

## ردیابی و تعیین خصوصیات مولکولی جدایه‌های ایرانی Fig badnavirus-1 بر اساس ژن تولید کننده آنزیم پروتئاز

اطهر علیشیری<sup>۱</sup>، فرشاد رخشنده‌رو<sup>۱</sup>✉، غلامرضا صالحی جوزانی<sup>۲</sup> و مسعود شمس بخش<sup>۳</sup>

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران؛ ۲- بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج؛ ۳- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵)

### چکیده

بادنا ویروس ۱ انجیر (*Fig badnavirus-1*) متعلق به خانواده *Caulimoviridae* و جنس *Badnavirus* بوده و یکی از شایع‌ترین عوامل ویروسی همراه با بیماری موزائیک انجیر در انجیرکاری‌های جهان می‌باشد. تعداد ۳۹۲ نمونه برگ‌گی علائم دار و بدون علائم ویروسی از انجیر کاری‌های نه استان کشور جمع آوری شد. نمونه‌ها توسط آزمون سرولوژیکی (DIBA) Dot Immunobinding Assay (DIBA) و با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی ویروس موزائیک انجیر مورد بررسی قرار گرفتند. وجود ویروس در نمونه‌های آلوده توسط آزمون‌های مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. برای این منظور، DNA کل از نمونه‌های آلوده استخراج و با استفاده از آغازگر اختصاصی برای ژن پروتئاز، قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۵۵ جفت باز تکثیر شد. پس از مشخص شدن توالی نوکلئوتیدی منطقه تکثیر شده نه جدایه FBV-1 مربوط به استان‌های مختلف، توالی‌های آنها با رس شماره‌های KU314932-40 در بانک ژن ثبت شدند. نتایج هم‌ردیف سازی توالی‌ها نشان داد جدایه‌های ایرانی در هر یک از سطوح نوکلئوتیدی یا اسید آمینه‌ای به میزان ۹۸-۹۹٪ مشابه بودند. در بررسی تبارزایی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه قرار گرفتند و جدایه‌های ایرانی مستقل از جدایه آمریکا در گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج این بررسی حاکی از حضور جمعیت‌های متفاوت FBV-1 در ایران بود.  
واژه‌های کلیدی: بادنا ویروس ۱ انجیر، تبارزایی، ردیابی.

## Detection and Molecular Characterization of Fig badnavirus-1 Iranian isolates on the Basis of the Protease Gene

A. ALISHIRI<sup>1</sup>, F. RAKHSHANDEHROO<sup>1</sup>✉, GH. SALEHI JOUZANI<sup>2</sup> and M. SHAMS-BAKHS<sup>3</sup>

1- Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran; 2- Department of Microbial Biotechnology and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran; 3- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

Fig badnavirus-1, a species of the genus *Badnavirus* in the family *Caulimoviridae*, is one the most prevalent viruses associated with the fig mosaic disease through fig plantations worldwide. During the growing seasons of the year 2012-2013, a total of 392 asymptomatic and symptomatic leaf samples were collected from different fig orchards located in nine provinces of Iran. Using the DIBA serological test and universal serum, samples were tested for the presence of fig mosaic disease. Following total DNA extraction from infected samples, an amplicon with a size about 1055bp was amplified using specific primer for FBV-1 protease gene. Protease gene of nine representative FBV-1 samples from different provinces were sequenced and submitted in GenBank under the accession numbers KU314932-40. Blast analysis showed 98-99% identity between the Iranian isolates at the nucleotide and amino acid levels. Phylogenetic analysis on the basis of the nucleotide sequences of studied isolates categorized them into two different groups in which Iranian isolates grouped together in a separate group distinct from American isolate. Results of this study indicated the presence of different FBV-1 populations in Iran.

**Key words:** Detection, Fig badnavirus-1, Phylogeny.

## مقدمه

انجیر گیاهی است با ارزش غذایی و دارویی بالا که سابقه کاشت آن به هزاران سال قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. درخت انجیر به صورت دیم و آبی در تمام نقاط جهان قابل کاشت است. امروزه انجیر در بسیاری از نقاط دنیا از جمله مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری، مناطق معتدل و نقاطی که آب و هوای ملایمی دارند مانند کشورهای حاشیه دریای مدیترانه، دریای سرخ و خلیج فارس می‌روید (Saddoud *et al.*, 2005). بر اساس آمار ارائه شده توسط FAO در سال ۲۰۱۱ میزان سطح زیر کشت این محصول در جهان در حدود ۱۱۱۷۴۵۲.۰۳ هکتار بوده که از این میزان حدود ۳۵۸۴۹۳.۹۲ تن میوه تولید شده است و ایران رتبه چهارم را از لحاظ میزان تولید انجیر در جهان به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2011). در ایران بیشترین سطح زیر کشت انجیر دیم در استان‌های فارس (شهرستان استهبان) و کرمان به ترتیب با ۴۷۲۵۰ و ۴۰۰ هکتار و بیشترین سطح زیر کشت انجیر آبی در استان‌های لرستان، کرمان، فارس و کرمانشاه به ترتیب با ۱۱۱۶، ۸۰۰، ۷۷۶ و ۶۶۵ هکتار صورت می‌پذیرد (Anonymous, 2013). مهم‌ترین عامل نابود کننده انجیر در ایران و جهان بیماری ویروسی موزائیک انجیر (FMD) Fig mosaic disease می‌باشد که مجموعه از گروه‌های مختلف ویروسی با ژنوم RNA و یا DNA در آن نقش دارند (Shahmirzaie *et al.*, 2012). تاکنون ویروس‌های زیادی از انجیر در جهان گزارش شده که در بیماری موزائیک انجیر نقش داشته‌اند که مهم‌ترین آنها به طور خلاصه شامل *Fig mosaic virus* (Emaravirus, Bunyaviridae) (Caglayan *et al.*, 2010)، *Fig cryptic virus* (Alphacryptovirus, Partitiviridae) (Elbeaino *et al.*, 2011a)، *Fig fleck associated virus* (Maculavirus, Tymoviridae) (Elbeaino *et al.*, 2011b)، *Fig badnavirus -1* (Badnavirus, Caulimoviridae) (Minafra *et al.*, 2012)، *Fig latent virus -1* (Trichovirus, Betaflexiviridae) (Gattoni *et al.*, 2009)،

*Fig leaf mottle associated virus -2* (Elbeaino *et al.*, 2006)، *Fig leaf mottle associated virus* (Closterovirus, Closteroviridae) (Elbeaino *et al.*, 2007)، *Fig leaf mottle associated virus* (Closterovirus, Closteroviridae) (Gattoni *et al.*, 2009) و *Fig mild mottle associated virus* (Elbeaino *et al.*, 2010) می‌باشند. در میان این مجموعه ویروسی، ویروس موزائیک انجیر (FMV) *Fig mosaic virus* مهم‌ترین عامل بوده و سایر عوامل ویروسی در همراهی با FMV از اهمیت برخوردار می‌شوند (Martelli, 2011). نتایج تحقیقات اخیر نشان داد که ویروس‌های با ژنوم دی.ان.ای دو رشته‌ای (dsDNA) نیز از توان آلودگی مشترک با FMV و یا آلودگی تکی انجیر برخوردار می‌باشند و در این راستا بادنا ویروس یک انجیر *Fig badnavirus-1* (FBV-1) از انجیر شناسایی و گزارش شده است (Laney *et al.*, 2012). FBV-1 از جنس *Badnavirus* بوده و به خانواده *Caulimoviridae* تعلق دارد. این ویروس پیکره میله‌ای شکل داشته و ژنوم آن از نوع DNA دورشته‌ای می‌باشد. طول کامل ژنوم آن دارای ۷۱۴۰ نوکلئوتید بوده و از چهار چارچوب ژنی (ORF) تشکیل شده که ژن بیان کننده پروتئین پروتئاز در سومین ORF قرار گرفته است (Laney *et al.*, 2012). FBV-1 همچنین قابلیت انتقال مکانیکی به چندین میزبان علفی را نیز دارد و از شیوع بالایی در انجیر برخوردار بوده و در میزبان‌های علائم دار و بدون علائم نیز دیده شده است (Laney *et al.*, 2012). برخی از عوامل ویروسی فوق تا کنون در ایران از انجیر گزارش شده‌اند. ویروس‌هایی که از انجیرهای آبی و دیم ایران تا کنون گزارش شده‌اند عبارتند از *FLMaV-1*، *FLV-1*، *FMV* (Shahmirzaie *et al.*, 2012)، *FLMaV-2* (Danesh-Amuz *et al.*, 2014)، *FCV* (Nouri-Ale Agha and Rakhshandehroo, 2014) و *FFKaV* (Norozian *et al.*, 2014). همچنین *FBV-1* در ایران از استان‌های تهران، البرز، همدان و مازندران با وقوع بالا گزارش شده است (Alimoradian *et al.*, 2014). لازم بذکر

لکه‌های بنفش رنگ در سطح غشاء به فاصله زمانی ۲۰ دقیقه از زمان اضافه شدن معرف رنگزا، به عنوان نمونه‌های آلوده در نظر گرفته شد. از انجیر سالم کشت داده شده در محیط MS به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

#### استخراج DNA کل و آزمون PCR: استخراج DNA کل

از نمونه‌های آلوده به روش Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) انجام شد (Dellaporta et al., 1983). در این تحقیق از جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده توسط Laney et al. (2012)، 5' - ATTGTCCTTTGTGTCTCCTAACA - 3' و R: 5' - TTGCCCTGATGACTCCTAAATCCA - 3' برای تکثیر ژن پروتئاز واقع در منطقه ژنومی ۴۹۵۵-۳۸۷۶ استفاده شد که بر اساس توالی تنها جدایه موجود از آمریکا (رس شمار: JF411989) طراحی شده بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت و حجم واکنشگرها عبارت بود از: ۱ میکرولیتر از DNA به غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر، ۱۰ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر از MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰ میکرومولار) و ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase (5 U/ML) شرکت فرمنتاس (Fermentas Inc, Germany). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت منطقه ژنتیکی مربوط شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک مرحله نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. جهت انجام الکتروفورز افقی از ژل آگاروز ۱/۲ درصد و بافر TBE 1X استفاده شد.

#### تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیکی: پس از ردیابی

نمونه‌های آلوده با روش PCR، تعداد ۹ نمونه آلوده بر مبنای تفاوت در منطقه جغرافیایی جهت تعیین توالی ژنتیکی منطقه بیان کننده آنزیم پروتئاز ویروس بطول ۱۰۵۰ جفت باز

است که به استثنای FBV-1 مطالعه تنوع ژنتیکی و تبارزایی بیشتر ویروس‌های گزارش شده از انجیر در ایران در گذشته انجام پذیرفته است. از آنجایی که داده‌های حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی و نیز ژنتیک جمعیتی عوامل ویروسی می‌تواند جهت تولید ارقام مقاوم تراژن و یا ارایه روش‌های مناسب و کارآمد جهت کنترل عوامل ویروسی سودمند باشد. لذا در این پژوهش تلاش شد تا ویژگی‌های مولکولی FBV-1 بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی و ترجمه اسید آمینه‌ای منطقه ژنتیکی تولید کننده پروتئاز در FBV-1 در جدایه‌های جدید شناسایی شده از ایران مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### روش بررسی

##### نمونه برداری: طی فصول زراعی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۱

تعداد ۳۹۲ نمونه برگگی از انجیرهای دیم و آبی باغات و یا فضاهای عمومی غیر زراعی با علائم شاخص موزائیک انجیر، لکه‌های کلروز خیلی ریز و بدشکلی برگ‌ها و از برگ‌های بدون علائم از استان‌های گیلان، گلستان، تهران، یزد، خراسان رضوی، مازندران، کرمانشاه، لرستان و کرمان جمع آوری شد (جدول ۱).

##### شناسایی نمونه‌های آلوده به بیماری موزائیک انجیر

(FMD): از آنجائی که هدف این تحقیق شناسایی جدایه‌های FBV-1 همراه با بیماری موزائیک انجیر (FMD) در درختان آلوده علائم دار و بدون علائم بود، لذا نمونه‌ها ابتدا با استفاده از آنتی بادی چند همسانه‌ای تولید شده برای FMD (اهدای دکتر Toufic Elbeaino، محقق مرکز IPM درختان میوه و زراعی مدیترانه‌ای، ایتالیا) و آزمون DIBA (Dot Immunobinding assay) مطابق با روش (Bantari and Goodwin, 1985) برای FMD مورد ردیابی قرار گرفتند. برای ردیابی ویروس (های) همراه این بیماری از آنتی بادی متصل شده به آنزیم ضدخرگوش، و نیز از سوبسترای Nitro blue tetrazolium (NBT) و 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP) (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. حضور

انتخاب شدند. برای این منظور محصول PCR مربوط به جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از کیت استخراج دی. ان. ای. از ژل و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Fermentas, Lithuanian) خالص سازی و برای تعیین توالی مستقیم و در دو جهت به شرکت‌های Bioscience انگلستان و Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. برای هر جدایه حداقل دو بار خوانش انجام پذیرفت. پس از ثبت در GenBank توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده برای بررسی میزان مشابهت نوکلئوتیدی با سایر جدایه‌های نظیر موجود در NCBI توسط موتور جستجوگر Blastn مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت مطالعه تبارزایی، توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد آزمون توسط نرم افزار ClustalX همردیف و سپس توسط نرم افزار Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013)، درخت فیلوژنتیکی برای جدایه‌ها ترسیم گردید. نمودار به صورت Bootstrap بر مبنای الگوی Neighbour joining و با ۱۰۰۰ با تکرار ترسیم شد. همچنین از توالی نظیر بادناوایروس Sweet potato badnavirus B (رس شمار: FJ560944) به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

## نتیجه و بحث

در این تحقیق از سرم عمومی تشخیصی کمپلکس ویروسی ایجاد کننده بیماری موزائیک در انجیر (FMD) در روش DIBA استفاده شد (شکل ۱) و نتایج آن با نتایج PCR برای ردیابی FBV-1 مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمون DIBA نشان داد که در مجموع همه شهرستان‌های نمونه برداری شده در این پژوهش با درصد‌های متفاوت در مناطق و شهرستان‌های مختلف دارای FMD بودند (جدول ۱). نتایج نشان داد که حدود ۶۹/۸٪ نمونه‌ها دارای FMD می باشند. بیشترین میزان FMD در استان‌های شمالی و غربی کشور دیده شد. به طوری که استان‌های کرمانشاه، گیلان، گلستان و مازندران به ترتیب با ۸۶/۶، ۸۳/۳، ۸۵/۷ و ۷۸/۹ درصد بیشترین میزان حضور کمپلکس موزائیک انجیر FMD را دارا

بودند. همچنین FMD در استان تهران و لرستان با درصد‌های آلودگی کمتر، به ترتیب ۷۱/۸ و ۶۸/۷ نسبت به استان‌های فوق ردیابی شد. اما کمترین میزان FMD در استان خراسان رضوی (۵۴/۲٪)، یزد و کرمان هر کدام با ۵۰ درصد آلودگی مشاهده شد. همچنین با استفاده از PCR نمونه‌های دارای FMD مشخص شد که تقریباً ۶۶٪ درصد به FBV-1 آلوده بودند و تمام شهرستان‌های نمونه برداری شده به FBV-1 آلوده بودند. بیشترین میزان آلودگی به FBV-1 در استان‌های کرمانشاه، مازندران و گیلان به ترتیب با ۸۲/۲، ۷۸/۹ و ۷۷/۷ درصد مشاهده شد. استان گلستان با ۷۱/۴٪، تهران با ۷۰/۸٪ و لرستان با ۶۲/۵٪ آلودگی به FBV-1 در مرتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. استان‌های خراسان رضوی، کرمان و یزد به ترتیب با ۵۱/۴، ۴۵/۲٪ و ۴۳/۳٪ کمترین میزان آلودگی به FBV-1 را دارا بودند. درصد‌های آلودگی FBV-1 در انجیرکاری‌های ایران پایین‌تر است از آنچه‌ی که در گذشته در سایر نقاط جهان از جمله کشورهای حاشیه دریای مدیترانه و نیز کشورهای آسیایی و اروپایی برای این ویروس گزارش شده است (Elci *et al.*, 2012; Laney *et al.*, 2012; Minafra *et al.*, 2012). در گذشته آلودگی تا ۱۰۰٪ این ویروس در انجیر کاری‌های جهان نیز گزارش شده بود (Minafra *et al.*, 2012). دلیل پراکندگی بالای ویروس در گزارش‌های پیشین امکان ادغام ویروس در ژنوم میزبان ارایه شده است (Laney *et al.*, 2012). نتایج این بررسی همچنین حاکی از بالاتر بودن درصد‌های آلودگی در استان‌های شمالی کشور در مقایسه با استان‌های جنوبی کشور بود که این امر می تواند به دلیل مساعد بودن شرایط محیطی برای امکان فعالیت ناقلین احتمالی ویروس و یا بالاتر بودن حساسیت ارقام انجیر زراعی در این مناطق باشد. نتایج تحقیق‌ها روی سایر عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک انجیر در ایران در گذشته نشان داد که این عوامل در استان‌های شمالی کشور از پراکندگی بالایی برخوردار هستند (Nouri Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014; Danesh-Amuz *et al.*, 2014;

تحقیق سعی شد تا به ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های FBV-1 که با FMD همراه هستند و به خسارت‌زایی بیشتر FMD در ایران کمک می‌کنند، پرداخته شود.

در تحقیقات گذشته اشاره شده بود که با DNA ویروس‌ها در اثر افزایش تنش‌های محیطی می‌توانند از حالت غیر بیماری‌زای درون ژنومی خارج شوند و به حالت اپی ژنومیک درآمده و شروع به بیماری‌زایی گسترده نمایند (Chabannes and Iskra-Caruaana, 2013). به این مفهوم که نمونه‌های بدون علائم انجیر امکان دارد که به FBV-1 آلودگی نشان دهند و با PCR ردیابی شوند ولی امکان دارد که مهاجم نباشند و در مجموع تهدید مهمی برای کاشت انجیر محسوب نشوند. این فرض محتمل است که حضور جدید سایر عوامل ویروسی همراه با بیماری موزائیک در انجیر می‌تواند به عنوان یک عامل تنش موجب آلودگی اپی ژنتیک FBV-1 در انجیرهای از قبل آلوده به FBV-1 و بیماری‌زایی ویروس و تشدید علائم بیماری حاصل از آن شود و در ادامه روند بیماری‌زایی، FBV-1 موجب اختلال فیزیولوژیکی در میزبان و حساسیت بیشتر آن به سایر ویروس‌های همراه با FMD می‌شود.

در مجموع FBV-1 همراهی مشترک با FMD از اهمیت برخوردار است. در این تحقیق مشخص شد برخی از نمونه‌ها فقط دارای FMD می‌باشند که این امر می‌تواند نشان دهنده تکامل و اتیلوژی مستقل FBV-1 در انجیر باشد. در گذشته ویروس موزائیک انجیر (FMV) مهم‌ترین عامل بیماری موزائیک انجیر FMD گزارش شده بود و سایر عوامل ویروسی از جمله FBV-1 ویروس‌های همراه با FMV اعلام شده بودند (Martelli, 2011).

در این بررسی جهت ردیابی مولکولی FBV-1 از آزمون PCR و آغازگر اختصاصی برای منطقه ژنتیکی ۳۸۷۶-۴۹۵۷ استفاده شد که نزدیک به انتهای ۳ ژنوم ویروس قرار دارد و کد کننده پروتئین پروتاز می‌باشد.

قطعه مورد انتظار به وزن ۱۰۸۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده از این طریق تکثیر گردید (شکل ۳).

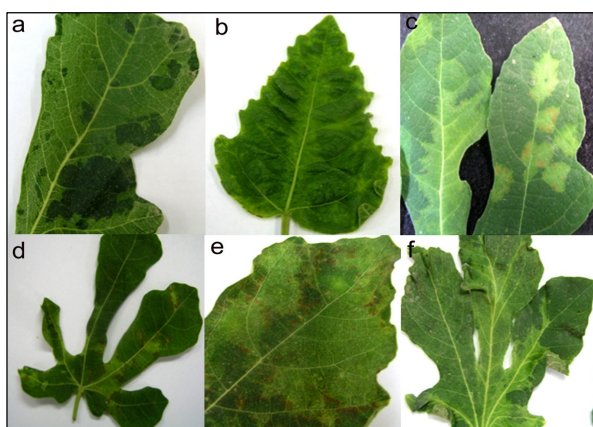
با این وجود احتمال ادغام ژنوم FBV-1 در کروموزوم پایه‌های انجیر قدیمی که برای تهیه قلمه استفاده شده اند و آلودگی ژنتیکی مواد گیاهی تکثیری را نیز نباید از نظر دور داشت.

نتایج PCR نشان داد استان‌های مختلف ایران از درصد‌های آلودگی متفاوتی برخوردار می‌باشند و FBV-1 در ایران از پراکنش متفاوت و ناهموار برخوردار است. این امر می‌تواند به دلیل حضور منابع آلودگی متفاوت (ناقل و میزبان ثانویه علفی و غیر علفی) و یا حساسیت متفاوت ارقام انجیر کاشته شده در استان‌های مختلف ایران باشد.

از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده شاخص‌ترین علائم که از فراوانی بیشتری نیز در درختان انجیر برخوردار بود، موزائیک سبز پراکنده در سطح پهنک برگ‌ها بود که با نوار نکرور حاشیه منطقه موزائیک شده احاطه شده بود (اشکال ۲ c, d و e). همچنین تغییر شکل و بدشکلی برگ در همراهی با FMD در نمونه‌ها دیده شد.

با استفاده از PCR آلودگی به FBV-1 هم در نمونه‌های انجیر دارای علائم و هم بدون علائم دیده شد (اشکال ۲ a, b و f). شاخص‌ترین علائم مرتبط با FBV-1 در نمونه‌های آلوده به FMD موزائیک سبز در سطح پهنک برگ‌ها بود. در گذشته نیز حضور FBV-1 در نمونه‌های دارای علائم و بدون علائم در سایر کشورها مشاهده شده بود (Minafra et al., 2012; Laney et al., 2012).

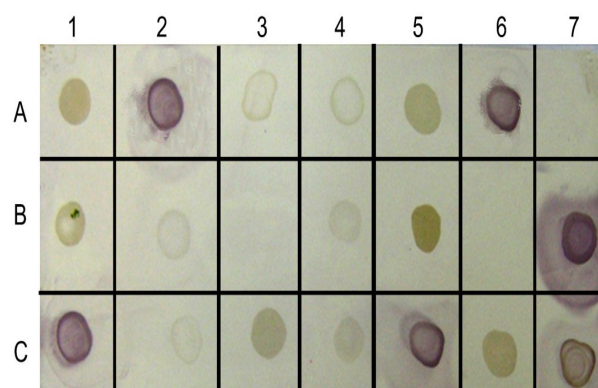
ویروس FBV-1 می‌تواند در نمونه‌های آلوده در ژنوم میزبان وارد شود و بدون ایجاد علائم باقی بماند اما شاخص‌ترین علائم مرتبط با آلودگی تکی آن که در بیشتر انجیرکاری‌های جهان در نمونه‌های دارای آلودگی تکی FBV-1 مشاهده شده است، بدشکلی و موزائیک خفیف برگ‌های جوان بوده است (Laney et al., 2012). بنابراین نمونه‌های بدون علائم نیز می‌توانسته‌اند آلودگی مستقل FBV-1 را نشان دهند. اما بدلیل نقش موثر FBV-1 در اتیلوژی FMD و تشدید خسارت حاصل از آلودگی FMD همراه با FBV-1 در این



**شکل ۲-** علائم در برگ‌های درختان انجیر آلوده به بیماری موزائیک انجیر FMD و FBV-1. بدشکلی برگ‌ها و موزائیک سبز در فواصل بین رگبرگ از علائم شاخص آلودگی FBV-1 در نمونه‌های انجیر آلوده به FMD در این تحقیق بودند. اشکال a و b و f: علائم موزائیک سبز در فواصل بین رگبرگ در نمونه آلوده به FBV-1 و FMD. اشکال c, d و e: موزائیک محدود به نوار نکروزه در اطراف منطقه موزائیک شده از علائم شاخص بیماری موزائیک انجیر در نمونه‌های آلوده به FMD و فاقد FBV-1 و اشکال b و f: بدشکلی برگ هادر نمونه‌های آلوده به FMD و FBV-1.

**Fig. 2.** Symptoms on fig leaf samples infected with fig mosaic disease and FBV-1. Leaf deformation and green mosaic were most typical symptoms of the single FBV-1 infection in the fig samples in this study. Figures a, b and f: representing interveinal green mosaic prominent in FBV-1 infected samples., figures c, d and e: representing typical symptoms for fig mosaic disease infected fig samples including mosaic restricted with marginal necrosis, and figures b and f: fig leaf deformations in FBV-1 infected fig samples.

آنالیز Blast توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای جدایه‌ها نشان داد جدایه‌های ایرانی به میزان ۹۹٪ در هر یک از سطوح نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای با یکدیگر مشابه می باشند (جدول ۲) در صورتی که در مقایسه با جدایه آمریکایی به میزان ۹۸-۱۰۰٪ در سطح نوکلئوتیدی و ۹۹-۱۰۰٪ در اسید آمینه‌ای مشابهت داشتند. این امر بیانگر تنوع بسیار کم ژنتیکی در منطقه ژنتیکی مسئول تولید آنزیم پروتئاز در ژنوم FBV-1 در بین جدایه‌ها می‌باشد. تنوع کم ژنتیکی در چارچوب ژنی سوم که منطقه ژنی تولید کننده پروتئاز در آن قرار دارد در برخی بادنا ویروس‌ها در گذشته اثبات شده بود ( Xu *et al.*, 2011).



**شکل ۱-** ردیابی بیماری موزائیک انجیر (FMD) از انجیرهای علائم دار و بدون علائم با آزمون DIBA. لکه های ارغوانی رنگ (A2, A6, B7, C1, C5 and C7) مربوط به نمونه های آلوده و لکه های سبزرنگ (C7 و C5, C1, B7, A6) نشان دهنده نمونه های غیر آلوده می باشد. B5 و B1 گیاهان انجیر سالم (کنترل منفی) و B3 و B6 بافر می باشند.

**Fig. 1.** Detection of fig mosaic disease (FMD) from symptomatic and asymptomatic fig samples with DIBA test. Spots with the purple colors (A2, A6, B7, C1, C5 and C7) are relate to the infected samples and green spots (A3, A4, A5, B1, B2, B5, C2, C3, C4, and C6) are representing for samples with low levels of viral infection. B1 and B5 squares are for healthy fig (negative control) samples. Colorless spots in A7, B3 and B6 squares are for blank samples which dotted by just the buffer.

این در حالی است که در گذشته محققین جهت ردیابی بادنا ویروس‌ها جفت آغازگرهای طراحی شده برای چارچوب‌های ژنی نزدیک به ابتدای ۵' ژنوم که مسئول تولید پروتئین حرکتی در ویروس می‌باشد را جهت ردیابی مناسب می‌دانستند (Bousalem *et al.*, 2009).

بمنظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های FBV-1، همسانه‌های حاصل از تکثیر PCR تعداد نه جدایه منتخب از نه استان مورد بررسی شامل: تهران، خراسان رضوی، کرمان، کرمانشاه، گلستان، گیلان، لرستان، مازندران و یزد (جدول ۲) مورد توالی‌یابی ژنتیکی قرار گرفت و توالی‌ها با رس شماره‌های KU314932-40 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند. جدایه‌ها بر مبنای تفاوت در مناطق جغرافیایی برای آنالیز فیلوژنتیکی انتخاب شدند.

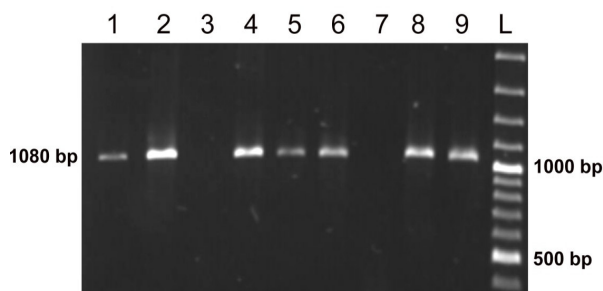
جدول ۱- وقوع بیماری موزائیک انجیر (FMD) و بادنا ویروس یک انجیر در درختان انجیر دارای علائم ویروسی جمع آوری شده از برخی استان‌های ایران

**Table 1.** Incidence of fig mosaic disease (FMD) and Fig badnavirus-1 in fig trees with virus like symptoms collected from some provinces of Iran

Province	Tested trees		Infected trees (FMD) <sup>1</sup>		FBV-1	
	No	No	%	No	%	
Yazd	30	15	50	13	43.3	
Gilan	18	15	83.3	14	77.7	
Golestan	21	18	85.7	15	71.4	
Khorasan Razavi	35	19	54.2	18	51.4	
Mazandaran	57	45	78.9	45	78.9	
Kermanshah	45	39	86.6	37	82.2	
Tehran	96	69	71.8	68	70.8	
Lorestan	48	33	68.7	30	62.5	
Kerman	42	21	50	19	45.2	
Total			69.8		66	

۱- درصدهای آلودگی برای FMD بر اساس آزمون سرولوژیک DIBA و برای FBV-1 بر مبنای PCR نمونه‌هایی که در آزمون DIBA آلوده تشخیص داده شده اند ارائه شده است.

1- Results for FMD are represented on the basis of the DIBA test and for FBV-1 are represented based on the PCR of the samples that were infected by DIBA.



**شکل ۳-** الکتروفورز محصول PCR بخشی از ژنوم FBV-1. ناحیه کد کننده پروتئاز ویروس باندازه ۱۰۸۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی. راهک های ۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹: قطعه تکثیر شده در نمونه های انجیر آلوده به ترتیب از شهرستان های گرگان، پیران، تالش، مهریز، سیرج، بروجرد و گناباد. راهک ۳: گیاه سالم انجیر به عنوان شاهد منفی. راهک ۷: آب مقطر به عنوان نمونه بلانک و راهک L: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس.

**Fig. 3.** Electrophoresis of FBV-1 PCR amplicons related to a part of the FBV-1 genome, viral protease encoding region with size about 1080bp on 1.2% agarose gel and amplified by specific primers. Lanes 1,2,4,5,6,8 and 9: Cloned DNA fragment for infected fig samples from Gorgan, Piran, Talesh, Mehriz, Circh, Broujerd and Gonabad counties, respectively. Lane 3: Healthy fig plant as a negative control, Lane 7: Distilled water as for blank sample in PCR and Lane L: 100bp DNA ladder (Fermentas, Lithuaniany).

با این وجود به صورت مشخص این ویژگی برای منطقه ژنی تولید کننده آنزیم پروتئاز مشخص نشده بود و در بیشتر تحقیقات مشابه به تنوع بالای ژنتیکی منطقه مذکور اشاره شده است (Kalischuk *et al.*, 2013; Barnawal, 2014).

دلیل پایین بودن تنوع ژنتیکی ویروس‌های با ژنوم dsDNA در مقایسه با ویروس‌های دارای ژنوم RNA مکانیسم اصلاح خطا سیستم تکثیر ژنوم آنها و نیز خطای کم آنزیم پلیمراز این دسته از ویروس‌ها در همانند سازی ژنوم است (Hull, 2000). از طرفی ژنوم این دسته از ویروس‌ها از توان ادغام در ژنوم میزبان و فرار از فشار انتخاب محیط برخوردار می باشد (Gregor *et al.*, 2004; Geering *et al.*, 2005). با این وجود شدت بیماریزایی آنها در مقایسه با سایر ویروس‌ها به میزبان بالا است و دلیل آن نیز تداخل در سیستم تنظیم بیان ژن در هسته میزبان می باشد (Daniels *et al.*, 2001).

جدایه‌ها در آنالیز فیلوژنتیکی بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و ترجمه اسید آمینه ای در دو گروه اصلی قرار گرفتند (شکل‌های ۴a و ۴b).

استناد به نتایج حاصل از این تحقیق در مورد پراکندگی FBV-1 در ایران و این حقیقت که پراکندگی ویروس در استان یزد نسبت به سایر استان‌ها کمتر بود، می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های FBV-1 در ایران از جدایه‌های متمایز تشکیل شده اند و احتمالاً واریانت‌های متفاوتی از ویروس در ایران وجود دارد. به هر حال با توجه به در دسترس نبودن اطلاعات مربوط به جدایه‌های مختلف ویروس از سایر کشورهای جهان و همچنین کم بودن تعداد جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق اثبات این مطلب نیاز به مطالعات گسترده تری دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که FBV-1 از پراکندگی نسبتاً بالایی در انجیر کاری‌های ایران برخوردار می‌باشد و از تنوع ژنتیکی کم برخوردار است و احتمالاً واریانت‌های متفاوتی از آن در ایران حضور دارد. با توجه به اهمیت زراعی انجیر در ایران و جهان و مشخص نبودن اتیولوژی بیماری موزائیک انجیر و روش انتقال FBV-1، استفاده از ارقام انجیر با توان دفاع مناسب در برابر آلودگی FBV-1 و حذف پایه‌های آلوده با توجه به دارا بودن آلودگی ژنتیکی توصیه می‌شود.

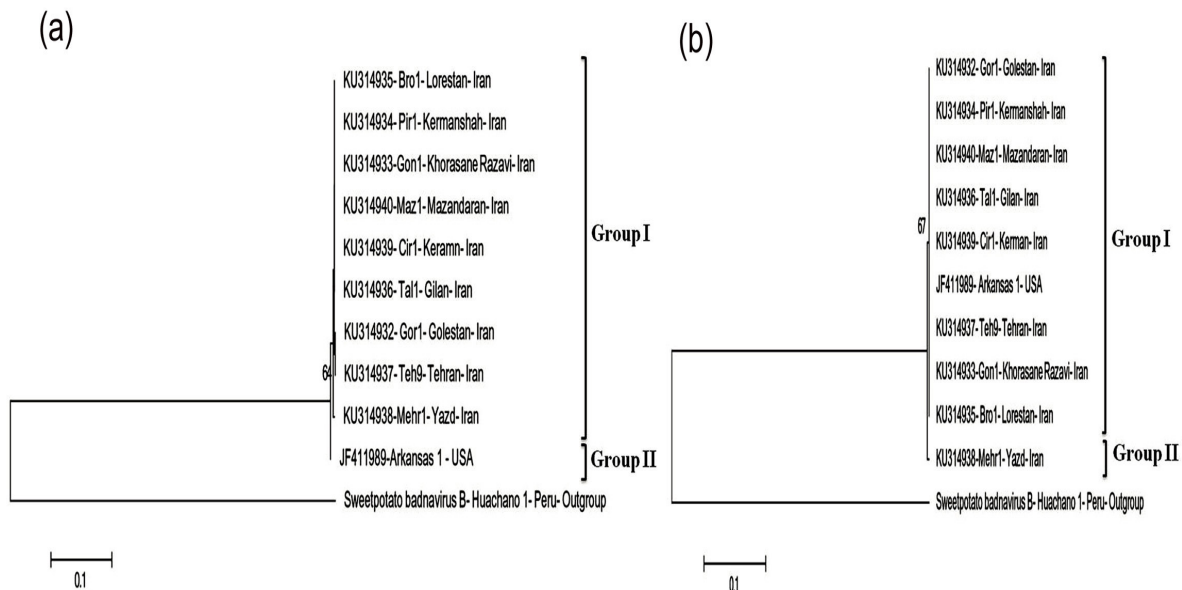
جدایه‌های ایرانی با فاصله ژنتیکی بسیار کم همگی در گروه فیلوژنتیکی اول کنار یکدیگر قرار گرفتند و هیچ ارتباطی بین تنوع جغرافیایی و گروه بندی جدایه‌ها مشاهده نشد. با این وجود تنها جدایه FBV-1 که از کشور آمریکا گزارش شده بود در گروه فیلوژنتیکی دوم قرار گرفت. این احتمال وجود دارد که در سطح جهانی تنوع جغرافیایی موجب تنوع ژنتیکی در جدایه‌های مختلف FBV-1 شده باشد. با توجه به قدمت و سابقه حضور دو قاره این احتمال نیز وجود دارد که منشأ جغرافیایی متفاوتی برای شکل گیری جمعیت‌های مختلف ژنتیکی FBV-1 در سطح جهانی وجود داشته باشد که به آنالیزهای ژنتیکی گسترده تری برای اثبات آن نیاز می‌باشد. تک جدایه Mehr1 از استان یزد در گروه اول با فاصله ژنتیکی بسیار کمی نسبت به سایر جدایه‌های ایرانی در این گروه قرار گرفت (شکل ۴a). همچنین در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر مبنی توالی اسید آمینه‌ای پروتئین پروتئاز مشاهده شد که جدایه Mehr 1 از یزد در گروه مستقلی نسبت به سایر جدایه‌ها قرار گرفت و جدایه آمریکایی ویروس در کنار سایر جدایه‌های ایرانی در گروه اول قرار گرفت (شکل ۴b). با

جدول ۲- اطلاعات جدایه های FBV-1 مورد استفاده جهت آنالیز فیلوژنتیکی در این تحقیق. از توالی جدایه آمریکایی (Acc. no. JF411989) به عنوان جدایه رفرانس جهت مقایسه مشابهت‌ها استفاده شد

**Table 2.** Information for FBV-1 isolates used for phylogenetic analysis in this study, nucleotide sequence for an American isolate (Acc. no. JF411989) was used as a reference isolate for identity level comparisons

Accession no.	Isolate	Origin	Nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences identity with reference * (%)	
			nt	aa
JF411989	Arkansas 1	USA	100	100
KU314932	Gor1	Golestan	99	99
KU314933	Gon1	Khorasan Razavi	99	99
KU314934	Pir1	Kermanshah	99	99
KU314935	Bro1	Lorestan	99	99
KU314936	Tal1	Gilan	99	99
KU314937	Teh9	Tehran	99	99
KU314938	Mehr1	Yazd	98	98
KU314939	Gir1	Kerman	99	99
KU314940	Maz1	Mazandaran	99	99
FJ560944 <sup>a</sup>	Huachano1	Peru	-	-





شکل ۴- درخت‌های فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی (a) و اسید آمینه ای (b) ژن کد کننده آنزیم پروتئاز از ژنوم FBV-1 که در آن تعداد نه جدایه منتخب از استان‌های مختلف ایران (جدول ۱) در کنار تنها توالی نظیر موجود در NCBI مربوط به جدایه ای از کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فاصله ژنتیکی برابر ۰/۱ و میزان cut off برابر ۸۰٪. ارزش‌های کمتر ۶۵٪ از روی گره‌های درخت‌های فیلوژنتیکی حذف شدند. جدایه Huachano1 ویروس Sweetpotato badnavirus B از کشور پرو به عنوان گروه خارجی انتخاب شد.

**Fig. 4.** Phylogenetic trees on the basis of the nucleotide (a) and amino acid (b) of protease encoding sequence in which 9 representative FBV-1 isolates from different provinces of Iran (Table 1) were analyzed beside the only corresponding isolate from U.S.A, available in NBCI. Genetic distance is 0.1% and cut off value is 80%. Values below the 65% were removed from the roots of the branches in phylogenetic trees. Isolate Huachano1 of Sweetpotato badnavirus B from Peru country selected as outgroup.

آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی مجتمع آزمایشگاهی زکریای  
رازی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران  
تشکر و قدردانی نمایند.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری  
صمیمانه آقای مهندس شهاب حاج منصور کارشناس

## References

- ALIMORADIAN, M. R., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKHSH, 2014. First record of Fig Badnavirus-1 in fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96: S4.124.
- ANONYMOUS, 2011. FAOSTAT. Preliminary 2009 Production Data. Statistical Data. <http://www.faostat.fao.org> (verified Dec 25, 2011).
- ANONYMOUS, 2013. Statistical annual report of Iranian agricultural crops.
- BANTTARI, E. E. and P. H. GOODWIN, 1985. Detection of Potato virus X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-Elisa). *Plant Disease*, 69: 202-205.
- BARNAWAL, V. K. 2014. Sequence analysis of shorter than genome length episomal banana streak oL virus like sequences isolated from banana in India. *Virus genes* 48: 120-127.
- BOUSALEM, M., O. DURAND, N. SCARCELLI, B. S. M. LEBAS, L. KENYON, J. L. MARCHAND, F. LEFORT and S. E. SEAL, 2009. Dilemmas caused by

- endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses: analyses to support safe germplasm movement. *Archive of Virology*, 154: 279-314.
- CAGLAYAN, K., C. U. SERCE, E. BARUTCU, K. KAYA, V. MEDINA, M. GAZEL, S. SOYLU and O. ÇALISKAN, 2010. Comparison by sequence-based and electron microscopic analyses of Fig mosaic virus isolates obtained from field and experimentally inoculated fig plants. *Plant Disease*, 94: 1448-1452.
- CHABANNES, M and M. L. ISKRA-CARUANA, 2013. Endogenous pararetroviruses – a reservoir of virus infection in plants. *Current Opinion in Virology*, 3: 615-620.
- DANESH-AMUZ, S., F. RAKHSHANDEHROO and S. REZAEI, 2014. Prevalence and genetic diversity of Fig mosaic virus isolates infecting fig tree in Iran. *Acta Virology*, 58:245-252.
- DANIELS, J. W., A. D. GEERING, N. J. BRYDE and J. E. THOMAS, 2001. The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. *Annual Applied Biology*, 139:51-60.
- DELLAPORTA, S. L., J. Y. WOOD and J. B. HICKS, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Report*, 1:19-21.
- ELBEAINO, T., K. HEINOUN, M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2010. Fig mild mottle-associated virus, a novel Closterovirus infecting fig. *Journal of Plant Pathology*, 92: 165-172.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2011a. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research*, 161: 198-202.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. De STRADIS and G. P. MARTELLI, 2006. Partial characterization of a Closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. *Journal of Plant Pathology*, 88:187-192.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. De STRADIS and G. P. MARTELLI, 2007. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology*, 89: 119-124.
- ELBEAINO, T., R. A. KUBAA, M. DIGIARO, A. MINAFRA and G. P. MARTELLI, 2011b. The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes*, 4: 415-421.
- ELCI, E., C. U. SERCE, M. GAZEL and K. CAGLAYAN, 2012. Molecular detection and comparative sequence analysis of viruses infecting fig trees in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 160: 418-423.
- GATTONI, G., A. MINAFRA, M. A. CASTELLANO, A. De STARDIS, D. BOSCIA, T. ELBEAINO, M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2009. Some properties of Fig latent virus 1, a new member of the family Flexiviridae. *Journal of Plant Pathology*, 91: 543-552.
- GEERING, A. D. W., N. E. OLSZEWSKI, G. HARPER, B. E. L. LOCKHART, R. HULL and J. E. THOMAS, 2005. Banana contains a diverse array of endogenous Badnaviruses. *Journal of General Virology*, 86: 511-520.
- GREGOR, W., M. F. METTE, C. STAGINNUS, M. A. MATZKE and A. J. M. MATZKE, 2004. A distinct endogenous pararetrovirus family in *Nicotiana tomentosiformis*, a diploid progenitor of polyploid tobacco. *Plant Physiology*, 134: 1191-1199.
- HULL, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*, 4th eds. San Diego: Academic Press. 1001pp. USA.
- KALISCHUK, M. L., FUSARO, A. F., WATERHOUSE, P. M., PAPPU, H and L.M. KAWCHUK, L. M. .2013. Complete genomic sequence of a *Rubus yellow net virus* isolate and detection of genome-wide pararetrovirus-derived small RNAs. *Virus Research* 178: 306-313.
- LANEY, A. G., M. HASSAN and I. E. TZANNETAKIS, 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. *Phytopathology*, 102:1182-1189.
- MARTELLI, G. P. 2011. Fig mosaic disease and associated pathogens. In: Hadidi A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann W. (eds). *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*, pp. 281-287. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- MINAFRA, A., M. CHIUMENTI, T. ELBEAINO, M. DIGIARO, G. BOTTALICO, V. PANTALEO and G.

- P. MARTELLI, 2012. Occurrence of Fig Badnavirus 1 in fig trees from different countries and symptomless seedlings. *Journal of Plant Pathology*, 94:S4.105.
- NOROZIAN, E., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKSH, 2014. Presence of Fig Leaf Mottle- associated Virus 3 in an Iranian fig orchard. *Journal of Plant Pathology*, 96: S4.131.
- NOURI ALE-AGHA, G. and F. RAKHSHANDEHROO, 2014. Detection and molecular variability of Fig fleck-associated virus and Fig cryptic virus in Iran. *Journal of Phytopathology*, 162:417-425.
- SADDOUD, O., A. SALHI-HANNACHI, K. CHATTI, M. MARS, A. RHOUMA, M. MARRAKCHI and M. TRIFI, 2005. Tunisian fig (*Ficus carica* L.) genetic diversity and cultivar characterization using microsatellite markers. *Fruits*, 60:143–153.
- SHAHMIRZAIE, M., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH and T. ELBEAINO, 2012. Current status of fig mosaic disease in Iran. *Journal of Phytopathology*, 160:324-330.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI and S. KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular biology and evolution*, No. 30(12): 2725–2729.
- XU, D., B. MOCK, G. KINARD and R. LI, 2011. Molecular analysis of the complete genomic sequences of four isolates of Gooseberry vein banding associated virus. *Virus Genes*. 43: 130-137.

