

مقایسه تنوع ژنتیکی ناحیه 3'UTR جدایه‌های ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر قند (Beet black scorch virus) خراسان با جدایه‌های ایران و سایر نقاط دنیا

جمشید سلطانی ایدلیکی^{۱*}، محسن مهرور^۲ و سید باقر محمودی^۳

۱- مربی پژوهشی، بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۲ - دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰)

چکیده

ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر قند (*Beet black scorch virus*, BBSV) از جمله ویروس‌های خاک‌برد چغندر قند است. در این تحقیق، ۸۰ نمونه چغندر قند از مزارع خراسان رضوی و شمالی جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA کل آنها، ناحیه 3'UTR ژنوم ویروس به تعداد ۳۱۵ نوکلئوتید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس و بهره‌گیری از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشتی تکثیر شد. این ناحیه در شش جدایه مختلف پس از همسانه سازی، توالی‌یابی و در NCBI ثبت شدند. نتایج بررسی خوشخواندی این جدایه‌ها (بر اساس 3'UTR) با کل جدایه‌های ثبت شده در بانک جهانی نشان داد که آنها در دو گروه عمده I و II قرار می‌گیرند به طوری که هر یک به دو زیرگروه تقسیم می‌شوند. شش جدایه این بررسی با ۲۳ جدایه از نقاط مختلف ایران در زیرگروه IA و چهار جدایه دیگر از خراسان در زیرگروه IB جای گرفتند. سه جدایه از کرمانشاه و یک جدایه از همدان (*Ir-KSh6*، *Ir-KSh4*، *Ir-KSh5* و *Ir-Ha2*) در زیرگروه IIA قرار گرفتند. چهار جدایه از کرمانشاه (*Ir-KSh9*، *Ir-KSh8*، *Ir-KSh7* و *Ir-KSh10*) به همراه جدایه‌های چینی، اروپایی و آمریکایی زیرگروه IIB را تشکیل دادند. نتایج مقایسه نوکلئوتیدی توالی شش جدایه نشان داد که اگرچه تغییر نوکلئوتیدی مهم در موقعیت ۳۴۷۷ (یوریدین بجای گوانین) صورت نگرفته است، اما در موقعیت ۳۳۹۸ آدنین جایگزین گوانین و در موقعیت ۳۳۹۳ فقط در جدایه فریمان (*MW274750*) یوریدین بجای سیتوزین جایگزین شده است. نتایج مقایسه میانگین شباهت نوکلئوتیدی ناحیه 3'UTR این جدایه‌ها نشان داد که با جدایه‌های ایرانی (به غیر از جدایه-های کرمانشاه با ۹۲/۵۲ درصد) در دامنه بین ۹۸/۷۵-۹۷/۳۷ درصد مشابهت دارند.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های چغندر قند، توالی‌یابی، ویروس‌های گیاهی.

Comparison of genetic variation of 3'UTR region of *Beet black scorch virus* in Khorasan isolates with the other isolates from Iran and the world

Jamshid Soltani Idliki^{1*}, Mohsen Mehrvar² and Seyed Bagher Mahmoudi³

1- Research Instructor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.

2 - Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karadi. Iran

(Received: Agu 2, 2020- Accepted: Dec 21, 2021)

Abstract

Beet black scorch virus is one of the soil-borne sugar beet viruses in Iran. In this research work, we collected 80 samples of sugar beet farms in Razavi and Northern Khorasan Provinces. After extraction of their total RNA, the 3'UTR region of the virus genome was amplified to 315 nucleotides using reverse transcription polymerase chain reaction using specific primers. The 3'UTR of six different isolates was sequenced following cloning and then submitted to NCBI. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of the 3'UTR region showed that the entire world isolates could be classified into two main groups II and I and each one was divided into two subgroups. Isolates of this study were grouped with 23 isolates from Iran in subgroup IA and Four isolates from Khorasan province were placed in the IB subgroup. Four Iranian BBSV isolates from the West were grouped in the subgroup IIA. All Chinese isolates and the European isolates together with the USA isolate clustered in subgroup IIB. The results of nucleotide comparison of six isolates showed that although no mutation occurred at position 3477 (uridine instead of guanine), However, in position 3398, adenine replaced guanine (similar to 60% of Iranian isolates) and in position 3393, uridine was substituted for cytosine only in Fariman isolates (*MW274750*). The results of comparing the average nucleotide identity of 3'UTR isolates in this study showed that they are identical to Iranian isolates in the range from 97.75% to 97.98%. Nevertheless, they had the least identity with Kermanshah isolates (92.52%).

Keywords: Plant viruses, sugar beet diseases, sequencing.

* Corresponding author E-mail: soltani51@gmail.com

مقدمه

ویروس خاک‌برد سوختگی سیاه برگ چغندرقد (Beet black scorch virus, BBSV) از جنس *Betanecrovirus* در خانواده *Tombusviridae* است (Cao et al. 2002a; Lommel, 2005) که ناقل آن در طبیعت شبه قارچ کیتريد *Olpidium brassicae* است (Junxi et al. 1999). این شبه قارچ به راحتی از طریق آب آبیاری، جابجایی خاک آلوده و قطعات آلوده ریشه چغندرقد از یک نقطه به سایر نقاط منتقل می‌گردد (Hull 2002). این ویروس چندوجهی بوده، ژنوم آن RNA تک‌رشته‌ای دارای ۳۶۴۴ نوکلئوتید با قطبیت مثبت و متشکل از شش قالب خواندنی (ORF) است. ژنوم فاقد ساختار CAP در انتهای ۵' و زنجیره PolyA در انتهای ۳' است (Cai et al. 1993). این ویروس برخلاف بسیاری از ویروس‌های گیاهی در غیاب Cap در ناحیه ۵' و پلی آدنین PolyA در انتهای ۳' خود، تنها با وجود ساختارهای ثانویه ویژه به نام-BYDV^۱ CITE قادر به ترجمه و تکثیر مناسب ژنوم خود است. این ساختار با ساختمان و شکل خاصی که به انتهای ۳' ژنوم می‌دهد باعث تسریع و تسهیل بیان و تکثیر ژنوم ویروس می‌گردد (Shen and Miller 2007). با این وجود با هر تغییر در سطح نوکلئوتیدی این ناحیه از ژنوم ویروس، ساختار ثانویه و عملکرد آن تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد (Merhvar and Bragard, 2009). گونزالس و همکاران در مطالعات تبارزایی بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی این ناحیه، جدایه‌های چینی، آمریکایی و اروپایی را در سه گروه مجزا از یکدیگر قراردادند (Gonzalez-Vazquez et al. 2009). ویروس BBSV برای اولین بار در اواخر سال ۱۹۸۰ میلادی در مغولستان و چین شناسایی شد (Liu and Xian, 1995; Zhang, 1996); به علت ایجاد علائم سوختگی و سیستمیک شدن آن در برگ‌ها به نام سوختگی سیاه برگ نامیده شد. سپس از آمریکا (John J Weiland et al. 2007)، ایران (Koenig and Valizadeh, 2008) و برخی کشورهای اروپایی

(Gonzalez-Vazquez et al. 2009) نیز گزارش شد. در مزارع چغندرقد چین، علائم به صورت ایجاد سوختگی‌های شدید به رنگ سیاه بر روی برگ‌ها و نکروز در ریشه چغندرقد آلوده به این ویروس بروز می‌کند (Cao et al. 2002; Guo et al. 2005). به نظر می‌رسد، این ویروس علائم ایجاد شده توسط ویروس عامل بیماری ریزومانیا را تشدید کند (Cai and Liu, 1991). علائم آلودگی به این ویروس در مزرعه شامل سوختگی سیاه برگ و توقف رشد چغندرقد است (Cai et al. 1993; X. Cui, 1988). جدایه‌های BBSV از ایالات متحده، علائم سوختگی سیاه برگ چغندرقد را نشان نمی‌دهد. این ویروس ظاهراً علائم بیماری ریزومانیا مانند تکثیر ریشه‌های فرعی را تشدید می‌کند (Weiland et al. 2007). در اسپانیا نیز در تعدادی از نمونه‌ها علیرغم وجود علائم بیماری ریزومانیا، ویروس عامل ریزومانیا (*Beet necrotic yellow vein virus, BNYYV*) در آن‌ها تشخیص داده نشده و فقط ویروس BBSV جداسازی گردید (Gonzalez-Vazquez et al. 2009). کونینگ و ولی زاده برای اولین بار، این ویروس را از مزارع کشت چغندرقد (تربت‌حیدریه در خراسان رضوی) گزارش نمودند (Koenig and Valizadeh, 2008). مهرور و همکاران (Mehrvar et al. 2009) در تحقیقی نشان دادند که بعضی از جدایه‌های این ویروس در مزرعه هیچ‌گونه علائم سوختگی بر روی برگ چغندرقد نشان نمی‌دهند، اما همراه BNYYV عامل بیماری ریزومانیا موجب تولید ریشه‌های فرعی فراوان می‌گردند. ویروس BBSV در حال حاضر در ده استان زیر کشت چغندرقد از جمله استان‌های خراسان، شناسایی شده است. بر این اساس وجود BBSV در مزارع چغندرقد استان‌های خراسان رضوی، شمالی، جنوبی، لرستان، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه و زنجان شناسایی و تأیید گردیده است (Mehrvar and Bragard 2011). بر اساس مطالعات فیلوژنی و آنالیز جمعیتی جدایه‌های ایرانی ویروس BBSV را می‌توان به دو سویه غربی و شرقی تقسیم‌بندی نمود (Samiei

1. Barley yellow dwarf virus (BYDV)-cap independent translation element-

GGGCACCTGGAAGACCAGGTATATAAG)^r طراحی شده توسط مهرور و همکاران (2011) به همراه دو میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله قبل به عنوان الگو استفاده شد. از کیت مسترمیکس شرکت Taq DNA Polymerase Master Mix Red- (Ampliqon (Denmark) و بر اساس دستورالعمل آن جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. این واکنش با برنامه دمایی شامل: سه دقیقه به منظور واسرشتگی ابتدائی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل ساخت رشته مکمل، اجرا شد. محصولات همه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز دو درصد رنگ‌آمیزی شده با گرین ویور (TMDNA Green Viewer) (شرکت پارس طوس-ایران) با غلظت یک میکرولیتر در میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه الکتروفورز PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA) از هم جدا شدند. سپس با استفاده از دستگاه Gel-Doc (AlphaImager Mini System)، از ژل حاوی باندهای تفکیک شده عکس برداری شد.

همسانه سازی ناحیه انتهای 3'UTR ویروس سوختگی سیاه چغندر

همسانه سازی در داخل ناقل پلاسمیدی^۳ pTG19-T بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Vivantis, Malaysia) انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب، به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH₅α ترانسفورم شدند. همسانه‌های ناحیه انتهای 3'UTR ویروس از طریق کلونی پی سی آر^۴ با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 شناسایی شدند. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعه هدف با استفاده از کیت isolation (GenetBio-Korea) Kit PrimPrep Plasmid DNA استخراج شده و سپس توالی‌یابی به روش

(et al. 2017). هدف از انجام این تحقیق جداسازی، شناسایی، تعیین توالی ناحیه 3'UTR ویروس سوختگی سیاه چغندر، مقایسه توالی آن‌ها با جدایه‌هایی از ایران و جهان (ثبت شده در بانک ژن) و گروه‌بندی آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA ی کل و RT-PCR

در شهریور سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ نمونه‌های چغندر (در مرحله رشد کامل بوته) از مزارع استان‌های خراسان رضوی و شمالی شامل مناطق مشهد، فریمان، چناران، جلگه رخ، جوین و شیروان با علائم سوختگی در برگ‌ها به‌خصوص در ارقام چغندر داخل فاد ژن یا ژن‌های مقاومت به بیماری ویروس ریزومانیا شامل شریف، جلگه، پایا دارای علائم ریشه‌ریشی (نمونه مشهد) یا بدون علائم ریشه‌ریشی (نمونه چناران) در ریشه‌های آلوده جمع‌آوری و در آزمایشگاه استخراج RNA ی کل با استفاده از کیت استخراج (RNA RNeasy Mini Kit) شرکت کیاژن بر اساس پروتکل شرکت سازنده (Qiagen-Germany) انجام شد. پنج میکرولیتر از آن برای بررسی‌های کمی و کیفی محصول الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TAE^۲ استفاده گردید.

سنتز cDNA ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر

سنتز cDNA ویروس BBSV با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (پارس طوس، ایران) و با استفاده از آغازگر Random hexamer primer (شرکت دنا زیست) انجام شد. برای تکثیر قطعه ۳۱۵ نوکلئوتیدی، در ناحیه انتهای 3'UTR ویروس از آغازگرهای اختصاصی رفت BBSV-
f)

ATTAGATCCCACATCCTGGTGTGGTTAA
BBSV- و برگشتی TC

3. Vectors
4. Colony PCR

2. Tris-acetate-EDTA

نتایج و بحث

ویروس‌های خاک‌برد متعددی از جمله BNYVV، (Beet soil-borne virus, Beet virus Q, BVQ) و BBSV روی ریشه چغندر قند ایجاد بیماری می‌کنند. این ویروس‌ها گاهی به صورت آلودگی مخلوط در مزرعه مشاهده می‌شوند (Meunier et al. 2003; Ratti and Henry, 2005). بنا بر بررسی‌های انجام شده در سال ۱۳۸۸ توسط مهرور و همکاران در ۳/۷ درصد از نمونه‌ها هر چهار ویروس BBSV، BVQ، BNYVV و BBSV موجود بودند و در هیچ‌یک از نمونه‌ها ویروس BVQ به همراه BBSV نبوده است که دلیل آن ممکن است رقابت دو ویروس بر سر اشغال جایگاه تکثیری در میزبان باشد (Mehrvar and Bragard, 2011). بر این اساس از شش منطقه کشت چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و شمالی نمونه‌هایی با علائم متفاوت در اندام‌های هوایی و ریشه جمع‌آوری شده، ردیابی ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر قند و تعیین برخی خصوصیات آن انجام گردید. در این بررسی علائم سوختگی در برگ‌ها به‌خصوص در ارقام چغندر قند داخلی فاقد ژن یا دارای ژن‌های مقاومت به بیماری ویروس ریزومانیا شامل شریف، جلگه، پایا و غیره دارای علائم ریش‌ریشی (نمونه مشهد) یا بدون علائم ریش‌ریشی (نمونه چناران) در ریشه‌های آلوده مشاهده گردید. در نمونه فریمان علاوه بر سوختگی در برگ رقم داخلی شکوفا (واجد ژن *Rz1* مقاوم به ریزومانیا) نکروز آوندی ریشه بدون علائم ریشه‌ریشی، مشاهده گردید (شکل ۱). محققین در چین اظهار نمودند که جدایه‌های چینی BBSV علاوه بر ایجاد نکروز در آوندهای ریشه، سبب ایجاد لکه‌های نکروتیک روی برگ‌های آلوده می‌شوند، با گسترش این لکه‌ها پس از یک هفته برگ‌ها به‌طور کامل خشک می‌گردند (Guo et al. 2005). جدایه‌های آمریکایی بدون ایجاد نکروز در برگ و ریشه چغندر قند موجب تولید ریشه‌های فرعی فراوان مشابه علائم بیماری ریزومانیا می‌گردند (Weiland et al. 2007) و در نمونه‌های چغندر قند اروپا نیز ویروس BBSV باعث ایجاد علائمی مشابه جدایه آمریکا شامل عدم ایجاد

سنگر^۵ با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. شش توالی‌های حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn با ۵۶ توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. در ادامه برای تعیین روابط خویشاوندی و رسم درخت فیلوژنتیکی این توالی‌ها به همراه جدایه‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA-X، Genius prime، 2019 و Excel 2013 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل ترادف‌های نوکلئوتیدی و ترسیم درخت فیلوژنی

ترادف نوکلئوتیدی به دست آمده از ناحیه 3'UTR در نرم‌افزار پایگاه داده آنلاین مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری^۶ بررسی و سپس در پایگاه اطلاعاتی GenBank مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) ثبت شد. با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime، 2019، شش توالی نوکلئوتیدی 3'UTR در این تحقیق با جدایه‌های ثبت شده در NCBI از ایران و دنیا هم ردیف‌سازی شدند. درخت فیلوژنتیکی و گروه‌بندی این توالی‌های نوکلئوتیدی با روش حداکثر احتمال ترکیب^۷ و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد و با توجه به اهمیت این ناحیه حفاظت شده از ویروس در ترجمه، تکثیر و بیماری‌زایی، ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی و غیر ایرانی بر اساس مدل مناسب کیمورا با دو متغیر^۸ با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X (Kumar and Tamura, 2018) بررسی شدند. در این طبقه‌بندی از ویروس *Tobacco necrosis virus* (TNV-D) به‌عنوان برون گروه (Out-group) استفاده شد. ماتریس درصد تشابه با استفاده از نرم‌افزار Sequence Demarcation Tool (SDT 1.2) (Varsani, and Martin, 2014) رسم و درصد تشابه نوکلئوتید با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime، 2019 محاسبه شد.

5. Sanger Sequencing

6. National center for Biotechnology Information (NCBI)

7. Maximum Likelihood method (MLM)

8. Kimura 2-parameter (K2+G)

چغندر قند (Gonzalez-Vazquez *et al.* 2009) می‌گردد.

علائم نکروز برگ‌ها و ایجاد ریشه‌ریشی در ریشه اصلی



شکل ۱. علائم BBSV روی ریشه چغندر قند در مزرعه فریمان
Figure 1. Symptoms of BBSV on the tap roots of sugar beet in Fariman

ایرانی به تفکیک استانی نشان داد که این جدایه‌ها با جدایه‌های استان‌های خراسان (kh)، همدان (Ha)، آذربایجان غربی (AzGh)، کرمان (Kr)، قزوین (Gh) و لرستان (Ir) بین ۹۸/۷۵-۹۷/۳۷ درصد مشابهت دارند، اما با جدایه‌های کرمانشاه (Ksh) کمترین شباهت (۹۲/۵۲ درصد) را دارند. نتایج نشان داد که این جدایه‌ها با جدایه‌های دیگر مناطق دنیا نیز از درصد تشابه کمتری برخوردارند، به طوری که با جدایه‌های آمریکایی، چینی و اروپایی به ترتیب ۸۹/۶۸، ۸۹/۵۶ و ۸۹/۲۱ درصد مشابهت دارند (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین درصد شباهت سطح نوکلئوتیدی جدایه‌های ایران (۳۵ جدایه)، اروپا (۱۳ جدایه)، چین (۷ جدایه) و آمریکا (۱ جدایه) نشان داد که شباهت بین جدایه‌های چین و آمریکا ۹۶/۸۲ درصد، چین و اروپا ۹۷/۷۷ درصد، اروپا و آمریکا ۹۷/۸۸ درصد، ایران و چین ۹۰/۳۷ درصد، ایران و آمریکا ۹۰/۳۶ درصد و در نهایت جدایه‌های ایران و اروپا ۹۰/۰۵ درصد (کمترین شباهت) هستند (شکل ۳). در تأیید نتایج این بررسی، قبلاً محققین با مقایسه توالی انتهایی 3'UTR سیزده جدایه اروپایی با دیگر جدایه‌ها اظهار کردند که شباهت بسیار زیادی بین جدایه‌های چینی، آمریکایی و اروپایی وجود دارد (Koenig and Valizadeh 2008; Weiland and

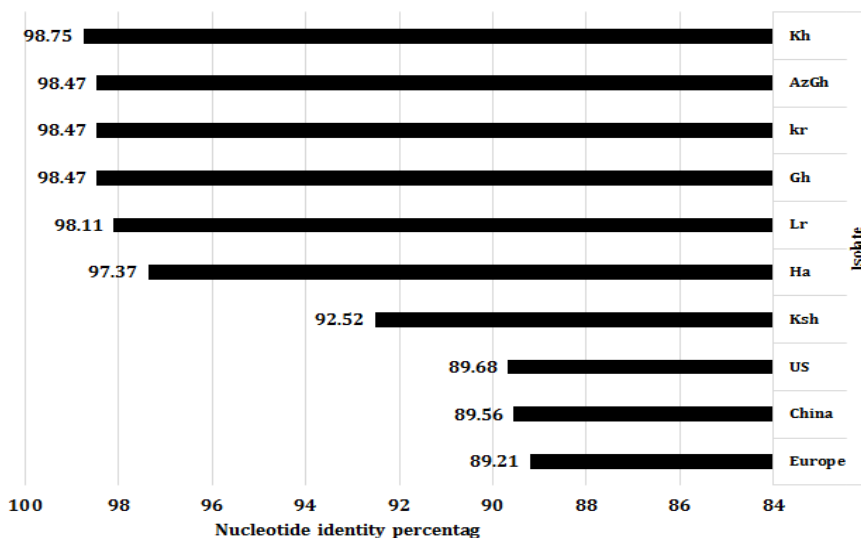
جهت ردیابی BBSV در نمونه‌های مورد مطالعه، ناحیه 3'UTR این ویروس با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلمیراز ترانس‌کریپتاز معکوس بررسی شد. در این بررسی نقوش الکتروفورزی، تکثیر قطعه ۳۱۵ نوکلئوتیدی مورد انتظار برای همه جدایه‌ها را نشان داد، این نتیجه حاکی از حضور ویروس در نمونه‌های جمع‌آوری شده بود. قبلاً نیز محققین از نمونه‌های ریشه چغندر قند با علائم ریشه‌ریشی در ریشه اصلی (علائم مختص بیماری ریزومانیا) در ایران، اسپانیا و آمریکا، BBSV را جداسازی نمودند (Weiland *et al.* 2007; Gonzalez-Vazquez *et al.* 2009; Merhvar *et al.* 2009; Samiei *et al.* 2017).

بررسی توالی نوکلئوتیدی 3'UTR شش جدایه ایرانی مربوط به مزارع چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و شمالی شامل فریمان (Ir-Far1 (MW274750)، مشهد (Ir-Mash1 (MK092329)، جوین (Ir-Jov1 (MW274751)، چناران (Ir-Chen1 (MW274749)، شیروان (Ir-MW274753)) و جلگه رخ (Ir-Rokh (MW274752) در پایگاه داده آنلاین مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری به ثبت رسیدند.

مقایسه میانگین شباهت سطح نوکلئوتیدی ناحیه 3'UTR جدایه‌های مورد مطالعه با دیگر جدایه‌های

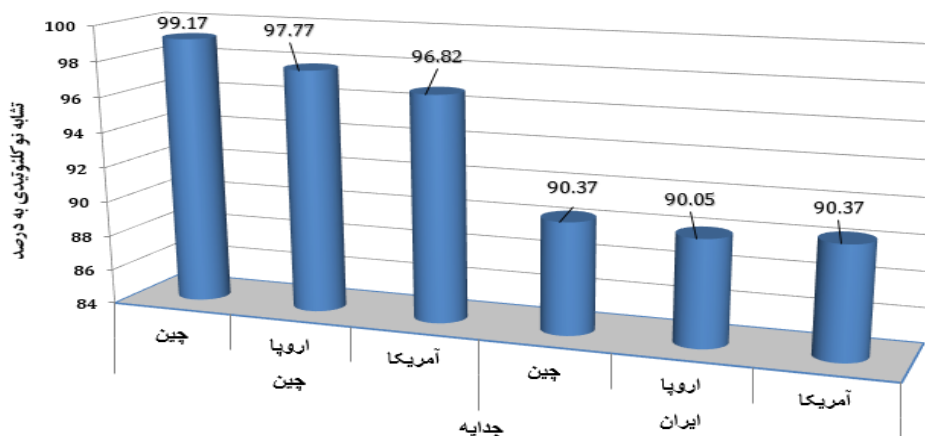
سمیعی و همکاران (2017) مطابقت دارد بطوریکه ایشان با آنالیزهای خویشاوندی توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی به این نتیجه رسیدند که با توجه به اینکه جدایه‌های چینی و ایرانی از نظر جغرافیایی به هم نزدیک هستند، اما جدایه‌های چینی به جدایه‌های آمریکایی مشابهت بیشتری دارند.

(Edwards 2006). نتایج بررسی مقایسه میانگین درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی 3'UTR نشان داد که اگرچه جدایه‌های ایرانی با اختلاف اندکی نسبت به جدایه‌های آمریکایی و اروپایی به جدایه‌های چینی شباهت دارند، اما جدایه‌های چینی درصد شباهت بیشتری به جدایه‌های اروپایی دارند (شکل ۳). این نتیجه با نتایج



شکل ۲. مقایسه میانگین درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی در ناحیه 3'UTR شش جدایه مورد مطالعه BBSV با سایر جدایه‌های ایران به تفکیک استان و جدایه‌های اروپا، آمریکا و چین (ثبت شده در NCBI) kh=خراسان، همدان=Ha، آذربایجان غربی=AzGh، کرمان=Kr، لرستان=Lr، قزوین=Gh

Figure 2. Comparison of the average percentage of nucleotide sequence identity of 3'UTR in six studied isolates with other isolates from Iran, Europe, America, and China (registered in NCBI).

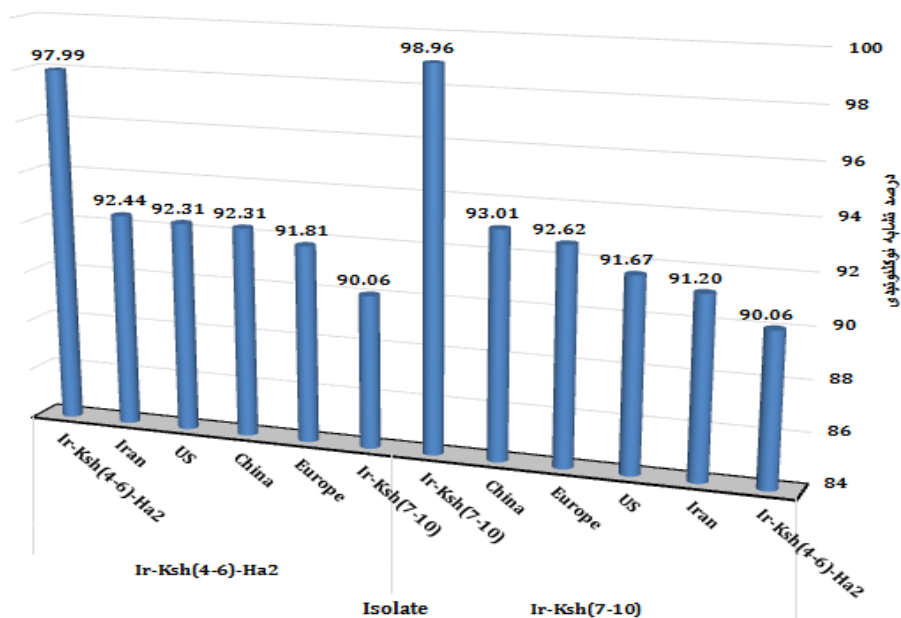


شکل ۳. مقایسه میانگین درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی در ناحیه 3'UTR ژنوم ۳۵ جدایه ایرانی BBSV با جدایه‌های سایر نقاط دنیا (ثبت شده در NCBI) و مقایسه جدایه‌های چین با جدایه‌های اروپا و آمریکا

Figure 3. Comparison of the average percentage of nucleotide sequence identity in 3'UTR of 35 Iranian isolates of BBSV with isolates from other parts of the World (Registered in NCBI) and Comparison of Chinese with European, and American isolates

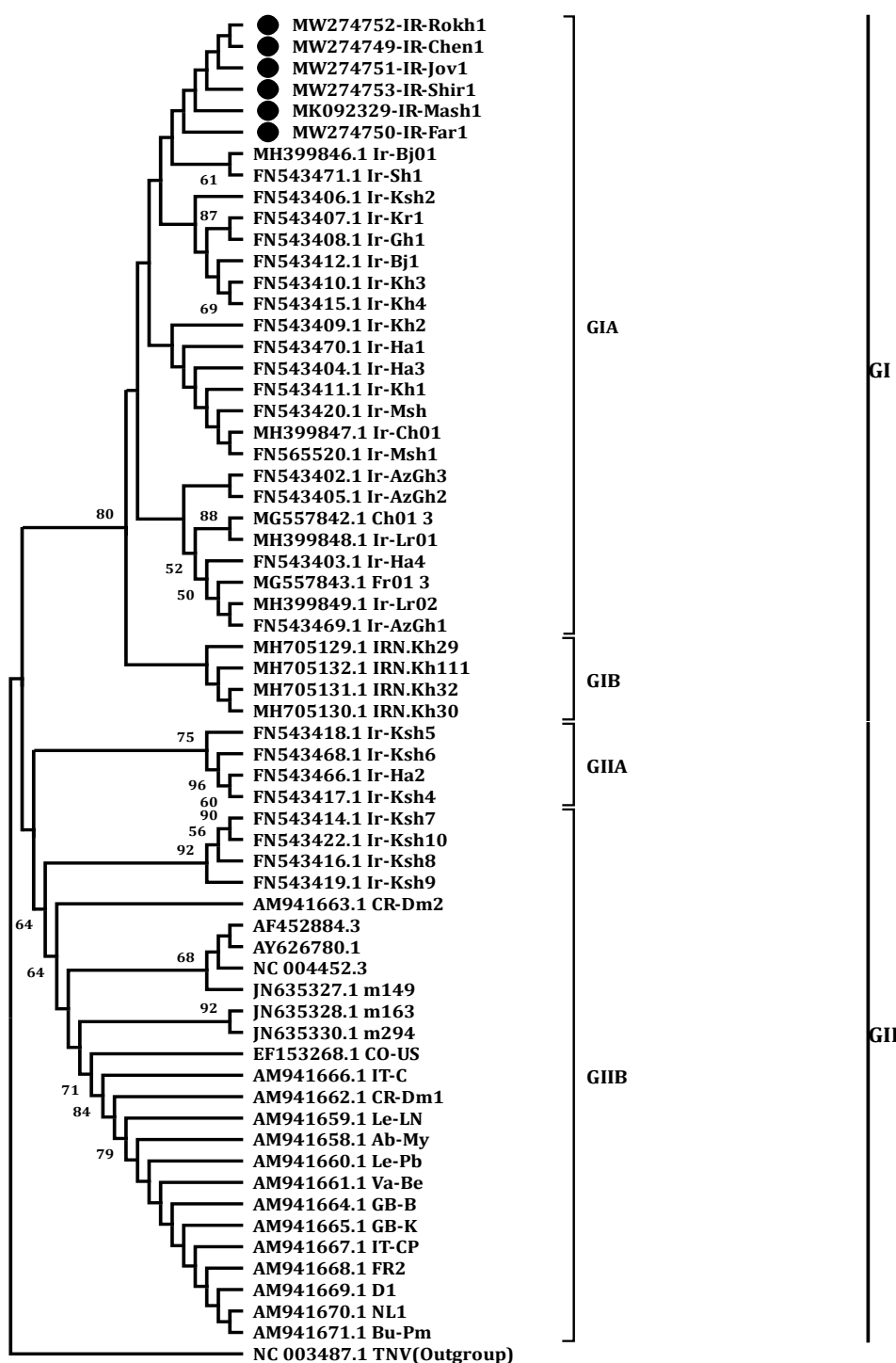
زیرگروه IIA و IIB تقسیم می‌شوند. بطوریکه سه جدایه از کرمانشاه (Ir-KSh5, Ir-KSh4, Ir-KSh6) و یک جدایه از همدان (Ir-Ha2) در زیرگروه IIA قرار می‌گیرند اگرچه دو محقق قبلی ذکر شده این چهار جدایه را در زیرگروه دوم از گروه اول قرار دادند، نتایج مقایسه نوکلئوتیدی این چهار جدایه نشان داد که با جدایه‌های چینی و آمریکایی تشابه نوکلئوتیدی (۹۲/۳۱ درصد) بالایی دارند (شکل ۴). با توجه به اینکه میانگین درصد تشابه نوکلئوتیدی چهار جدایه از استان کرمانشاه (Ir-KSh7, Ir-KSh8, Ir-KSh9 و Ir-KSh10) با جدایه‌های ایرانی کم بود (۹۱/۲۰ درصد) و بیشترین تشابه را با جدایه‌های چینی (۹۳/۰۱ درصد) داشتند، آن‌ها به همراه همه جدایه‌های چینی، اروپایی و آمریکایی در زیرگروه IIB گروه‌بندی شدند (شکل‌های ۴ و ۵). این نتیجه با نتایج سایر محققین ذکر شده کاملاً مطابقت دارد. در این بررسی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SDT نیز تجزیه و تحلیل و نمودار آن ترسیم شد که نتایج حاصل شده را مورد تأیید قرارداد (شکل ۶).

در آنالیز تبارزایی، جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق به همراه تعداد ۵۶ جدایه داخلی و خارجی (جدول ۲) موجود در بانک ژن NCBI بررسی شدند. ترادف‌های موجود از ناحیه 3'UTR متناظر با ناحیه تعیین ترادف شده به‌اندازه حدود ۲۷۳ نوکلئوتید انتخاب و هم‌ردیف‌سازی شدند. دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی (شکل ۵) نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی BBSV بر اساس ناحیه ذکر شده در دو گروه اصلی I و II جدا از هم قرار می‌گیرند که با گروه‌بندی سایر محققین (فرزادفر و همکاران ۲۰۱۹ و سمیعی و همکاران ۲۰۱۷) مطابقت دارد. جدایه‌های قرار گرفته در گروه اول (I) به دو زیرگروه IA و IB تقسیم می‌شوند. نتایج بررسی نشان داد که اکثر جدایه‌های ایرانی به همراه شش جدایه شناسایی شده در این بررسی در زیرگروه IA قرار می‌گیرند حال آنکه چهار جدایه از خراسان شامل IRN.KH29, IRN.KH30, IRN.KH32 و IRN.KH11 در زیرگروه IB جای گرفتند (شکل ۴). نتایج این بررسی نشان داد که گروه دوم (II) به دو



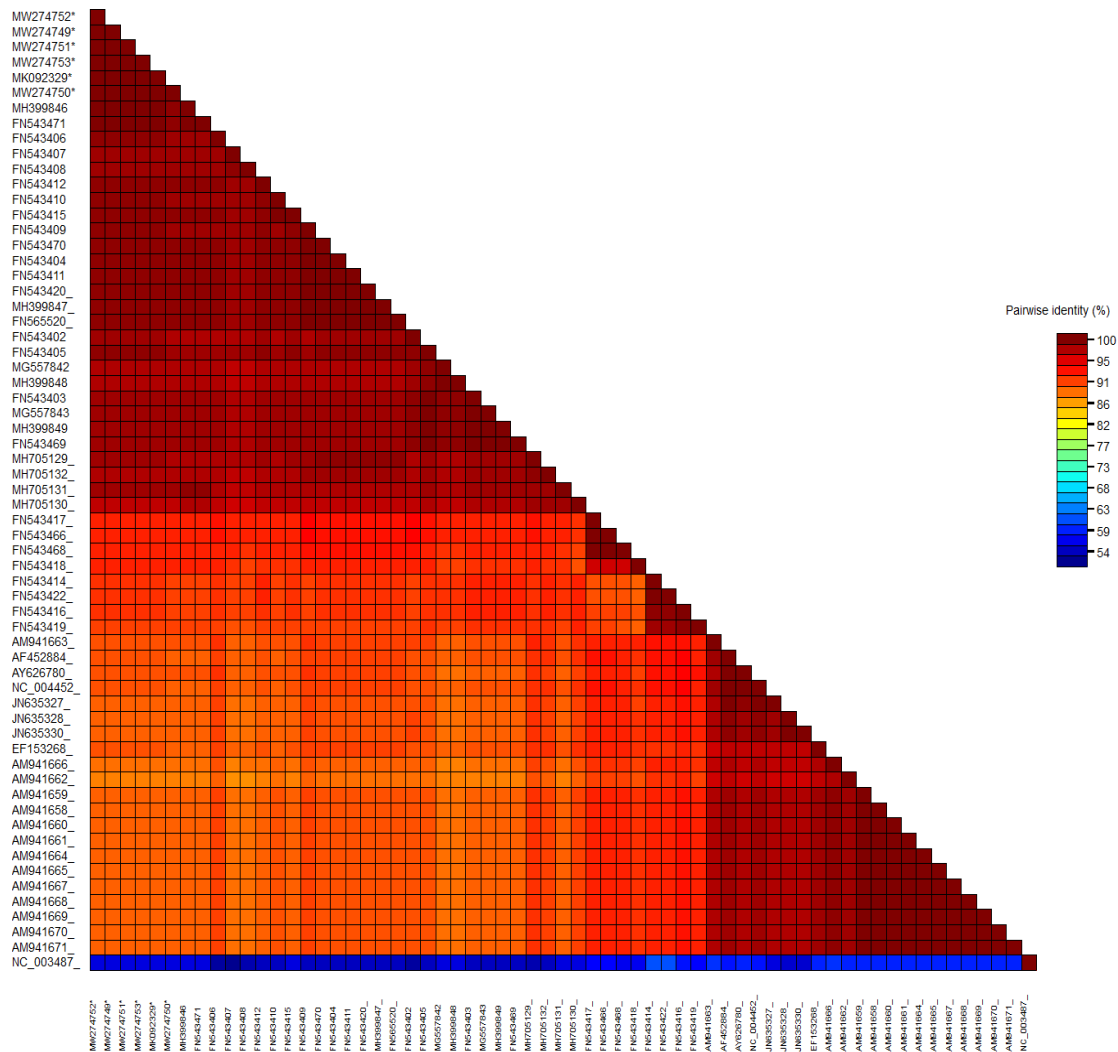
شکل ۴. مقایسه میانگین درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی در ناحیه 3'UTR ژنوم BBSV جدایه‌های کرمانشاه و همدان با جدایه‌های ایرانی، آمریکایی، اروپایی و چینی در NCBI

Figure 4. Comparison of the average percentage of nucleotide sequence identity in 3'UTR of Kermanshah and Hamadan isolates of BBSV with Iranian, European, American, and Chinese isolates (Registered in NCBI)



شکل ۵. درخت تبارزایی رسم شده به روش Maximum Likelihood method شش جدایه در این مطالعه (دایره مشکی) و سایر جدایه‌های ایران و جهان با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه یک‌سوم انتهایی (3'UTR) ژنوم BBSV. ویروس TNV-D به علت قرابت زیاد با BBSV، به‌عنوان برون گروه استفاده شد.

Figure 5. Molecular phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood Method (MLM) six isolate this study (black dot) and other isolates based on sequence 3'UTR of the BBSV genome. (Out group virus: *Tobacco necrosis virus-D*)



شکل ۶. مقایسه درصد شباهت نوکلئوتیدی شش جدایه شناسایی شده (*) با جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI بر اساس روش STD
Figure 6. Comparison of the percentage of nucleotide similarity of the six studied isolates (*) with the isolates in NCBI based Sequence Demarcation Tool (STD)

توجه به علائم مزرعه‌ای روی ریشه (نکروز آوند و بدون تولید ریشه‌های فرعی) و سوختگی برگ‌ی روی اندام‌های هوایی، نقش این نوکلئوتید مشخص نیست و نیاز به بررسی بیشتر دارد. دومین تغییر نوکلئوتیدی در موقعیت ۳۵۹۰ از ژنوم کامل این ویروس رخ داده است. بطوریکه در ۵۲ جدایه (۸۳/۹ درصد) از ۶۲ جدایه ثبت‌شده در بانک جهانی، به‌طورمعمول در این موقعیت نوکلئوتید آدنین (A) قرار دارد، اما نتایج این بررسی نشان می‌دهد که در ۱۰ جدایه ایرانی (شش جدایه مورد مطالعه و چهار جدایه شناسایی‌شده توسط دیگر محققین) نوکلئوتید آدنین به گوانین (G) تغییر یافته است. جالب این است که از ۱۰ جدایه مذکور، ۹ جدایه (۹۰ درصد) مربوط به جدایه‌های خراسانی بوده و تنها

مقایسه توالی نوکلئوتیدی در ناحیه انتهای 3'UTR شش جدایه موردبررسی (شباهت ۱۰۰-۹۹/۶۳ درصد) با ۵۶ جدایه ثبت‌شده در NCBI (جدول ۲) با نرم‌افزار MEGA-X نشان داد که در مجموع ۶۱ موقعیت از مجموع ۲۷۳ موقعیت نوکلئوتیدی در توالی‌ها تغییر یافته‌اند، این بدین معنی است که در ۲۲/۷ درصد از نوکلئوتیدهای توالی این ناحیه جهش رخ داده است. درحالی‌که مهرور و همکاران در سال ۲۰۰۹ مجموع تعداد جهش را در ۵۶ موقعیت اعلام کرده بودند. در این بررسی چهار تغییر اساسی مدنظر قرار گرفت. اولین مورد جهش از این تغییرات در نوکلئوتید موقعیت ۳۳۹۳ از ژنوم ویروس جدایه فریمان (Ir-Far1) است که در هیچ‌یک از جدایه‌های دیگر مشاهده نشد، با

می‌گردد (Xu *et al.* 2012). با بررسی ۵۷ جدایه ثبت‌شده در پایگاه جهانی NCBI، شش جدایه Ir- Ir-Ksh4(FN543417.1)، AzGh3 (FN543402) Ir- Ksh4(FN543418.1)، Ksh4(FN543418.1) و Ir- Ksh6 (FN543468.1) Ha2 (FN543466.1) در ایران و به همراه دو جدایه از چین China-m294(JN635330) و China-m163(JN635328) دارای این تغییر بودند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، جدایه‌های شناسایی‌شده در این بررسی با توجه به تنوع در ایجاد علائم در جدایه‌های مشهد، جوین و جلگه رخ (سوختگی برگ، نکروز در ریشه، ایجاد ریشه‌های فرعی)، جدایه چناران (سوختگی برگ) و جدایه فریمان (سوختگی برگ و نکروز ریشه) در شرایط طبیعی، نوکلئوتید یوریدین در جایگاه مذکور قرار گرفته بود (جدول ۲). در نتیجه عدم تغییر نوکلئوتیدی در جدایه‌های خراسانی این ویروس عامل اصلی در تفاوت علائم بیماری در میزبان نبوده و احتمالاً دلایل دیگری در این تغییرات مؤثر است که از آن جمله می‌توان به تغییرات نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پروتئین پوششی موجود در جدایه‌های مختلف یک ویروس اشاره نمود که باعث ایجاد علائم گوناگون شامل تشدید یا کاهش در بیماری‌زایی، افزایش شدت علائم، واکنش فوق حساسیت و یا اختلال در پدیده خاموشی ژنی اشاره نمود (Zhang *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013) که در این ویروس نیز ممکن است تغییرات پوشش پروتئینی نقش مهمی در تفاوت علائم ایجادشده داشته باشد، اگرچه تأیید نهائی آن نیاز به تحقیق بیشتر به‌خصوص بر روی تغییرات نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پروتئین پوششی^۱ دارد.

یکی (۱۰ درصد) از آن‌ها متعلق به جدایه‌های کرمانشاه (Ir-Ksh5, FN543418.1) است. در نتیجه جهش در این موقعیت نوکلئوتیدی می‌تواند موضوع مطالعه در آینده باشد؛ اما سومین تغییری که در بعضی از جدایه‌های ایرانی و همه جدایه‌های اروپایی، چینی (به‌جز جدایه AY626780.1) و آمریکایی مشاهده گردید، جایگزین شدن نوکلئوتید آدنین (A) به جای گوانین (G) در موقعیت ۳۳۹۸ توالی است. نتایج بررسی نشان داد که این تغییر در ۶۰ درصد (۲۵/۴۱) از جدایه‌های ایرانی (از جمله تمام جدایه‌های مورد بررسی) رخ داده است. مهرور و همکاران (2009) اثبات کردند که جدایه‌هایی که در این موقعیت به جای گوانین نوکلئوتید آدنین قرار گرفته باشد، آن جدایه در طبیعت همواره همراه با satRNA^۲ هستند و اظهار داشتند که در ۲۵ درصد از نمونه‌های مورد بررسی این satRNA ردیابی شده‌اند. نقش این satRNA در تشدید ایجاد علائم بیماری است اگرچه که در نمونه‌های آمریکایی و اروپایی و ایرانی علائم سوختگی برگی مربوط به این ویروس مشاهده نشده است و علائم بیشتر مشابه به علائم بیماری ریزومانیاست (Li *et al.* 2007; Weiland *et al.* 2008). فراتر از نقشی که قبلاً برای این satRNA توسط محققین در نظر گرفته شده بود، نتایج تحقیق ژو و همکاران در چین نشان داد که اثر متقابل پیچیده‌ای بین ویروس و satRNA های مرتبط در طول تکامل ویروس وجود دارد اگرچه مهرور و همکاران (2009) اظهار کردند که با ایجاد جهش در نوکلئوتیدهای این ناحیه در کلون آلودگی این ویروس تغییری در نقش ساختاری و کارایی آن ایجاد نخواهد شد اما بر اساس تحقیقات اخیر ژو و همکاران (2012) نشان می‌دهد که قرار گرفتن تک نوکلئوتید یوریدین (U) به جای نوکلئوتید گوانین (G) در جایگاه نوکلئوتیدی ۳۴۷۷ در ناحیه 3'UTR (GUA³⁴⁷⁶AAA³⁴⁸⁰) باعث افزایش قابل‌توجهی در بیماری‌زایی ویروس می‌گردد. نتایج ایجاد جهش در ناحیه یادشده نشان داده است که تغییر در یک جایگاه ژنی، یک نوکلئوتید و یا یک اسید آمینه باعث ایجاد تغییرات زیادی در عملکرد بیماری‌زایی ویروس

تعارض منافع

وجود ندارد."

"هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان

REFERENCES

1. Cai, Z. N. Chen, D. H. Wu, M. S. Cui, X. M. Yu, J. L., & Liu, Y. (1993). Identification of pathogenic virus of Beet black scorch virus disease and detection by synthesized cDNA probes. *J. Beijing Agric. Univ*, 19, 112.
2. Cao, Y. Cai, Z. Ding, Q. Li, D. Han, C. Yu, J., & Liu, Y. (2002). The complete nucleotide sequence of *Beet black scorch virus* (BBSV), a new member of the genus Necrovirus. *Archives of Virology*, 147(12), 2431–2435.
3. Cui, X. (1988). An icosahedral virus found in sugar beet. *J Xinjiang Shihezi Agric College*, 10, 73–78.
4. Cui, X. M. Cai, Z. N. Wu, J., and Liu, Y. (1991). Study on symptom pattern of sugarbeet rhizomania disease. *Plant Protect*, 17, 5–7.
5. Farzadfar, S., & Pourrahim, R. (2019). Positive selection and recombination shaped the large genetic differentiation of *Beet black scorch virus* population. *PLoS ONE*, 14(4), 1–19.
6. Gonzalez-Vazquez, M. Ayala, J. Garcia-Arenal, F., & Fraile, A. (2009). The occurrence of *Beet black scorch virus* infecting sugar beet in Europe. *Plant Disease*, 93(1), 21–24.
7. Guo, L.H. Cao, Y.H. Li, D.W. Niu, S.N. Cai, Z.N. Han, C.G. Yu, J.L. (2005). Analysis of nucleotide sequences and multimeric forms of a novel satellite RNA associated with *Beet black scorch virus*. *Journal of Virology*, 79(6), 3664–3674.
8. Hull, R. (2002). Virus Infection, Plant. In *Encyclopedia of Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc.
9. Junxi, J. Jingfeng, Z. Shaochen, C. Dajin, Y. Jialin, Y. Zhunan, C., & Yi, L. (1999). Transmission of *Beet black scorch virus* by *Olpidium brassicae*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 21(4), 525-528.
10. Koenig, R., and Valizadeh, J. (2008). Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. *Archives of Virology*, 153(7), 1397–1400.
11. Kumar, S. Stecher, G. Li, M. Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
12. Li, J. Li, M. Li, C. Gao, Y. Li, D. Han, C., & Yu, J. (2008). Effects on the local symptoms of subgenomic RNAs expressions and their translational products of *Tobacco necrosis virus* A Chinese isolate. *Chin Sci Bull*, 53.
13. Lommel, S. A. (2005). Family Tombusviridae. *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the *International Committee on Taxonomy of Viruses*, San Diego, USA, 2005.
14. Mehrvar, M., & Bragard, C. (2011). Iranian diversity of *Beet black scorch virus* and satellite. In *Proceedings of the Eighth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Louvain-La-Neuve, Belgium, 6-8 July 2011 (pp. 41–46). *International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*.
15. Mehrvar, M. Valizadeh, J. Koenig, R., & Bragard, C. G. (2009). Iranian *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV): pronounced diversity of the p25 coding region in A-type BNYVV and identification of P-type BNYVV lacking a fifth RNA species. *Archives of Virology*, 154(3), 501–506.
16. Mehrvar, M., & Bragard, C. (2009). *Beet black scorch virus* in Iran is more diverse than anywhere. *Phytopathology*, 99(6), S84
17. Meunier, A. Schmit, J. F. Stas, A. Kutluk, N., & Bragard, C. (2003). Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2356–2360.
18. Muhire, B. M. Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One*, 9(9).
19. Ratti, C. Clover, G. R. G. Autonell, C. R. Harju, V. A., and Henry, C. M. (2005). A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B. *Journal of Virological Methods*, 124(1–2), 41–47.
20. Samiei, A. Mehrvar, M., & Zakiaghl, M. (2017). Genetic diversity and distribution of *Beet black*

- scorch virus* in some provinces of Iran. *Journal of Plant Protection*. 20(4), 540–547.
21. Shen, R., & Miller, W. A. (2007). Structures required for poly (A) tail-independent translation overlap with but are distinct from, cap-independent translation and RNA replication signals at the 3' end of *Tobacco necrosis virus* RNA. *Virology*, 358(2), 448–458.
 22. Weiland, J.J. Larson, R. L. Freeman, T. P., & Edwards, M. C. (2006). First report of *Beet black scorch virus* in the United States. *Plant Dis*, 90.
 23. Weiland, John J, Van Winkle, D. Edwards, M. C. Larson, R. L. Shelver, W. L. Freeman, T. P., & Liu, H.Y. (2007). Characterization of a U.S. Isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology*, 97(10), 1245–1254.
 24. Xu, J. Liu, D. Zhang, Y. Wang, Y. Han, C. Li, D., & Wang, X.B. (2016). Improved Pathogenicity of a *Beet black scorch virus* Variant by Low Temperature and Co-infection with Its Satellite RNA. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1771.
 25. Xu, J. Wang, X. Shi, L. Zhou, Y. Li, D. Han, C., & Yu, J. (2012). Two distinct sites are essential for virulent infection and support of variant satellite RNA replication in spontaneous *Beet black scorch virus* variants. *Journal of General Virology*, 93(12), 2718–2728.
 26. Zhang, X. Zhao, X. Zhang, Y. Y. Niu, S. Qu, F. Zhang, Y. Y., & Li, D. (2013). N-terminal basic amino acid residues of *Beet black scorch virus* capsid protein play a critical role in virion assembly and systemic movement. *Virology Journal*, 10(1), 200.
 27. Zhang, Y. Zhang, X. Niu, S. Han, C. Yu, J., & Li, D. (2011). Nuclear localization of *Beet black scorch virus* capsid protein and its interaction with importin α . *Virus Res*, 155(1), 307–315.