دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص۲۷-۱۳)

ویژگی‌های بیولوژیکی و فیلوژنتیکی جدایهٔ ایرانی گلایل ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV)

پریسا شریفی نظام‌آباد[۱]، مینا کوهی حبیبی[۲]، اکبر دیزجی[۳*]، سیامک کلانتری[۴] و معصومه رنجبر اقدم[۵]
۱،۲،۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۵، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، تبریز
(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۸)

چکیده

در سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷، تعداد ۱۵۴ پداژه از مراکز توزیع پداژه‌های گلایل در کرج جمع‌آوری و پس از کشت، بررسی بافت برگ بوته‌ها با آزمونDAS-ELISA حاکی از آلودگی ۷۴/۰۲ درصد بوته‌ها به ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) بود. پس از خالص‌سازی بیولوژیکی و تکثیر جدایه‌ای به نام BYMV-GPK، دامنه میزبانی آن تعیین شد. وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه با استفاده از روش SDS- PAGE، ۳۴ کیلودالتون محاسبه گردید و از طریق آزمون وسترن بلات تأیید شد. بررسی حساسیت آزمون‌های سرولوژیکی ایمنی‌سنجی اثر بافت (TPIA) و DAS-ELISA در ردیابی BYMV در بافت‌های برگ و پداژه‌ها نشان داد هر دو روش ویروس را به‌آسانی در بافت برگ بوته‌های گلایل آلوده ردیابی کردند اما هیچ‌یک از این دو روش قادر به ردیابی ویروس در بافت پداژه‌های آلوده نبود. دو بخش انتهای ´۳ و ناحیه HC-Pro ژنوم این جدایه، به‌ترتیب به اندازهٔ ۶۰۰ و ۱۱۰۰ جفت باز، با روش RT-PCR تکثیر گردید. در تحلیل فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی و ترجمهٔ اسید آمینه‌ای این نواحی، جدایه‌های مختلف ویروس تفکیک شد و جدایهٔ GPK در کنار جدایه‌های گلایل یا شبدر قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: **فیلوژنی، گلایل، وسترن بلات،BYMV، DAS-ELISA، TPIA.**

مقدمه

گلایل سفید (*Gladiolus grandiflorus* L.) از مهم‌ترین گل‌های زینتی تک‌لپه‌ای و شاخه‌بریده در دنیاست (Anonymous, 1997). گلایل مورد حملهٔ بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار می‌گیرد که در بین این عوامل، بیمارگرهای ویروسی اهمیت ویژه‌ای دارند (Katoch *et al*., 2003). به‌طورطبیعی ارقام گلایل از طریق اندام رویشی به نام پداژه (corm) تکثیر می‌شوند. بنابراین پداژه‌های آلوده به ویروس، به‌راحتی سبب گسترش ویروس به نقاط مختلف دنیا می‌گردند. در وضعیت طبیعی ارقام گلایل به ویروس‌های متعددی آلوده می‌شوند که سبب کاهش کمیت و به‌ویژه کیفیت تولید می‌شود. از گلایل ویروس‌های مختلفی مانند پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*)، رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*)، جغ‌جغک توتون (*Tobacco rattle virus*)، بافت‌مردگی توتون (*Tobacco necrosis virus*)، موزاییک نخودفرنگی (*Pea mosaic virus*)، موزاییک آرابیس (*Arabis mosaic virus*)، موزاییک سویا (*Soybean mosaic virus*) و لکه‌حلقوی نهفتهٔ توت‌فرنگی (*Strawberry latent ringspot virus*) از مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (Bridgmon & Walker, 1952; 1998; Katoch *et al*., 2003). در بین ویروس‌های آلوده‌کنندهٔ این گیاه، ویروس موزاییک زرد

* تلفن: ۰۲۶۳۲۸۱۸۷۰۵
E-mail: adizaji@ut.ac.ir

لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) و ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*) در مناطق مختلف غالب‌اند و به‌حدی گسترش دارند که به‌سختی می‌توان گیاهی را یافت که عاری از این ویروس‌ها باشد (Bridgmon &Walker, 1952; Staniulis, 1967). در دنیا ویروس موزاییک زرد لوبیا اولین بار توسط استانیولیس (Staniulis, 1967) از روی گلایل از اروپا گزارش شد. در ایران نیز از روی گلایل، اولین بار توسط Kamran & Izadpanah (1981) گزارش شد. این ویروس به جنس پوتی ویروس (*Potyvirus*)، از تیرهٔ پوتی ویریده (*Potyviridae*) تعلق دارد. ژنوم آن مانند سایر اعضای خانوادهٔ پوتی ویریده RNA، با قطبیت مثبت و تک‌رشته‌ای است و به‌صورت پلی‌پروتئین بیان می‌شود. ژنوم پوتی ویروس‌ها دارای یک چارچوب ژنی (open reading frame, ORF) است که در انتهای '۳ آن ناحیهٔ ترجمه‌نشونده (untranslated regions, 3'-UTR) به طول ۲۰۵-۱۴۴ نوکلئوتید قرار دارد (Revers & Candresse, 2004). در ویروس‌های مختلف، ناحیهٔ 3'-UTR از نظر طول و ترادف متفاوت است، اما در سویه‌های یک ویروس بیش از ۸۰ درصد شباهت وجود دارد (Frenkel *et al*., 1989). ژن کدکنندهٔ پروتئین پوششی (CP) پوتی ویروس‌ها در انتهای'۳ ژنوم قرار گرفته است و در بین گونه‌های مختلف این تیره تنوع زیادی دارد (Shukla & Ward, 1988 & 1989). این پروتئین در برگیرندهٔ نواحی تغییرپذیر انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی و ناحیهٔ میانی (core) است. ناحیهٔ انتهای آمینی حاوی بیشترین اپی‌توپ‌های اختصاصی ویروس است و در پوتی ویروس‌های مختلف از نظر طول و ترادف تفاوت زیادی دارد. CP در انتقال با شته، حرکت سلول به سلول و سیستمیک و تنظیم همانندسازی RNA دخالت دارد. موتیف‌های حفاظت‌شدهٔ DAG در انتهای آمینی پروتئین پوششی و KITC در پروتئین کمکی (HC-Pro) برای انتقال ناپایای پوتی ویروس توسط شته ضروری است (Atreya *et al*., 1995; Valkonen *et al*., 2002). پروتئین کمکی خاصیت پروتئینازی داشته و در تکثیر، انتقال سلول به سلول و آوندی پوتی ویروس اهمیت دارد (Urcuqui-Inchima *et al*., 2001). ویروس موزاییک زرد لوبیا بسته به رقم گلایل علائم موزاییک در برگ‌ها، کاهش اندازهٔ پداژه‌ها و شکستگی رنگ در گلبرگ‌ها را ایجاد می‌کند (Bridgmon & Walker, 1952; Nagel *et al*., 1983). این ویروس در طبیعت به‌وسیلهٔ بیش از ۲۰ گونه شته متعلق به تیرهٔ *Aphididae* و به‌صورت ناپایا منتقل می‌شود (Skaf & Makkouk, 1988) و در آزمایشگاه از طریق مکانیکی نیز قابل انتقال است. در این پژوهش ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی یک جدایهٔ گلایل این ویروس(BYMV-GPK)وحساسیت‌روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در شناسایی BYMV در برگ‌ها و پداژه‌های گلایل بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

ردیابی BYMV، تکثیر جدایهٔ GPK و تعیین دامنهٔ میزبانی آن

طی سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸، تعداد ۱۵۴ نمونه پداژه از مراکز توزیع پداژه‌های گلایل در کرج جمع‌آوری شد. پداژه‌ها پس از سپری کردن دورهٔ خواب در دمای چهار درجهٔ سلسیوس، در گلدان‌های پلاستیکی کوچک حاوی خاک سترون (شامل خاک رس، کود حیوانی پوسیده، خاک ورمیکولیت و ماسه به نسبت ۲:۱:۱:۱/۲) کاشته شدند. دمای گلخانه در طول رشد بسته به فصل بین ۳۳-۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد متغیر بود. پس از جوانه‌زنی پداژه‌ها، نمونه‌های برگی تمام بوته‌ها (دارا و بدون علائم) با آزمون داس- الایزا (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977) و استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی چندهمسانه‌ای BYMV (DSMZ-AS-0717)، TSV (DSMZ-AS-0903)، TSWV (DSMZ-AS-0105)، CMV (DSMZ-AS-0929) و TMV (DSMZ-AS-0041) بررسی شدند. نتایج آزمون به‌صورت تغییر رنگ از طریق مشاهده و اندازه‌گیری مقدار جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر به‌وسیلهٔ دستگاه پلیت‌خوان (ELISA-Reader, Beckman, AD 340S, CA, USA) ثبت و گیاهان آلوده به BYMV مشخص شدند. جدایه‌ای از ویروس به نام BYMV-GPK انتخاب و با روش انتقال تک‌لکه روی سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor* L.) خالص سازی بیولوژیکی شد. سپس این جدایه روی گیاه توتون

(*Nicotiana clevelandii* L.) مایه‌زنی شد و به‌عنوان منبع ویروس در گلخانه نگهداری شد.

برای مایه‌زنی ویروس از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار (pH ۷) حاوی ۲/۳ میلی‌مول NaDIECA (Natrium diethyldithocarbamate)، ۰/۰۱ درصد، پودر ذغال فعال و چهار میلی‌مول (Na2-Ethylenediaminetetraacetic acid) استفاده شد. برای مطالعهٔ ویژگی‌های بیولوژیکی جدایهٔ BYMV-GPK دامنهٔ میزبانی آن در شرایط گلخانه بررسی شد. بدین منظور جدایهٔ ویروس روی ۲۵ گونه متعلق به سه تیرهٔ گیاهی (*Chenopodiaceae*، *Solanaceae* و *Papilionaceae*) و در سه تکرار به روش مکانیکی مایه‌زنی شد و واکنش این گیاهان از نظر پیدایش علائم مطالعه شد (جدول ۲). سه هفته پس از مایه‌زنی، آلودگی بوته‌ها به ویروس به روش DAS-ELISA بررسی شد.

تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایهٔ BYMV-GPK

به‌منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی این جدایه از الکتروفورز عمودی پروتئین در ژل پلی‌اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) با ژل متمایزکنندهٔ ۱۵ درصد و ژل متراکم‌کنندهٔ ۴ درصد اکریل آمید به روش لملی (Laemmli, 1970) با اندکی تغییرات (Sambrook & Russell, 2001) استفاده شد. پروتئین کل از برگ‌های گیاهان سالم و آلودهٔ گلایل و نیز بوته‌های آلودهٔ گیاهان محک *C. amaranticolor*، *Nicotiana benthamiana* L. و *N. clevelandii* با همین روش استخراج شد. همچنین آمودهٔ نیمه‌خالص ویروس، پس از خالص‌سازی فیزیکی مقدماتی از بوته‌های آلودهٔ *N. clevelandii* به روش دیکسترا و جاگر (Dijikstra & Jager, 1998)، نیز در این آزمون استفاده شد.

الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و شدت جریان متغیر، به مدت دو تا سه ساعت تا رسیدن نمونه‌ها به انتهای ژل جداکننده انجام گرفت. براساس میزان حرکت نسبی مربوط به باند پروتئین‌های استاندارد در ژل پلی‌اکریل آمید، خط رگرسیونی بین لگاریتم وزن مولکولی این پروتئین‌ها و میزان حرکت نسبی آنها ترسیم و وزن مولکولی باند مربوط به BYMV-GPK برآورد شد و با بررسی وسترن بلات، براساس روش توبین و همکاران (Towbin *et al*., 1979) و سامبروک و همکاران (Sambrook & Russell, 2001)، تأیید شد. در ابتدا باندها از ژل به غشای نیتروسلولزی ۰/۴۵ میکرومتری (Optitran BA-S 85 Reinforced NC, DasseI, Germany) در شدت جریان الکتریکی ثابت ۳۶۰ میلی‌آمپر به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت انتقال یافتند. پس از انتقال باندها به غشای نیتروسلولزی عمل بلاکینگ با محلول دو درصد شیر خشک بدون چربی در دمای چهار درجهٔ سلسیوس انجام گرفت. پس از شست‌وشوی غشای نیتروسلولزی توسط بافر شست‌وشو (PBST)، سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه، غشا در محلول آنتی‌بادی اختصاصی ویروس (IgG) رقیق‌شده در بافر شست‌وشو به نسبت (۱:۱۰۰۰) و به مدت چهار ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از شست‌وشوی غشای نیتروسلولزی به‌وسیلهٔ بافر شست‌وشو، به شیوهٔ قبل، غشا به مدت یک شب در محلول آنتی‌بادی دوم (Goat-antirabbit IgG alkaline-phosphatase conjugate, IgG-AP) رقیق‌شده در بافر شست‌وشو به نسبت (۱:۳۰۰۰۰)، در دمای چهار درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از شست‌وشو به شیوهٔ قبل، در نهایت واکنش درون ۱۰ میلی‌لیتر بافر زمینه حاوی نیتروبلو تترازولیوم (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) و ۵-برمو-۴-کلرو-۳- ایندولیل فسفات (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate) در تاریکی انجام گرفت. پس از پیدایش باندها، واکنش با شست‌وشوی غشا در آب مقطر پایان یافت و غشا بین دو کاغذ صافی خشک قرار گرفت.

توانایی آزمون‌های سرولوژیکی ایمنی‌سنجی اثر بافت (TPIA) و DAS-ELISA در ردیابی BYMV در پداژه

دو آزمون سرولوژیکی ایمنی‌سنجی اثر بافت (TPIA (tissue print immunoassay, (Huth *et al*., 1997)) و DAS-ELISA در ردیابی BYMV در بافت‌های برگ و پداژه‌ها بررسی شد. براساس نتایج حاصل از بررسی برگ بوته‌های گلایل با هر دو آزمون، بوته‌های آلوده به BYMV تعیین و در مرحلهٔ بعد از قسمت‌های مختلف

سطحی و داخلی پداژه‌های مربوط به همان بوته‌های آلوده به ویروس، نمونه‌هایی تهیه و با هر دو آزمون بررسی شد.

تکثیر ناحیهٔ HC-Pro و انتهای'۳ ژنوم جدایهٔ BYMV-GPK

استخراج آر.ان.ای کل (Total RNA)

به‌منظور استخراج آر.ان.ای کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ‌های تازهٔ گیاه محک سلمه قرمز آلوده به جدایهٔ BYMV-GPK و کیت RNeasy شرکت کیاژن (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) استفاده شد. به‌منظور تکثیر ناحیهٔ HC-Pro، از جفت آغازگر اختصاصی این ناحیه (BYMV F1370 (AC) CT – 5' (CA (AG) ATG GAGAA (CT) CC (CT) GC-3' و BYMV R 2340 CCA AAG TTC CAA TCA – 5' (CCA CC -3') (Nakazono-Nagaoka *et al*., 2004a) و برای تکثیر ناحیهٔ انتهای '۳ ژنوم (شامل نیمهٔ کربوکسیلی چارچوب ژنی CP و '3-UTR) از جفت آغازگر عمومی جنس پوتی ویروس (POTFOR (AG) AA (CT) GG -3' و POTR GCG GGA – 5' (AGCT) TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT T -3') (Langeveld *et al*., 1991) استفاده شد.

واکنش آر تی پی سی آر (RT-PCR)

هر واکنش ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲۰ واحد RNase inhibitor، dNTPs ۰/۷۵ mM، DTT ۰/۵ mM، ۵ pM آغازگر معکوس، چهار میکرولیتر بافر RT-5X و سه میکرولیتر RNAی خالص‌شده بود. ابتدا به مدت سه تا پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد تیمار و پس از افزودن ۱۰۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز وارونه (M-MuLV, Fermentase) به هر واکنش، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. هر واکنش پی‌سی‌آر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، ۰/۲ mM dNTPs، ۳ mM $MgCl_2$، ۲ pM از هر آغازگر مستقیم و معکوس، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی‌سی‌آر و ۲/۵ واحد آنزیم دی.ان.ا پلی‌مراز (SmarTaq DNA Polymerase, Sinaclone) و پنج میکرولیتر دی.ان.ای مکمل افزوده شد. تکثیر ناحیهٔ مورد نظر ژنوم با دستگاه ترموسایکلر (thermal cycler مدل Palm cycler به شمارهٔ CG1-96, Corbett Research, Australia) و طبق برنامهٔ حرارتی پی‌سی‌آر شامل یک چرخهٔ واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه: واسرشت‌سازی در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دورگه‌سازی در ۵۳ °C به مدت یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و یک چرخهٔ بسط نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات RT-PCR در ژل آگاروز یک درصد در بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) تفکیک و پس از رنگ‌آمیزی با محلول ۴۰ µg/ml اتیدیوم بروماید، تکثیر قطعات در اندازهٔ مورد انتظار بررسی شد. استخراج محصولات RT-PCR مربوط به ناحیهٔ HC-Pro از ژل آگارز به‌وسیلهٔ کیت خالص‌سازی شرکت کیاژن (QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol) انجام و قطعات تکثیرشده به‌منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی در هر دو جهت و با استفاده از آغازگرهای مربوطه به شرکت سیناکلون ارسال شد.

بررسی فیلوژنتیکی

پس از مقایسهٔ ترادف هر قطعه با کروماتوگرام مربوطه و اصلاح جزئی (در صورت نیاز)، ترادف‌ها با استفاده از ابزار جست‌وجوی (Biological Local Alignment Search Tool) BLAST با ترادف‌های موجود در بانک ژن (National Center for Biotechnology Information) NCBI مقایسه شد.

هم‌ردیف‌سازی چندگانهٔ ترادف نوکلئوتیدی و ترجمهٔ اسید آمینه‌ای قطعات تکثیرشده از جدایهٔ BYMV-GPK با ترادف نواحی متناظر جدایه‌های مختلف ثبت‌شده در بانک ژن NCBI (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN 4.02 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) تحت سیستم عامل ویندوز انجام گرفت و درخت فیلوژنی مربوط به هر ناحیهٔ ژنومی به روش neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) و با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. در تحلیل‌های فیلوژنی جدایه‌ای از ویروس رگبرگ زردی شبدر (ClYVV) با رس‌شمار AB011819، به‌عنوان برون‌گروه استفاده شد.

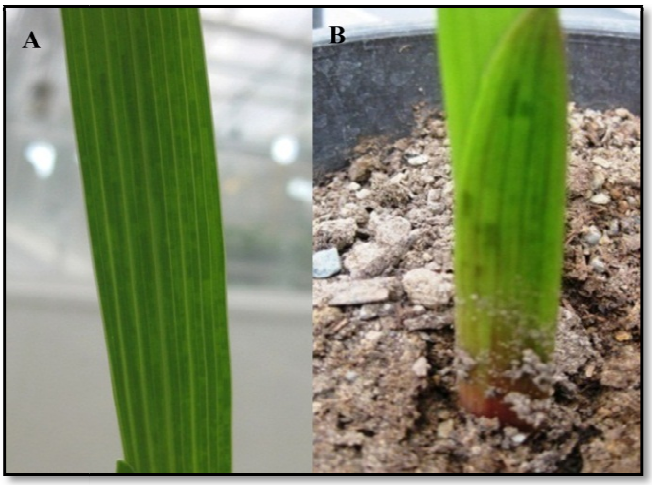
جدول ۱. جدایه های BYMV مورد استفاده در تحلیل های فیلوژنتیکی در این تحقیق

نام جدایه	میزبان	رس شمار	منشا جغرافیایی
Chz	*Canna* sp.	EF592168	چین
Csz	*Canna* sp.	EF592169	چین
KP2	*Diuris magnifica* L.	JX173278	استرالیا
SW3.2	*Diuris* sp.	JX156423	استرالیا
Fr	*Freesia* sp.	FJ492961	کره جنوبی
E-24N	*Gladiolus hybrida* L.	AB029438	ژاپن
E-92C	*G. hybrida*	AB029439	ژاپن
S-22N	*G. hybrida*	AB029435	ژاپن
S-22C	*G. hybrida*	AB029436	ژاپن
M11	*G. hybrida*	AB079886	ژاپن
IbG	*G. hybrida*	AB079887	ژاپن
G1	*G. hybrida*	AB439730	ژاپن
Gla	*G. hybrida*	AB439729	ژاپن
GDD	*G. hybrida*	AY192568	امریکا
Danish	*G. hybrida*	X53684	دانمارک
E441	*G. hybrida*	AJ844916	هندوستان
Solan	*G. hybrida*	EF611822	هندوستان
Glad-7	*Gladiolus* cv. Video	KF155421	هندوستان
Glad-13	*Gladiolus* cv. Regency	KF155420	هندوستان
Glad-20	*Gladiolus* cv. Tiger flame	KF155422	هندوستان
GB2	*Gladiolus* sp.	AB079888	ژاپن
BYMV-GPK	*Gladiolus* sp.	-	ایران
LDw-NN	*Lupinus angustifolius* L.	EU082118	استرالیا
LP-1	*L. pilosus*	EU082119	ترکیه
LP-2	*L. pilosus*	EU082120	ترکیه
LutKP-2	*L. luteus*	EU082122	استرالیا
RLut-2	*L. luteus*	EU082125	روسیه
Pullman	*L. luteus*	EU144223	آمریکا
CS	*Pisum sativum* L.	AB373203	ژاپن
P242	*P. sativum*	AB041971	ژاپن
92-1	*Trifolium pratense* L.	AB439732	ژاپن
VM-23	*Vanilla fragrans* L.	AY845012	هندوستان
Verbena	*Verbena* × *hybrida*	AY520092	امریکا
90-2	*Vicia faba* L.	AB439731	ژاپن
V124	*V. faba* (cv. Boushu-hachibu)	AB041970	ژاپن
Sb-50C	*V. faba* (cv. Ryosia-issun)	AB029437	ژاپن
Sb-12C	*V. faba* (cv. Sanuki-nagasaya)	AB029440	ژاپن
BYMV-IRAN	*V. faba*	-	ایران
FBI-1	*V. faba*	EU082116	استرالیا
FBI-2	*V. faba*	EU082114	استرالیا
FBI-3	*V. faba*	EU082115	استرالیا
FBD3	*V. faba*	EU082113	استرالیا

نتایج و بحث

براساس نتایج آزمون الایزا، از ۱۵۴ پداژهٔ جمع‌آوری‌شده از مراکز توزیع پداژهٔ شهرستان کرج، ۱۱۴ نمونه (۷۴/۰۲ درصد) آلوده به BYMV بود، درحالی که آلودگی به سایر ویروس‌های مورد بررسی مشاهده نشد. براساس این نتایج BYMV مهم‌ترین ویروس بیمارگر گلایل در این شهرستان است. در برگ‌های گیاهان گلایل آلوده به این ویروس، علائم موزاییک خفیف تا شدید مشاهده شد (شکل ۱). این میزان بالای آلودگی به BYMV نشان‌دهندهٔ شیوع گستردهٔ این ویروس در گلایل است

که با نتایج سایر محققان (Bridgmon & Walker 1952, Nagel *et al*., 1983) نیز مطابقت دارد، درحالی که عدم ردیابی ویروس موزاییک خیار در بوته‌های گلایل حاصل از پداژه‌های مورد بررسی در این تحقیق با نتایج محققان مذکور که CMV را بعد از BYMV دومین ویروس غالب گلایل معرفی کرده بودند مغایرت دارد.

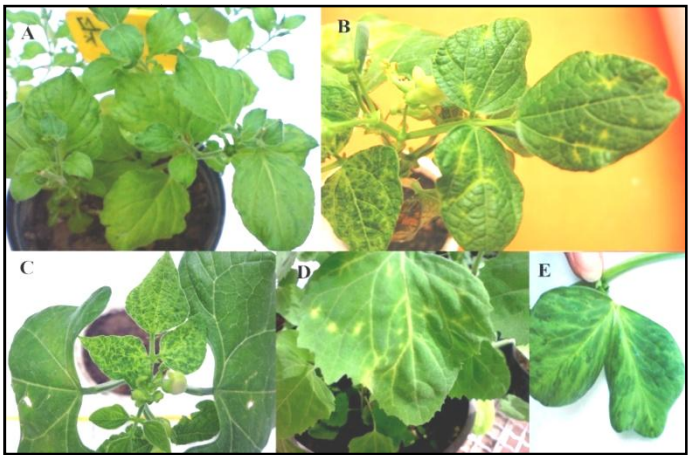


شکل ۱. علائم موزاییک رگه ای در گلایل سفید آلوده به جدایه BYMV-GPK.

مطالعهٔ دامنهٔ میزبانی BYMV-GPK در شرایط گلخانه‌ای

پس از مایه‌زنی مکانیکی جدایهٔ BYMV-GPK روی گیاهان محک، علائم موضعی یا سیستمیک روی برخی از آنها ظاهر شد (جدول ۲). علائم در *N. benthamiana* به‌صورت موزاییک سیستمیک مشاهده شد (شکل ۲، A) درحالی که در *N. clevelandii* آلودگی نهان بود و هیچ علائمی مشاهده نشد. در لوبیا چیتی رقم دانشجو (*P. vulgaris* cv. Daneshjou) علائم موزاییک زرد، رگبرگ زردی و در بوته‌های آلوده، کاهش رشد، کاهش اندازهٔ برگچه‌ها و تغییر شکل در برخی برگ‌های جوان مشاهده شد (شکل ۲، B و C). در گیاه لوبیا (*P. vulgaris* cv. Bountiful) علائم موزاییک سبزرد، کاهش رشد و بدشکلی در برگ‌های بالایی و جوان مشاهده شد. در گیاه لوبیا قرمز (*P. vulgaris* cv. Red Kidney) علائم موزاییک خفیف مشاهده شد. در گیاه لوبیا قرمز رقم صیاد (*P. vulgaris* cv. Sayad) علائم موزاییک زرد و در بوته‌های آلوده کاهش رشد، کاهش اندازه و پیچ خوردن به سمت پایین در برگ‌های بالایی و جوان قابل مشاهده بود. در گیاه محک سلمه قرمز (*C. amaranticolor*) علائم لکهٔ موضعی زرد روی برگ‌های مایه‌زنی‌شده مشاهده شد، اما تا حدودی در رگبرگ‌ها گسترش یافت، ولی سیستمیک نشد (شکل ۲، D). در گونه‌های *C. quinoa* و *C. album* علائم موضعی به‌صورت لکه‌های ریز سبز روشن تا زرد روی برگ‌های مایه‌زنی‌شده مشاهده شد. در گیاه باقلا رقم سرازیری (*V. faba* cv. Saraziri) در برگ‌ها به‌خصوص برگ‌های جوان بالایی و روی پاجوش‌های ایجادشده علائم موزاییک زرد دیده شد (شکل ۲، E). در گیاه باقلا رقم شاخ بزی (*V. faba* cv. Shakh bozi) رگبرگ روشنی در برگ‌های جوان مشاهده شد. در گیاه باقلا رقم (*V. faba* cv. VC 1973) آلودگی سیستمیک بدون علائم رخ داد. براساس تحقیقات پیشین جدایه‌های گلایل ویروس موزاییک زرد لوبیا از نظر بیماری‌زایی روی گیاهان توتون (*N. benthamiana*) و باقلا به دو گروه شدید و خفیف تقسیم می‌شوند (Nakazono-Nagaoka *et al*., 2004a). علائم ایجادشده به‌وسیلهٔ جدایهٔ BYMV-GPK در گیاه توتون (*N. benthamiana*) بسیار شبیه به علائم جدایهٔ شدید BYMV-GB2 و S-22N این ویروس است. همچنین علائم جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق روی باقلا (رقم سرازیری) بسیار شبیه به علائم جدایهٔ شدید BYMV-IbG این ویروس بود. ازاین‌رو براساس این نتایج می‌توان جدایهٔ BYMV-GPK را جزء جدایه‌های شدید

بیماری‌زای ویروس موزاییک زرد لوبیای جداشده از گلایل گروه‌بندی کرد. براساس تحقیقات وادا و همکاران (۲۰۰۰) جدایه‌های گلایل این ویروس از نظر بیماری‌زایی روی گیاه محک *C. quinoa* به دو گروه NS (لکهٔ بافت مرده) شامل دو جدایهٔ E-24N و S-22N و CS (لکهٔ سبزرد) شامل دو جدایهٔ E-92C و S-22C تقسیم می‌شوند. با توجه به تولید لکه‌های سبزرد توسط جدایهٔ BYMV-GPK روی *C. quinoa*، این جدایه در گروه CS قرار می‌گیرد. اما از نظر علائم ایجادشده روی توتون شبیه به جدایهٔ S-22N است که در گروه اول NS قرار گرفته است. جدایهٔ BYMV-GPK از نظر دامنهٔ میزبانی و علائم ایجادشده روی گیاهان محک با جدایهٔ باقلا (BYMV-IRAN) (Rohani, 2008) مطابقت دارد.



شکل ۲. علائم ناشی از مایه زنی گیاهان محک با جدایه BYMV-GPK .

A) علائم موزاییک سیستمیک در *N. benthamiana*، B، C) علائم موزاییک، رگبرگ زردی و کاهش رشد در *P. vulgaris* cv. Daneshjou، D) علائم لکه موضعی زرد در برگ‌های سلمه قرمز، E) علائم موزاییک سیستمیک در *V. faba* cv. Saraziri.

جدول۲. واکنش گیاهان محک پس از مایه زنی مکانیکی با جدایه BYMV-GPK، جدا شده از گلایل

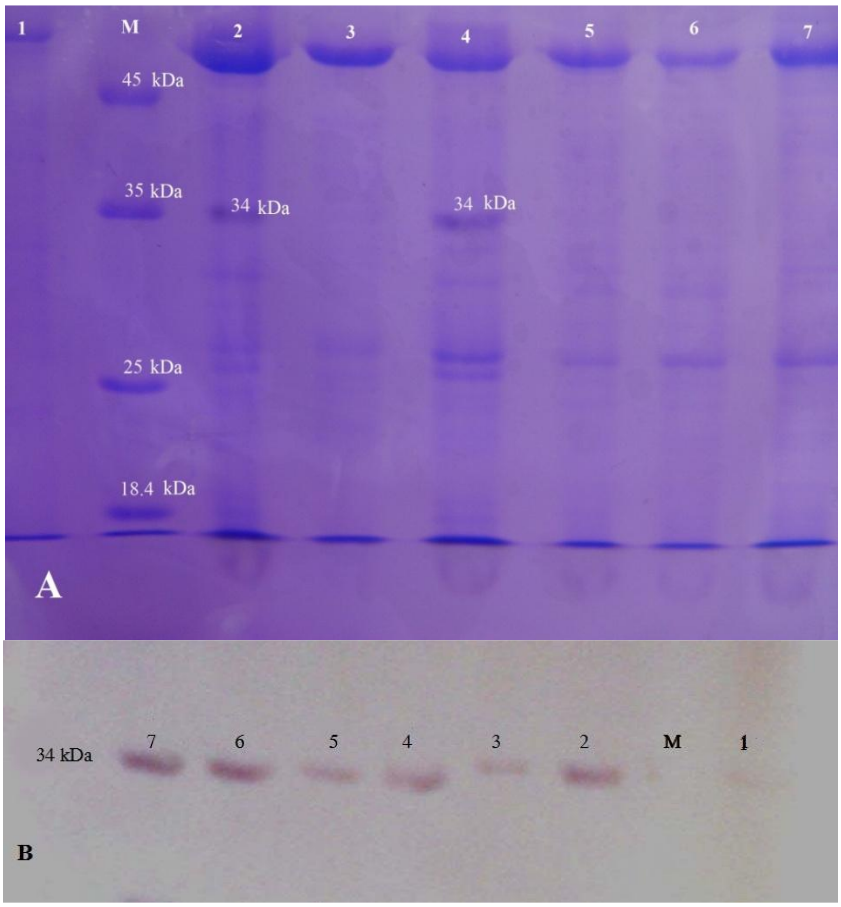
خانواده	نام علمی گیاه محک	علایم ایجاد شده سیستمیک/موضعی
Chenopodiaceae	*Chenopodium album* L.	CLL / -
	C. amaranticolor L.	CLL / -
	C. quinoa L.	CLL / -
	C. murale L.	-
Solanaceae	*Capsicum annuum* L.	-
	Datura metel L.	-
	D. stramonium L.	-
	Nicotiana benthamiana L.	- / M
	N. clevelandii L.	- / L
	N. debneyi L.	-
	N. glutinosa L.	-
	N. rustica L.	-
	N. tabacum L. cv. Samsun	-
	N. tabacum L. cv. Burley	-
	Nicandra physalodes L.	-
	Physalis floridana L.	-
	Solanum nigrum L.	-
Papilionaceae	*Phaseolus vulgaris* L. cv. Bountiful	- / M, LD
	P. vulgaris L. cv. Red Kidney	- / M
	P. vulgaris L. cv. Sayad	- / M, D, LR
	P. vulgaris L. cv. Daneshjou	- / M, LD, D
	Vicia faba L. cv. Saraziri	- / M
	V. faba L. cv. VC 1973	- / L
	V. faba L. cv. Shakh bozi	- / V
	Vigna unguiculata L. cv. Kamran	-

CLL: لکه موضعی سبزرد، D: کاهش رشد، L: آلودگی پنهان، LD: بد شکلی در برگ‌ها، LR: پیچیدگی برگ‌ها، M: موزاییک، V: رگبرگ روشنی و - : بدون علائم و عدم ردیابی ویروس در مایه‌زنی برگشتی.

وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایهٔ BYMV-GPK

پس از انجام آزمون SDS-PAGE (شکل ۳، A)، براساس خط رگرسیون بین حرکت نسبی پروتئین‌های استاندارد در ژل و لگاریتم وزن مولکولی آنها، وزن مولکولی باند مربوط به پروتئین پوششی جدایهٔ BYMV-GPK ، ۳۴ کیلودالتون برآورد شد و با آزمون

وسترن بلات نیز به تأیید رسید (شکل ۳، B) که با نتایج تحقیقات پیشین (Hollings & Brunt, 1981; Rohani, 2008) مطابقت داشت.

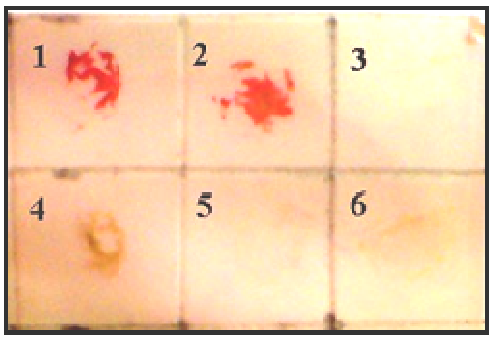


شکل ۳. نقوش الکتروفورزی (A) و وسترن بلات (B) آموده پروتئین کل استخراج شده از برگ گیاهان سالم *N. glutinosa* (چاهک ۱) و آلوده گلایل (چاهک های ۲ و ۴)، آموده نیمه خالص جدایه BYMV-GPK (چاهک ۳) و آموده پروتئین کل استخراج شده از برگ گیاهان آلوده سلمه قرمز، *N. benthamiana* و *N. clevelandii* (به ترتیب چاهک های ۵، ۶ و ۷). M ، نشانگر پروتئین های استاندارد.

بررسی توانایی آزمون‌های سرولوژیکی TPIA و-DAS ELISA در ردیابی BYMV در پداژه

با بررسی بافت جوانه و برگ، هر دو آزمون سرولوژیکی TPIA(شکل ۴) و DAS-ELISA به‌خوبی آلودگی بوته-های گلایل به BYMV را آشکار کرد ، درحالی که هیچ‌یک از این دو آزمون قادر به ردیابی ویروس از قسمت‌های داخلی و سطحی پداژه‌های مربوط به همان بوته‌های آلوده به ویروس نبود که با نتایج تحقیق *et al.*, Katoch (2003) مطابقت دارد. با توجه به نتایج تحقیقات گروهی از محققان، BYMV با روش‌های نوردرن بلات، تلفیق سرولوژی و الکترون میکروسکوپی (ISEM)، DAS-ELISA و RT-PCR در پداژه‌ها و پداژک‌های گلایل قابل ردیابی نیست، اما در برگ‌ها به‌راحتی ردیابی می‌شود (Stein *et al*., 1986; Vunsh *et al*., 1990; Stein *et al*., 1994). Stein et al., (1986) معتقدند که نوع آنتی‌بادی مورد استفاده در روش‌های تحت بررسی علت عدم ردیابی این ویروس در پداژه‌ها و پداژک‌ها است. بدین معنا که آنتی‌بادی‌های تولیدشده برای جدایه‌های میزبان‌های غیر گلایل قادر به ردیابی این ویروس در پداژه‌ها و پداژک‌های گلایل نیست، اما می‌توان این ویروس را در بخش‌های هوایی گیاه، با استفاده از این آنتی‌سرم‌ها ردیابی کرد. برخی محققان تنوع سرولوژیکی زیاد این ویروس را علت این نتایج دانسته و استفاده از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای در TAS-ELISA (Triple antibody sandwich ELISA) را برای ردیابی این ویروس پیشنهاد کرده‌اند (Sasaya *et al*.,

1998b). Vunsh *et al.*, (1991) نیز دخالت مواد بازدارندهٔ داخل بافت‌های پداژه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز را علت شکست این روش در ردیابی این ویروس می‌دانند.

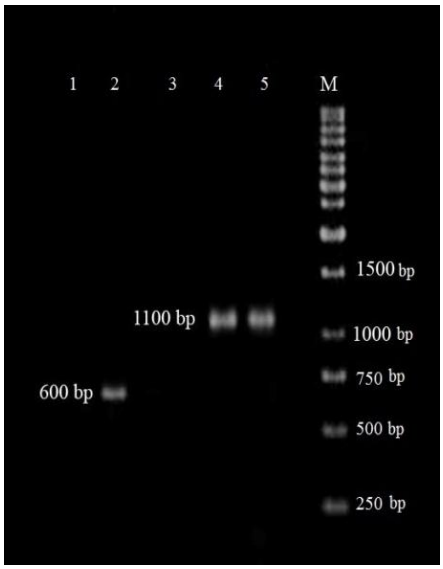


شکل ۴. نتایج آزمون TPIA در ردیابی BYMV در بافت برگ گلایل آلوده به جدایه BYMV-GPK (۱و ۲) و قسمت‌های مختلف پداژه مربوط به همان بوته گلایل (۳، ۵ و ۶) در مقایسه با گیاه سالم گلایل (۴). واکنش مثبت به صورت رنگ قرمز اثر بافت گیاه در سطح غشای نیتروسلولزی مشاهده می شود.

بررسی فیلوژنتیکی

با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR، به‌ترتیب قطعاتی به طول ۱۱۰۰ (از ناحیهٔ HC-Pro) و ۶۰۰ جفت باز (از انتهای ' ۳ ژنوم) تکثیر شد (شکل ۵). پس از تعیین ترادف نوکلئوتیدی، بخش‌های ۸۹۵ جفت باز (موقعیت ۳۵۲ تا ۱۲۴۷ از ژنوم) و ۳۹۸ جفت باز (موقعیت ۴۲۰ تا ۸۱۸ از ژنوم) به‌ترتیب مربوط به نواحی HC-Pro و پروتئین پوششی (نیمه‌کربوکسیلی CP) و همچنین ۱۴۹ جفت باز مربوط به ناحیهٔ 3'-UTR به‌دست آمد. میزان یکسانی نوکلئوتیدی نواحی تکثیرشده از HC-Pro، پروتئین پوششی و 3'-UTR و ترجمهٔ اسید آمینه‌ای قطعات تکثیرشده HC-Pro و پروتئین پوششی جدایهٔ BYMV-GPK با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در جدول ۳ آمده است.

در درخت فیلوژنتیکی به‌دست‌آمده براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیهٔ HC-Pro ۱۷ جدایهٔ BYMV از میزبان‌های مختلف دنیا به روش neighbor-joining، جدایه‌ها در سه خوشه و هفت گروه قرار گرفتند (شکل ۶) که جدایه‌های گلایل در هر دو خوشه حضور داشتند. اغلب جدایه‌های گلایل در یکی از خوشه‌ها (دو زیرخوشهٔ مجزا) واقع‌اند و جدایهٔ GPK در کنار دو جدایهٔ Gla و Glad-20 گلایل و جدایهٔ شبدر (1-92) قرار دارند. از جدایه‌های گلایل فقط دو جدایهٔ IBG و M11 در خوشه‌ای دیگر و در کنار جدایه‌هایی از سایر میزبانان زینتی و حبوبات قرار دارند.



شکل ۵. نقوش الکتروفورزی محصول RT-PCR مربوط به تکثیر پروتئین پوششی (CP) و ناحیه HC-Pro جدایه BYMV-GPK با استفاده از آموده آر ان ا کل گیاه گلایل آلوده به ترتیب (راهک ۲، ۴ و ۵)، گیاه سالم (راهک ۱ و ۳) و آغازگرهای عمومی POT R / POT FOR و اختصاصی BYMV F1370 / BYMV R2340. M، نشانگر اندازه DNA یک کیلو بازی، Gene RulerTM 1Kb DNA Ladder.

درخت فیلوژنتیکی مربوط به ترادف ترجمهٔ اسید آمینه‌ای این جدایه‌ها نیز مشابه درخت فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی بود. براساس نتایج حاصل از مقایسهٔ ترادف نوکلئوتیدی و ترجمهٔ اسید آمینه‌ای ناحیهٔ تکثیرشده از HC-Pro، جدایه‌های Gla و BYMV-IRAN به‌ترتیب بیشترین و کمترین شباهت را با جدایهٔ BYMV-GPK داشتند (جدول ۳). جدایهٔ Gla از گیاه گلایل (*Gladiolus hybrida*) جداسازی شده و از نظر بیماری‌زایی و شدت علائم جزء جدایه‌های شدید گروه‌بندی می‌شود (Nakazono-Nagaoka *et al.*, 2009). با توجه به علائم ایجادشده توسط جدایهٔ

BYMV-GPK در گیاهان محک باقلا و *N. benthamiana* و نتایج حاصل از بررسی مولکولی، می‌توان این جدایه را جزء جدایه‌های شدید بیماری‌زا در گلایل گروه‌بندی کرد.

جدول ۳. درصد یکسانی ترادف نوکلئوتیدی (nt) و ترجمه اسید آمینه ای (aa) جدایه های BYMV مورد استفاده در تحلیل فیلوژنتیکی با جدایه مورد بررسی در این تحقیق (BYMV-GPK)

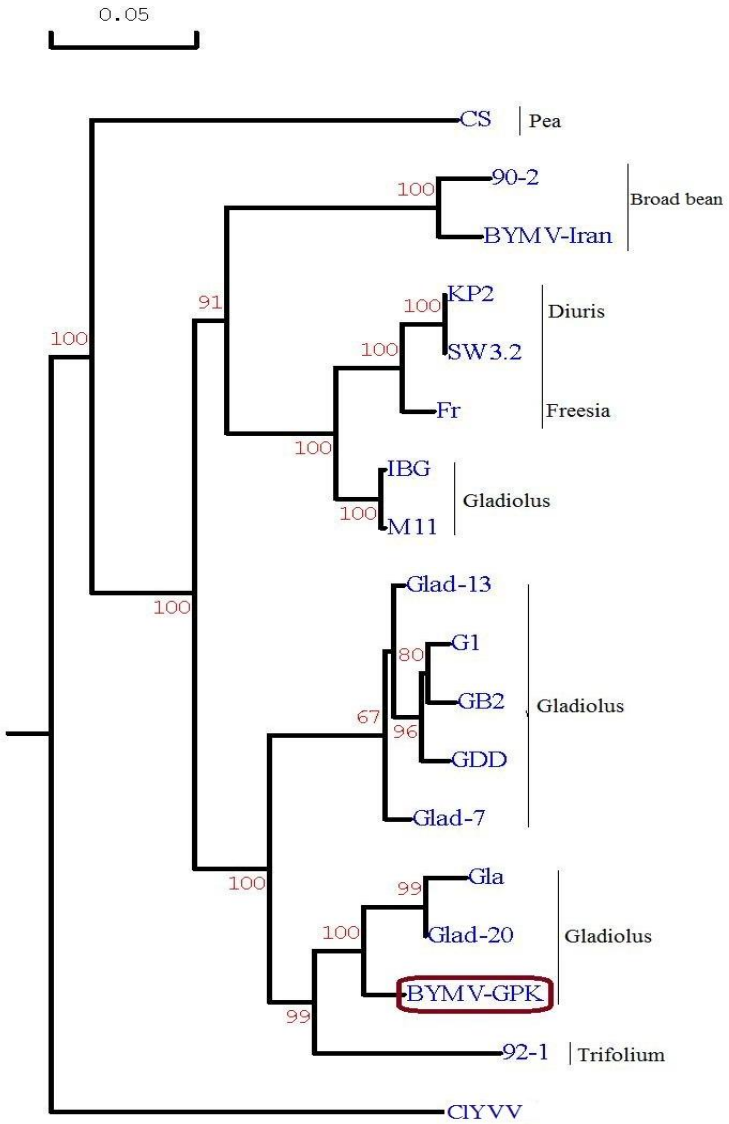
جدایه	Partial CP		Partial HC-Pro		3'- UTR
	aa (%)	nt (%)	aa (%)	nt (%)	nt (%)
BYMV-IRAN	ND	ND	٪۸۳ /۴۸	٪۷۲/۱۳	ND
Chz	٪۸۷ /۵۶	٪۹۵/۴۹	ND	ND	ND
Csz	٪۸۷ /۳۱	٪۹۵/۰۹	ND	ND	ND
CS	٪۹۶ /۸۸	٪۸۸ /۴۷	٪۸۷ /۶۵	٪۷۶/۸۱	٪۷۸ /۱۶
Danish	٪۸۵ /۸۶	٪۹۶/۹۹	ND	ND	ND
E-24N	٪۹۹ /۳۸	٪۹۶ /۲۴	ND	ND	٪۸۲ /۱۸
E-92C	٪۹۷ /۵۰	٪۸۶ /۴۷	ND	ND	٪۸۲ /۱۸
E441	٪۸۶ /۳۲	٪۹۶/۲۴	ND	ND	ND
Fr	٪۹۶ /۸۸	٪۸۶ /۷۲	٪۹۴/۴۰	٪۸۲/۵۳	٪۸۱ /۷۱
FBI-1	٪۹۰ /۵۵	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND
FBI-2	٪۹۰ /۰۵	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND
FBI-3	٪۹۰ /۰۵	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND
FBD3	٪۹۰ /۳۰	٪۹۶/۲۴	ND	ND	ND
GDD	٪۹۸/۰۰	٪۸۶/۷۲	٪۹۶ /۴۶	٪۸۸/۴۲	٪۷۵ /۴۳
Glad-7	ND	ND	٪۹۶/۵۵	٪۹۰ /۸۵	ND
Glad-13	ND	ND	٪۹۷/۴۹	٪۹۰ /۵۲	ND
Glad-20	ND	ND	٪۹۸/۹۷	٪۹۱ /۵۰	ND
GB2	٪۹۷ /۵۰	٪۸۶ /۷۲	٪۹۵/۸۷	٪۸۹ /۰۱	٪۸۲ /۱۸
G1	٪۹۷ /۵۰	٪۸۶ /۴۷	٪۹۶/۴۶	٪۸۸ /۹۱	٪۸۲ /۱۸
Gla	٪۹۷ /۵۰	٪۸۶ /۴۷	٪۹۹ /۱۲	٪۹۶ /۲۷	٪۸۲ /۱۸
KP2	٪۹۶ /۸۸	٪۸۷ /۲۲	٪۹۳ /۸۱	٪۸۱/۷۵	٪۸۱ /۶۱
IbG	٪۹۶ /۲۵	٪۹۴/۹۹	٪۹۴ /۱۰	٪۸۴ /۳۰	٪۸۱ /۶۱
M11	٪۹۸ /۱۳	٪۹۵ /۴۹	٪۹۳ /۲۲	٪۸۴ /۱۲	٪۸۱ /۱۴
LDw-NN	٪۸۶ /۳۲	٪۹۶/۹۹	ND	ND	ND
LP-1	٪۹۳ /۲۸	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND
LP-2	٪۹۸/۱۳	٪۹۳/۹۸	ND	ND	ND
LutKP-2	٪۸۶/۵۷	٪۹۶/۹۹	ND	ND	ND
Pullman	٪۹۳ /۳۰	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND
P242	٪۹۶/۸۸	٪۸۷/۹۷	ND	ND	٪۷۸ /۱۶
RLut-2	٪۹۳ /۵۳	٪۹۹/۲۵	ND	ND	ND
Sb-50C	٪۹۸/۱۳	٪۹۰ /۲۳	ND	ND	٪۸۰ /۴۶
Sb-12C	٪۹۹ /۳۸	٪۹۰ /۷۳	ND	ND	٪۸۱ /۰۳
S-22N	٪۹۸ /۷۵	٪۹۶ /۲۴	ND	ND	٪۸۲ /۱۸
S-22C	٪۹۷/۵۰	٪۸۶/۹۷	ND	ND	٪۸۲/۱۸
Solan	٪۸۷/۴۷	٪۹۶/۹۹	ND	ND	ND
SW3.2	٪۹۶ /۸۸	٪۸۷ /۲۲	٪۹۳ /۸۱	٪۸۱/۷۵	٪۸۱ /۶۱
92-1	٪۹۹/۳۸	٪۹۴ /۹۹	٪۹۷ /۳۵	٪۹۰/۳۸	٪۸۲ /۷۶
90-2	٪۹۸ /۷۵	٪۹۰ /۹۸	٪۹۴ /۴۰	٪۸۰/۷۷	٪۸۱ /۰۳
Verbena	٪۹۷ /۵۰	٪۸۸ /۷۲	ND	ND	٪۷۹ /۵۳
V124	٪۹۹ /۳۸	٪۹۰ /۹۸	ND	ND	٪۸۱ /۰۳
VM-23	٪۹۵ /۰۴	٪۹۸/۵۰	ND	ND	ND

ND، تعیین نشده. به دلیل عدم وجود ترادف مربوط به ناحیه مورد نظر در بانک ژن

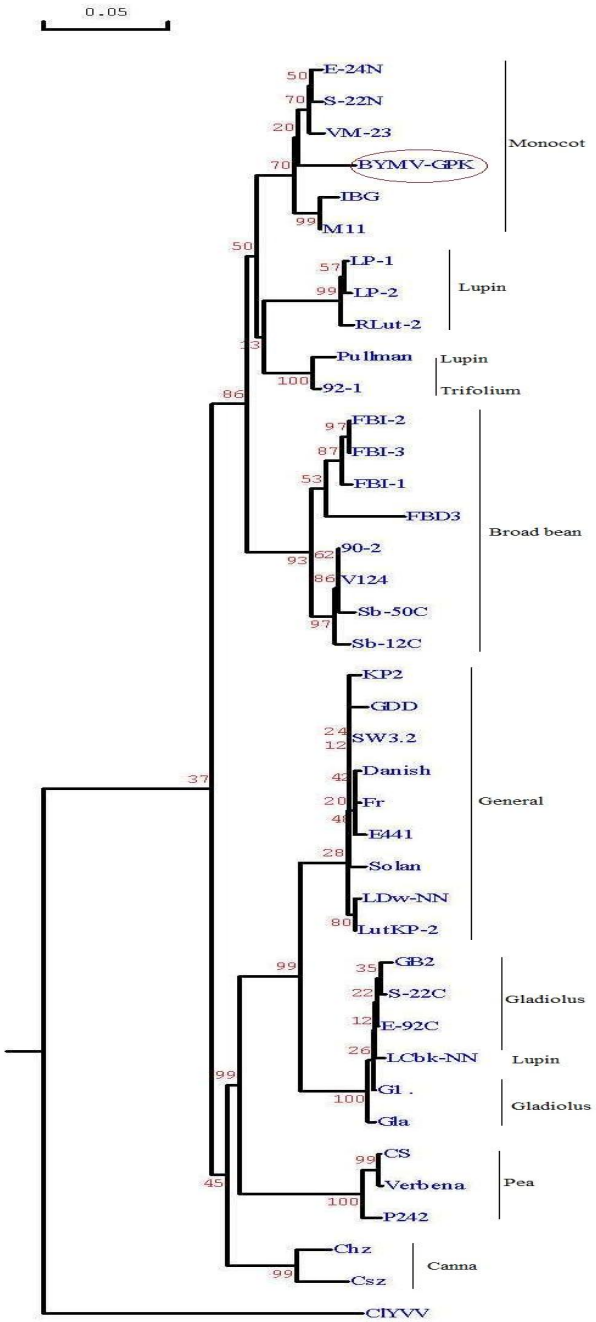
در درخت فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی بخشی از چارچوب ژنی پروتئین پوششی ۳۸ جدایهٔ BYMV از میزبان‌های مختلف دنیا به روش neighbor-joining، جدایه‌ها در دو خوشه و براساس منشأ میزبانی در هشت گروه قرار گرفتند (شکل ۷) که به‌غیر از سه گروه، دو گروه با دو منشأ میزبانی و گروه عمومی با چهار منشأ میزبانی، هر یک از پنج گروه دیگر با یک منشأ میزبانی بودند. نکتهٔ جالب توجه در این درخت اینکه همانند درخت قبلی، جدایه‌های گلایل در هر دو خوشهٔ مختلف قرار داشتند. درخت فیلوژنتیکی مربوط به ترادف ترجمهٔ اسید آمینه‌ای ناحیهٔ پروتئین پوششی این جدایه‌ها نیز مشابه درخت فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی بود. نتایج حاصل از مقایسهٔ ترادف نوکلئوتیدی قطعهٔ تکثیرشده از ژن پروتئین پوششی جدایه‌ها نشان داد که جدایهٔ

RLut-2 بیشترین و سه جدایهٔ E-92C، G1 و Gla کمترین شباهت را با جدایهٔ GPK داشتند (جدول ۳).

در درخت فیلوژنتیکی مربوط به ترادف نوکلئوتیدی ۱۴۹ بازی 3'-UTR از ۲۱ جدایهٔ مختلف میزبانی ویروس و جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق (BYMV-GPK) به روش neighbor-joining، جدایه‌ها در دو خوشه و چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۸) که به‌جز جدایهٔ مورد بررسی گلایل (GPK) تمام جدایه‌های میزبان‌های تک‌لپه‌ای در یکی از خوشه‌ها قرار داشتند و خوشهٔ دیگر شامل دو گروه از میزبان‌های دولپه‌ای (نخودفرنگی و لوبیا) و گروه سوم، شامل جدایه‌های گلایل (GPK) و شبدر (92-1) بود. همچنین 92-1 و GDD به‌ترتیب بیشترین و کمترین شباهت نوکلئوتیدی در ناحیهٔ 3' –UTR با جدایهٔ مورد مطالعه نشان دادند (جدول ۳).



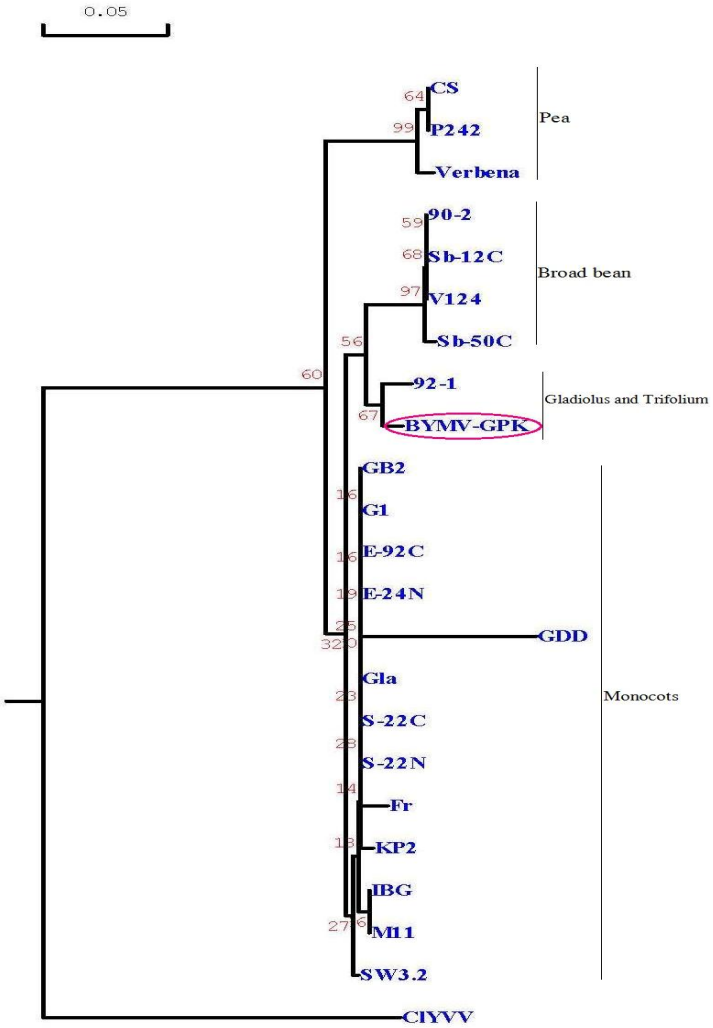
شکل ۶. درخت فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه HC-Pro ژنوم ۱۷ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) از مناطق مختلف دنیا و جدایه BYMV-GPK، با استفاده از نرم افزار DNAMAN و به روش neighbor joining. اعداد در محل گره ها نشان دهنده درجه اطمینان پس از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار می باشد. ترادف (*clover yellow vein virus*) ClYVV با رس شماره AB011819، به عنوان برون گروه استفاده گردیده است. رس شمار جدایه های مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۷. درخت فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی نیمه کربوکسیلی ناحیه پروتئین پوششی (CP) ژنوم ۳۸جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) از مناطق مختلف دنیا و جدایه BYMV-GPK، با استفاده از نرم افزار DNAMAN و به روش neighbor-joining. اعداد در محل گره ها نشان دهنده درجه اطمینان پس از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار می باشد. ترادف ClYVV (*clover yellow vein virus*) با رس شماره AB011819، به عنوان برون گروه استفاده گردیده است. رس شمار جدایه های مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

در درخت‌های فیلوژنی ترسیم‌شده، در اغلب موارد جدایه‌های BYMV براساس منشأ میزبانی از همدیگر تفکیک و در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند که جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق نیز در کنار سایر جدایه‌های گلایل یا جدایهٔ 1-92 شبدر قرار گرفت. قبلاً نیز تفکیک جدایه‌های BYMV براساس میزبان در مطالعات فیلوژنتیکی کل ژنوم و بخش‌های ژنومی اندامک‌های ضمیمه‌ای سیتوپلاسمی (CI) و پروتئین پوششی گزارش

شده است (Wylie *et al*., 2008; Nakazono-Nagaoka *et al*., 2009; Parrella & Lanave, 2009).



شکل ۸. درخت فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی 3'-UTR ژنوم ۲۱ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) از مناطق مختلف دنیا و جدایه BYMV-GPK، با استفاده از نرم افزار DNAMAN و به روش neighbor-joining. اعداد در محل گره ها نشان دهنده درجه اطمینان پس از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار می باشد. ترادف (*clover yellow vein virus*) ClYVV با رس شماره AB011819، به عنوان برون گروه استفاده گردیده است. رس شمار جدایه های مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

برخی محققان معتقدند که تنوع در ناحیهٔ 3'–UTR جدایه‌ها، ارتباط زیادی با منشأ میزبانی آنها دارد (Wada *et al*., 2000)، ازاین‌رو احتمالاً این ناحیهٔ ژنومی نسبت به پروتئین پوششی نقش مهم‌تری را در اختصاصیت میزبانی جدایه‌های BYMV ایفا می‌کند (Parrella & Lanave, 2009). براساس نتایج فیلوژنتیکی در این تحقیق، جدایه‌های BYMV براساس منشأ جغرافیایی از هم قابل تفکیک نیستند که تا حدی مشابه نتایج سایر محققان (Wylie *et al*., 2008) است.

تنوع بیولوژیکی و سرولوژیکی بین جدایه‌های BYMV جداشده از گلایل و غیر گلایل در مطالعات سایر محققان نیز مشاهده شده است (Nagel *et al*., 1983). گروهی از محققان معتقدند که سازگاری تکاملی جدایه‌ها با میزبان‌های خود علت تنوع بیولوژیکی و سرولوژیکی بین آنها است و بقای جدایه‌های آلوده‌کنندهٔ گلایل در پداژه‌های این گیاه را دلیل تنوع این جدایه‌ها از جدایه‌های غیر گلایل می‌دانند (Nakazono-Nagaoka *et al*., 2004b).

نتیجه‌گیری کلی

ویروس موزاییک زرد لوبیا در بخش‌های هوایی گیاه زینتی گلایل با روش‌های سرولوژیکی رایج به‌راحتی قابل شناسایی است، اما در پداژه‌ها و پداژک‌ها احتمالاً به‌دلیل تنوع سرولوژیکی زیاد این ویروس و دخالت مواد بازدارندهٔ موجود در بافت‌های آنها قابل شناسایی نیست.

در بررسی‌های فیلوژنتیکی بر مبنای ترادف نوکلئوتیدی بخشی از پروتئین پوششی، HC-Pro و 3' UTR، جدایه‌های ویروس براساس منشأ میزبانی از همدیگر تفکیک شدند و در خوشه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق در کنار جدایه‌های گلایل یا جدایه‌ای از شبدر قرار گرفت. با توجه به علائم ایجادشده توسط جدایهٔ BYMV-GPK در گیاهان محک باقلا و توتون (*N. benthamiana*) و نتایج حاصل از بررسی مولکولی، می‌توان این جدایه را از جمله جدایه‌های شدید بیماری‌زا در گلایل گروه‌بندی کرد. ازاین‌رو ارتباط اساسی و محکمی بین ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های قرارگرفته در یک گروه وجود دارد. دلیل تنوع بیولوژیکی و سرولوژیکی بین جدایه‌های BYMV، سازگاری تکاملی آنها با میزبان‌های خود است.

سپاسگزاری

نویسندگان از خانم مهندس ناهید حمزه و آقای مهندس کیوان غضنفری (کارشناسان بخش بیماری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی) به‌سبب کمک در اجرای این تحقیق سپاسگزارند.

REFERENCES

1. Anonymous. (1997). Gene banks for 150 gladiolus varieties developed Agricultural News, Vol. III, NO. 3. May-June. 139.
2. Atreya, P.L., Lopezmoya, J.J., Chu, M.H., Atreya, C.D. & Pirone T. P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *potyvirus* transmission by aphids. *Journal of General Virology*, 76, 265–270.
3. Bridgmon, G.H. &Walker, J. C. (1952). Gladiolus as a virus reservoir. *Phytopathology*, 42, 65-70.
4. Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the micro plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
5. Dijikstra, J. & Jager, C. (1998). *Practical plant virology protocols and exercises*. Springer Lab Manual 459Pp**.**
6. Frenkel, M.J., Ward, C.W. & Shukla, D.D. (1989). The use of 3′ non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to *Watermelon mosaic virus 2* and *Soybean mosaic virus*-N . *Journal of General Virology*, 2783-2775,70.
7. Hollings, M. & Brunt, A.A. (1981). *Potyvirus* group. CMI/ABB. *Description of plant viruses*. No. 249.
8. Huth, J.R., Bewley, C.A., Jackson, B.M., Hinnebusch, A G., Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1997). Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Science***,** 6, 2359-2364.
9. Kamran, R. & Izadpanah, K. (1981). Isolation and identification of BYMV and ToRSV from Gladiolus in Shiraz. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 17, 1-7.
10. Katoch, M., Abdin, M.Z., Raja, R. & Zaidi, A.A. (2003). An overview of diagnostics for viruses infecting gladiolus. *Crop Protection*, 22, 153-156.
11. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
12. Langeveld, A.S., Dore, J.M., Memelink, J., Derks, A.F. L.M., van der Vlugt, C.I. M. & Asjes, C.J. (1991). Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology*, 72, 1531–1541.
13. Nagel, J., Zettler, F.W. & Hiebert, E. (1983). Strains of *Bean yellow mosaic virus* compared to *Clover yellow vein virus* in relation to gladiolus production in Florida. *Phytopathology*,73, 449-454.
14. Nakazono-Nagaoka, E., Satoh, G., Kosaka, Y. &Natsuaki, T. (2004a). Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of *Bean yellow mosaic virus* by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 359-362.

15. Nakazono-Nagaoka, E., Manabe, T. & Kosaka, Y. (2004b). Transmission of *Bean yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in a field of gladiolus. *annual Kanto-Tosan Plant Protection Society*, 51,71-74 (in Japanese).
16. Nakazono-Nagaoka, E., Takahashi, T., Shimizu, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Omura, T. &Sasaya, T. (2009). Cross-protection against *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Clover yellow vein virus* by attenuated BYMV isolate M11. *Phytopathology*, 99(3), 251-257.
17. Parrella, G. & Lanave, C. (2009). Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. *Archives of Virology***,** 154, 1689-1694.
18. Rohani, B. (2008). *Survey partial of the biological and molecular characterization of Bean yellow mosaic virus isolated from faba bean planting in key areas in Iran*. M.Sc. Thesis. University College of Agriculture and Natural Resource, University Tehran, Iran.
19. Reverse, F. & Candresse, T. (2004). Family *Potyviridae* .In H. Lapierre, P. Signoret (Eds ,(.*Virus and virus diseases of Poaceae (Gramineae*) *.(*pp. 385- 389). INRA Publication.
20. Saitou, N. &Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
21. Sambrook, J. &Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
22. Sasaya, T., Nozu, Y. an&d Koganezawa, H. (1998b). Specific detection of *bean yellow mosaic virus* and *clover yellow vein virus* by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies.*Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 64, 179–182.
23. Shukla, D.D. &Ward, C.W. (1988). Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 69, 2703–2710.
24. Shukla, D.D. &Ward, C.W. (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research*, 36, 273-314.
25. Skaf, J.S. &Makkouk, K.M. (1988). Aphid transmission of *Bean yellow mosaic virus* and *Bean leaf roll virus* in Syria. *Phytopathologia Mediterranea***,** 27(3), 133-137.
26. Staniulis, J. (1967). Ankstiniu augalu virusines ligos. Kn. Virusines augalu ligos. *virology***,** 66-81.
27. Stein, A., Salomon, R., Cohen, J. & Loebenstein, G. (1986). Detection and characterization of *Bean yellow mosaic virus* in corms of*Gladiolus grandiflorus. Annals of Applied Biology*,109, 147–184.
28. Stein, A., Rosner, A. and Hammond, J. (1994). Detection of *Bean yellow mosaic virus* in gladioli corms. In V. Mokra, A. Brunt, T. Derks & A. Zaayen (Eds.), *Acta Horticulturae* (pp. 209–220). .
29. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.
30. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus ptoteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.
31. Valkonen, J.P.T., Rajama-Ki, M.L. & Kekarainen, T. (2002). Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7, 683– 692.
32. Vunsh, R., Rosner, A. &Stein, A. (1990). The use of the polymerasechain reaction (PCR) for the detection of *Bean yellow mosaic virus*in gladiolus. *Annals of Applied Biology*,117 (3), 561–569.
33. Vunsh, R., Rosner, A. &Stein, A. (1991). Detection of *Bean yellow mosaic virus* in gladioli and corms by the polymerase chainreaction. *Annals of Applied Biology*,119 (2), 289–294.
34. Wada, Y., Iwai, H., Ogawa, Y. &Arai, K. (2000). Comparison of pathogenicity and nucleotide sequences of 3'-terminal regions of *Bean yellow mosaic virus* isolates from Gladiolus. *Journal of General Plant Pathology*,66, 345-352.
35. Wylie, S.J. Coutts, B.A. Jones, M.G.K. and Jones, R.A.C. (2008). Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: Relationship between the seven distinct groups found and their natural isolation hosts and geographical origins. *Plant Disease*, 92, 1596-1603.