

## تعیین ویژگی‌های مولکولی سه جدایه ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا به دست آمده از نخود در ایران

یلدا سخن سنج<sup>۱</sup>، کاوه بنانج<sup>۲</sup>✉، فرشاد رخشنده رو<sup>۱</sup> و علی آهون منش<sup>۳</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

۲- استاد، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، تهران، ایران؛ ۳- استاد، موسسه آموزش عالی صنعتی فولاد، فولادشهر، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶)

### چکیده

زردی از علائم شایع در مزارع نخود در دنیا و ایران می باشد. ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) از جنس *Nanovirus* تیره *Nanoviridae* از عوامل ویروسی همراه با عارضه زردی می باشد. در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ نمونه‌های نخود با علائم زردی از استان‌های لرستان و کرمانشاه جمع آوری و پس از استخراج دی‌ان‌ا، آلودگی به نانو ویروس با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی در آنها ردیابی گردید. دی‌ان‌ا نمونه‌های آلوده از طریق روش دایره غلطان (RCA) تغلیظ و با انجام هضم آنزیمی محصول (RCA) توسط آنزیم برشی *Aat II* قطعات مختلف ژنومی ویروس با اندازه حدود یک کیلو جفت باز جداسازی گردید. قطعه ژنومی با اسامی DNA-R, DNA-S, DNA-C, DNA-U1, DNA-U2, DNA-N, DNA-M, DNA-U4 و DNA-U4 با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی FBNYV. تکثیر و تعیین ترادف گردید. مقایسه ترادف قطعات ۸ گانه در سه جدایه ایرانی FBNYV با ترادف‌های موجود در بانک ژن GenBank نشانگر شباهت زیاد جدایه‌های ایرانی با دو جدایه [FBNYV-[AZ; 12] و [FBNYV-[AZ; 13.5] از آذربایجان بود. درخت تبارزایی‌های رسم شده برای قطعات DNA-S, C, U1 نشانگر شباهت زیاد آنها با قطعات مشابه در جدایه آذربایجان [FBNYV-[AZ;12] و در گروه مستقل (II) از سایر جدایه‌های دنیا قرار گرفتند. ترادف قطعات DNA-R, M, N, U2, U4 جدایه‌های ایرانی با جدایه دیگری از آذربایجان [FBNYV-[AZ;13.5] بسیار شباهت داشته و در گروه مستقل (I) قرار گرفتند. تفاوت ژنتیکی بین دو جدایه آذربایجان در بین جدایه‌های ایرانی نیز مشاهده شد. نتایج بدست آمده فرضیه وقوع نوجوری بین جدایه‌های ایران و آذربایجان را حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: زردی، نخود، ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا.

### Molecular characterization of three *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) isolates, originated from chickpea in Iran

Y. SOKHANSANJ<sup>1</sup>, K. BANANEJ<sup>2</sup>✉, F. RAKHSHANDEHROO<sup>1</sup> and A. AHOONMANESH<sup>3</sup>

1-PhD Student & Assistant Professor, Respectively; Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Professor, Department of Plant Virus Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 3- Professor, Foulad Institute Technology (FIT), Foulad-shahr, Isfahan-Iran

#### Abstract

Yellowing is one of the most prevalent symptoms in chickpea fields, worldwide and Iran. *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV, genus *Nanovirus*, family *Nanoviridae*) is associated with the yellowing symptoms in the chickpea fields. During the survey of the Lorestan and Kermanshah provinces in May 2015-2016, chickpea plants showing yellowing symptoms were collected and total DNAs were extracted. The samples were checked for nanovirus infection by PCR, using nanovirus-specific degenerate primers. Total DNA preparations from the nanovirus-positive samples were used for RCA, using  $\phi 29$  polymerase and restriction endonuclease *Aat II* digests yielding products of ~1kb corresponding to linearized nanovirus DNA components. FBNYV genomic components were amplified using RCA products and specific primers of eight different U1, M, N, C, S, R, U2, and U4 components. The amplified fragments were purified and sequenced. Nucleotide sequences of the eight different components of three Iranian isolates of FBNYV (Lor-28, Lor-1, and Ker-21) were compared with FBNYV sequences in GenBank. Sequence comparison indicated that Iranian isolates of FBNYV are most similar to Azerbaijan isolates of FBNYV: FBNYV-[AZ; 12], and FBNYV-[AZ; 13.5]. Phylogenetic analyses of nucleotide and deduced amino acid sequences of DNA-S, C, and U1 revealed that Iranian FBNYV isolates clustered with Azerbaijan isolate FBNYV-[AZ;12] (group II), while DNA-R, DNA-M, DNA-N, DNA-U2, and DNA-U4 clustered with FBNYV-[AZ; 13.5], (group I). Considering the genomic differences between two Azerbaijan isolates, which can be expected among Iranian isolates. These results may provide evidence of the reassortment occurrence among Iranian and Azerbaijan FBNYV isolates.

**Key words:** Chickpea, *Faba bean necrotic yellows virus*, yellowing

## مقدمه

حبوبات یکی از منابع اصلی تأمین پروتئین در دنیا و ایران به شمار می‌آید. نخود *Cicer arietinum* از خانواده بقولات (*Fabaceae*) می‌باشد و یکی از مهم‌ترین منابع غذایی سرشار از پروتئین (۱۸ تا ۲۳ درصد) می‌باشد ( Parsa and Bagheri, 2008). بر اساس آخرین آمارنامه سازمان خوار و بار کشاورزی سازمان ملل متحد (FAOSTAT, 2014)، کشور ایران از نظر میزان تولید نخود بعد از کشورهای هند، استرالیا، پاکستان و میانمار در مقام پنجم جهان قرار دارد (FAO, 2014). کشت نخود در اکثر مناطق ایران به استثنای سواحل دریای خزر کم و بیش معمول است و مهم‌ترین مناطق کشت آن عبارتند از: آذربایجان شرقی و غربی، قزوین، فارس، خراسان، کرمان، لرستان، کردستان و استان مرکزی. بر مبنای آخرین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال‌های زراعی ۹۴-۱۳۹۳ نخود با ۴۶۳۰۰۰ هکتار (۷۲۶۹ هکتار آبی و ۴۵۵۷۳۱ هکتار دیم) بالاترین سطح زیر کشت را در میان سایر حبوبات دارا بوده است که از آن میزان ۱۹۳۰۰۰ تن نخود (۱۰۰۹۴ تن از زمین‌های کشت شده به صورت آبی و ۱۸۲۹۰۶ تن از زمین‌های کشت شده به صورت دیم) برداشت شده است (Anonymous, 2015).

ویروس‌های گیاهی از عوامل اصلی و محدود کننده کشت حبوبات در دنیا به شمار می‌آیند. ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV) از ویروس‌های شایع و خسارت‌زای مزارع حبوبات در غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد و در سال‌های اپیدمی، ویروس زردی بافت مرده باقلا سبب خسارت‌های سنگین می‌شود. به عنوان مثال در کشور مصر در سال‌های ۱۹۹۲، و ۱۹۹۸ میلادی باعث کاهش میزان محصول به میزان بیش از ۹۰ درصد شده است (Makkouk and Kumari, 2009). ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV)، مهم‌ترین ویروس خسارت‌زا در مزارع عدس (*Lens culinaris* Medik.)، نخود (*C. arietinum* L.) و لوبیا (*Phaseolus vilgaris*) در بسیاری از کشورهای غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد (Katul et al.,

1993; Makkouk et al., 1994; Makkouk et al., 1998a; 1998b; (Najar et al., 2000).

ویروس زردی بافت مرده باقلا اولین بار در سال ۱۹۸۸ از میزبان باقلا (*V. faba*) در منطقه Lattakia در سوریه گزارش شد و پس از آن در تعداد زیادی از کشورهای عربی غرب آسیا و شمال آفریقا نظیر اردن، اتیوپی، مصر، الجزیره و مراکش ثبت شد ( Katul et al., 1993; Franz et al., 1995; 1996). تا چندی پیش تصور می‌شد این ویروس تنها در غرب آسیا و شمال آفریقا حضور دارد اما در سال ۲۰۰۰ این ویروس برای اولین بار در اروپا از اسپانیا (Babin et al., 2000) و پس از آن در سال ۲۰۰۹ (Kumari et al., 2009) از آذربایجان گزارش شد. ویروس زردی بافت مرده باقلا FBNYV یکی از اعضای جنس نانوویروس (*Nanovirus*) در تیره نانوویریده (*Nanoviridae*) می‌باشد. نانوویروس‌ها دارای ژنوم تک لای حلقوی از جنس دی‌ان‌ای (+SSDNA) و بصورت چند قطعه‌ای می‌باشند (multiple circular ssDNAs) که هر کدام بطور جداگانه در پیکره‌های چند وجهی (Small isometric virions) بسته‌بندی می‌شوند. ژنوم این ویروس از ۸ قطعه حلقوی تشکیل شده است، که تمامی این قطعات قطری در حدود ۲۰-۱۷ نانومتر دارند. پوشش پروتئینی این ویروس شامل یک پروتئین تک لایه ۲۰ کیلو دالتون است. قطعات ژنوم اندازه‌های در حدود ۹۵۸ تا ۱۰۱۴ جفت باز دارند و شامل یک قاب خواندنی باز اصلی و یک ناحیه غیرکدکننده می‌باشند. ناحیه کد کننده دارای یک توالی پروموتور با TATA box می‌باشد و همچنین یک سیگنال پلی‌آدنین در انتها دارند و یک پروتئین را رمزگذاری می‌کنند. پروتئین آغاز کننده تکثیر و پروتئین اصلی همانندسازی، پروتئین پوششی، پروتئین تعدیل کننده سیکل سلولی، پروتئین انتقال هسته‌ای و پروتئین حرکتی (به ترتیب) توسط قطعات DNA-C، DNA-S، DNA-R، DNA-M و DNA-N بیان می‌شوند همچنین قطعات DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 سه پروتئین با عملکرد ناشناخته را رمزگذاری می‌کنند (Aronson et al., 2000; Timchenko

باقلا و عدس در استان‌های کرمانشاه، کردستان، لرستان، مرکزی، اصفهان و چهارمحال و بختیاری توسط منصورپور و همکاران با استفاده از روش Nested-PCR و قطعه‌ای با اندازه ۳۸۷ جفت باز مربوط به DNA-1 تکثیر و تعیین ترادف گردید (Mansourpour *et al.*, 2010). علوی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۱ وجود این ویروس را در مزارع باقلا، لوبیا، یونجه، عدس و نخود در چند استان کشور ردیابی نموده و با تعیین ترادف بخشی از پروتئین پوششی (DNA-S) این ویروس نشان دادند که تنوع مولکولی قابل توجهی در این بخش از ژنوم ویروس در بین جدایه‌های ایرانی FBNYV مشاهده نمی‌شود (Alavinejad *et al.*, 2011). تا قبل از انجام این تحقیق، قطعه DNA-S جدایه نخود (Acc. No. AM493899) و جدایه باقلا فرامان (به ترتیب) و قطعه DNA-N جدایه نخود (Acc. No. AM493900) از لرستان (الشر) و کرمانشاه (درود) (AM493898) از لرستان (الشر) و جدایه باقلا کرمانشاه (درود) فرامان (Acc. No. AM493901) تعیین ترادف و در بانک ژن ثبت شده‌اند (بنانج و همکاران، داده‌های منتشر نشده).

در این تحقیق توالی قطعات ۸ گانه ژنوم ۳ جدایه ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا تعیین و ارتباط و قرابت جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های FBNYV در دنیا بررسی شد.

#### روش بررسی

**نمونه برداری:** در سال زراعی ۹۵-۹۴ از برخی مزارع نخود در استان لرستان (الشر، نورآباد، خرم آباد، فیروزآباد، زاغه و بروجرد) و کرمانشاه (روانسر، کنگاور، هرسین، سرارود، کرند و اسلام آباد) بازدید و نمونه‌هایی با نشانه‌های زردی و کوتولگی (شکل ۱) (لرستان ۷۰ نمونه و کرمانشاه ۸۰ نمونه) جمع‌آوری و پس از ثبت مشخصات هر نمونه از قبیل نشانه‌های مشاهده شده، محل و تاریخ جمع‌آوری، نمونه‌های جمع‌آوری شده روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس تا هنگام انجام آزمایش‌های مربوطه نگهداری شد.

انتقال ویروس زردی بافت مرده باقلا توسط شته‌ها چرخشی (غیر تکثیری) می‌باشد (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 1998). نشانه‌های ایجاد شده توسط ویروس زردی بافت مرده باقلا در نواحی سردسیر غالباً شامل زردی، کوتولگی و اختلال در تشکیل غلاف می‌باشد. ویروس زردی بافت مرده باقلا دارای دامنه میزبانی نسبتاً محدودی می‌باشد که اکثر آن‌ها گونه‌های مختلف لگوم‌ها می‌باشند. این ویروس بیش از ۵۰ گونه لگوم و تنها تعداد بسیار محدودی از گیاهان غیر لگوم (*Amaranthus spp.*, *Stellaria media*, *Arabidopsis thaliana* و *Malva spp.*) را در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی آلوده می‌کند.

باقلا میزبان اصلی این ویروس است اما نخودفرنگی، لوبیا فرانسوی، لوبیا چشم بلبلی، نخود و عدس به صورت طبیعی توسط FBNYV آلوده می‌شوند (Makkouk *et al.*, 1992; Katul *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1995). تا به حال ویروس زردی بافت مرده باقلا از کشورهای آذربایجان، اسپانیا، مراکش، مصر، سوریه، اتیوپی، تونس و ایران گزارش و تعیین ترادف شده است (جدول ۳). در ایران ویروس زردی بافت مرده باقلا از برخی مزارع نخود و عدس در پنج استان کشور (کرمانشاه، لرستان، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی) و تعدادی از مزارع باقلا در یک منطقه از استان کرمانشاه (منطقه‌ای بین کرمانشاه و فرامان) گزارش شده است (Makkouk *et al.*, 2002). این ویروس در سال ۱۳۸۷ از مزارع نخود و عدس در استان‌های قزوین، کرمانشاه، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی با استفاده از روش Tissue blot immunoassay (TBIA) گزارش شد (Vafaei *et al.*, 2008). در سال ۱۳۸۹ تعداد ۳۳۰ نمونه از مزارع نخود، لوبیا،

ستون اضافه و پس از گذشت ۲ دقیقه، میان‌گریز شد. نمونه‌های دی.ان.ای استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از نمونه‌های دی.ان.ای استخراج شده و جفت آغازگر اختصاصی جنس نانویروس (Kumari *et al.*, 2009) انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X)، یک میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر dNTPs ده میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی نانویروس‌ها، یک میکرولیتر از آنزیم (Taq DNA polymerase, 5u/μl) و ۲ میکرولیتر دی.ان.ای بود که با افزودن آب مقطر دوبار تقطیر به حجم رسانده شد. برنامه PCR برای ردیابی نانویروس‌ها شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C، و برنامه ۳۰ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۴۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس یک چرخه در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR با الکتروفور در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم برماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بررسی، مشاهده و عکس برداری از قطعات تکثیر شده دی.ان.ای طی واکنش PCR با استفاده از دستگاه UV illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام شد.

**تغلیظ دی.ان.ای به روش دایره غلظان (RCA):** در این تحقیق تغلیظ دی.ان.ای با استفاده از DNA پلیمرز باکتروفاز 29 (Rolling Circle Amplification, RCA) و بر اساس توصیه شرکت تولید کننده کیست (Amersham biosciences Templiphi™ 100 Amplification Kit) به شرح زیر انجام شد:

یک میکرولیتر از دی.ان.ای استخراج شده به عنوان الگو با ۴ میکرولیتر از بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس مخلوط به مدت یک تا دو دقیقه روی یخ نگهداری و بعد از



شکل ۱- (A) مزرعه نخود فاقد علائم زردی (B و C) علائم زردی

و کوتولگی مشاهده شده در مزرعه نخود در استان لرستان منطقه نورآباد

**Fig. 1.** Noninfected chickpea field (A). Yellowing and dwarfing symptoms in the chickpea fields in Noorabad region, Lorestan province (B and C).

### استخراج DNA و تعیین آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری

شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): استخراج دی.ان.ای کل گیاهی (Total DNA) با استفاده از کیت استخراج (Vivantis) GF-1 Plant DNA Extraction Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به شرح زیر انجام گرفت:

ده تا سی میلی‌گرم از بافت برگ‌های نخود با استفاده از ازت مایع در یک هاون له شده و پودر بدست آمده به لوله پلاستیکی انتقال و ۲۸۰ میکرولیتر از بافر PL اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. ۲۰ میکرولیتر از پروتئیناز K به لوله پلاستیکی اضافه و پس از نگهداری مخلوط به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه، بلافاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰۰g میان‌گریز گردید. فاز رویی با ۲ حجم از بافر PB مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول مطلق اضافه و بعد از انجام چند نوبت ورتکس، ۶۵۰ میکرولیتر از نمونه به ستون‌های تعبیه شده در کیت منتقل و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g میان‌گریز و پس از حذف مایع زیری مجدداً میان‌گریز شد. سپس ستون با ۶۵۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشو برای ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g میان‌گریز و پس از حذف مایع زیری مجدداً میان‌گریز شد. سپس ستون به یک لوله پلاستیکی جدید منتقل و ۳۰ میکرولیتر از آب سترون به

از مرحله قبل با استفاده از کیت DNA Recovery Kit-Vivantis از ژل استخراج و خالص سازی شد و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت MacroGen کشور کره جنوبی (توسط شرکت پیشگام) ارسال شد.

**آنالیز فیلوژنتیکی:** شباهت قطعات تعیین توالی شده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن GenBank با استفاده از موتور جستجوگر nBlast انجام شد. قطعات ژنومی جدایه ایرانی و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار ClustalW هم‌ردیف سازی و پس از حذف نوکلئوتیدهای پوچ از درون توالی، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura et al., 2013) و به صورت neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) با ۵۰۰ بار تکرار ترسیم گردید. ویروس Banana bunchy top virus به عنوان عضو خارج از گروه (outgroup) تعیین شد. جدایه‌های مورد استفاده در مقایسه‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در این تحقیق در جدول ۳ ارائه شده است.

### نتیجه و بحث

**ردیابی نانوویروس‌ها:** نتایج بدست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی جنس نانوویروس (Kumari et al., 2009)، نشانگر آلودگی ۱۳ و ۱۴ نمونه جمع‌آوری شده (به ترتیب کرمانشاه و لرستان) به جنس نانوویروس بود و قطعه‌ای با اندازه حدود ۷۵۰ جفت باز (bp) در ژل الکتروفورز مشاهده گردید (شکل ۲). آلودگی در تمام مناطق نمونه برداری به استثنا منطقه کرند (کرمانشاه) ردیابی شد.

**تغلیظ دی.ان.ای به روش دایره غلطان (RCA):** در این تحقیق تغلیظ دی.ان.ای با استفاده از روش دایره غلطان (RCA) انجام شد و مشاهده پلیمرهای خطی بر روی ژل الکتروفورز نشانگر تغلیظ دی.ان.ای در نمونه‌های آلوده به نانوویروس‌ها و مطابق با نتایج بدست آمده توسط Grigoras et al. (2009) بود (شکل ۳).

خنک شدن مخلوط، پنج میکرولیتر از بافر (Reaction buffer) و ۰/۲ میکرولیتر از محلول (Enzyme mix) که حاوی  $\Phi 29$  DNA Polymerase بود به مخلوط سرد اضافه و مرحله بسط با نگهداری در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. به منظور غیر فعال کردن آنزیم DNA Polymerase مخلوط در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد.

**هضم آنزیمی محصولات RCA:** پس از مشاهده محصولات RCA در ژل آگارز ۱٪ و حصول اطمینان از انجام تغلیظ نمونه دی.ان.ای استخراج شده، محصول آر.سی.ای (RCA) با آنزیم برشی *Aat II* (Fermentas Co., Germany) که دارای یک جایگاه برشی برای جنس نانوویروس می‌باشد (Grigoras et al., 2009)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و قطعات حاصله پس از انجام الکتروفورز بررسی شد.

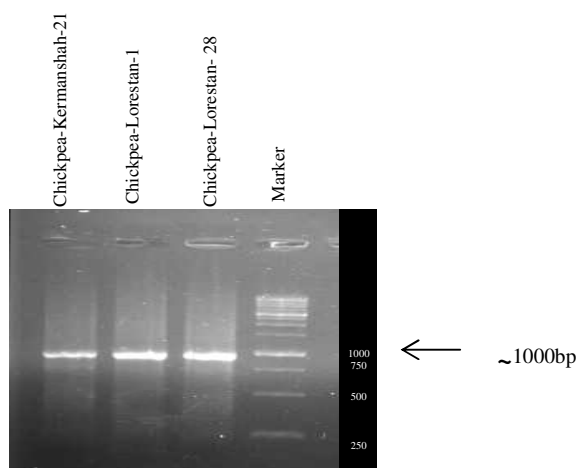
### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هدف تعیین ماهیت قطعات

حاصله از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Aat II* با استفاده از هشت جفت آغازگر اختصاصی مربوط به قطعات ۸ گانه ژنوم FBVNYV (R,S,C,M,N,U1,U2,U4) (جدول ۲)، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای قطعات حاصله از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Aat II* انجام شد. برنامه PCR شامل یک مرحله ابتدایی به مدت ۵ دقیقه در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  جهت واسرشت سازی اولیه دی.ان.ای و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، دمای  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۹۰ ثانیه و دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ دقیقه و سپس یک چرخه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه بود.

محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم برماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس برداری از قطعات دی.ان.ای تکثیر یافته طی واکنش PCR با استفاده از دستگاه UV illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام شد.

**خالص سازی و تعیین توالی:** محصول PCR بدست آمده

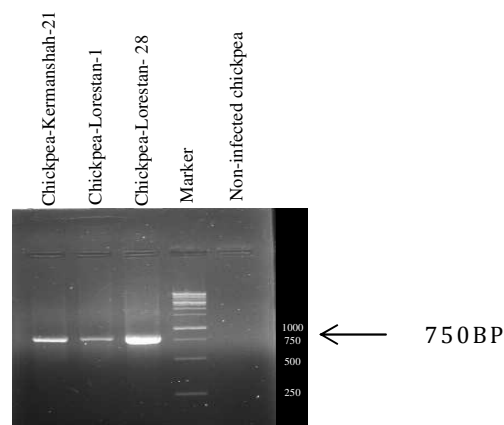
**هضم آنزیمی دی‌ان‌ای تغلیظ شده با آنزیم برشی *Aat II***: آنزیم برشی *Aat II* دارای یک جایگاه اختصاصی برشی در نانویروس‌ها می‌باشد و هضم آنزیمی محصول RCA باعث برش قطعاتی با اندازه یک کیلو جفت باز هم اندازه با قطعات ژنومی در نانویروس‌ها می‌شود (Grigoras *et al.*, 2009). نتایج بدست آمده از هضم آنزیمی محصول RCA در این تحقیق نیز مشابه با نتایج بدست آمده توسط Grigoras *et al.* (2009) بود و قطعاتی با اندازه‌ای حدود یک کیلو جفت باز (1kb) در ژل آگاروز یک درصد مشاهده و هم چنین نتایج PCR تائید شد (شکل ۴) و بدین ترتیب آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده با نشانه‌های زردی و کوتولگی به نانویروس‌ها تائید شد.



**شکل ۴-** نقوش الکتروفورزی هضم آنزیمی محصول RCA سه جدایه ایرانی FBNYV با آنزیم برشی *Aat II* قطعاتی به اندازه 1kb در هر راهک مشاهده می‌شود. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نوشته شده است؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

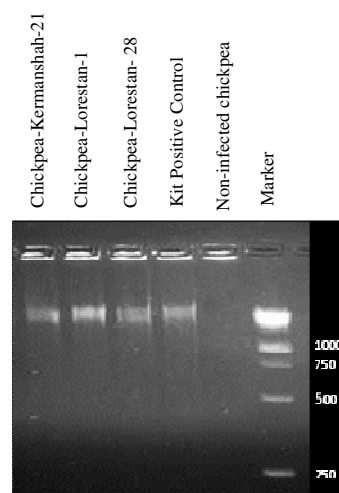
**Fig. 4.** Electrophoresis pattern of RCA products digestion using *AatII* restriction enzyme of 3 Iranian FBNYV isolates. Name of the host and isolate typed at the top of the each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی مربوط به قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه ایرانی FBNYV:** نتایج بدست آمده از PCR با استفاده از هشت جفت



**شکل ۲-** نقوش الکتروفورزی محصول PCR نمونه‌های نخود آلوده به نانویروس تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی جنس نانویروس. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ N: نمونه نخود سالم (عاری از ویروس)؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

**Fig. 2.** Electrophoresis pattern of PCR product from Nanovirus-infected chickpea samples using Nanovirus specific primers. Name of the host and province and non-infected chickpea were typed at the top of each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).



**شکل ۳-** نقوش الکتروفورزی دی‌ان‌ای تغلیظ شده با استفاده از روش دایره غلطان RCA مربوط به ۳ جدایه ایرانی FBNYV. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ N: نمونه نخود سالم (عاری از ویروس)؛ شاهد مثبت: Kit positive control؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

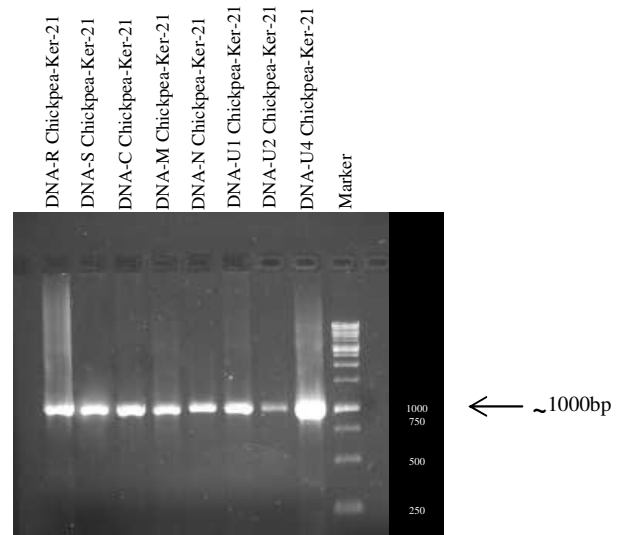
**Fig. 3.** Electrophoresis pattern of RCA product of 3 Iranian FBNYV isolates. Name of the host and isolate. None-infected chickpea typed at the top of each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

توالی و گزارش شده است (جدول ۳). FBNYV در ایران تا به حال از لوبیا، عدس، نخود، یونجه و باقلا گزارش شده است (Vafaei *et al.*, 2008; Mansourpour *et al.*, 2010; Alavinejad *et al.*, 2011). قطعه DNA-R با اندازه ۳۸۷ جفت باز تعیین توالی و گزارش شده است (Mansourpour *et al.*, 2010) با توجه به اطلاعات فوق و نتایج بدست آمده در این تحقیق، ۸ قطعه ژنوم جدایه ایرانی ویروس FBNYV برای اولین بار در ایران تکثیر و تعیین توالی شد. با توجه به اطلاعات موجود در GenBank تکثیر و تعیین توالی ۸ قطعه ژنوم FBNYV از میزبان نخود (*C. arietinum*) برای اولین بار در دنیا در این تحقیق انجام گرفت (جدول ۳).

#### موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی ویروس

**زردی بافت مرده باقلا:** ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسید قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه ایرانی با ترادف‌های ثبت شده در GenBank (جدول ۳) مقایسه گردید. نتایج بدست آمده نشانگر بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-R جدایه‌های ایرانی (به ترتیب Lor-1, Lor-28 و Ker-21) به ترتیب  $99/3\%$ ،  $99/3\%$  و  $99/1\%$  در ترادف نوکلئوتیدی و  $98/7\%$ ،  $98/7\%$  و  $98/3\%$  در ترادف آمینواسیدی) با جدایه اتیوپی (Acc. No. HE663168) و جدایه آذربایجان (KC979009 و KC979000) به میزان  $98/4\%$  تا  $99/1\%$  در ترادف نوکلئوتیدی و  $95\%$  تا  $97/4\%$  در ترادف آمینواسیدی) بود. قطعه DNA-S جدایه‌های نخود لرستان (Lor-1 و Lor-28) بیشترین تشابه نوکلئوتیدی ( $99/1\%$  و  $99/2\%$  به ترتیب) و آمینو اسیدی ( $98/1\%$ ) را با جدایه ایرانی (لرستان) (Acc. No. AM493899) داشتند. جدایه کرمانشاه (Ker-21) بیشترین میزان تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (به ترتیب  $97/6\%$  و  $93/9\%$ ) را با جدایه ایرانی کرمانشاه (Acc. No. AM493900) داشت همچنین این سه جدایه ایرانی (Ker-21 و Lor-1, Lor-28) به میزان  $95/5\%$  تا  $95/6\%$  در توالی نوکلئوتیدی و  $89/9\%$  تا  $90/2\%$  در توالی آمینواسیدی با جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979001) شباهت داشتند. قطعه DNA-N در ۳ جدایه مورد بررسی

آغازگر اختصاصی قطعات ۸ گانه (R,S,C,M,N,U1,U2,U4) ژنوم FBNYV (Grigoras *et al.*, 2014)، نشانگر تکثیر قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه‌های ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا FBNYV بود و آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده با نشانه‌های زردی و کوتولگی به FBNYV به اثبات رسید (شکل ۵). قطعات ۸ گانه ژنومی در هر سه جدایه نخود (کرمانشاه-۲۱)، جدایه نخود (لرستان-۱) و جدایه نخود (لرستان-۲۸) تکثیر گردید. تعیین ترادف قطعات ۸ گانه ژنوم ۳ جدایه ایرانی FBNYV نشان داد که طول قطعات بین ۹۸۷ تا ۱۰۰۵ نوکلئوتید می باشد (جدول ۴).



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR قطعات ۸ گانه ژنوم

جدایه ایرانی FBNYV با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی (Grigoras *et al.*, 2014). نام هر کدام از قطعات ۸ گانه، میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

**Fig. 5.** Electrophoresis pattern of PCR products of 8 components of Iranian FBNYV isolate (ker-21) using specific primers (Grigoras *et al.*, 2014), name of the amplified fragments, host, and isolate typed at the top of the each lane. Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

بر اساس اطلاعات موجود در GenBank قطعات ۸ گانه ژنوم FBNYV تنها از کشورهای آذربایجان، اسپانیا، مراکش، مصر، سوریه، و تونس و از میزبان باقلا (*Vicia Faba*) (به جز یک جدایه عدس از آذربایجان (Acc. No. GQ351600)) تعیین

۹۸/۲٪ و ۹۸/۲٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۵/۱٪) را با جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979005) داشتند. بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-U2 در جدایه‌های لرستان (Lor-1) و Lor-28) و جدایه کرمانشاه (Ker-21) به میزان ۹۵/۹٪ تا ۹۷/۲٪ در توالی نوکلئوتیدی و ۸۸/۳٪ تا ۹۱/۹٪ در توالی آمینواسیدی با جدایه ویروس زردی بافت مرده باقلا از کشور آذربایجان (Acc.No. KC979006) و جدایه کشور ایتویپی ( Acc.No. HE663171) بود (جدول ۳). بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-U4 در ۳ جدایه مورد بررسی (Lor-1، Lor-28، و Ker-21) از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۶/۳٪ تا ۹۹/۲٪) و از لحاظ ترادف آمینواسیدی (۹۲/۵٪ تا ۹۸/۴٪) با ۲ جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979007, KC979017) بود (جدول ۳).  
درخت تبارزایی حاصل از مطالعات تبارزایی نشان داد که قطعه R جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه جدایه‌های آذربایجان، ایتویپی، تونس و اسپانیا در گروه I و جدایه‌های مراکش، تونس (یک جدایه)، سوریه و مصر در گروه II قرار گرفتند (شکل ۶).

(Lor-1، Lor-28 و Ker-21) دارای تشابه نوکلئوتیدی (۹۹/۵٪، ۹۹/۴٪ و ۹۷/۹٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۸/۷٪ و ۹۴٪ به ترتیب) با جدایه ایرانی (لرستان) (Acc. No. AM493898) بودند؛ هم‌چنین این سه جدایه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۶/۸٪، ۹۶/۹٪ و ۹۹٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۱/۳٪ و ۹۷/۳٪ به ترتیب) با جدایه ایرانی کرمانشاه ( Acc. No. AM493901) مشابه بودند. قطعه DNA-C در جدایه‌های لرستان و کرمانشاه (Lor-1، Lor-28، و Ker-21) بیشترین میزان تشابه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۵/۸٪، ۹۵/۷٪ و ۹۶/۱٪ به ترتیب) و از لحاظ ترادف آمینواسیدی (۸۸/۹٪، ۸۸/۵٪ و ۹۰/۲٪ به ترتیب) را با جدایه FBNYV از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979002) داشتند. قطعه DNA-M در جدایه‌های (Lor-28 و Lor-1، Ker-21) بیشترین میزان تشابه را از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۰/۸٪ تا ۹۳٪) و آمینواسیدی (۸۰/۴٪ تا ۸۶/۹٪) با ۳ جدایه از کشور آذربایجان ( Acc. No. KC979018, KC 979003, KC 979012) داشتند. قطعه DNA-U1 در ۳ جدایه مورد بررسی در این تحقیق (Lor-1، Lor-28، و Ker-21) بیشترین میزان تشابه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۸/۳٪،

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برای ردیابی نانویروس‌ها

Table 1. List of primer used in this study for detection of Nanoviruses

Primer	Sequence	Size (bp)	Reference
Nano_F103	5'-ATTGTATTTGCTAATTTA-3'	776	Kumari <i>et al.</i> , 2009
Nano_R101	5'-TTCCTTCTCCACCTTGT_3'		

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برای تکثیر قطعات ژنومی ویروس زردی بافت مرده باقلا

Table 2. List of primer used in this study for detection of FBNYV

Primer	Sequence	Size(bp)	Reference
R-F	5'-CGAAGCTTCGAGGAGTATGTTAATTACGG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
R-R	5'- TCGAAGCTTCGTGGAAAGTCGAAGAGCACT-3'		
S-F	5'- CTGTTCTAGAACACAGAGTTTATGT -3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
S-R	5'-GTGTTCTAGAACAGCTTTAAGAGCA-3'		
C-F	5'- ATTGTCAACTGCAGTGAATTGGATAAATTA-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
C-R	5'- GCAGTTGACAATCATACCGTCTTCGTATGT-3'		
M-F	5'-TTGCGTCAACTGACCAGAACTCC-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
M-R	5'-CAGTGTGACGCAACTTCTCTC-3'		
N-F	5'-TGGATCTCGAGTCTCAGTACTTGAAGAAGG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
N-R	5'-TGAGACTCGAGATCCAGGTTGAATGTCCTT-3'		
U1-F	5'-GTCTGAATTCGTTGAAGAGTCTTCTCC-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U1-R	5'- TCAACGAATTCAGACTTGTGTTCTTCA-3'		
U2-F	5'- TATGAAGCTTTCGATGAGAGAATTG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U2-R	5'- TCGAAAGCTTCATACGCCTAATCGA-3'		
U4-F	5'- GACTTGATTCAAAGGTCGATGAAG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U4-R	5'- CAAGCGTCTTYAAATGCTGCATAAC-3'		



جدول ۳- درصد شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی قطعات هشت گانه جدایه‌های ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا با سایر جدایه‌های ثبت شده در GenBank

(نمونه‌های C-Lor-1، C-Lor-28، و C-Ker-21 به ترتیب نخود ۱ لرستان، نخود ۲۸ لرستان و نخود ۲۱ کرمانشاه)

**Table 3.** Percentage of amino acid and nucleotide sequence identity of 8 genomic DNA of Iranian FBNYV isolates in compare of other FBNYV isolates available in GenBank (C-Lor-1: Chickpea of Lorestan No.1, C-Lor-28: Chickpea of Lorestan No.28, C-Ker-21: Chickpea of Kermanshah No.21)

Genome component	FBNYV Isolates			Iranian FBNYV Isolates					
	Host	Country	Acc. number	C-Lor-1		C-Lor-28		C-Ker-21	
				Nt (%)	aa (%)	nt (%)	aa (%)	nt (%)	aa (%)
DNA-C	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979011	94.3	85.6	94.4	85.9	94.7	87.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979002	95.8	88.9	95.7	88.5	96.1	90.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979021	93.5	84.6	93.4	84.3	93.2	83.4
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979029	93.3	84.3	93.2	84.0	93.0	83.1
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979037	93.6	85.0	93.5	84.6	93.0	82.4
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274023	92.6	82.4	92.5	82.0	92.4	82.1
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC003559	89.9	79.4	89.8	79.1	89.7	78.5
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132179	89.8	79.4	89.7	79.1	89.5	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431393	92.5	82.0	92.4	81.7	92.4	81.4
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431392	92.6	82.0	92.5	81.7	92.7	82.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431391	92.5	82.0	92.4	81.7	92.6	82.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431390	92.5	82.0	92.4	81.7	92.4	81.4
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431389	93.1	83.3	93.0	83.0	92.6	81.4
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431388	91.6	78.4	91.5	78.1	91.4	77.9
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431387	91.6	78.4	91.5	78.1	91.2	76.5
DNA-M	<i>V. faba</i>	Spain	KC979022	89.4	74.4	89.2	74.4	90.4	78.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979038	89.2	76.0	89.2	76.0	90.6	77.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979030	89.5	75.4	89.5	75.4	90.9	78.8
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979003	91.0	80.8	91.2	80.8	90.8	80.4
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979018	93.5	86.9	93.8	86.9	93.0	85.2
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979012	90.9	80.5	91.1	80.5	91.0	80.4
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274027	89.4	73.4	89.6	73.4	91.0	76.8
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	AF159705	81.0	69.9	81.2	73.4	80.8	72.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003562	80.4	62.3	80.6	62.3	82.4	65.9
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132182	80.2	60.1	80.4	60.1	82.2	63.0
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11407	83.2	65.5	83.4	65.5	84.9	69.5
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431394	82.1	58.1	82.3	58.1	83.2	61.1
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431395	82.2	58.8	82.4	58.8	83.3	61.7
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431400	89.0	76.4	89.0	76.4	90.3	77.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431399	89.1	74.8	88.9	74.8	89.8	75.6
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431398	89.1	77.3	89.1	77.3	90.5	78.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431397	88.9	75.7	88.9	75.7	90.3	76.8
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431396	88.4	75.6	88.4	75.6	89.4	75.9
DNA-N	<i>Cicer arietinum</i>	Iran	AM493898	99.5	98.7	99.4	98.7	97.9	94.0
	<i>V. faba</i>	Iran	AM493901	96.8	91.3	96.9	91.3	99.0	97.3
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979004	92.2	81.5	92.3	81.5	93.3	87.5
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979013	91.4	84.9	91.5	84.9	92.9	86.0
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979023	91.8	82.9	91.9	82.9	92.9	85.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979031	91.8	82.6	91.9	82.6	92.9	84.9
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979039	91.8	82.2	91.9	82.2	93.0	85.2
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274030	92.4	84.0	92.5	84.0	93.4	86.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003566	92.2	79.8	92.3	79.8	93.5	82.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431403	92.2	83.9	92.3	83.9	93.3	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431404	92.2	84.3	92.3	84.3	92.9	85.0
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431405	92.2	83.9	92.3	83.9	93.3	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431406	92.3	83.9	92.4	83.9	93.4	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431407	92.2	83.6	92.3	83.6	93.3	85.9

	<i>V. faba</i>	Syria	KX431402	90.9	78.3	91.0	78.3	93.2	82.3
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431401	90.9	78.0	91.0	78.0	93.2	82.0
<b>DNA-R</b>	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979000	98.8	96.7	99.0	97.4	98.4	95.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979009	98.9	96.7	99.1	97.4	98.5	95.0
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979019	97.5	92.4	97.3	91.7	97.1	90.7
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979027	97.7	93.0	97.5	92.4	97.3	91.4
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979035	97.7	93.0	97.5	92.4	97.3	91.4
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663168	99.3	98.7	99.1	98.0	99.3	98.3
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274025	97.5	93.7	97.5	93.7	97.4	92.0
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003560	96.0	89.4	96.0	89.4	96.2	89.4
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132180	95.9	88.1	95.9	88.1	96.1	88.4
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11407	96.2	90.1	96.2	90.1	96.4	90.1
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431380	96.2	90.6	96.2	90.6	96.5	90.3
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431381	96.1	90.3	96.1	90.3	96.4	89.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431382	97.4	92.4	97.2	91.7	97.0	90.7
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431383	97.2	90.7	97.0	90.1	96.6	89.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431384	95.8	87.7	95.8	87.7	95.9	86.8
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431385	97.3	91.7	97.1	91.0	96.7	90.0
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431386	97.2	91.4	97.0	90.7	96.8	89.7
<b>DNA-S</b>	<b><i>Cicer arietinum</i></b>	<b>Iran</b>	AM493899	99.1	98.1	99.2	98.1	96.6	92.7
	<i>V. faba</i>	Iran	AM493900	94.7	87.3	94.8	87.3	97.6	93.9
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979001	95.5	89.9	95.6	89.9	95.6	90.2
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979010	87.9	72.8	87.8	72.8	90.3	77.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	GQ371215	89.3	81.0	89.1	81.5	92.2	88.3
	<b><i>Lens culinaris</i></b>	<b>Azerbaijan</b>	GQ351600	89.0	81.3	88.9	81.2	92.3	88.5
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979020	87.8	72.5	87.9	72.5	90.4	77.3
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979028	87.8	72.5	87.9	72.5	90.4	77.3
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979036	87.4	72.1	87.5	72.1	89.9	76.9
	<i>V. faba</i>	Spain	DQ830990	91.6	85.4	91.7	85.6	93.2	87.0
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663169	87.2	70.4	87.3	70.4	89.7	75.5
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274028	87.7	71.9	87.6	71.9	90.2	76.7
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003563	88.2	73.9	88.3	73.9	90.4	78.0
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132183	88.3	73.9	88.4	73.9	90.5	77.7
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11408	88.0	74.0	88.1	74.0	90.3	78.8
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431408	85.5	70.4	85.6	70.4	87.4	73.9
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431409	86.2	72.0	86.3	72.0	88.1	75.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431410	87.9	72.8	88.0	72.8	90.5	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431411	87.6	71.8	87.7	71.8	90.2	76.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431412	87.7	72.8	87.8	72.8	90.3	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431413	87.5	71.8	87.5	71.8	90.0	76.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431414	87.8	73.1	87.9	73.1	90.4	78.2
<b>DNA-U1</b>	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979005	98.3	95.1	98.2	95.1	98.2	95.1
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979014	89.8	76.8	89.9	76.5	89.8	75.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979024	89.2	75.5	89.1	76.1	89.6	76.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979032	89.1	75.2	89.0	75.8	89.5	76.5
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979040	89.4	74.8	89.3	75.5	89.8	76.1
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663170	88.8	72.9	88.9	72.5	88.8	72.5
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274026	87.9	69.6	87.8	70.3	88.1	70.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003561	87.1	69.3	87.4	68.6	87.1	68.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132181	87.1	69.3	87.4	68.6	87.1	68.3
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11406	87.8	73.9	87.9	73.9	87.8	73.2
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431415	87.4	73.9	87.5	73.9	87.2	72.5
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431416	87.2	72.5	87.3	72.5	87.0	71.6
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431417	89.4	75.2	89.3	75.8	89.8	76.8
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431418	88.9	73.2	88.8	73.9	89.3	74.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431419	88.8	73.5	89.1	72.9	88.8	72.5
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431420	89.0	73.9	88.9	74.5	89.4	75.2	
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431421	89.0	73.5	88.9	74.2	89.4	74.8	
<b>DNA-U2</b>	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979006	97.1	91.6	97.1	91.6	97.2	91.9

<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979015	92.3	80.6	92.3	80.6	92.6	81.9
<i>V. faba</i>	Spain	KC979025	91.4	77.9	91.4	78.3	91.7	78.9
<i>V. faba</i>	Spain	KC979033	91.3	77.5	91.3	77.9	91.5	78.2
<i>V. faba</i>	Spain	KC979041	91.7	79.2	91.7	79.5	92.0	79.9
<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663171	96.1	89.0	95.9	88.3	96.4	89.6
<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274029	90.6	77.6	90.4	77.3	90.6	77.5
<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003564	79.0	59.2	79.0	58.9	79.3	59.7
<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132184	79.1	59.2	79.1	58.9	79.4	60.1
<i>V. faba</i>	Syria	Y11409	85.4	69.1	85.6	69.5	85.7	69.1
<i>V. faba</i>	Syria	KX431422	87.5	73.2	87.6	73.2	87.8	73.2
<i>V. faba</i>	Syria	KX431423	90.4	77.5	90.6	78.5	90.9	78.9
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431424	90.9	77.2	91.1	77.9	91.4	78.5
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431425	90.7	78.5	90.9	79.5	91.2	79.8
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431426	87.6	73.2	87.7	73.2	87.9	73.2
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431427	90.1	76.1	90.3	76.8	90.6	78.1
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431428	90.9	79.2	91.1	80.2	91.4	80.5
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979007	99.1	98.4	99.2	98.4	98.4	96.1
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979016	93.4	88.4	93.5	88.4	93.7	87.5
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979017	96.6	93.5	96.5	93.5	96.3	92.5
<i>V. faba</i>	Spain	KC979034	89.4	78.2	89.3	78.2	89.4	79.4
<i>V. faba</i>	Spain	KC979042	89.3	78.2	89.2	78.2	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Spain	KC979026	89.3	78.2	89.2	78.2	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274024	88.0	78.2	87.9	78.2	88.3	77.8
<i>V. faba</i>	Egypt	NC_024457	83.2	67.8	83.1	67.8	83.3	68.6
<i>V. faba</i>	Egypt	AJ749902	83.2	67.8	83.1	67.8	83.3	69.0
<i>V. faba</i>	Syria	AJ749903	84.2	70.7	84.1	70.7	84.3	72.5
<i>V. faba</i>	Syria	KX431429	86.0	71.3	85.9	71.3	86.1	72.9
<i>V. faba</i>	Syria	KX431430	86.2	72.6	86.1	72.6	86.3	74.2
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431431	89.0	77.9	89.1	77.9	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431432	88.9	77.9	89.0	77.9	89.2	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431433	88.9	77.9	89.0	77.9	89.2	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431434	88.6	77.9	88.7	77.9	88.9	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431435	89.1	77.9	89.2	77.9	89.4	79.4

## DNA-U4

آذربایجان (Acc. No. KC979018, Acc. No. KC979003 و Acc. No. KC979012) با هم در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

در درخت تبارزایی قطعه U1 جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه یک جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979005) با هم در یک زیر گروه از گروه II قرار گرفتند (شکل ۶). درخت تبارزایی قطعه U2 نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی با جدایه کشور آذربایجان (Acc. No. KC979006) و جدایه اتیوپی (Acc. No. HE663171) در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶). درخت تبارزایی قطعه U4 نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی با ۲ جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979007, Acc. No. KC979017) در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

درخت تبارزایی قطعه S نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی در این تحقیق با دو جدایه ایران (لرستان (Acc. No. AM493899) و کرمانشاه (Acc. No. AM493900) و جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979001) در یک گروه (گروه II) قرار گرفتند (شکل ۶).

در درخت تبارزایی قطعه N جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه جدایه‌های ایرانی (Acc. No. AM493898 و Acc. No. AM493901) با هم در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

درخت تبارزایی قطعه C نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی در این تحقیق با جدایه کشور آذربایجان (Acc. No. KC979002) در یک گروه (گروه II) قرار گرفتند (شکل ۶). در درخت تبارزایی قطعه M جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه ۳ جدایه از کشور



شکل ۶- درخت تبارزایی حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم جدایه‌های ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV) با سایر ترادف‌های نوکلئوتیدی ثبت شده از این ویروس با استفاده از نرم افزار MEGA6. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. از ویروس Banana bunchy top virus (BBTV) به عنوان ویروس خارج از گروه (outgroup) استفاده شد.

**Fig. 6.** Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of Faba bean necrotic yellow virus (FBNYV) isolates compare with other isolate of this virus using MEGA6 program. Numbers on the branches indicate bootstrap percentage. In Phylogenetic analysis Banana bunchy top virus (BBTV) were used as outgroup.

(گروه II) قرار گرفته‌اند اما قطعه (DNA-N) در سه جدایه ایرانی بیشترین شباهت را با دو جدایه ایرانی FBNYV-[IR;1] و FBNYV-[IR;2] (بنانج و همکاران، داده‌های منتشر نشده) داشته و تشکیل یک زیرگروه مستقل در گروه I را داده‌اند (شکل ۶). قطعات (R، M، U2 و U4) در ۳ جدایه ایرانی با هر دو جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] مشابهت داشته و در یک زیرگروه در گروه I قرار گرفته‌اند (شکل ۶). گریگورایس و همکاران گزارش کرده‌اند که احتمالاً جدایه FBNYV-[AZ;13.5] تیپ معمولی FBNYV (type common) در منطقه دریای خزر و ایران می‌باشد (Grigoras *et al.*, 2014) درحالی که درخت تبارزایی‌های ترسیم شده خلاف مطلب فوق می‌باشد به‌طوری‌که قطعات (S، C و U1) بیشترین شباهت را با جدایه FBNYV-[AZ;12]، قطعات (R، M، U2 و U4) در ۳ جدایه ایرانی با هر دو جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] مشابهت داشته و قطعه N در سه جدایه ایرانی مورد بررسی در این تحقیق بیشترین شباهت را با دو جدایه ایرانی FBNYV-[IR;1] و FBNYV-[IR;2] داشته و در یک زیرگروه از گروه I قرار گرفته‌اند. علت وجود تنوع قطعات در جدایه‌های ایرانی را می‌توان به وقوع پدیده نوجوری (reassortment) نسبت داد. حضور هم‌زمان جدایه‌های مختلف یکی از پیش شرط‌های وقوع نوجوری و نوترکیبی (recombination) در میان جدایه‌های ویروسی خصوصاً در تیره ویروس‌های دوقلو *Geminiviridae* و تیره نانوویریده *Nanoviridae* می‌باشد. با توجه به تشخیص آلودگی در ایران (Makkouk *et al.*, 2002) در مقایسه با آذربایجان (Grigoras *et al.*, 2009) و هم چنین سابقه کشت نخود در ایران می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً جدایه‌های مختلفی از ویروس زردی بافت مرده باقلا در ایران وجود دارد و برای دستیابی به وضعیت چگونگی تکامل طبیعی، تعیین منشأ ویروس و ارتباط آن با جدایه‌های آذربایجان نیاز به انجام نمونه‌برداری‌های بیشتر می‌باشد.

جدول ۴- اندازه قطعات مختلف ژنوم جدایه‌های ایرانی ویروس

زردی بافت مرده باقلا

**Table 4-** Genomic Fragments size of Iranian isolates of Faba bean necrotic yellows virus

Isolate	Component	Size of DNA (nts)
	R	1003
	S	1005
	C	993
Chickpea-Lor-1,	M	992
Chickpea-Lor-28,	N	987
Chickpea-Ker-21	U1	987
	U2	987
	U4	989

مقایسه ترادف ۳ جدایه از اسپانیا و یک جدایه از مراکش نشانگر شباهت زیاد آنها با یکدیگر و احتمال انتقال آن از مراکش به جنوب اروپا می‌باشد. علاوه بر این، این جدایه‌ها ممکن است نمایانگر تیپ معمولی FBNYV (type common) در مراکش و جنوب غربی اروپا باشد (Grigoras *et al.*, 2014). تاکنون قطعات ۸ گانه ژنوم دو جدایه FBNYV از کشور آذربایجان به نام‌های FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] تعیین ترادف شده‌اند. جدایه‌های آذربایجان در یک گروه مستقل بین جدایه‌های خاورمیانه (سوریه و مصر) از یک طرف و اسپانیا و مراکش از طرف دیگر قرار گرفته‌اند. تفاوت ژنتیکی دو جدایه مذکور بیش از تفاوت ژنتیکی جدایه‌های اسپانیا و مراکش با یکدیگر می‌باشد در حالیکه فاصله محل نمونه برداری دو جدایه آذربایجان تنها ۵۰۰ متر بوده است. مقایسه ترادف قطعات (DNA-S و DNA-N) جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] نشانگر شباهت زیاد با جدایه ایران FBNYV-[IR;1] (لرستان-الشترا، Acc. No. AM493899 and Acc. No. AM493898) بود در حالیکه جدایه FBNYV-[AZ;13.5] بیشترین شباهت را با جدایه ایران FBNYV-[IR;2] (کرمانشاه) (Acc. No. AM493900) و Acc. No. AM493901 داشت (Grigoras *et al.*, 2014). درخت تبارزایی‌های حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم ۳ جدایه ایرانی FBNYV (شکل ۶) نشانگر آن است که علاوه بر قطعه (DNA-S)، قطعات (C و U1) جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق نیز بیشترین شباهت را با جدایه FBNYV-[AZ;12] از آذربایجان داشته و در یک گروه مستقل

## References

- ALAVINEJAD, E., S. A. A. BEHJATNIA, K. IZADPANAH and M. MASOUMI, 2011. Molecular detection of *Faba bean necrotic yellows virus* in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. The 7<sup>th</sup> National Biotechnology Congress of I. R. Iran. 6 pp. (in Persian with English summary).
- ANONYMOUS, 2015. Statistical annual report of Iranian agricultural crops (in Persian).
- ARONSON, M. N., A. D. MEYER, J. GYRGYEV, L. KATUL, H. J. VETTEN, B. GRONENBORN and T. TIMCHENKO, 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *Journal of Virology*, No. 74: 2967-2972.
- BABIN, M., V. ORTIZ, S. CASTRO and J. ROMERO, 2000. First detection of *faba bean necrotic yellows virus* in Spain. *Plant Dis*, No.84: 707.
- FAOSTAT, 2014. Prunus production: National Agricultural statistics Service, USDA.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK and H. J. VETTEN, 1995. *Faba bean necrotic yellows virus* naturally infects Phaseolus bean and cowpea in the coastal area of Syria. *Journal of Phytopathology*, No. 143(5):319-320.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK, L. KATUL and H. J. VETTEN, 1996. Monoclonal antibodies for the detection and differentiation of *faba bean necrotic yellows virus* isolates. *Ann Appl Biol.*, No.128: 255-268.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK and H. J. VETTEN, 1998. Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Phytopathology*, NO. 146(7): 347-355.
- FRANZ, A., F. VAN DER WILK, M. VERBEEK, A. M. DULLEMANS and J. F. J. M. VAN DEN HEUVEL, 1999. Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology*, NO. 262: 210-219.
- GRONENBORN, B. 2004. *Nanoviruses: genome organization and protein function*. *Veterinary Microbiology*, NO. 98: 103- 109.
- GRIGORAS, I., A. L. GINZO, D. P. MARTIN, A. VARSANI, J. ROMERO, V. A. CH. MAMMADO, I. M. HUSEYNOVA, J. A. ALIYEV, A. KHEYRPOUR, H. HUSS, H. ZIEBELL, T. TIMCHENKO, H. J. VETTEN, and B. GRONENBORN, 2014. Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Journal of General Virology*, NO.95:1178-1191.
- GRIGORAS, I., T. TIMCHENKO, L. KATUL, A. GRANDE-PEREZ, H. J. VETTEN and B. GRONENBORN, 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *Journal of Virology* .NO.83: 10778-10787.
- HORN, N. M., K. M. MAKKOUK, S. G. KUMARI, J. F. VAN DEN HEUVEL and D. V. R. REDDY, 1995. Survey of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for chickpea stunt disease and associated viruses in Syria, Turkey and Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea*, NO. 34: 192-198.
- KATUL, L., H. J. VETTEN, E. MAISS, K. M. MAKKOUK, D. E. LESEMANN and R. CASPER, 1993. Characteristics and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Annals of Applied Biology*, NO. 123: 629- 647.
- KOONIN, E. V. and T. V. ILYINA, 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology*, NO. 73(10):2763-2766.
- KUMARI, S. G., N. ATTAR, E. MUSTAFAYEV and Z. AKPAROV, 2009. First report of *faba bean necrotic yellows virus* affecting legume crops in Azerbaijan. *Plant Disease*, NO. 93: 1220.
- MAKKOUK, K. M., S. G. KUMARI and R. AL-DAOUD, 1992. Survey of viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Med.) in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, NO.31(3): 188-190.
- MAKKOUK, K. M., Y. FAZLALI, S. G. KUMARI and S. FARZADFAR, 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, NO. 51: 387-387.
- MAKKOUK, K. M., L. RIZKALLAH, M. MADKOUR, M. EL-SHERBEENY, S. G. KUMARI, A. W. AMRITI and M. B. SOHL, 1994. Survey of faba bean (*V. faba* L.) for viruses in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea*, NO. 33(3): 207-211.
- MAKKOUK, K. M., B. M. MUHAMMAD and R. JONENS, 1998a. First Record of *Faba Bean Necrotic Yellow Virus* and *Beet Western Yellow Luteovirus* Affecting Lentil and Chickpea in Pakistan. *Plant disease of APS. Journals*. NO. 5:591.
- MAKKOUK, K. M., L. KATUL, S. G. KUMARI and H. J. VETTEN, 1998b. Characterization and control of faba bean necrotic yellows nanovirus affecting legume crops in west Asia and North Africa. In: *Proceedings of the Eighth Turkish Phytopathological Congress*, 21-25 September, 1998. Turkey: Ankara University. NO. 210-217.
- MAKKOUK, K. and S. KUMARI, 2009. Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa *Virus Research* Vol.141 (2), Pages, 29-218.
- MANSOURPOUR, M., A. MASSAH, A. AHOONMANESH and M. R. LAK, 2010. Detection and determination of certain molecular properties of *Faba bean necrotic yellows virus* in central and western provinces of Iran. 19th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p 769, (in Persian with English summary).
- NAJAR, A., K. M. MAKKOUK and S. G. KUMARI, 2000. First record of *faba bean necrotic yellows virus* and *beet western yellows virus* infecting faba bean in Tunisia. *Plant Disease*, NO. 84(9):1046.
- PARSA, M. and A. BAGHERI, 2008. *Pulses*. Jihad Daneshgahi Publication. 522p.(in Persian).
- SAITOU, N. and M. NEI, 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. NO.4: 406-425.
- 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.
- TIMCHENKO, T., L. KATUL, Y. SANO, F. DE KOUCHKOVSKY, H. J. VETTEN and B. GRONENBORN, 2000. The master Rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology*, NO. 274: 189-195.
- VAFAEI, S. H., N. AZADBAKHT, N. SHAHRAEEN and N. HAJI, 2008. Survey virus disease of chickpea and lentil in province of Lorestan. 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran.525. (In Persian with English summary).

