایه‌های مختلف ویروس در ایران و از آنجا که ویروس‌ها در خاستگاه خود دارای تنوع بیشتری هستند (Escriu 2017)، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً جدایه‌های آذربایجان از جدایه‌های ایرانی ویروس منشأ گرفته‌اند. هرچند با توجه به اینکه در این تحقیق برای انجام تحلیل‌های تبارزایی، تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت تنها از یک قطعه ژنومی ویروس استفاده شده است، برای رسیدن به نتیجه قطعی در این زمینه و تعیین منشأ اصلی ویروس، مطالعات بیشتری با استفاده از ترادف کامل تمام قطعات ژنومی جدایه‌ها ضروری می‌باشد.

وقوع نوترکیبی در قطعه ژنومی M

نوترکیبی بین ویروس‌ها در آلودگی‌های توأم، یکی از مهمترین عوامل ایجاد تنوع در ویروس‌های با ژنوم دی‌ان‌ا است که منجر به ایجاد سازگاری و ظهور استرین‌های جدید می‌شود (Seal et al. 2006). بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی M ویروس زردی بافت مرده باقلا در ۱۷ جدایه حاصل از این تحقیق و ۲۲ جدایه موجود در بانک ژن بوسیله نرم افزار RDP4 وجود نه رخداد نوترکیبی را آشکار کرد که چهار رخداد در جدایه‌های نخود (ایران)، دو رخداد در جدایه‌های

اسیدآمین و ۶۱: بدون تعصب و استفاده از همه کدون‌های مترادف برای هر اسیدآمین) قرار می‌گیرد و بیانگر تعصب اندک در استفاده از یک کدون برای هر اسیدآمین می‌باشد. جهت تخمین میزان جریان ژنی بین زیرجمعیت‌های مختلف نیز از ضریب F_{ST} استفاده شد (جدول ۶). مقادیر کمتر از ۰/۳۳ نشان‌دهنده وجود جریان ژنی و مقادیر بیشتر از ۰/۳۳ بیانگر عدم وجود جریان ژنی بین جمعیت‌ها است. براین اساس کمترین جریان ژنی بین زیرجمعیت‌های اسپانیا و سوریه (۰/۹۲)، سوریه و غرب ایران (۰/۸۷) و اسپانیا و غرب ایران (۰/۸۳) تخمین زده شد. همچنین بیشترین میزان جریان ژنی بین آذربایجان و شمال ایران (۰/۰۳-)، شمال و مرکز ایران (۰/۰۸-) و آذربایجان و مرکز ایران (۰/۰۴) بود که نشان‌دهنده وجود تبادلات ژنتیکی بین این زیرجمعیت‌ها است. جریان ژنی بالا بین زیرجمعیت‌های شمال، شرق و مرکز ایران ($F_{ST} < 0.33$) بیانگر عدم تفرق این زیرجمعیت‌ها بوده و می‌توان گفت در ایران فقط زیرجمعیت غرب از سایر زیرجمعیت‌های جغرافیایی ایران تمایز ژنتیکی یافته است. جدایه‌های غرب ایران در درخت فیلوژنی نیز در کلاسه جداگانه‌ای (به همراه یک جدایه مازندران) نسبت به سایر جدایه‌های ایران و آذربایجان قرار گرفت که بر نتایج تجزیه و تحلیل F_{ST} منطبق است. با توجه به اینکه گزارش آلودگی به FBNYV در ایران پیش‌تر از آذربایجان صورت گرفته است و نیز با

جدول ۷: رخدادهای نوترکیبی در قطعه ژنومی M جدایه‌های مختلف FBNYV. روش‌های تعیین نوترکیبی به صورت تک‌حرفی نمایش داده شده‌اند. R: RDP, G: GENECONV, B: BOOTSCAN, M: MACHI, C: CHIMERA, S: SISCAN, T: 3SEQ. *P* value مربوط به روشی که بالاترین میزان حمایت از هر نوترکیبی را نشان می‌دهد با فونت ایتالیک و ضخیم در جدول آورده شده است.

Table 7. Recombination events detected in DNA-M of FBNYV isolates. The recombination detection methods that detected the illustrated recombination events are indicated by a single letter: R, RDP; G, GENECONV; B, BOOTSCAN; M, MACHI; C, CHIMERA; S, SISCAN; T, 3SEQ. The *P* value listed is for the method yielding the greatest support for occurrence of recombination indicated in bold italic type in the detection methods.

Event	Recombinant	Recombination region	Potential major parent	Potential minor parent	Detection method	<i>P</i> value
1	IR:Maz14:Chi:17	155-460	IR:Raz:88:Chi:16	IR:Alb28:Bean:17	R GBMCS <i>T</i>	1.154x10 ⁻³²
2	IR:Gol1:Pea:17	106-442	IR:Maz11:Chi:17	IR:Qaz23:Len:16	R GBMCS <i>T</i>	7.550x10 ⁻³¹
3	IR-Lor-1	1-362, 843-993	Lahic13.5-DNAM*	IR:Alb28:Bean:17	R GMCS	5.778x10 ⁻¹³
4	IR-Lor-28	1-428,843-993	Lahic13.5-DNAM*	IR:Alb28:Bean:17	R GMCS	5.396x10 ⁻¹²
5	IR-Ker-21	219-496	Lahic13.5	Unknown	R GMCS <i>T</i>	1.576x10 ⁻¹⁴
6	Ev1-93(Egypt)	860-992	Sy36(Syria)	Unknown	R GBMCS <i>T</i>	5.773x10 ⁻¹³
7	IR:Gol9:Pea:17	1-453, 963-993	IR:Maz1:Chi:17	IR:Ka140:Faba:16	G MCS	8.988x10 ⁻¹¹
8	Ev1-93(Egypt)	62-224	Sy36(Syria)	TuF4(Tunisia)	R GMCS	2.467x10 ⁻⁶
9	IR:Rab:14A1:Len:16	1-223, 818-994	IR:Raz:77:Len:16	IR:Maz11:Chi:17	R BMCS <i>T</i>	3.379x10 ⁻⁵

به بیان پروتئین‌های ناقص یا با ساختار نامناسب می‌شوند. دلیل دیگر وجود خاستگاه همانندسازی در بیرون از چارچوب ژنی در ژنوم ویروس‌های ssDNA است که نقطه شکست مناسبی در جریان نوترکیبی وابسته به همانندسازی محسوب می‌گردد (Alberter et al. 2005) در مجموع براساس نتایج تحقیق حاضر، ویروس بافت مرده باقلا از میزبان‌های مختلف از جمله نخودفرنگی ایران ردیابی شد. تحلیل مولکولی قطعه ژنومی DNA-M جدایه‌های ایران و سایر نقاط جهان نشان داد که میزبان به‌عنوان یک عامل مهم در انتخاب طبیعی جدایه‌های این ویروس بوده و تبارزایی این ویروس براساس قطعه ژنومی M با خاستگاه جغرافیایی جدایه‌ها ارتباط زیادی دارد. تنوع ژنتیکی کمی در این قطعه ژنومی ویروس تعیین شد که تحت فشار انتخاب منفی بود. همچنین نقش نوترکیبی در تکامل این ویروس و در نقاط داغ خارج از چارچوب ژنی آشکار شد. با این حال، استفاده از یک قطعه از هشت قطعه ژنومی ویروس ممکن است برای نتیجه‌گیری نهایی در خصوص تنوع ژنتیکی و تبارزایی ویروس کافی نباشد و برای رسیدن به نتایج قطعی‌تر، مطالعات بیشتری با استفاده

نخودفرنگی (ایران)، دو رخداد در جدایه باقلا (مصر) و یک رخداد در جدایه عدس (ایران) بود (جدول ۷). بیشترین نرخ نوترکیبی تأیید شده توسط برنامه RDP4 (چهار رخداد از هشت رخداد در جدایه‌های ایران) مربوط به جدایه‌های نخود می‌باشد که حائز اهمیت است. همچنین دو جدایه نخودفرنگی از نوترکیبی والد‌های اصلی دو جدایه نخود (MK560487 و MK560486) و دو والد فرعی جدایه‌های عدس (MK560490) و باقلا (MK560491) به‌وجود آمده‌اند. بیشترین تعداد رخدادهای نوترکیبی در جدایه‌های نخود و نخودفرنگی می‌تواند دلیل دیگری مبنی بر جدیدتر بودن این گیاهان به‌عنوان میزبان FBNYV باشد. نقاط داغ وقوع نوترکیبی در نواحی غیررمزکننده واقع بود که بیانگر نقش این نواحی در تنوع و تکامل نانوویروس‌ها است. نوترکیبی در بابوویروس‌ها و سایر ویروس‌های دارای ژنوم ssDNA، الگوی مشابهی دارد و بیشتر نقاط شکست تعیین شده خارج از مناطق رمزکننده هستند (Lefuevere et al. 2009, Stainton et al. 2012). این امر احتمالاً به دلیل عدم انتخاب طبیعی نوترکیبی‌های رخ داده در نواحی رمزکننده است که منجر

از ترادف کامل تمام قطعات ژنومی جدایه‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

رساله دکتری با شماره طرح ۷۳۱۴۸۹۲۴/۶/۱۵ و بخشی از آن در قالب فرصت مطالعاتی در مؤسسه ملی تحقیقات کشاورزی فرانسه (INRA) در شهر مونت‌پولیه انجام شده است.

قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران در قالب

منابع

- 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. The 7th National Biotechnology Congress of I. R. Iran. 6 pp. (in Persian with English summary).
- Anonymous. (2018). Statistical annual report of Iranian agricultural crops. (In Persian)
- Asghari G. S., Shahraneen N., Ghorbani S. and Hosseinnia S. (2009). Identification of *Faba bean necrotic yellows virus* in Mazandaran province, Iran. *Indian Journal of Virology* 20: 11-13.
- Alberter B., Rezaian A. M., Jeske H. (2005). Replicative intermediates of ToLCV and its satellite DNAs. *Virology* 331: 441-448.
- Elena S. F. 2017. Local adaptation of plant viruses: lessons from experimental evolution. *Molecular Ecology* 26 (7): 1711-1719.
- El-muadhidi M. A., Makkouk K. M., Kumari S. G., Jerjess M., Murad S. S., Mustafa R. R. and Tarik F. (2001). Survey for legume and cereal viruses in Iraq. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 224-233.
- Escrui F. (2017). Diversity of Plant Virus Populations: A Valuable Tool for Epidemiological Studies. In: Bits L. (Ed). Genetic diversity. InTech. Rijeca. 3-18.
- Faraji K., Farzadfar Sh., Maleki M. and Pour Rahim R. (2012). Application of PCR to detect *Faba bean necrotic yellows virus* in Alfalfa fields of Ilam province. 12th Congress of Iranian Genetics Society. Tehran.
- Franz A. W. E., Wilk F. V. D., Verbeek M., Dulleman A. M. and Heuvel J. F. J. M. (1999). *Faba bean necrotic yellows virus* (Genus *Nanovirus*) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* 29: 210-219.
- Grigoras I., Timchenko T., Katul L., Grande-Prez A., Vetten H. G. and Gronenborn B. (2009). Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *Journal of Virology* 83: 10778-10787.
- Grigoras I., Timchenko T., Grande-perez A., Katul L., Vetten H. J and Gronenborn B. (2010). High variability and rapid evolution of a nanovirus. *Journal of Virology* 84(18): 9105-9117.
- Grigoras I., del Cueto Ginzo A. I., Martin D. P., Varsani A., Romero J., Mammadov A. Ch., 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. *Journal of General Virology* 95: 1178-1191.
- Hull R. (2014). *Plant virology* (5th Edition). Academic Press, USA. 1056 p.
- Karan M., Harding R. M. and Dale J. L. (1995). Evidence for two groups of *banana bunchy top virus* isolates. *Journal of General Virology* 75(12): 3541-6.
- 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.
- Lefevre P., Lett J., M., Varsani A. and Martin D. P. (2009). Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83: 2697-2707.
- Libardo P. and Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Majnoon Hoseini N. (1995). *Legumes in Iran*. Academic center of education culture and research. University of Tehran. Iran. 284 p. (in Persian)
- Makkouk K. M., Faslali Y., Kumari S. G. and 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.

- Makkouk K. M. and Kumari S. G. (2009). Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legumes and cereal crops in West Asia and North Africa. *Virus Research* 141: 209-218.
- Makkouk K. M., Pappu H. and Kumari S. G. (2012). Virus disease of peas, beans and faba bean in the Mediterranean Region. *Advances in Virus Research* 84: 367-402.
- Marco C. F., Aranda M. A. (2005). Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal of General virology* 88: 815-822.
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A. and Muhire B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1(1): 1-5.
- Matsumura E. E., Filho H. D. C., Dorta S. O., Nouri Sh. and Machato M. A. (2016). Genetic Structure and Molecular Variability Analysis of *Citrus sudden death-associated virus* Isolates from Infected Plants Grown in Brazil. *Viruses* 8: 330.
- 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.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia university press. 512 p.
- Ortiz A., Navarro E., Castro S., Carazo G. and Romero J. (2006). Incidence and transmission of *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) in Spain. *Journal of Agricultural Research* 4: 255-260.
- Savory F. R., Varma V. and Ramkrishnan U. (2014). Identifying geographic hot spots of reassortment in a multipartite plant virus. *Evolutionary Applications* 7: 569-579.
- Seal S. E., VandenBosch F. and Jeger M. J. (2006). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implication for sustainable control. *Critical reviews in plant sciences* 25(1): 23-46.
- Sokhansanj Y., Bananej K., Rakhshandehroo F. and Ahoonmanesh A. (2018). Molecular characterization of three *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) isolates, originated from chickpea in Iran. *Entomology and Phytopathology* 86(1): 77-90. (In Persian with English summary)
- Stainton D., Kraberger S., Walters M., Wiltshire E. J., Rosario K., Halafihi M., Lolohea S., Katoa I., Faitua T. H., Aholelei W., Taufa L., Thomas J. E., Collings D. A., Martin D. P. and Varsani A. (2012) Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. *Journal of General Virology* 93: 1103-1119.
- 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.
- Zhang Y., Vyomoto J. K. and Kirkpatrick B. C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogenes for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-30.