

خالص سازی، تهیه آنتی سرم و فیلوژنی جدایه آفتابگردان ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) بر اساس ترادف بخشی از ناحیه CI ژنوم

محمد مرادی^۱، احمد حسینی^{۲*} و ثمین حسینی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران (hosseini.vru.ac.ir)

۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۲۵

چکیده

ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus, BYMV*)، از جنس *Potyvirus*، با دارا بودن دامنه میزبانی وسیع می تواند روی محصولات مختلف خسارت زیادی وارد کند. طی نمونه برداری هایی که در سال های زراعی ۹۳-۹۱ از مزارع آفتابگردان استان اصفهان صورت گرفت یک جدایه از این ویروس با علایم موزاییک و بدشکلی گزارش گردید که اختصاراً *BYSun* نامگذاری گردید. خالص سازی فیزیکی جدایه مورد مطالعه با استفاده از دو دور سانتریفوژ افتراقی بر روی بالشک های سوکروز ۲۰ و ۳۰ درصد انجام شد. از هر ۱۰۰ گرم بافت آلوده، حدود ۲۰-۱۵ میلی گرم ویروس خالص به دست آمد. وزن مولکولی پروتئین پوششی آماده خالص *BYSun* به روش SDS-PAGE، ۳۳/۵ کیلو دالتون بر آورد گردید. آنتی سرم جدایه مورد بررسی با استفاده از پنج تزریق هفتگی آماده خالص ویروس به خرگوش تهیه شد. نتایج آزمون الیزای غیرمستقیم مشخص کرد غلظت ۱/۲۵۰۰ گاماگلوبولین این آنتی سرم مناسب ترین رقت در آزمون های سرولوژیکی می باشد. یک قطعه به اندازه ۶۸۰ جفت باز از ناحیه کد کننده اندامک درون سیتوبلاسمی (CI) جدایه انتخابی با بهره گیری از جفت آغازگر عمومی پونی ویروس ها (CIRev/CIFor) در واکنش های زنجیره ای پلی مرز تکثیر گردید. مقایسه ترادف به دست آمده با ترادف های موجود در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از برنامه BLAST بیشترین شباهت را با جدایه *BYMV-S* از استرالیا نشان داد. تجزیه و تحلیل درخت های فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ترادف این ناحیه از ژنوم جدایه *BYSun* با سایر جدایه های *BYMV* نشان داد این جدایه ها در شش گروه *Lupin, General, Broad bean, Pea, W, S* قابل تفکیک هستند که تا حدود زیادی با منشاء میزبانی آن ها مطابقت دارد. جدایه *BYSun* به همراه *BYMV-S* در شاخه S جای گرفت.

کلید واژه ها: ویروس موزاییک زرد لوبیا، آفتابگردان، فیلوژنی

مقدمه

آسانی می تواند در محصولات چند ساله تیره بقولات (*Leguminosae*) مانند شبدر و یونجه یا علف های هرز مانند ماشک زمستانگردانی کند. *BYMV* بر روی گلایول نیز آلوده کننده است. این ویروس در میزبان هایی مانند نخودفرنگی، باقلا، لوبیا و توتون (*Nicotiana clevelandii*) به خوبی تکثیر می یابد (Bos, 1970).

ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus, BYMV*) برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ از ایالت متحده آمریکا و از روی لوبیای فرانسوی (*Phaseolus vulgaris*) گزارش شده است (Doolittle and Jones, 1925). این ویروس دامنه میزبانی وسیعی دارد و به

Wylie et al., 2008). Pea, Monocot و W قرار دادند (Wylie et al., 2008). در پژوهش یادشده از پروتئین VPg نیز برای تمایز جدایه‌ها در مطالعات فیلوژنی استفاده گردید، که طی آن جدایه‌های BYMV به پنج گروه متمایز I, II, III, VI و V تقسیم شدند.

تاکنون *Cucumber mosaic virus* (Danesh, 1969), *Tobacco streak virus*, *Potato virus Y* (Hosseini et al., 2007; Hosseini et al., 2012) و *Tomato spotted wilt virus* (Motamedi et al., 2009) از مزارع آفتابگردان ایران گزارش شده‌اند. در نمونه برداری‌های انجام شده از مزارع آفتابگردان استان اصفهان، (Rabiee, 2013) آلودگی این گیاه به BYMV برای اولین بار از ایران گزارش شد. در پژوهش حاضر، جدایه‌ای تحت عنوان BYSun انتخاب و پس از خالص سازی فیزیکی، تهیه آنتی سرم علیه آن تهیه شد. علاوه بر این، جایگاه این جدایه ویروس در بین سایر جدایه‌های BYMV بر اساس ناحیه کدکننده اندامک درون سیتوپلاسمی (CI) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

منبع ویروس

از گیاه باقلا به عنوان میزبان تکثیر جدایه BYMV که با نام اختصاری BYSun نامگذاری می‌شود استفاده شد. این جدایه پس از خالص سازی بیولوژیکی اولیه، در کلکسیون ویروس شناسی دانشگاه ولی عصر رفسنجان نگهداری می‌گردد (Rabiee, 2013). بافت آلوده به ویروس در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با اسیدیته هفت عصاره گیری و پس از پاشش پودر کاربراندوم روی گیاه میزبان، مایه زنی به صورت مکانیکی انجام شد. گیاه در شرایط گلخانه در دمای ۲۰-۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

خالص سازی فیزیکی

به منظور خالص سازی BYSun از روش *minipurification* به روش Lane (1986) همراه با تغییرات اساسی به شرح زیر استفاده گردید (Hosseini et al., 2010):

ویروس موزاییک زرد لوییا عضوی از خانواده *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* می‌باشد. پیکره ویروس، میله‌ای خمش پذیر به طول ۷۵۰ نانومتر و عرض ۱۵-۱۲ نانومتر می‌باشد. پیکره دارای ۵ درصد اسید نوکلئیک، ۹۵ درصد پروتئین و فاقد لیپید است (Hull, 2002). این ویروس با ویروس‌های زردی رگبرگ شبدر (*Clover yellow vein virus*, CIYVV) و موزاییک معمولی لوییا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) ارتباط سرولوژیکی دارد.

بذور آلوده منبع مهمی برای پراکندگی و انتشار بیماری‌های ویروسی می‌باشند. BYMV در لوییا (Orellana and Fan, 1978) و سویا (Nooh, 1985) با بذر منتقل نمی‌شود ولی از طریق بذر باقلا تا ۱/۵ درصد انتقال می‌یابد. با این حال، بر اثر فعالیت شته‌ها می‌تواند به سرعت در سراسر مزرعه پراکنده شود. ویروس موزاییک زرد لوییا به راحتی از طریق مکانیکی قابل انتقال است (Bos, 1970).

بسیاری از سویه‌های BYMV، با آزمون‌های بیماری‌زایی، ویژگی‌های سرولوژیکی و اخیراً با روش‌های مولکولی تشخیص داده می‌شوند. Inouye (1968) بر اساس دامنه میزبانی سه سویه B از باقلا، P از نخود و O از لویای معمولی را از ژاپن گزارش کرده است. در مطالعات بعدی با استفاده از هیبریداسیون RNA/cDNA کل ژنوم، سویه‌ها به چهار گروه ژنتیکی تقسیم شدند که با سویه‌های B، P و O مطابقت داشتند. در این طبقه‌بندی یک سویه جدید دیگر نیز از گلائیول (*Gladiolus hybrida*) جدا شد (Wada et al., 2000). در پژوهش‌های مختلف از نواحی CP و 3'UTR برای بررسی روابط فیلوژنتیکی و تعیین سویه‌های BYMV استفاده شده است (Choi et al., 2013; Parrella and Lanave, 2009; Guyat et al., 1996; Wylie et al., 2008) فیلوژنی مترادف‌های ژن پروتئین پوششی ۶۴ جدایه را از نظر نوع میزبان طبیعی اولیه و توزیع جغرافیایی بررسی کردند و جدایه‌های مورد بررسی را در هفت گروه *Lupin*, *General*, *Canna*, *Broad bean*،

آن با محلول سولفات آمونیوم اشباع، از کروماتوگرافی ستونی با بهره‌گیری از سلولوز DEAE^۲ استفاده شد (Clark and Adams, 1977). محلول‌های عبور کرده از ستون سلولوز با یکدیگر مخلوط و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۱/۴ تنظیم گردید. محلول‌های IgG حاصل در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون ELISA غیرمستقیم به روش ارائه شده توسط Converse and Martin (1990) با تغییراتی انجام شد. نمونه‌های برگ گیاهان باقلای سالم و آلوده جدایه مذکور در بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار عصاره‌گیری شد و در مقادیر ۱۰۰ میکرولیتری درون حفرات میکروپلیت^۳ ریخته و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. غلظت‌های ۱:۱۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۵۰۰، ۱:۲۰۰۰، ۱:۲۵۰۰ و ۱:۳۰۰۰ از IgG ضد ویروس برای جدایه مذکور در بافر Blocking (بافر شستشو حاوی دو درصد PVP و egg albumin) تهیه و به چاهک‌ها اضافه گردیدند. سپس آنتی‌بادی ضد خرگوش متصل به آنزیم (Goat antirabbit IgG-E) با غلظت ۱:۳۰۰۰ در بافر نمونه حاوی سه درصد شیر خشک تهیه، و درون چاهک‌ها ریخته شد. در نهایت محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پارانیتروفنیل فسفات^۴ در بافر زمینه تهیه شد و میزان واکنش‌های انجام شده در رقت‌های مختلف IgG و آنتی ژن با تعیین میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت خوان (BIOTEK مدل ELx 808) اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA کل و RT-PCR

RNA کل نمونه باقلای آلوده به جدایه BYSun با استفاده از Column RNA isolation kit (شرکت دنازیست-ایران) استخراج شد. در این پژوهش بخشی از ناحیه CI ژنوم با استفاده از آغازگر اختصاصی خانواده پوتی

پانزده گرم بافت برگ گیاه باقلا دارای علائم موزائیک در ۱۲۰ میلی‌لیتر بافر شامل سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، (حاوی ۰/۱ درصد NaDIECA و ۰/۲۵ درصد ۲-مرکاپتواتانول) با اسیدیته ۶/۵ افشره‌گیری شد. در مرحله همگن‌سازی به افشره حاصل به میزان ۱۰ درصد حجم کلروفورم اضافه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله شفاف‌سازی به رونشین حاصل یک سوم حجم محلول تریتون X-100 (حاوی ۳۳ درصد تریتون در سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس مخلوط گردید. افشره تیمار شده با تریتون در دو مرحله با استفاده از سانتریفیوژاتراقی بر روی بالشتک تهیه شده از سوکروز ۲۰ درصد و ۳۰ درصد در سیترات آمونیوم به مدت ۲۷۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. آماده نهایی به عنوان آماده نسبتاً خالص جمع‌آوری گردید. کیفیت نوکلئوپروتئین خالص شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ (BioTech, Epoch) بررسی شد. همچنین برای بررسی خلوص آماده خالص شده و اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین پوشش از الکتروفورز عمودی در ژل پلی‌آکریل آمید حاوی سدیم دو سیل سولفات^۱ (SDS-PAGE) به روش Laemmli (1970) استفاده شد.

تهیه آنتی‌سرم و آزمون الیزا

برای تهیه آنتی‌سرم جدایه BYSun پنج تزریق به صورت زیر جلدی در پشت گردن خرگوش نیوزلندی به فواصل یک هفته انجام گرفت. در هر بار تزریق ۲۰۰ میکرولیتر آماده خالص حاوی ۱/۶ میلی‌گرم ویروس خالص با حجم مساوی روغن Freund's incomplete adjuvant مخلوط و به مدت ۳-۵ دقیقه بهم زده شد تا به صورت امولسیون درآمد. یک هفته پس از آخرین تزریق، عمل خونگیری از رگ‌های حاشیه‌ای گوش خرگوش انجام پذیرفت. برای خالص‌سازی گاماگلوبولین، پس از رسوب دادن

2- Diethylaminoethyl cellulose
3- Microtiter plate
4- Para-nitrophenyl phosphate

1- Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

از ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه یک دقیقه و یک چرخه ۶۸ درجه‌ای به مدت پنج دقیقه (جهت کامل شدن رشته‌های ناقص) اعمال گردید.

ترادف یابی و آنالیز ترادف

محصولات PCR مربوط به ناحیه تکثیر شده از جدایه مورد بررسی به شرکت MacroGen در کشور کره جنوبی برای تعیین ترادف فرستاده شد. قطعات تکثیر شده در دو جهت با استفاده از آغازگرهای CIREV و CIFor تعیین ترادف گردیدند. ترادف نواحی تکثیر شده ابتدا با برنامه Chromas version 2.13 بازبینی و سپس با نرم افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادف‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. هم‌ردیف‌سازی چندگانه بر اساس ترادف نوکلئوتیدی و بازسازی درخت فیلوژنی به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI Advance 11 software (Invitrogen) و MEGA6 (Tamura et al., 2013) انجام شد. درخت فیلوژنی با روش Maximum Likelihood و بر اساس آزمون اعتبارسنجی (Bootstrap) ۱۰۰۰ ترسیم گردید.

نتایج و بحث

حدود ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی مکانیکی روی برگ‌های باقلا علایم موزاییکی سبزرده ظاهر شد (شکل ۱). این گیاه به‌عنوان منبع ویروس جهت خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

ویریده تکثیر شد. ساخت cDNA در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. در مرحله اول ده میکرولیتر آب، دو میکرولیتر Reverse transcriptase Buffer (10X)، یک میکرولیتر dNTPs (10 mmol/μ lit)، یک میکرولیتر آغازگر CIREV (10 pmol/ul) با ترادف 5'-ACICCRTTYTCDATDATRRTTIG TIGC-3' (Ha et al., 2007) و پنج میکرولیتر از RNA کل استخراج شده و ویروس درون میکروتیوب ریخته، و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه RNA شکسته شود و سپس بلافاصله بر روی یخ منتقل گردیدند. در مرحله دوم نیم میکرولیتر آنزیم MuMLV Reverse transcriptase (RT) و نیم میکرولیتر آنزیم RNase inhibitor (40 U/μl) اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. به این ترتیب cDNA آماده شد. واکنش PCR با استفاده از cDNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل شش میکرولیتر آب، ۱۲ میکرولیتر Master mix (ساخت شرکت ویراژن ایران)، یک میکرولیتر CIFor (10 pmol/ul) با ترادف 5'-GGIVVIGTIGGIWSIGG IAARTCIAC-3' (Ha et al., 2007)، یک میکرولیتر CIREV (10 pmol/ul) و پنج میکرولیتر cDNA بود. برنامه حرارتی PCR در یک چرخه ۹۴ درجه به مدت سه دقیقه، ۴۰ چرخه متشکل



شکل ۱- علایم جدایه BYSun سه هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی روی گیاه باقلا

Figure 1. Symptoms on BYSun-infected broad bean three weeks after mechanical inoculation

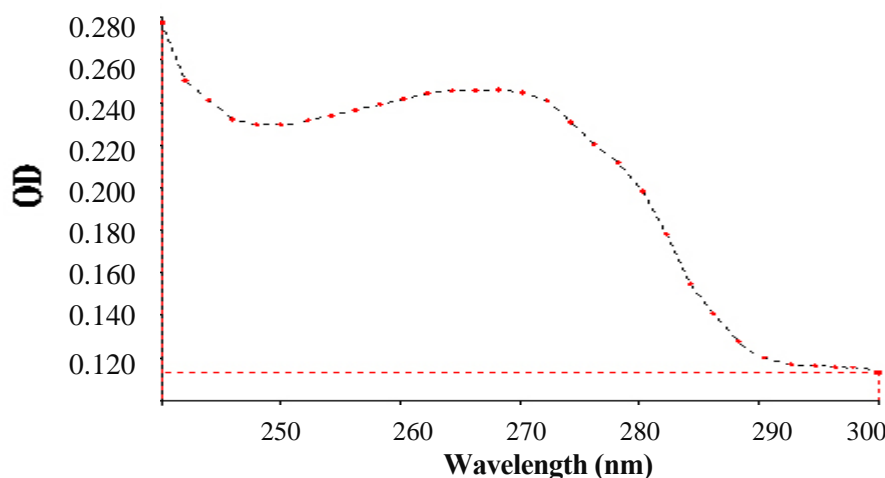
بهره‌گیری از کلروفورم به‌عنوان یکی از تغییرات افزوده شده به پروتکل اصلی اثر قابل توجهی در حذف سریع پروتئین‌های گیاهی و تغییر رنگ آموده گیاهی در طی مراحل خالص‌سازی دارد. با استفاده از رابطه $C = OD_{260}/E_{2/1}$ ، با در نظر گرفتن $E_{2/1} = 2/1$ که برای بسیاری از پوتی ویروس‌ها گزارش شده است (McDaniel and Gordon, 1989)، میزان ویروس خالص شده از ۱۰۰ گرم بافت بین ۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم برآورد گردید. نتایج الکتروفورز آموده خالص جدایه BYSun بیانگر تشکیل تنها یک باند قوی پروتئینی بود که نشان‌دهنده خلوص بالای آموده به‌دست آمده می‌باشد (شکل ۳).

با استفاده از روش Weber and Osborn (1969)، و پس از ترسیم خط رگرسیون بین لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌ها و میزان حرکت نسبی باندهای پروتئینی، وزن مولکولی پروتئین پوششی این ویروس ۳۳/۵ کیلو دالتون برآورد گردید (شکل ۴).

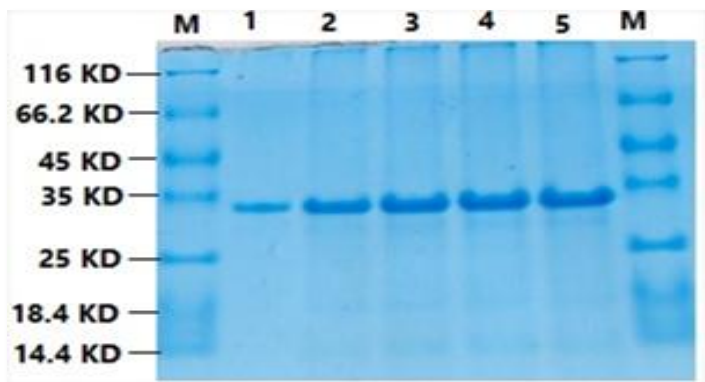
استفاده از الیزای غیر مستقیم در آزمون عیارسنجی مشخص نمود در تمام رقت‌های مورد استفاده، بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن موجود در عصاره گیاه آلوده واکنش مثبت دیده شد. مقرون به صرفه‌ترین حالت استفاده از این آنتی‌بادی، غلظت ۱:۲۵۰۰ بود که به خوبی آنتی‌ژن را در رقت ۱:۵۰ ردیابی کرد. میزان جذب نور در این رقت از

در خالص‌سازی BYSun، سوسپانسیون نیمه شفاف به‌دست آمده پس از حذف رسوب، حاصل از آخرین سانتریفیوژ دور پایین به‌عنوان آموده نسبتاً خالص ویروسی مورد استفاده قرار گرفت. نسبت میزان جذب نوری برای محصول خالص شده در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (A_{260}/A_{280}) ۱/۴۸ برآورد گردید که نشان‌دهنده خلوص نسبتاً مناسب آموده مورد مطالعه می‌باشد. منحنی جذب حاصل از این جدایه خالص شده بیشترین جذب را در طول موج ۲۶۵ نانومتر و کمترین جذب را در طول موج ۲۴۵ نانومتر نشان داد (شکل ۲).

خالص‌سازی پوتی ویروس‌ها همواره با مشکلات زیادی همراه می‌باشد و اغلب راندمان این فرآیند پایین بوده است (Hollings and Brunt, 1981). در ویروس‌های رشته‌ای بخش مهمی از پیکرهای ویروس به سبب به هم چسبیدن و یا خرد شدن در طول مراحل مختلف خالص‌سازی از دست می‌رود (Jones and Tolin, 1972). روش minipurification که یک روش خالص‌سازی نسبی است برای تشخیص ویروس‌های ناشناخته با استفاده از آزمون‌های الکتروفورز شیوه‌ای سریع و مفید است. از ویژگی‌های مثبت این روش کارایی آن با مقادیر کم بافت گیاهی است. استفاده از تریتون X-100 یکی دیگر از مزایای مهم روش یاد شده برای رفع این مشکل می‌باشد.

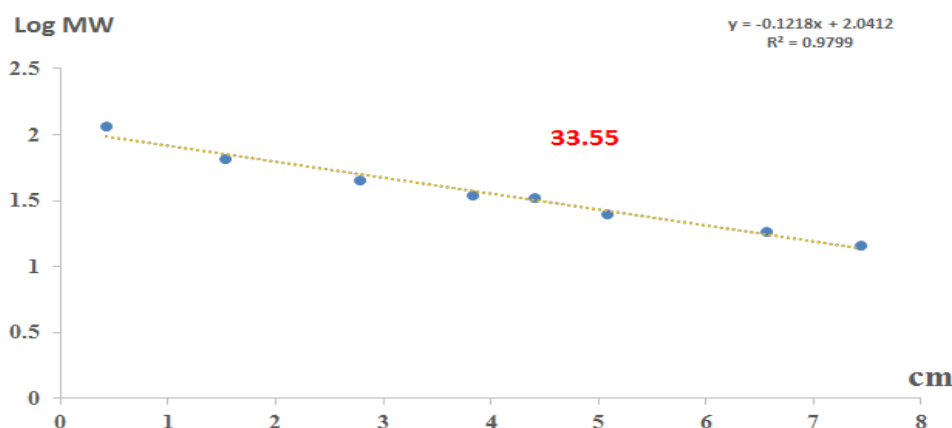


شکل ۲- نمودار طیف جذبی آموده نسبتاً خالص جدایه BYSun در ناحیه نور ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه نانودراپ
Figure 2. UV spectrophotometry of partially purified preparation of BYSun using nanodrop (BioTech)



شکل ۳- نقش الکتروفورزی آماده نسبتاً خالص جدایه BYSun. راهک های M: پروتئین های استاندارد، راهک ۱ تا ۵: غلظت های مختلف آماده خالص شده و پروس با استفاده از روش minipurification

Figure 3. SDS-PAGE of partially purified BYSun. Lines M: standard protein marker, line 1-5: different dilutions of partially purified preparation using minipurification method



شکل ۴- خط رگرسیون تخمین وزن مولکولی پروتئین پوششی آماده خالص جدایه BYSun بر اساس حرکت نسبی پروتئین های استاندارد (محور افقی) و لگاریتم وزن مولکولی آن ها در ژل پلی آکریل آمید

Figure 4. Determination of BYSun CP molecular weight based on relative migration distance of standard protein marker and log of their molecular weight In SDS-PAGE

آغازگرهای مورد استفاده دارای ۶۸۰ جفت باز بود (شکل ۵) که با ترادف آغازگر CIFor شروع و به ترادف مکمل آغازگر CIREv ختم شد.

نمونه تعیین ترادف شده با برنامه BLAST مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بلاست شباهت این جدایه را با جدایه های BYMV موجود در بانک ژن آشکار نمود. این مقایسه نشان داد ترادف نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده از ژنوم بیشترین شباهت را به قسمتی از همین ناحیه از ژنوم جدایه استرالیایی BYMV-S با یکسانی نوکلئوتیدی ۹۸ درصد داشت.

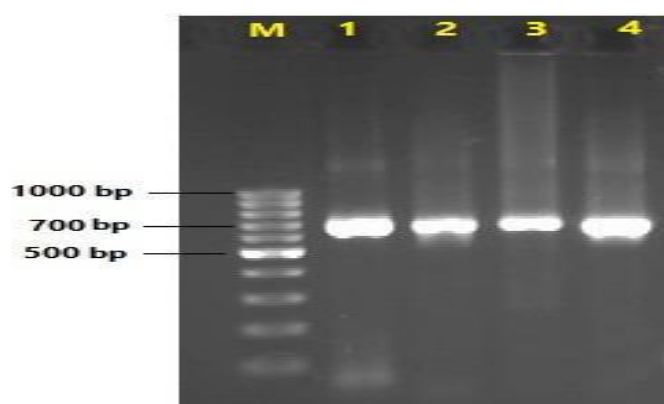
عصاره گیاه آلوده و عصاره گیاه سالم به ترتیب ۰/۹ و ۰/۱۰۵ بود (جدول ۱). علاوه بر این، آنتی بادی تهیه شده و خالص شده در این تحقیق به خوبی قادر به ردیابی ویروس BYMV در نمونه های باقلای جمع آوری شده از مزارع استان های کرمان و خوزستان با بهره گیری از روش الیزای غیرمستقیم بود.

تحلیل نتایج ترادف های تعیین شده به صورت رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار Vector NTI انجام گرفت. ترادف مونتاژ شده با در نظر گرفتن ترادف

جدول ۱- نتایج آزمون الیزا به روش غیرمستقیم با استفاده از رقت‌های مختلف IgG جدایه BYSun و رقت‌های مختلف عصاره گیاه سالم (H) و آلوده به این جدایه (I)

Table 1. Indirect ELISA results using different dilution of BYSun IgG versus different dilution of crude extract of healthy (H) and BYSun-infected (I) plants

Crude extract dilution	IgG dilution					
	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000
H 1:5	0.41	0.41	0.3	0.22	0.25	0.15
I 1:5	2.21	2.25	2.03	1.84	1.45	1.18
H 1:10	0.23	0.22	0.2	0.18	0.17	0.15
I 1:10	1.97	1.55	1.35	1.3	1.05	0.98
H 1:50	0.14	0.133	0.121	0.105	0.101	0.089
I 1:50	1.67	1.55	1.25	1.05	0.9	0.6



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای CIFor و CIRev در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده به وسیله Red-safe. راهک M: نشانگر (100 bp DNA ladder, Qiagen)، راهک‌های ۱ تا ۴ نمونه جدایه BYSun می‌باشند

Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products using CIRev/CIFor primer pairs stained with Red-safe. Line M: 100 bp DNA ladder (Qiagen), lines 1-4: DNA fragments of 680 bp representing partial CI of BYSun genome

موتیف II (با ترادف DEXH)، موتیف III (با ترادف TATPP)، موتیف IV (با ترادف PS)، موتیف V (با ترادف TD-2X-E-X-G) و موتیف VI (با ترادف T-5X-QR-X-GRX-GR) (Ha et al. 2007)؛ BYSun (Kadare and Haenni 1997). در ویروس BYSun ترادف‌های حفاظت شده KVLMIESTRPLAE، DECH و SATPP به ترتیب به عنوان نماینده موتیف‌های Ia، II و III، مورد شناسایی قرار گرفتند. هرچند موتیف IV با ترادف SP در نواحی دیگر پروتئین CI جدایه BYSun مشاهده گردید اما در ناحیه متناظر با سایر جدایه‌های BYMV و یا سایر پوتی ویروس‌ها یافت نشد.

مقایسه با استفاده از ناحیه کدکننده CI می‌تواند با

پروتئین CI دارای موتیف‌های متعددی می‌باشد. این موتیف‌ها مشخصه اصلی بالا خانواده دو آنزیم هلیکاز آر ان ای^۱ هستند و شامل یک موتیف اتصال به ژنوم^۲ و تعدادی موتیف دیگر از این بالا خانواده پروتئینی می‌شوند. موتیف اتصال به ژنوم (GSGKS-3X-P) که در برخی منابع به عنوان موتیف I نیز شناخته می‌شود در جدایه BYSun به صورت ترادف حفاظت شده GSGKSTGLP در ابتدای قطعه تکثیر شده از ناحیه CI وجود داشت. چند موتیف دیگر که دارای نقش هلیکاز آر. ان. ای. بودند شامل موتیف Ia (با ترادف R-5X-PTR-4X-E)،

1- Super family 2 RNA helicase
2- NTP-binding motif

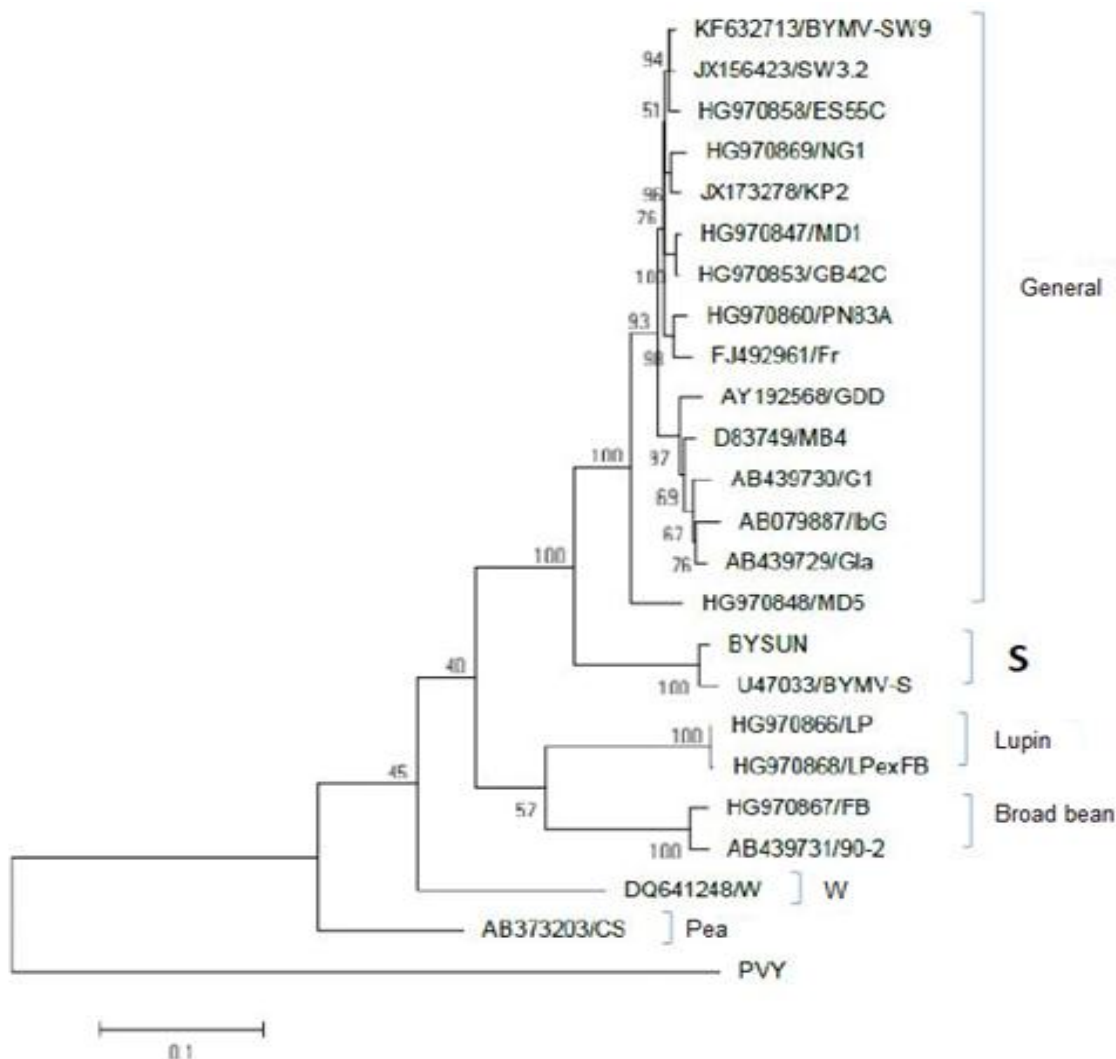
BYMV-S و BYMV-SW9 به ترتیب با ۱۰۰ و ۹۸ درصد شباهت بیشترین قرابت را با BYSun داشتند. با استفاده از نرم افزار MEGA6 و روش Maximum Likelihood درخت فیلوژنیک با ۲۳ جدایه ترسیم گردید (شکل ۶). برای ترسیم درخت سعی شد از جدایه‌هایی استفاده شود که از مناطق مختلف جهان جمع آوری گردیده و در عین حال ترادف ناحیه یاد شده از ژنوم آن‌ها در دسترس باشد. از یک جدایه *Potato virus Y* نیز به عنوان out group استفاده شد. چنانچه مشاهده می شود کلیه جدایه‌های مورد بررسی در شش گروه جای گرفتند. گروه General متشکل از جدایه‌هایی است که از نقاط مختلف کره زمین و از میزبان‌های مختلف جدا شده‌اند. در گروه Lupin جدایه‌هایی جای دارند که از گیاه لوبیای مصری جدا شده‌اند. در گروه Broad bean نیز جدایه‌هایی که از

دقت بسیار زیادی بازتاب ترادف نوکلئوتیدی کل ORF باشد و اگر ترادف کامل ژنوم در دسترس نباشد این ناحیه مناسب ترین قسمت برای اهداف تشخیصی و تاکسونومیکی به نظر می‌رسد (Adams et al. 2005). موقعیت تاکسونومیکی جدایه BYSun در بین جدایه‌های BYMV با تعیین ترادف قطعه یاد شده در مرکز ناحیه CI مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه BYSun با سایر جدایه‌ها، اطلاعات موجود در بانک ژن بررسی شد (جدول ۲). بر اساس مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CI، میزان شباهت جدایه BYSun با جدایه BYMV-S به ۹۸ درصد رسید، درحالی که این میزان برای سایر جدایه‌های مورد بررسی از ۷۸-۸۹ متغیر بود (جدول ۳). مقایسه چند گانه ترادف آمینواسیدی پروتئین CI جدایه BYSun شباهت ۱۰۰-۹۲ درصدی این ناحیه را با پروتئین‌های متناظر سایر جدایه‌های BYMV نشان داد. جدایه‌های

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های BYMV برداشت شده از بانک ژن به منظور رسم درخت فیلوژنی

Table 2. Properties of BYMV isolates used for phylogenetic analysis

Isolate name	Accession No.	Origin	Host
Fr	FJ492961	S. Korea	<i>Freesia</i> sp.
PN83A	HG970860	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
MD1	HG970847	Australia	<i>Lupinus cosentinii</i>
GB42C	HG970853	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
SW3.2	JX156423	Australia	<i>Diuris</i> sp.
NG1	HG970869	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
KP2	JX173278	Australia	<i>Diuris magnifica</i>
ES55C	HG970858	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
SW9	KF632713	Australia	<i>Diuris</i> sp.
MB4	D83749	Japan	<i>Gladiolus hybrida</i>
G1	AB439730	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
GIa	AB439729	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
LP	HG970866	Australia	<i>Lupinus pilosus</i>
LPexFB	HG970868	Australia	<i>Vicia faba</i>
MD5	HG970848	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
S	U47033	Australia	<i>Vicia faba</i>
IbG	AB079887	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
FBI-1	EU082116	Australia	<i>Vicia faba</i>
90-2	AB439731	Japan	<i>Vicia faba</i>
W	DQ641248	USA	<i>Lupinus albus</i>
CS	AB373203	Japan	<i>Pisum sativum</i>



شکل ۶- درخت ترسیم شده به روش Maximum Likelihood با استفاده از نرم افزار MEGA6 بر اساس مقایسه توادف نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه CI ژنوم BYSun با برخی جدایه‌های موجود در بانک ژن. در این مقایسه ویروس PVY به عنوان out group در نظر گرفته شده است.

Figure 6. Phylogenetic tree resulting from maximum likelihood analysis of the partial CI nucleotide sequences of BYSun and other BYMV isolates using MEGA6 software. The PVY was used as outgroup

(atypical) در بین سایر جدایه‌های BYMV بود (Randles et al., 1980). این جدایه که از لحاظ بیماری‌زایی در زیر‌گروه پاتوتیپ II جدایه‌های BYMV قرار می‌گیرد (Sasaya et al., 1997)، از نظر دامنه میزبانی (عدم توانایی آلوده‌سازی لوبیا) و نوع علائم با سایر جدایه‌های باقلای BYMV متفاوت بود (Hammond and Hammond, 2003). یافته‌های این بررسی هرچند با نتایج به دست آمده توسط Wylie et al. (2008) که جدایه BYMV-S را بر اساس

گیاه باقلا جدا شده‌اند قرار دارند. گروه W نیز تنها شامل یک جدایه بود که از آمریکا جدا شده است و همچنین جدایه گروه Pea نیز از گیاه نخود ردیابی شده است. گروه S که در این پژوهش به عنوان یک شاخه جدید معرفی می‌شود شامل جدایه BYSun و جدایه BYMV-S (از استرالیا) بود. این گروه با Bootstrap 1000 (۹۸ درصد شباهت ژنتیکی) از گروه‌های دیگر تفکیک شده است. جدایه BYMV-S از مزارع باقلای استرالیا جدا شده است و یک جدایه غیرتیبیک

نامگذاری بر اساس میزبان پیشنهاد می‌کنند (Kehoe et al., 2014). از طرف دیگر، با در نظر گرفتن جایگاه قرارگیری جدایه‌ها در درخت‌های فیلوژنتیکی می‌توان گفت که پراکندگی جغرافیایی با گروه‌بندی فیلوژنتیک همخوانی زیادی ندارد. این وضعیت را می‌توان با ویژگی‌های اپیدمیولوژیک این ویروس‌ها توجیه کرد. انتشار با غده (در مورد گلاپول) و بذر (در حبوبات) بیشترین احتمال ممکن برای گسترش ویروس در قاره‌های مختلف می‌باشد.

در تجزیه و تحلیل‌های حاصل از بررسی‌های نوترکیبی، جدایه *BYMV-S* به‌عنوان جدایه نوترکیب بالقوه که از نوترکیبی بین مولکولی با سایر جدایه‌های *BYMV* حاصل شده‌اند یاد شده است (Parrella and Lanave, 2009). با توجه به شباهت ژنتیکی زیاد جدایه *BYSun* با جدایه یاد شده، وقوع نوترکیبی در این جدایه ایرانی نیز دور از ذهن به نظر نمی‌رسد، اما کاملاً مشخص نیست *BYSun* تغییرات نوترکیبی خود را از جدایه‌های والد ایرانی کسب کرده است یا منشاء نوترکیبی آن را باید مانند جدایه *BYMV-S* در میان جدایه‌های استرالیایی جستجو کرد. جهت پی بردن به روابط بین جدایه *BYSun* و سایر جدایه‌های *BYMV*، بررسی جهش‌ها و نوترکیبی‌ها و همچنین سیر تکاملی این جدایه‌ها، دستیابی به ترادف کامل ژنوم *BYSun* ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر این، تعیین ترادف کامل ژنوم *BYSun* اولین گام در تولید همسانه بیماری‌زا می‌باشد. ساخت همسانه بیماری‌زا از این ویروس با مشخص کردن قسمت‌هایی از ژنوم که به‌عنوان تعیین‌کننده‌های بیماری‌زایی و دامنه میزبانی مؤثر هستند، می‌تواند باعث افزایش شناخت ما از این جدایه گردد.

نتایج بررسی حاضر نیاز به تعیین ترادف کل ژنوم و تجزیه و تحلیل تعداد بیشتری از جدایه‌های *BYMV* به خصوص جدایه‌هایی که در حال حاضر در گروه *General* قرار دارند و اطلاعات درباره بیولوژی و خصوصیات ژنتیکی آن‌ها اندک است را نیز مورد تأکید قرار می‌دهد.

مقایسه ترادف نوکلئیدی ناحیه *CP* در کنار برخی دیگر از جدایه‌های باقلا در گروه *Broad bean* قرار داده بودند اختلاف دارد، اما با بررسی‌های برخی محققین دیگر از جمله Parrella and Lanave (2009) که آن را مستقل از گروه یاد شده و در همسایگی گروه *Monocot* جای داده است، همخوانی زیادی دارد. بررسی اخیر نیز بر پایه مطالعه بر روی ناحیه *CP* و *3-UTR* تعداد زیادی جدایه *BYMV* صورت گرفته بود. جدایه *BYSun* با وجود شباهت‌های زیاد ژنتیکی با جدایه *BYMV-S*، در برخی صفات بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفته (مانند دامنه میزبانی) چندان نزدیک نبود. با وجود آن که جدایه *BYSun* قادر به ایجاد آلودگی سیستمیک در لویا بوده است (Rabiee, 2013)، گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد این گیاه نمی‌تواند توسط جدایه *BYMV-S* آلوده شود (Hammond and Hammond, 2003). بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه *BYSun* با جدایه‌های ایرانی *BYMV* با مشکلاتی همراه بود. از ایران تنها ترادف بخشی از ژن پروتئین پوششی دو جدایه *BYMV* (به اندازه ۳۰۴ جفت باز) در بانک ژن وجود دارد که از باقلا از استان گلستان جداسازی شده‌اند، به همین دلیل امکان وارد کردن آن‌ها در بررسی‌های هم‌ردیف‌سازی‌های چندگانه با سایر جدایه‌ها و ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی وجود نداشت.

با وجود آن که در بسیاری از مطالعات پیشین در درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ترادف قسمت‌های مختلف ژنوم (به‌خصوص پروتئین پوششی)، گروه‌بندی‌های نسبتاً مشخصی بر اساس منشاء میزبانی حاصل شده است، اما برخی بررسی‌های بعدی نشان داد شاخه‌بندی با استفاده از ترادف قطعات ناقص ژنومی در اکثر موارد پایداری چندانی نداشته و ممکن است با معرفی برخی جدایه‌های جدید دچار دگرگونی شود (Parrella and Lanave, 2009). به همین دلیل، برخی محققین استفاده از ترادف کل ژنوم را به همراه جایگزینی سیستم شماره‌دهی به گروه‌ها به جای

پژوهشی این دانشگاه به خاطر تأمین هزینه‌های این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنند.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با پشتیبانی مالی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان انجام گرفته است. نویسندگان از معاونت

REFERENCES

- Adams, M. J., Antoniw, J., and Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology*, 6: 471-487.
- Bos, L. 1970. The identification of three new viruses isolated from wisteria and pisum in the Netherlands, and the problem of variation within the *Potato virus X* group. *Journal of Plant Pathology*, 76: 8-46.
- Choi, S.H., Yoon, J.Y., Ryu, K.H., and Choi, S.K. 2013. The complete nucleotide sequence of a Korean isolate *Bean yellow mosaic virus* from *Freesia* sp. and comparison to other potyviruses. *Research in Plant Disease*, 19(2): 77-83.
- Clark, M.F., and Adams, A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Convers, R.H., and Martin, R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. In R.O., Hampton, E.M., Ball, and S.H., Deboer (eds). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, a laboratory manual*. APS Press. pp: 179-196.
- Danesh, D. 1969. Studies of the different strains of *Cucumber mosaic virus* in Iran. Regional pulse improvement project. *Proceeding of Second Plant Medicine Congress of Iran*, Tehran, Iran. pp: 45-57.
- Doolittle, S., and Jones, F. 1925. The mosaic disease in the garden pea and other legumes. *Phytopathology*, 15: 772-672.
- Guyatt, K.J., Proll, D.F., Menssen, A., and Davidson, A.D. 1996. The complete nucleotide sequence of *bean yellow mosaic potyvirus* RNA. *Archives of virology*, 141(7): 1231-1246.
- Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M., and Dale, J.L. 2007. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of Potyviruses. *Archives of Virology*, 153: 25-36.
- Hammond, J., and Hammond, R.W. 2003. The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of bean yellow mosaic virus, and comparison to other potyviruses. *Archives of virology*, 148(12): 2461-2470.
- Hollings, M., and Brunt, A. 1981. Potyviruses. *Archives of Virology*, 155: 439-450.
- Hosseini, A., Koohi Habibi, M., Izadpanah, K., Mosahebi, G.H., Rubies-Autonell, C., and Ratti, C. 2010. Characterization of a filamentous virus from Bermuda grass and its

molecular, serological and biological comparison with *Spartina mottle virus*. *Archives of Virology*, 155:1675-1680.

Hosseini, S., Koochi Habibi, M., Mosahebi, G., Motamedi, M., and Winter, S. 2012. First report on the occurrence of *Tobacco streak virus* in sunflower in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 94: 585-589.

Hosseini, S., Mosahebi, G., and Koochi Habibi, M. 2007. Distribution of sunflower viruses in four provinces of Iran. 10th International plant virus epidemiology symposium, Controlling epidemics of emerging and established Plant Virus Disease. P. 127.

Hull, R. 2002. Family *Potyviridae*. In: Matthew's Plant Virology, 4th ed. Academic Press, San Diego. P. 36.

Inouye, T. 1968. Studies on host range of PVY-group viruses in leguminous plants in Japan and the identification of them by selected differential test plants. *Nogaku Kenkyu*, 52: 11-29.

Jones, R.K., and Tolin, S.A. 1972. Factors affecting purification of Maize dwarf mosaic virus from corn. *Phytopathology*, 62: 812-816.

Kadare, G., and Haenni, A.L. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71(4): 2583-90.

Kehoe, M.A., Coutts, B.A., Buirchell, B.J., and Jones, R.A. 2014. Plant virology and next generation sequencing: Experiences with a *Potyvirus*. *PLoS ONE*, 9(8): e104580.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lane, L. C. 1986. Propagation and purification of RNA plant viruses. *Methods Enzymol*, 118: 687-696.

McDaniel, L.L., and Gordon, D.T. 1989. Characterization of oat infecting strain of Maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 79: 113-120.

Motamedi, M., Koochi Habibi, M., and Mosahebi, G. 2009. Biological and molecular characterization of Tomato spotted wilt virus from sunflower field in Iran. 5th Congress of Virology, Tehran, Iran, PP. 45.

Nooh, S. 1985. Identification and properties of a virus causing mosaic in MACS-13 cultivar of soybean (*Glycine max* L.) Merrill. M.Sc. Thesis Marathwada Agricultural University, Department of Plant Pathology, India.

Orellana, R.G., and Fan, F.F. 1978. Nodule infection by *Bean yellow mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 814-818.

Parrella, G., and 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

Rabiee, S. 2013. Distribution and characterization of most prevalent potyviruses in sunflower fields of Isfahan province. M.Sc. Thesis in Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran (in farsi with English abstract).

Randles, J., Davies, C., Gibbs, J., and Hatta, T. 1980. Amino acid composition of capsid protein as a taxonomic criterion for classifying the atypical S strain of *Bean yellow mosaic virus*. Australian Journal of Biological Sciences, 33: 245-254.

Sasaya, T., Shimizu, T., Nozu, Y., Nishiguchi, M., Inouye, N., and Koganezawa, H. 1997. Biological, serological, and molecular variabilities of clover yellow vein virus. Phytopathology, 87(10): 1014-1019.

Wada, Y., Iwai, H., Ogama, Y., and 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.

Weber, K., and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Biochemistry, 244: 4406-4412.

Wylie, S., Coutts, B., Jones, M., and Jones, R. 2008. Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: relationship between the seven groups found and their hosts and origins. Plant Disease, 92: 1596-1603.

Purification, antiserum production and phylogeny of Iranian sunflower isolate of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) based on partial sequence of CI region of the genome

M. Moradi¹, A. Hosseini^{2*} and S. Hosseini³

1. Former M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran (hosseini.vru.ac.ir)
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Received: 5 March 2016

Accepted: 15 September 2017

Abstract

Bean yellow mosaic virus (BYMV), a member of genus *Potyvirus*, causes economic losses to several crop species due to its wide host range. During 2012-2014 growing seasons, a BYMV isolate causing mosaic and leaf distortion was detected in sunflower fields of Isfahan province (Iran), tentatively designated as BYSun. Virions of BYSun were purified using two cycles of differential centrifugation on 20% and 30% sucrose cushions. Yields were 15-20 mg per 100g of infected leaves. SDS-PAGE of purified virus preparations revealed a single protein band with MW of about 33.5 kDa for BYSun. Antiserum against BYSun was prepared by five subcutaneous injections of purified viruses into rabbits at weekly intervals. Indirect ELISA indicated that the immunoglobulin obtained had the best results in dilution 1/2500. A 680 bp DNA fragment, corresponding to the partial CI (cylindrical inclusion) region of the viral genome was amplified using potyvirus-specific degenerate primers (CIRev/CIFor) by RT-PCR. BLAST search showed that the most similar sequence in the databases was that of BYMV-S. Phylogenetic analysis of this part of the genome in different BYMV isolates sequences revealed six distinct groups including General, Lupin, Broad bean, W, Pea and S which correlated with original natural isolation hosts. BYSun and BYMV-S were grouped apart from other isolates, so they were placed within a distinct group called "S".

Keyword: *Bean yellow mosaic virus, BLAST, Sunflower, Taxonomic position*