آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۲، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۳

وقوع ویروس زردی غربی چغندرقند (BWYV) در مزارع یونجه لرستان و ایلام و تعیین جایگاه تاکسونومی آن بر اساس ژن پروتئین پوششی (CP)*

شیرین فرزادفر[1]✉، رضا پوررحیم[1] و مژده ملکی[2]
۱- بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، تهران
(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲)

چکیده

طی دو سال ۹۱-۱۳۹۰، مجموعاً ۹۳۲ نمونه برگی یونجه با علائم زردی، قرمز شدن برگ‌ها، نکروز و کم‌رشدی از دو استان لرستان و ایلام جمع‌آوری گردید. بر اساس آزمون سرولوژیکی لکه‌گذاری بافتی و بکارگیری پادتن تک همسانه‌ای 5G4 (اختصاصی علیه لوتئوویروس‌ها) ۳۵ درصد نمونه های تصادفی دارای واکنش مثبت بودند. آنالیز مولکولی نشان دهنده آلودگی این نمونه‌ها به ویروس زردی غربی چغندرقند (BWYV) از جنس پولروویروس بود. نموده‌سازی بیولوژیکی با تلقیح بوته‌های سالم توسط شته سبز هلو، منجر به تولید علائم رگبرگ روشنی در رقم IC1 چغندرقند، زردی رگبرگ در کلزا رقم Otsubu، زردی رگبرگ و کم‌رشدی در خردل سفید و نیز زردی رگبرگ شدید در یونجه همدانی گردید. ناحیه ژن پروتئین پوششی (CP) با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و منجر به تولید قطعه مورد نظر به طول حدود ۵۶۰ جفت‌باز گردید. نتایج حاصل از تعیین نقشهٔ تحدید قطعات به کمک آنزیم‌برشی *Sma* I تایید کننده آلودگی نمونه‌ها با BWYV بود. آنالیز توالی‌ها، نشان دهنده وجود ۹۸/۶ تا ۹۹/۴ درصد شباهت نوکلئوتیدی در بین جدایه‌های ایرانی بود. کمترین و بیشترین شباهت به ترتیب ۹۲/۵ و ۹۷ درصد با جدایه ایتالیایی (L40020) و جدایه فرانسوی FL1 (X13063) تعیین گردید. بر اساس درخت تبارزایی بروش NJ جدایه‌های ایرانی BWYV به دو زیر گروه تقسیم شدند. این اولین گزارش از آلودگی مزارع یونجه با BWYV و تعیین توالی ژن CP جدایه‌های یونجه آن در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس زردی غربی چغندرقند، یونجه، سرولوژی، رونوشت برداری برگردان- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

Incidence of *Beet western yellows virus* (BWYV) in alfalfa fields of Lorestan and Ilam provinces (West Iran) and its taxonomical place using coat protein gene

SH. FARZADFAR✉[1], R. POURRAHIM[1] and M. MALEKI[2]
1- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran; 2- Islamic Azad University, Faculty of agriculture, Varamin - Pishva branch, Iran

Abstract

During 2011 and 2012, a total of 932 alfalfa leaf samples with yellows, reddening, necrosis and stunting were collected from Lorestan and Ilam provinces. Samples were tested by tissue blot immuno assay (TBIA) using 5G4 monoclonal antibody (a broad spectrum antibody against wide range of legume infecting luteoviruses) in which 35% of random leaf samples showed positive reaction. Molecular analysis confirmed the infection of samples by *Beet western yellows virus*-BWYV (*Polerovirus* genus). Inoculation tests using green peach aphids (*Myzus persicae*) induced vein clearing in sugar beet cv. IC1, vein yellowing in canola (cultivar Otsubu), stunting in white mustard and severe vein yellowing in alfalfa cv. Hamedani. A DNA fragment with the expected length of 560 bp corresponding to BWYV coat protein (CP) gene was amplified. PCR-RFLP analysis using *Sma* I also revealed BWYV specific profile for the studied isolates. The identity of BWYV-CP gene was 98.6 to 99.4 %.among the Iranian isolates at nt levels The lowest and highest sequence identities were 92.5 % and 97 % with isolates from Italy (L40020) and FL1 (X13063) from France, respectively. Phylogenetic tree using NJ method showed that Iranian BWYV isolates clustered into two subgroups. This is the first report of BWYV occurrence in alfalfa fields in Iran and their CP nucleotide sequences.

Key words: *Beet western yellows virus*, Alfalfa (*Medicago sativa*), Serology, RT-PCR.

✉ **Corresponding author: farzadfar2002@yahoo.com**

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) از مهم‌ترین محصولات علوفه‌ای است که مهد آن را به آسیای مرکزی، خاور نزدیک و غالباً کشور ایران نسبت داده و از زمان‌های بسیار قدیم در آن کشت می‌شده است (Karimi, 1990). سطح زیر کشت این گیاه در جهان حدود ۳۵ میلیون هکتار است. حدود یک میلیون هکتار (معادل ۸ درصد) سطح زیر کشت محصولات سالانه کشور متعلق به گیاهان علوفه‌ای است که کل تولید آن حدود ۱۵ میلیون تن می‌باشد. از مجموع سطح زیر کشت گیاهان علوفه‌ای، ٦٢ درصد به یونجه تعلق دارد (Anonymous, 2010). این آمار نشان دهنده جایگاه ویژه یونجه در بین گیاهان علوفه‌ای است. یونجه میزبان بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی و ویروسی می‌باشد که منجر به کاهش محصول و افت عملکرد آن می‌گردند. تاکنون ۳۱ ویروس از مزارع یونجه دنیا گزارش شده است (Jones, 2004). ویروس‌های عامل زردی در گیاهان عمدتاً محدود به آوندهای آبکش بوده و به صورت مکانیکی قابل انتقال نمی‌باشند. از جمله مهم‌ترین ویروس‌های عامل زردی می‌توان به ویروس‌های عضو خانواده لوتئوویریده (Luteoviridae) اشاره نمود (King *et al*. 2012). در نتیجه آلودگی به این ویروس‌ها لوله‌های غربالی تخریب شده و جابجایی مواد غذایی از طریق مسیرهای آوندی مختل می‌گردد. همین مسئله موجب ضعف گیاه و بازماندن از رشد شده، زردی و حتی مرگ قبل از بلوغ گیاه را بدنبال دارد. مجموع این علائم منجر به جلب حشرات مختلف ناقل از جمله شته‌ها و سفیدبالک‌ها (*Bemisia tabaci*) شده و شرایط را برای ایجاد آلودگی‌های توام در این گیاهان فراهم می‌سازد. به این ترتیب میزان آلودگی و نیز خسارت وارده افزایش می‌یابد (Loebenstein *et al*. 2001).

ویروس زردی غربی چغندرقند (*Beet western yellows virus*-BWYV) که اولین بار توسط Duffus در سال ۱۹٦۴ توصیف شده است، بدون شک یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی عضو جنس پولروویروس می‌باشد که در تمام نقاط دنیا گسترش دارد (Domier and D'Arcy, 2008; Sutic *et al*. 1999). این ویروس دامنه میزبانی وسیعی در میان گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای داشته و خسارت زیادی را وارد می‌نماید (Jones *et al*. 1991). این ویروس در بین کلیه ویروس‌های عامل زردی لگوم، دارای وسیع‌ترین دامنه میزبانی لگومی می‌باشد. بیش از ۱۵۰ گونه در ۲۰ خانواده دولپه به این ویروس حساس می‌باشند (Domier and D'Arcy, 2008). برخی از گونه‌های *Medicago* نیز از گیاهان حساس به این ویروس هستند (Brunt *et al*. 1996). همچنین آلودگی مزارع یونجه به BWYV از جنوب غربی استرالیا گزارش شده است (Jones, 2004). دامنه میزبانی آزمایشی این ویروس شامل بیش از ۹۰ خانواده گیاهی است، اغلب گیاهانی که به طور آزمایشی آلوده می‌شوند علائم زردی، قرمزی و بازماندن از رشد را نشان می‌دهند (Domier and D'Arcy, 2008). در ایران، BWYV اولین بار توسط Hajimorad *et al*. (1993) از مزارع چغندر گزارش شده است. ولی اولین گزارش این ویروس از محصولات لگومی ایران، توسط Makkouk *et al*. (2003) از مزارع نخود ارائه شده است.

برای شناسایی ویروس‌های عامل زردی از جمله لوتئوویروس‌ها روش‌های مولکولی دقیق و به کارگیری آغازگرهای مناسب توصیه شده است (Abraham *et al*. 2008; Domier and D'Arcy, 2008). همچنین گزارش شده است که با تکثیر ژن پروتئین پوششی و به کمک روش هضم آنزیمی (restriction fragment length polymorphism-RFLP) و استفاده از دو آنزیم برشی *Sma*I و *Rsa*I می‌توان دو جنس *Luteovirus* و *Polerovirus* را از یکدیگر تمایز داد (Abraham *et al*. 2008; Vigano and Stevens, 2007; Robertson *et al*. 1991).

داشتن اطلاعات در مورد وقوع و پراکنش بیماری‌های ویروسی شایع در مناطق کشت هر محصول یکی از مهم‌ترین اولویت‌ها به منظور توسعه ارقام جدید و مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌باشد. تاکنون ویروس‌های عامل موزائیک از جمله موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*-AMV) (Kaiser *et al*.

1968)، موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*-CMV)، موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*-BYMV) و موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*-BCMV) (Bananej *et al*. 1995) از مزارع یونجه کشور گزارش شده‌اند. اخیراً ویروس پیچیدگی برگ باقلا (*Bean leaf roll virus*-BLRV) از لوتئوویروس‌ها از مزارع یونجه جنوب کشور گزارش شده است (Massumi *et al*. 2012) ولی تاکنون در خصوص ویروس‌های عامل زردی در مزارع یونجه بویژه در استان‌های غربی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در این تحقیق احتمال دخالت لوتئوویروس‌های عامل زردی و پراکنش آن‌ها در مزارع یونجه دو استان لرستان و ایلام با استفاده از روش‌های سرولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

بازدید از مزارع و نمونه‌برداری: طی پاییز ۱۳۹۰ تا بهار ۱۳۹۱ از مناطق مهم کشت یونجه در شهرستان‌های دو استان ایلام و لرستان بازدید و از مزارع مورد نظر نمونه‌برداری انجام گردید (جدول ۳). در مجموع ۹۳۲ نمونه علائم‌دار و تصادفی از دو استان لرستان و ایلام جمع‌آوری گردید. از این تعداد ۲۵۲ نمونه علائم‌دار (به ترتیب ۱۹۱ و ۶۱ نمونه از استان لرستان و ایلام) و ۶۸۰ نمونه تصادفی (به ترتیب ۴۹۶ و ۱۸۴ نمونه از استان لرستان و ایلام) بود. در هر مزرعه نمونه‌های تصادفی با حرکت بصورت زیگزاگ در اقطار مزرعه و به فواصل هر سه تا پنج متر برداشت شده و نیز درصد بوته‌های دارای علائم زردی بصورت مشاهده‌ای یادداشت برداری گردید. نمونه‌ها با ذکر مشخصات محل و مزرعه، داخل کیسه‌های نایلونی و درون جعبه‌های یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

آزمون لکه‌گذاری بافتی (Tissue Blot Immunoassay-TBIA): به منظور بررسی آلودگی ویروسی، همه نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش TBIA مورد سنجش قرار گرفتند (Makkouk and Kumari, 1996). پس از برش عرضی در دمبرگ نمونه‌ها لکه‌گذاری روی کاغذ نیتروسلولز (Protan 45، ساخت شرکت S&S آلمان) انجام گردید. پس از لکه‌گذاری و خشک شدن کامل کاغذها سه بار عمل شستشو توسط بافر PBS-T (شامل: NaCl 0.13M، KCl 0.003M، KH_2PO_4 0.001M، Na_2HPO_4 0.008M، NaN_3 0.003M، اسیدیته ۷/۴، حاوی ٪۲ PVP-24000 و ۰/۰۵ درصد Tween 20) انجام گرفت. سپس برای انجام مرحله بلاکینگ (blocking) کاغذ نیتروسلولز به مدت یک ساعت در محلول PBS-T حاوی ۲/۵ درصد شیر خشک بدون چربی، در دمای اتاق تیمار و پس از سه بار شستشو، به مدت یک ساعت در محلول بافر PBS (اسیدیته ۷/۴ و محتوی 2% PVP-24000، Tween-20 0.5ml، $MgCl_2$.6H2O 0.001M) حاوی رقت ۱/۱۰۰۰ از پادتن تک همسانه‌ای (5G4) با قابلیت واکنش با طیف وسیعی از لوتئوویروس‌های لگومینوز (اهدایی از مرکز ایکاردا–سوریه) برای سنجش آلودگی لوتئویروس‌های مهم عامل زردی استفاده شد. پادتن 5G4 قادر به واکنش با چندین لوتئوویروس بیمارگر در لگوم‌ها می‌باشد (Katul, 1992). در مرحله بعد و پس از شستشو، غشاهای نیتروسلولزی یک ساعت در محلول بافر کانجوگیت حاوی رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتی بادی (goat anti-mouse) متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز قرار گرفتند. غشا نیتروسلولزی قبل از قرار گرفتن در محلول رنگ‌آمیزی، به مدت ۲۰ دقیقه در بافر Tris-HCl (اسیدیته ۹/۵)، حاوی NaCl (0.1M) و $MgCl_2$ (5mM) قرار گرفته و سپس به محلول رنگ‌آمیزی تازه تهیه شده انتقال داده شد. این محلول شامل یک میلی‌گرم نیتروبلو تترازولیوم (NBT) در ۳ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (0.1M) با اسیدیته ۹/۵ بود که بلافاصله قبل از استفاده، به آن ۱۰ میکرولیتر ان و ان دی متیل فرمامید (N,N-dimetylformamide) حاوی نیم میلی گرم از ترکیب ۵ـ برومو ـ٤ـ کلرو ـ ۳ـ ایندولیل فسفات (BCIP) اضافه گردید. نمونه‌هایی که محل اثر آن‌ها روی غشا نیتروسلولزی به رنگ ارغوانی تا بنفش درآمده بود، به عنوان نمونه مثبت یا

آلوده در نظر گرفته شدند.

استخراج آر.ان.ای و RT-PCR: در این مرحله ۳۰ نمونه دارای واکنش مثبت با پادتن تک همسانه‌ای 5G4 بر اساس مناطق جغرافیایی و پراکندگی در مزارع دو استان مورد بررسی انتخاب شده و احتمال آلودگی آنها با لوتئوویروس‌ها با استفاده از روش رونوشت‌برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از یک جفت آغازگر عمومی توصیف شده برای ردیابی لوتئوویروس‌های آلوده کننده لگوم‌ها (Abraham *et al.* 2008) و یک جفت آغازگر اختصاصی برای ردیابی BWYV (Stevens *et al.* 2005) استفاده شد (جدول ۱). ابتدا با استفاده از کیت کیاژن (QIAGEN USA) و طبق توصیه شرکت سازنده استخراج آر.ان.ای کل انجام گردید. ترکیب واکنش رونوشت برداری برگردان شامل یک میکرولیتر از آغازگر پایین دست با غلظت ۲۰ پیکومول بر میکرولیتر، دو میکرولیتر بافر MMuLV-10X (سیناژن-ایران)، دو میکرولیتر از مخلوط dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی مولار (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (Revert Aid M-MuLV) (Fermentas، لیتوانی)، نیم میکرولیتر (۲۰ واحد) (RNase inhibitor) (Fermentas، لیتوانی)، پنج میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل بود که در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط مورد نظر به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (ساخت MWG آلمان) قرار گرفت.

برای واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول cDNA، یک میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میکرولیتر محلول ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ و یک میکرولیتر آنزیم دی.ان.ای پلیمراز *Taq* (سیناژن) (۵ واحد) به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین دست (۲۰ پیکومول در میکرولیتر) استفاده گردید. برنامه PCR شامل، ۲ دقیقه ۹٤ درجه و ۳۰ چرخه شامل، ۱ دقیقه ۹٤ درجه، ۲ دقیقه ۵۵ درجه،۳ دقیقه ۷۲ درجه و در انتها ۱۰ دقیقه، دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصولات پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد تهیه شده در بافر TBE حاوی اتیدیوم بروماید رانده شد و باندهای دی.ان.ای حاصله با استفاده از دستگاه UV transilluminator (ساخت ایماکو- هلند) مشاهده و عکس برداری شدند. قطعات دی.ان.ای تکثیر یافته به کمک آغازگرهای Lut-FS1 و Lut-RAS3 در مورد حداقل سه جدایه از هر استان انتخاب شده و پس از خالص‌سازی به کمک کیت Promega PCR clean-up kit و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده، با استفاده از سرویس‌های تجاری (شرکت پویا گستر ژن)، تعیین توالی گردید.

جدایه‌های BWYV در ناحیه ژن پروتئین پوششی (BWYV-CP) دارای یک مکان برشی برای آنزیم *Sma* I می‌باشند (Robertson *et al.* 1991)، لذا به عنوان آزمون تأییدی، هر یک از محصولات دی.ان.ای که در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BWYV-CP بدست آمده بودند، بطور جداگانه توسط آنزیم برشی *Sma* I (Fermentas، لیتوانی)، مورد تیمار قرار گرفتند. اجزای مخلوط واکنش هضم آنزیمی شامل ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر، ۱۰ واحد آنزیم *Sma* I بود. واکنش هضم آنزیمی در شرایط ۴۵ دقیقه در ۳۰ درجه سلسیوس، ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۰ ساعت در ۴ درجه سلسیوس (دمای یخچال) انجام گردید. محصولات هضم آنزیمی در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و قطعات دی.ان.ای حاصله با استفاده از دستگاه UV transilluminator (ساخت ایماکو- هلند) مورد مشاهده قرار گرفتند.

آزمون انتقال و نموده‌سازی بیولوژیکی: بر اساس نتایج حاصل از آزمون نقشه تحدید، جدایه‌هایی که با BWYV آلوده بودند (از هر استان دو نمونه) انتخاب و علاوه بر روش مکانیکی، بوسیلهٔ شتهٔ سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer.) روی گیاهان محک شامل خردل سفید (*Sinapis alba* L.)، چغندرقند رقم IC1 (*Beta vulgaris* L.)، سلمک (*Chenopodium*

(*Brassica napus* L.) Otsubu، کلزا رقم (*capitatum* (L.) Asch. و یونجه همدانی (با حداقل سه تکرار) مایه‌زنی شدند. در این مطالعه، از کلنی سالم شتهٔ سبز هلو استفاده گردید. شته‌ها به مدت حداقل ۲۴ ساعت از برگ‌های بوته یونجه آلوده (تأیید شده با لکه‌گذاری بافتی) تغذیه داده شدند. سپس این شته‌ها در دستجات ۲۰ تایی روی گیاهان محک بذری سالم که بین دو تا سه هفته از کشت آن‌ها می‌گذشت، قرار داده شده و این گیاهان به زیر قفس توری انتقال داده شدند. شته‌ها مدت ۴۸ ساعت از این گیاهان تغذیه نموده و پس از این مرحله شته‌ها با استفاده از حشره‌کش ایمیداکلوپراید (شرکت سینجنتا- آلمان) سم‌پاشی شدند. جدایه‌های فوق علاوه بر تلقیح توسط انتقال با شته، به طور مکانیکی نیز با عصاره گیری از برگ بوته‌های آلوده در بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ روی گیاهان آزمون فوق‌الذکر مایه‌زنی شدند. یک ماه پس از مایه‌زنی آلودگی گیاهان با استفاده از آزمون TBIA و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

خالص‌سازی BWYV : به منظور ارزیابی ماهیت ویروس جداسازی شده، جدایه BWYV خالص‌سازی شد. جهت خالص‌سازی BWYV از روش D'Arcy *et al*. (1983) استفاده شد. برای خالص‌سازی از برگ‌های انتهایی بوته‌های خردل سفید آلوده شده در شرایط گلخانه توسط شته سبز هلو استفاده گردید. حدود ۲۴ روز پس از مایه‌زنی گیاهان، ۵۰ گرم بافت آلوده با استفاده از ازت مایع و هاون سرد بصورت پودر در آمده و بلافاصله به آن بافر فسفات (۱/ مولار، اسیدیته ۷) سرد (به ازای هر گرم بافت یک میلی‌لیتر بافر) اضافه شد. عصاره از پارچه ململ چهار لایه عبور داده شده و به آن سدیم آزاید و آنزیم پکتولایتیک (Rohament P) با غلظت نهایی به ترتیب ۱ و ۱/۵ درصد اضافه شد. عصاره به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس) نگه‌داری شد. عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شده و به رونشین حاصله پلی اتلین گلیکول ۶۰۰۰ (PEG 6000) به نسبت ۶ درصد و سدیم کلراید با غلظت نهایی ۰/۳ مولار افزوده و پس از مدت ۲ ساعت بهم زدن آرام در دمای ۴ درجه سلسیوس، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله در ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات مرحله اول حل و مجدداً مراحل رسوب دادن با PEG 6000 و سانتریفیوژ همانند مراحل بالا انجام گردید. رسوب بدست آمده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات مرحله اول حاوی یک درصد Trition X-100 حل و پس از ۲۰ دقیقه بهم زدن آرام در دمای اتاق، با ۳۳ درصد حجم خود کلروفرم مخلوط و مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه به هم زده شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰g در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. رونشین این مرحله به مدت ۳ ساعت در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیده و رسوب در ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار حل شد. آموده خالص سازی شده در دمای ۳۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

به منظور بررسی قدرت آلوده کنندگی آموده ویروس خالص، نمونه‌ای از این آموده حاوی ۲۰ درصد سوکروز تهیه و به مدت ۳ روز به روش تغذیه از طریق غشای ظریف پارافیلم در اختیار کلنی سالم شته سبز هلو (*M. persicae*) قرار گرفت (Pirone and Thornbury, 1983). این شته‌ها روی گیاهچه‌های یونجه رقم همدانی، خردل سفید و نیز کلزا در مرحله چهار برگی (۸ تا ۱۰ شته به ازای هر بوته) منتقل شده و پس از ۴ تا ۵ روز تغذیه با استفاده از حشره‌کش ایمیداکلوپراید بوته‌ها سم‌پاشی شدند. ظهور علائم ویروسی در این گیاهان و نیز آلودگی آنها به ویروس زردی غربی چغندرقند در این گیاهچه ها و آلودگی آنها به این ویروس با روش سرولوژیکی و نیز مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز تبارزایی: برای آنالیز تبارزایی از ۲۱ توالی ژن پروتئین پوششی BWYV شامل ۱۱ توالی‌جدایه‌های خارجی و نیز شش جدایه ایرانی جدا شده از کلزا (ثبت شده در بانک ژن GenBank) به همراه چهار توالی تعیین شده در این بررسی استفاده شد. فهرست و مشخصات توالی‌های ژنومی جدایه‌های خارجی BWYV که برای مقایسه با توالی

نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی این ویروس مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در جدول شماره ۲ ارائه شده است. ابتدا توالی‌های به دست آمده در این تحقیق با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) بررسی شدند. پس از هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X2 (Larkin *et al.* 2007) درخت تبارزایی این جدایه‌ها با استفاده از روش Neighbor Joining (NJ) با ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap موجود در برنامه MEGA 4 رسم گردید (Tamura *et al.* 2007).

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی Luteoviruses

Table 1. Name and sequence of primers that were used for detection of Luteoviruses

منبع Reference	اندازه محصول (جفت‌باز) Product size (bp)	توالی آغازگر Primer Sequence	آغازگرها Primers
Abraham *et al.* (2008)	600	5'-GCTCTAGAATTGTTAATGARTACGGTCG-3'	Lut-F S1
		5'-CACGCGTCIACCTATTTIGGRTTITG-3'	Lut-R AS3
Stevens *et al.* (2005)	562	5'-ATGAATACGGTCGTGGGTAGAAG-3′	BWYV-CPF
		5′-CCAGCTATCGATGAAGAACCATTG-3'	BWYV-CPR-

جدول ۲- مشخصات توالی‌های ژن پروتئین پوششی BWYV موجود در بانک ژن که در این تحقیق مورد مقایسه قرار گرفته‌اند

Table 2. Isolates which their coat protein sequences were used in this study

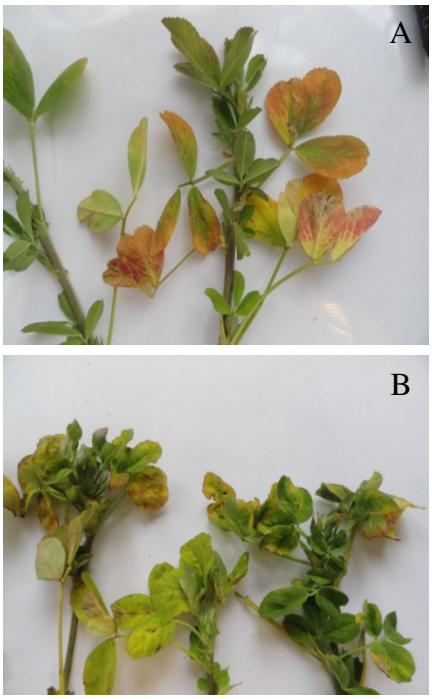
Reference	**Accession No.**	**Source/Host**	**Country**	**Isolate/Strain**
de Miranda *et al.* 1995	L39969	*B. napus*	England	BWYV1-Isolate 3a2
de Miranda *et al.* 1995	L39970	*B. napus*	England	BWYV2-Isolate 3b
de Miranda *et al.* 1995	L39973	*B. oleracea*	England	BWYV1-Isolate 6A
de Miranda *et al.* 1995	L39986	*B. oleracea*	England	BWYV1-Isolate 5A
de Miranda *et al.* 1995	L39967	*B. napus*	France	BWYV2-Isolate 2B
de Miranda *et al.* 1995	L40016	*Beta vulgaris*	France	BWYV-CP
de Miranda *et al.* 1995	X13063	*Lactuca sativus*	France	BWYV-FL1
de Miranda *et al.* 1995	L40019	*B. vulgaris*	Italy	BWYV-CP
de Miranda *et al.* 1995	L39977	*B. vulgaris*	Italy	BWYV1-Isolate 12a
de Miranda *et al.* 1995	L40020	*B. vulgaris*	Italy	BWYV-CP
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501661	*B. napus*	Iran	IR 4
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501662	*B. napus*	Iran	IR 8
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501663	*B. napus*	Iran	IR 10
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501664	*B. napus*	Iran	IR 11
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501665	*B. napus*	Iran	IR 15
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501666	*B. napus*	Iran	IR 100
Zahedi Tabarestani *et al.* 2012	JX501667	*B. napus*	Iran	IR 317
Guilley *et al.* 1995	X83110	*B. vulgaris*	USA	BMYV
This study	-	*Medicago sativa*	Lorestan	IRNL1
This study	-	*M. sativa*	Lorestan	IRNL2
This study	-	*M. sativa*	Ilam	IRNI1
This study	-	*M. sativa*	Ilam	IRNI2

نتیجه و بحث

مشاهدات مزرعه‌ای: قرمز شدن برگ‌ها (reddening)، زردی (yellowing) و کم رشدی (stunting) از شایع‌ترین علائم همراه با نمونه‌های علائم‌دار جمع‌آوری شده و با واکنش مثبت در آزمون TBIA بود (شکل ۱A و ۱B). هر چند شدت این علائم در دو استان و نیز شهرستان‌های مختلف آن‌ها متفاوت بود. بیشترین علائم زردی بین ۴۵ تا ۵۰ درصد در مزارع استان لرستان و بین ۳۰ تا ۳۵ درصد در استان ایلام مشاهده گردید. در غالب مزارع یونجه مورد بازدید شته سبز هلو (*M. persicae*)، شته خالدار (*Therioaphis maculate* Buckton)، شته نخودفرنگی (*Acyrhosiphon pisum* Harris) و شته سیاه باقلا (*Aphis faba* Scop.) مشاهده شدند.

نتایج آزمون سرولوژیکی: بر اساس نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی TBIA روی ۶۸۰ نمونه تصادفی، در مجموع ۲۳۸ نمونه (۳۵ درصد) با پادتن 5G4 واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۳). این پادتن با چندین لوتئوویروس بیمارگر در لگوم‌ها دارای واکنش می‌باشد (Katul, 1992). همچنین تعداد نمونه‌های یونجه تصادفی دارای واکنش مثبت در استان ایلام با ۴۳/۵ درصد بیشتر از تعداد این نمونه‌ها در استان لرستان (با ۳۰/۲ درصد) بود. نتایج بررسی در نمونه‌های علائم‌دار (شکل ۱) نشان داد که از ۱۹۱ و ۶۱ نمونه جمع‌آوری شده به ترتیب از دو استان لرستان و ایلام، به ترتیب ۵۹/۲ و ۵۷/۴ درصد با آنتی‌بادی 5G4 واکنش مثبت داشت (جدول ۳).

انتقال با شته: حدود سه هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان توسط شته‌های سبز هلو تغذیه داده شده از نمونه‌های مزرعه‌ای آلوده به BWYV و نیز آموده ویروسی خالص، علائم زردی و رگبرگ روشنی در چغندرقند رقم IC1 (شکل ۲C) و همچنین علائم زردی و کم‌رشدی در گیاهان محک کلزا رقم Otsubu (شکل ۲D) و خردل سفید (شکل ۲E) ظاهر گردید. در بوته‌های یونجه نیز در نتیجه تغذیه شته و انتقال آلودگی علائم زردی رگبرگ ایجاد گردید (شکل ۲F).در گیاه سلمک *Ch. capitatum* هیچ علائمی ظاهر نگردید. نتایج آزمون TBIA و RT-PCR آلودگی گیاهان محک مورد نظر با BWYV را تأیید نمود. گیاهان محکی که با عصاره نمونه‌های مزرعه‌ای آلوده به BWYV و یا آموده ویروس خالص مایه‌زنی مکانیکی شده بودند، بعد از گذشت یک ماه هیچ علائمی نشان ندادند.



شکل ۱- علائم زردی در یونجه؛ A- قرمز شدن و زردی برگ‌ها؛ B- زردی و کم رشدی شدید

Fig. 1. Yellowing symptoms in alfalfa; A: Leaf reddening and yellowing; B: yellows and severe stunting

نتایج PCR و نقشه تحدید آنزیمی: در این تحقیق، ۳۰ نمونه با واکنش مثبت در آزمون TBIA انتخاب و آر.ان.ای استخراجی از آنها وارد واکنش RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر LutF-S1 و LutR-AS3 (عمومی لوتئوویروس‌ها برای ناحیه پروتئین پوششی) و نیز جفت آغازگر BWYV-CPF و BWYV-CPR (اختصاصی BWYV) شد. تعداد ۲۸ نمونه از ۳۰ نمونه در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار ۶۰۰ جفت باز شده (شکل ۳) و ۲۶ نمونه از این ۲۸ نمونه، در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای

شکل ۲- علائم ایجاد شده در گیاهان محک. **C**- رگبرگ روشنی در چغندرقند رقم IC1 با BWYV؛ **D**- زردی رگبرگ کلزا رقم Otsubu با BWYV؛ **E**- زردی رگبرگ و بازماندن رشد در خردل سفید با BWYV؛ **F**- زردی رگبرگ شدید در یونجه همدانی با BWYV.

Fig 2. Symptoms induced on indicator plants. **C:** Vein clearing in *B. vulgaris* cv.IC1 with BWYV; D: Vein yellows in *B. napus* cv. Otsubu with BWYV; **E:** Vein yellows and stunting in *S.alba* with BWYV; **F:** Severe vein yellows in *M. sativa* cv. Hamedani with BWYV.

اختصاصی BWYV منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار (۵۶۰ جفت باز) شدند (شکل ۴).

دو نمونه 19LAl و 53IDeh به ترتیب از شهرستان‌های الیگودرز و دهلران که دارای واکنش مثبت با آنتی‌بادی 5G4 بوده و در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها منجر به تشکیل یک باند ضعیف بوزن ۶۰۰ جفت باز در ژل آگارز شده بودند، در آزمون RT-PCR واکنشی با آغازگرهای اختصاصی BWYV نداشته و هیچ باند دی.ان.ای در ژل آگارز مشاهده نشد. در مورد ۲۶ جدایه‌ای که در واکنش با آغازگرهای اختصاصی BWYV منجر به تکثیر قطعه ۵۶۰ جفت‌بازی شده بودند، در واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *Sma* I، دو قطعه بطول تقریبی ۱۱۰ و ۴۵۰ جفت‌باز تولید گردید (شکل ۵).

آنالیز تبارزائی: بخش اعظمی از توالی ژن پروتئین پوششی (CP) چهار جدایه ویروس BWYV از یونجه بطول حدود ۵۳۰ نوکلئوتید تعیین شد. این جدایه‌ها شامل IRNL1 و IRNL2 از استان لرستان و دو جدایه IRNI1 و IRNI2 از استان ایلام بودند. این توالی‌ها با توالی ژن CP مربوط به ۱۷ جدایه دیگر BWYV موجود در بانک ژن از جمله شش جدایه ایرانی این ویروس از کلزا مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۳). در درخت تبارزایی، جدایه‌های ایرانی BWYV در دو زیر گروه قرار گرفتند (شکل ۶).

چهار جدایه BWYV تعیین توالی شده از یونجه در این بررسی با سه جدایه ایرانی IR4، IR8 و IR100 (از کلزا) در یک شاخه مستقل (مونوفلتیک) قرار گرفتند.

جدول ۳- درصد نمونه‌های دارای واکنش مثبت با آنتی‌بادی تک همسانه‌ای 5G4 در آزمون TBIA

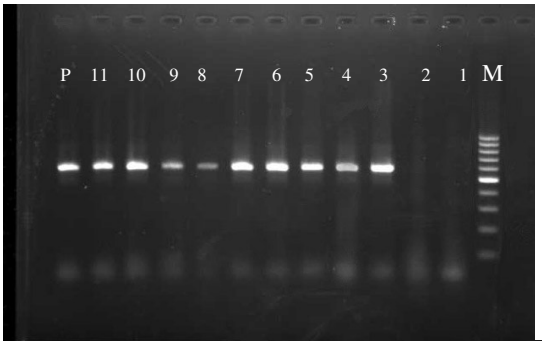
Table 3. Samples (%) with positive reaction in TBIA using monoclonal 5G4 antibody

استان (Province)	شهرستان (County)	تعداد نمونه‌های مورد آزمون (Sample No.)		نمونه‌های دارای واکنش با 5G4 (Positive samples with 5G4)	
		تصادفی Random	علائم‌دار Symptomatic	تصادفی Random	علائم‌دار Symptomatic
لرستان Lorestan	خرم‌آباد Khoram-Abad	322	118	76 (23.60)	65 (55.08)
	دورود Dorood	72	41	31 (43.05)	31 (75.6)
	پلدختر Poldokhtar	20	9	11 (55.00)	5 (55.55)
	کوهدشت Kohdasht	46	12	21 (45.65)	5 (41.66)
	الیگودرز Aligodarz	36	11	19 (52.77)	7 (63.63)
	جمع کل استان لرستان Total of Lorestan Province	496	191	158 (30.24)	113 (59.16)
ایلام Ilam	ایلام Ilam	30	10	17 (56.66)	8 (80.0)
	دره‌شهر Darreh-shahr	79	21	43 (54.43)	13 (61.9)
	دهلران Dehloran	75	30	20 (26.66)	14 (46.66)
	جمع کل استان ایلام Total of Ilam Province	184	61	80 (43.47)	35 (57.37)
	جمع کل Total	680	252	238 (35.00)	148 (58.73)

در حالی که سایر جدایه‌های ایرانی (IR5، IR10 و IR317 از کلزا) به همراه جدایه‌های اروپایی از انگلیس و فرانسه در زیر گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۶). سایر جدایه‌های خارجی نیز در یک گروه دیگر قرار گرفتند. میزان شباهت بین جدایه‌های ایرانی ۹۷/۶ تا ۹۹/۴ درصد بود. کمترین میزان شباهت (۹۲/۵ درصد) بین جدایه IRNL2 (از استان لرستان) با جدایه ایتالیایی (L40020) و بیشترین میزان شباهت (۹۷ درصد) بین جدایه IRNI1 (از استان ایلام) با جدایه فرانسوی SL1 (X13063) به دست آمد. چهار توالی ۵۳۰ نوکلئوتیدی بدست آمده در این تحقیق، در سطح اسیدآمینه‌ای بیشترین درصد شباهت (۹۹/۴ درصد) را با جدایه ایرانی IR4 (شماره دسترسی JX501661) و کمترین شباهت (۹۰/۹ درصد) را با جدایه BWYV از ایتالیا (شماره دسترسی L40020) نشان دادند. همچنین بر اساس توالی اسیدآمینه‌ای، حداقل و حداکثر میزان شباهت بین اعضای دو زیر گروه جدایه‌های ایرانی ۹۳/۹ و ۹۴/۵ درصد بدست آمد.

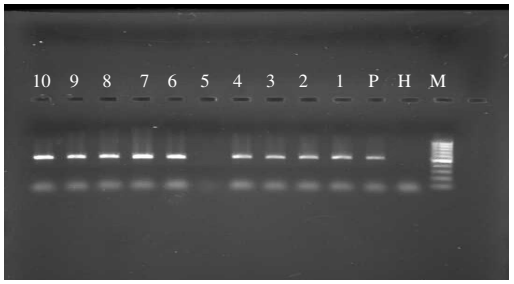
نتایج حاصل از بررسی‌های آزمایشگاهی روی مجموعاً ۹۳۲ نمونه جمع‌آوری شده از ۳۵ مزرعه یونجه از دو استان ایلام و لرستان نشان داد که ۲۲ مزرعه (۶۲/۸ درصد) دارای آلودگی به لوتئوویروس عامل زردی می‌باشند. ویروس‌های عامل زردی از جنس *Polerovirus* محدود به آوندهای آبکش بوده و منجر به تخریب بافت آوندی و بروز علائم زردی و در برخی لگوم‌های زراعی مانند نخود مانع از تشکیل غلاف و بذر در گیاه می‌گردند (Bos, 2012, Bos *et al*. 1988, Franz *et al*.

.(1997, Kumari *et al*. 2008



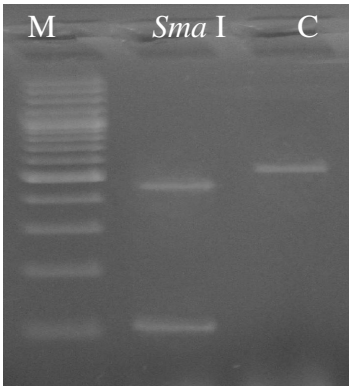
شکل ۳- محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها (Lut S1 و Lut AS3). ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون‌های ۱و ۲: شاهد سالم، ستون‌های ۳ تا ۱۱ تکثیر قطعه حدود ۶۰۰ جفت‌بازی بترتیب در جدایه‌های Kho30، Mz27، Gil23، Do16، Che20 و Al78 و جدایه‌های ED21، ED26، DrSh7 و I9. ستون P: شاهد مثبت.

Fig 3. PCR products amplified using universal primers of luteoviruses (Lut S1 & Lut AS3). Lane M: 100 bp ladder (Fermentas, Lithuania); lanes 1 and 2: negative control; lanes 3 to 11: a DNA fragment about 600 bp was amplified in Kho30, Mz27, Gil23, Do16, Che20 and Al78 and ED21, ED26, DrSh7 and I9, respectively; P: positive control.



شکل ۴- محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BWYV. ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، ستون H: شاهد سالم، P: شاهد مثبت، ۱ تا ۴و ۶ تا ۱۰: تکثیر قطعه حدود ۵۶۰ جفت‌بازی به ترتیب در جدایه‌های ED21، ED26، DrSh7 و I9 و جدایه‌های Kho30، Mz27، Gil23، Do16 و Che20، ۵: عدم تکثیر قطعه دی.ان.ای در جدایه Al78.

Fig 4. PCR products amplified using specific primers of BWYV. M: 100 bp ladder; H: negative control; P: positive control; Lanes 1 to 4 and 6 to 10: a DNA fragment about 560 bp was amplified in ED21, ED26, DrSh7 and I9 and Kho30, Mz27, Gil23, Do16 and Che20 isolates; 5: Isolate Al78.



شکل ۵- نقشه تحدید آنزیمی محصول PCR جدایه Gil23 با بکارگیری آنزیم برشی *Sma* I. ستون M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون *Sma* I: برش محصول PCR با طول تقریبی ۵۶۰ جفت‌باز توسط آنزیم *Sma* I که منجر به تولید دو قطعه بطول تقریبی ۴۵۰ و ۱۱۰ جفت‌بازی گردید، ستون C: شاهد منفی (محصول PCR بدون تیمار با آنزیم برشی *Sma* I).

Fig 5. Agarose gel electrophoresis of RFLP-PCR fragments after *Sma* I digestion in Gil23 isolate. Lane M: 100 bp ladder (Fermentas, Lithuania); Lane Sma I: DNA fragments about 110 and 450 bp were produced by *Sma* I digestion. Lane C: negative control (PCR product without *Sma* I treatment).

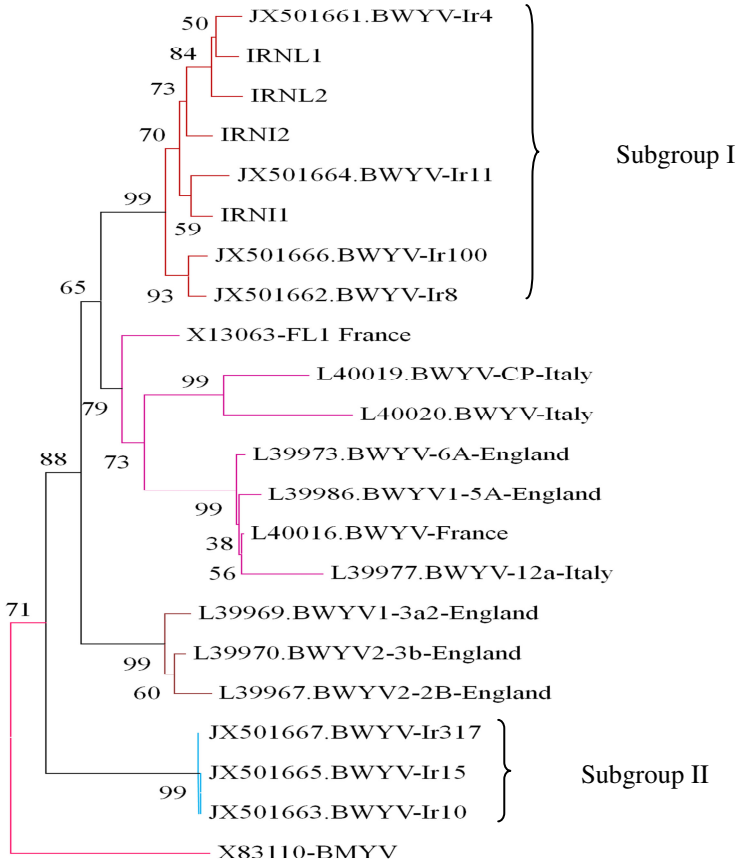
در این بررسی از پادتن بادی تک همسانه‌ای 5G4 برای ردیابی لوتئوویروس‌ها استفاده شد. این پادتن با طیف وسیعی از ویروس‌های جنس *Polerovirus* و *Luteovirus* بیمارگر در لگوم‌ها واکنش نشان می‌دهد (Katul, 1992). نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی TBIA روی ۶۸۰ نمونه تصادفی جمع-آوری شده از مزارع یونجه نشان داد که ۳۵ درصد آنها (۴۳/۵ و ۳۰/۳ درصد بترتیب از استان ایلام و لرستان) با پادتن 5G4 دارای واکنش مثبت بود. عدم واکنش برخی از نمونه‌های یونجه علائم‌دار با این پادتن می‌تواند نشان دهنده احتمال وجود عوامل ویروسی دیگر باشد.

به علاوه در نمونه‌های علائم‌دار با واکنش مثبت با پادتن 5G4، نقش سایر آلودگی‌های ویروسی توام در ایجاد علائم مشاهده شده در این نمونه‌ها دور از انتظار نیست. همچنین در بسیاری از موارد کمبودها نیز موجب ایجاد علائمی مشابه با علائم بیماریهای ویروسی حاصل از لوتئوویروس‌ها می‌شوند. در این بررسی با استفاده از شته سبز هلو، آلودگی ویروسی

BWYV از چهار نمونه یونجه آلوده و نیز آموده ویروسی خالص، به روی گیاهان محک مورد بررسی منتقل شد. نتایج حاصل از بررسی علائم و سیستمیک شدن ویروس در این گیاهان با توصیفات ارائه شده در مورد ویروس BWYV مطابقت داشت (Stevens *et al.* 1994; Hauser *et al.* 2000).

چهار جدایه BWYV مورد بررسی در مطالعه دامنه میزبانی، علاوه بر چغندرقند قادر به ایجاد آلودگی در گیاهان خردل سفید و کلزا (از خانواده *Brassicaceae*) و نیز یونجه (خانواده *Fabaceae*) بودند. از جمله میزبان‌های این ویروس می‌توان به کلزا، کاهو، اسفناج، تربچه، باقلا، کلم و چغندرقند اشاره نمود (Stevens *et al.* 1994). تاکنون در خصوص آلودگی طبیعی یونجه به ویروس BWYV فقط یک گزارش از استرالیا (Jones, 2004) ارائه شده است.

نتایج حاصل از آزمون سرولوژیک TBIA، با استفاده از واکنش مولکولی RT-PCR و بکارگیری آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها و اختصاصی BWYV مورد تایید قرار گرفت. از ۳۰ نمونه یونجه دارای واکنش مثبت با پادتن 5G4، تعداد ۲۸ نمونه در واکنش RT-PCR با آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها منجر به تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت‌بازی مورد انتظار شدند.



شکل ۶- درخت تبارزایی Neighbor Joining (NJ) رسم شده مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس زردی غربی چغندرقند با استفاده از برنامه MEGA 4. ویروس زردی خفیف چغندرقند (BMYV) *Beet mild yellowing virus* دیگر گونه جنس پولروویرس به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است.

Fig 6. Phylogenetic relationships of CP nucleotide sequence of BWYV isolates. The tree was constructed by the Neighbor Joining (NJ) algorithm implemented by MEGA 4. *Beet mild yellowing virus* another species of *Polerovirus* was used as out-group.

دو جدایه LKho41 و LD115 (به ترتیب از دو شهرستان خرم‌آباد و درود استان لرستان) در این آزمون واکنشی با آغازگرهای فوق نداشته و در آنها قطعه دی.ان.ای مورد نظر در ژل آگارز مشاهده نشد. دلایل متعددی از جمله بروز خطا در آزمون سرولوژیکی اولیه (واکنش مثبت کاذب)، احتمال تنوع این جدایه‌ها، غلظت بسیار کم ویروس یا تخریب آموده‌های آر.ان.ای در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند منجر به چنین نتیجه‌ای شده باشد. از ۲۸ نمونه دارای واکنش مثبت با آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها به غیر از دو مورد (نمونه‌های 19LAl و 53IDeh به ترتیب از شهرستان‌های الیگودرز و دهلران در دو استان لرستان و ایلام) بقیه ۲۶ نمونه با آغازگرهای اختصاصی BWYV در آزمون RT-PCR وارد واکنش شده و منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بوزن ۵۶۰ جفت باز مربوط به ناحیه ژن CP این جدایه‌ها گردید. دو نمونه 19LAl و 53IDeh علی‌رغم واکنش مثبت با پادتن 5G4 در آزمون TBIA و نیز با آغازگرهای عمومی لوتئوویروس‌ها در آزمون RT-PCR، واکنشی با آغازگرهای اختصاصی BWYV نداشتند. این نتایج بویژه با توجه به اینکه پادتن تک همسانه‌ای 5G4 با چندین لوتئوویروس بیمارگر در لگوم‌ها دارای واکنش می‌باشد (Katul, 1992)، احتمال حضور ویروس‌های دیگری از لوتئویروس‌ها یا جدایه‌های متنوعی از ویروس BWYV را در این نمونه‌ها مطرح می‌نماید که تعیین دقیق آن نیازمند مطالعه بیشتر روی این نمونه‌ها می‌باشد.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی مربوط به ۲۶ جدایه بدست آمده از دو استان ایلام و لرستان نیز تایید کننده آلودگی این نمونه‌ها با BWYV بود. در تمامی ۲۶ جدایه مورد بررسی، قطعه دی.ان.ای ۵۶۰ جفت‌بازی حاصل از واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BWYV، در نتیجه برش با آنزیم *Sma* I منجر به تشکیل دو قطعه باندازهٔ تقریبی ۴۵۰ و ۱۱۰ جفت باز گردید. این نتایج با خصوصیات گزارش شده در مورد ویروس BWYV مطابقت دارد (Robertson *et al*. 1991).

ویروس زردی غربی چغندرقند (BWYV) که اولین بار توسط Duffus در سال ۱۹۶۴ توصیف شده است، بدون شک یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی عضو جنس *Polerovirus* می‌باشد که در تمام نقاط دنیا گسترش دارد (Sutic *et al*. 1999). این ویروس دامنه میزبانی وسیعی در میان گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای داشته و خسارت زیادی را وارد می‌نماید (Stevens *et al*. 1994; Jones *et al*. 1991). تاکنون توالی نوکلئوتیدی ژن CP هفت جدایه ایرانی ویروس BWYV از کلزا تعیین و گزارش شده است (Zahedi Tabarestani *et al*. 2012). در این بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن CP چهار جدایه ویروس BWYV از یونجه تعیین و میزان شباهت موجود بین آنها و سایر جدایه‌های این ویروس از ایران و نیز دیگر مناطق (شامل اروپا، استرالیا و آمریکا) مورد مقایسه قرار گرفت. میزان شباهت توالی ژن CP در بین چهار جدایه یونجه BWYV در سطح نوکلئوتیدی بین ۹۸/۶ تا ۹۹/۴ درصد بود. همچنین میزان شباهت توالی CP بین جدایه‌های ایرانی BWYV شامل شش جدایه از کلزا (Zahedi Tabarestani *et al*. 2012) و چهار جدایه از یونجه، در سطح نوکلئوتیدی بین ۹۷/۶ تا ۹۹/۴ درصد تعیین شد. در درخت تبارزایی جدایه‌های ایرانی BWYV در دو زیر گروه قرار گرفتند. زیرگروه اول شامل چهار جدایه BWYV به دست آمده از یونجه در این بررسی و سه جدایه ایرانی IR4، IR8 و IR100 از کلزا بود که یک شاخه مستقل (مونوفلتیک) محسوب می‌شود. سه جدایه ایرانی دیگر از کلزا (IR5، IR10 و IR317) به همراه جدایه‌های اروپایی از انگلیس و فرانسه در زیر گروه دوم قرار گرفتند. این نتایج احتمالا نشان می‌دهد که برخی از جدایه‌های این ویروس علاوه بر گیاهان جنس براسیکا (*Brassiac*) قادر به ایجاد آلودگی طبیعی در گیاهان خانواده لگوم از جمله یونجه نیز می‌باشند که این موضوع می تواند در اپیدمی و خسارت ناشی از این ویروس نقش مهمی داشته باشد. البته برای تایید این مطلب لازم است تا جدایه‌های بیشتری از مناطق مختلف مورد بررسی و تعیین توالی قرار

بگیرند. هم مشاهدات مزرعه‌ای و هم بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که BWYV از پراکنش و فراوانی قابل توجهی در مزارع یونجه مورد بازدید در دو استان لرستان و ایلام برخوردار می‌باشد. پیش بینی می‌شود که درصد خسارت ایجاد شده توسط ویروس‌های محدود به آوندها مانند BWYV می‌تواند خیلی به میزان درصد وقوع آلودگی ویروسی نزدیک باشد (Kumari *et al*. 2008). بنابراین با توجه به اینکه در این بررسی میزان وقوع آلودگی ناشی از لوتئویروس‌ها در مزارع یونجه حدود ۳۵ درصد برآورد گردید می‌توان انتظار داشت که میزان خسارت و کاهش محصول نیز به همین میزان باشد، هر چند قضاوت دقیق در این مورد نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. در تدوین و اجرای برنامه‌های کنترل و کاهش خسارت ناشی از لوتئوویروس‌ها در این محصول باید نسبت به شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های شایع در هر منطقه توجه لازم صورت گیرد. از آنجا که این ویروس‌ها در سایر محصولات لگومی مهم مانند نخود و عدس نیز شایع بوده و قبلا از این محصولات گزارش شده‌اند (Makkouk *et al*. 2003)، بنابراین ارقام مقاوم یا متحمل مناسب علیه هر یک از ویروس‌های مورد نظر باید مورد بررسی و غربالگری قرار گیرند (Kumari *et al*. 2008).

از سوی دیگر محصولات زراعی چند ساله از جمله یونجه در صورت آلودگی با BWYV می‌توانند منبع مناسبی برای حفظ و نگه‌داری و سپس گسترش آلودگی ویروسی باشند. در این بررسی در اکثر مزراع مورد بازدید حضور شته‌های مهم یونجه از جمله شته سبز هلو، شته خالدار، شته نخودفرنگی و شته سیاه باقلا مشاهده گردید. این شته‌ها از جمله ناقلین BWYV بوده و چنانچه در فصل بهار بوته‌های تازه رویش یافته را کلونیزه نمایند، به سرعت تکثیر پیدا کرده و منجر به گسترش سریع بیماری می‌گردند (Kumari *et al*. 2008; Duffus, 1972).

References

ABRAHAM, A. D., M. VARRELMANN and H. J. VETTEN, 2008. Molecular evidence for the occurrence of two new luteoviruses in cool season food legumes in Northeast Africa. African Journal of Biotechnology, 7: 414-420.

ANONYMOUS, 2010. Crop production year book. Ministry of Jihad Agriculture, Deputy of Planning and Economy, Statistics and Information Technology Office, 136 pp.

BANANEJ, K., M. R. HAJIMORAD and N. SHARAEEN, 1995. Isolation and characterization of a cucumovirus resembling *Peanut stunt virus* from Iran. Proceeding of the 12th Iranian plant protection congress, Septamber 2-7, Karaj, Iran, 107.

BOS, L. 2012. Legume viruses. In: KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. and LEFKOWITZ, E. J. 2012. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, USA. p. 212-220.

BOS, L., R. L. HAMPTON and K. M. MAKKOUK, 1998. Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. In: *World Crops: Cool Season Food Legumes*. (Summerfield, R.J., ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 591–615.

BRUNT, A. A., K. CRABTREE, M. J. DALLWITZ, A. J. GIBBS, L. WATSON and E. J. ZURCHER, (editors). 1996. Plant viruses online: Description and lists from the VIDE database. CAB International, UK.1484 pp. http://pvo.bio-mirror.cn/sppindex.htm.

D'ARCY, C. J., A. D. HEWINGS, P. A. BURNETT and H. JEDLINSKI, 1983. Comparative purification of two Luteoviruses. Phytopathology 73: 755-759.

DE MIRANDA, J. R., M. STEVENS, E. DE BRUYNE, H. G. SMITH, C. BIRD and R. HULL, 1995. Sequence comparison and classification of beet luteovirus isolates. Archives of Virology, 140: 2183-2200.

DOMIER, L. L. and C. L. D'ARCY, 2008. Family *Luteoviridae*. In: Mahy, B.W.J. and van Regenmortel, M.H.V. Encyclopedia of Virology, third edition.

Academic Press is an imprint of Elsevier. USA pp 231-238.

DUFFUS, J. E. 1964. Host relationships of *Beet western yellows virus* strains. Phytopathology 54: 736-738.

DUFFUS, J. E. 1972. *Beet western yellows virus*. Description of Plant Viruse. No. 89.

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. Annuals of Applied Biology 128: 255–268.

GUILLEY, H., K. E. RICHARDS and G. JONARD, 1995. Nucleotide sequence of *Beet mild yellowing virus* RNA. Archives of Virology 140: 1109-1118.

HAJIMORAD, M. R., M. KHEYRI, K. BANANEJ and E. HERRBACH, 1993. First report of occurrence and identification of beet mild yellowing luteovirus in karaj, Iran. Proceeding of the 11th plant protection congress of Iran.p 131.

HAUSER, S., M. STEVENS, C. MOUGEL, H. G. SMITH, C. FRITSCH, E. HERRBACH and O. LEMAIRE, 2000. Biological, serological and molecular variability suggest three distinct beet polerovirus species. Phytopathology 90: 460-466.

JONES, R. A. C. 2004. Occurrence of virus infection in seed stocks and 3-year old pastures of lucerne (*Medicago sativa*). Australian Journal of Agricultural Research 55:757–764

JONES, T. D., K. W. BUCK and R. T. PLUMB, 1991. The detection of *Beet western yellows virus* and *Beet mild yellowing virus* in crop plants using the polymerase chain raction. Journal of Virological Methods 35: 287-296.

KAISER, W. J., D. DANESH, M. OKHOVAT and G. H. MOSSAHEBI, 1968. Diseases of pluse crops in Iran. Plant Disease Reporter 52: 687-691.

KARIMI, H. 1990. Alfalfa. Tehran University Publication Center, 371 pp.

KATUL, L. 1992. Serologische und molekularbiologishe characterisierung des *Bean leaf roll virus* (BLRV) und des *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV). Ph. D. dissertation, University of Göttingen, Germany, 115 pp.

KING, A., M. Q. ADAMS, M. J. CARSTENS and E. J. LEFKOWITZ, 2012. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, USA.

KUMARI, S. G., K. M. MAKKOUK, M. H. LOH, K. NEGASSI, S. TSEGAY, R. KIDANE, A. KIBRET, and A. TESFATSION, 2008. Viral diseases affecting chickpea crops in Eritrea. Phytopathlogy of Mediterrena 47: 42-49.

LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, D. P. MARTIN and P. LEMEY, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.

LOEBENSTEIN, G., P. H. BERGER, A. A. BRUNT and R. H. LAWSON, eds. 2001. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed potatoes. Kluwer Academic Publishers, 460 pp.

MAKKOUK, K. M. and S. G. KUMARI, 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab Journal of Plant Protection 14: 3–9.

MAKKOUK, K. M., S. G. KUMARI, N. SHAHRAEEN, Y. FAZLALI, SH. FARZADFAR, T. GHOTBI and A. R. MANSOURI, 2003. Identification and seasonal variation of viral diseases of chickpea and lentil in Iran. Journal of Plant Diseases and Protection 110: 157-169.

MARTIN, D. P., P. LEMEY, M. LOTT, V. MOULTON, D. POSDA and P. LEFEUVRE, 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26: 2462–2463.

MASSUMI, H., M. MADDAHIAN, J. HEYDARNEJAD, A. HOSSEINI POUR and A. FARAHMAND, 2012. Incidence of Viruses Infecting Alfalfa in the Southeast and Central Regions of Iran. Journal Agricultural Science and Technology 14: 1141-1148.

PIRONE, T. P. and D. W. THORNBURY, 1983. Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of *Tobacco etch virus*. Phytopathology 73: 872-875.

ROBERTSON, N. L., R. FRENCH and S. M. GRAY, 1991. Use of group specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of General Virology 72: 1473-1477.

STEVENS, M., N. J. PATRON and C. A. DOLBY, 2005. Distribution and properties of geographically distinct isolates of sugar beet yellowing viruses. Plant Pathology 54: 100-107.

STEVENS, M., H. G. SMITH and P. B. HALLSWORTH, 1994. The host range of beet yellowing viruses among arable weed specious. Plant Pathology 43: 579-588.

SUTIC, D. D., R. F. FORD and M. T. TOSIC, 1999. Hand book of plant virus diseases. CRC Press. Boca Raton, Florida 33431.

TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

VIGANO, F. and M. STEVENS, 2007. Development of a multiplex immunocapture-RT-PCR for simultaneous detection of BMYV and BChV in plants and single aphids. Journal of Virological Methods 146: 196-201.

ZAHEDI TABARESTANI, A., M. SHAMS-BAKHSH and N. SAFAIE, 2012. Comparison of the coat protein gene sequence of Iranian canolainfecting *Beet western yellows virus* isolates. Journal of Crop Protection 1: 211-219.