پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۳): ۱۲۹-۱۲۱ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 11(3): 121-1129 (2022)-Research Article
DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13544

تحلیل تبارزایی جدایه ایرانی ویروس نوار زرد تره‌فرنگی از میزبان سیر براساس نواحی ژنومی CI و CP

آزاده انتظاری، محسن مهرور✉، محمد زکی‌عقل

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد، ایران. ✉mehrvar@um.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۳ بازنگری: ۱۴۰۰/۴/۱۱ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۴

چکیده

ویروس نوار زرد تره‌فرنگی (*Leek yellow stripe virus*- LYSV) متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae*، به عنوان یکی از بیمارگرهای غالب و مهم با بیماری‌زایی بالا در میزبان سیر معرفی شده است. در این مطالعه به منظور شناسایی LYSV، نمونه‌برداری از استان خوزستان، شهرستان شوشتر انجام شد. بدین منظور تعداد ۲۸ نمونه برگی سیر با علائم کلروز نواری، موزائیک و بدشکلی جمع‌آوری شد. بررسی اولیه آلودگی با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروسی مربوط به هر یک از نواحی ژنی CI (Cylindrical Inclusion) و NIb (Nuclear Inclusion body) با استفاده از آزمون RT-PCR صورت گرفت. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ به ترتیب وجود قطعاتی به طول ۷۰۰ و ۳۵۰ جفت بازی را در ۱۵ نمونه از میان ۲۸ نمونه جمع‌آوری شده نشان داد. اما نتایج حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی، صرفا آلودگی سه نمونه از میان ۱۵ نمونه به LYSV را تأیید نمود. جهت تکمیل بررسی‌ها، جدایه‌ای با نام LYSV-AE65 انتخاب و با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی مربوط به توالی کامل ژن‌های CI و CP (Coat Protein) مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR مربوط به هر قطعه ژنومی پس از همسانه‌سازی در حامل پلاسمیدی pTG19-T، توالی‌یابی شد. نتایج حاصل از بررسی تبارزائی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی هریک از ژن‌های *CI* و *CP*، ارتباط روشنی بین گروه‌بندی تبارزائی با منشاء جغرافیـایی و میزبانی را نشان نداد. در بررسی وقوع نوترکیبی در این جدایه با استفاده از برنامه RDP4 هیچ نوترکیبی در این نواحی مشاهده نشد. این مطالعه اولین بررسی مولکولی LYSV در ایران می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیر، آنالیز فیلوژنتیکی، نوترکیبی، LYSV، RT-PCR

Phylogenetic analysis of the Iranian *Leek yellow stripe virus* isolate from garlic based on CP and CI Regions

Azadeh Entezari, Mohsen Mehrvar✉, Mohammad Zakiaghl

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
✉mehrvar@um.ac.ir

Received: 13 June 2021 Revised: 2 July 2021 Accepted: 26 July 2021

Abstract

Leek yellow stripe virus (LYSV) (*Potyvirus*, *Potyviridae*), is one of the most important and prevalent viral pathogens of garlic (*Allium sativum*) causing significant yield losses worldwide. In this study, in order to identify LYSV, sampling was performed from Shushtar in Khuzestan province. For this purpose, 28 garlic leaf samples with chlorosis, mosaic and deformity were collected. Preliminary evaluation of the infection was performed using potyvirus-degenerate primers related to each of the CI (Cylindrical Inclusion) and NIb (Nuclear Inclusion body) genomic regions using RT-PCR test. Electrophoresis of PCR product on 1% agarose gel showed the presence of 700 and 350 bp fragments in 15 samples out of 28 collected samples, respectively. However, the results of nucleotide sequencing only confirmed the contamination of 3 samples out of 15 samples with LYSV. To complete the study, an isolate called LYSV-AE65 was selected and tested using two specific primer pairs for the complete sequence of CI and CP (Coat Protein) genes. The PCR product of each genome fragment was sequenced following cloning in the plasmid vector pTG19-T. In the phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of each of the *CI* and *CP* genes separately, no clear correlation was found between LYSV isolates similarities, their geographical origins and host range. Moreover, recombination analysis by RDP4 revealed that no potential recombination event/s happened between LYSV-AE65 from Iran with their respective isolates from NCBI in CI and CP genes. This study is the first molecular study of LYSV in Iran.

Keywords: Garlic, *Leek yellow stripe virus*, Phylogenetic, Recombination

How to cite:
Entezari A, Mehrvar M, Zakiaghl M, 2022. Phylogenetic analysis of the Iranian *Leek yellow stripe virus* isolate from garlic host based on CP and CI Regions. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (3): 121–129.

مقدمه

ویروس نوار زرد تره‌فرنگی (*Leek yellow stripe virus*- LYSV) متعلق به جنس *Potyvirus*، خانواده *Potyviridae* و یکی از مهمترین و گسترده‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده سیر و تره‌فرنگی در سراسر جهان بوده (Lunello *et al*. 2002; Santosa *et al*. 2020) و بومی کشورهای مختلف مدیترانه‌ای می‌باشد (Katis *et al*. 2012). این گونه ویروسی علاوه بر دارا بودن قابلیت انتقال مکانیکی، به‌وسیله بیش از ده گونه ناقل شته‌ای به روش ناپایا نیز منتقل می‌شود (Katis *et al*. 2012). بیماری ایجاد شده توسط LYSV برای اولین بار در سال ۱۹۳۷ در کشور آلمان و به‌طور همزمان در چندین کشور اروپایی مورد توجه قرار گرفت. سپس در سال ۱۹۵۷ این بیماری برای اولین بار توصیف شد. در نهایت در سال ۱۹۷۸ عامل بیماری LYSV معرفی شد (Bos 1983; Vučurović *et al*. 2017). LYSV یکی از گسترده‌ترین ویروس‌ها با انتشار جهانی بوده که از کشورهایی نظیر برزیل، آمریکا، چین، هند، اکوادور و مصر و همچنین از کشورهایی نظیر فرانسه، اسلوونی و مراکش نیز گزارش شده است (Vučurović *et al*. 2017). LYSV یک *Potyvirus* رایج و مختص گونه‌های گیاهی جنس آلیوم (*Allium* L.) بوده که به طور معمول در طبیعت به‌صورت یک مجموعه ویروسی به همراه سایر ویروس‌های آلوده‌کننده آلیوم نظیر کارلاویروس‌ها، آلکسی‌ویروس‌ها و گونه‌های‌دیگری از پوتی‌ویروس‌ها یافت می‌شود. به همین علت ظهور LYSV در چنین مجموعه‌های ویروسی، شناسایی اولیه و رده‌بندی آن را دشوار می‌کند (Bos 1983; Barg *et al*. 1997; Katis *et al*. 2012). LYSV موجب ظهور کلروز نواری در سطح پهنک برگ در تره‌فرنگی و سیر می‌شود. این نوارها نامنظم و منقطع بوده و ممکن است کل برگ زرد شود. همچنین آلودگی ویروسی باعث ایجاد حبه‌های سیر بدشکل و کوچکتر از حالت نرمال می‌شود که منجر به کاهش بازده محصول می‌گردد (Katis *et al*. 2012). ظهور علائم آلودگی به این ویروس در مزارع در طول تابستان نادر و به‌صورت تصادفی رخ می‌دهد اما در ماه‌های پاییز به‌طور فزآینده‌ای آشکار می‌شود (Katis *et al*. 2012). در مجموع اطلاعات در مورد علائم LYSV در مقایسه با ویروس کوتولگی زرد پیاز (*Onion yellow dwarf virus*- OYDV) که به عنوان گونه غالب در کمپلکس بیمارگر سیر شناخته شده است (Lunello *et al*. 2005)، به دلیل دشوار بودن جداسازی این ویروس از OYDV و به‌تنهایی از میزبان سیر محدود می‌باشد (Lot *et al*. 1998). تاریخچه بررسی و شناسایی این ویروس در ایران محدود به مطالعه Shahraeen *et al*. (2008) در برخی از مناطق کشور نظیر: تهران، ورامین، رودبار، جیرفت، چالوس، ساری، قزوین و نوشهر با استفاده از روش سرولوژیکی ساندویچ دو طرفه الایزا (Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) بوده که در نهایت وجود آلودگی در نمونه‌های برگی سیر جمع‌آوری شده به LYSV، در شهرهای رودبار، چالوس، ساری، قزوین و نوشهر تایید شد (Shahraeen *et al*. 2008). لازم به ذکر است که در ایران ویروس‌هایی که محصولات پیاز و سیر را آلوده می‌کنند از نظر اقتصادی دارای اهمیت زیادی بوده زیرا بیماری‌های موزائیکی میزان بازده محصول را به شدت کاهش می‌دهند (Shahraeen *et al*. 2008). بر اساس بررسی‌های انجام شده، این مطالعه اولین شناسایی مولکولی LYSV از ایران می‌باشد. در این تحقیق، علاوه بر وقوع این ویروس در استان خوزستان، برخی از خصوصیات زیستی، مولکولی و تبارزائی جدایه ایرانی LYSV نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به‌منظور شناسایی و تعیین آلودگی ویروس عامل نوار زرد تره‌فرنگی (LYSV)، نمونه‌برداری در زمستان ۱۳۹۸ از مزارع سیر (*A. sativum* L.) در استان خوزستان، شهرستان شوشتر انجام گرفت. در مجموع تعداد ۲۸ نمونه برگی مشکوک به آلودگی از پنج مزرعه، از هر مزرعه پنج نمونه برگی سیر و یا حداکثر شش نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده اغلب دارای علائمی نظیر: نوارهای کلروتیک تیره و روشن، موزائیک شدید، بدشکلی و کوتولگی بودند. نمونه‌ها در شرایط خنک (بر روی یخ) به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA، آزمون‌های RT-PCR، همسانه‌سازی و تعیین ترادف

در این پژوهش استخراج RNA کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای شناسایی ویروس هدف در نمونه‌های جمع‌آوری شده، از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروسی CIFor/Rev و NIbF/Rev (جدول ۱) که به‌ترتیب قادر به تکثیر قطعاتی به طول ۷۰۰ و ۳۵۰جفت بازی مربوط به بخشی از نواحی ژنی CI (Cylindrical Inclusion) و NIb (Nuclear Inclusion body)

بودند و دو جفت آغازگر اختصاصی LYSV شامل CI F/R و CP FULL F/R (جدول ۱)، که به‌ترتیب در برگیرنده توالی کامل ژن‌های CI و CP (Coat protein) بوده و منجر به تکثیر قطعاتی به طول ۱۹۰۵ و ۸۶۴ جفت بازی گردیدند، استفاده شد. RNA ویروس استخراج شده از بافت گیاهی آلوده در واکنش نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcription- RT) جهت تهیه cDNA مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری انجام شد. در مرحله اول، سه میکرولیتر RNA استخراج شده، یک میکرولیتر (10 mM) dNTPs به همراه یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای برگشت (10 pmol) (جدول ۱)، هریک به صورت مجزا در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری و پنج میکرولیتر آب مقطر استریل را به خوبی با هم مخلوط کرده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, England) به‌منظور واسرشت کردن RNA قرار داده شدند. بلافاصله بعد از اتمام واکنش، میکروتیوپ را به مدت یک دقیقه بر روی یخ قرار داده و در مرحله دوم به مخلوط حاصل چهار میکرولیتر بافر PrimeScript buffer (5X) و یک میکرولیتر از آنزیم (200 U/µL) PrimeScript Reverse Transcriptase (TAKARA, Japan) و پنج میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و پس از مخلوط کردن ترکیبات واکنش، میکروتیوپ را مجدا به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به منظور ساخت cDNA در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, England) قرار می‌دهیم. cDNA حاصل از واکنش RT، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. مخلوط مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول آماده DNA Polymerase Master Mix Red (Ampliqon, Denmark)، پنج میکرولیتر از cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس (10 mM) (جدول ۱) و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. برنامه دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، دمای اتصال آغازگرها که بسته به نوع آغازگر متفاوت بوده (جدول ۱) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. به منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده در واکنش PCR، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ حاوی EcoDye™ DNA Staining solution (SolGent, Korea) الکتروفورز شد. محصولات PCR مربوط به نمونه‌هایی که در ناحیه مورد انتظار باند داده بودند پس از جداسازی، با استفاده از کیت Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از روی ژل آگارز خالص‌سازی و قطعه مورد نظر در پلاسمید pTG19-T (Vivantis, Malaysia) همسانه‌سازی شد. ناقل نوترکیب به منظور تکثیر به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α منتقل شد. پلاسمید نوترکیب پس از استخراج با استفاده از کیت Plasmid DNA Isolation (Denazist, Iran) جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی (Macrogen Inc, South Korea) ارسال شد. نمونه‌های ارسالی با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 تعیین توالی شدند.

تعیین تبارزائی و بررسی نوترکیبی

جهت شناسایی ترادف استنتاجی (Consensus sequence) به‌دست آمده از هم‌ردیف‌سازی قطعات توالی‌یابی شده از سه تا پنج پرگنه به کمک نرم‌افزار Vector NTI 11 (Invitrogen, USA)، ابتدا از برنامه BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) با استفاده از نرم افزار Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) انجام و مشابهت‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی محاسبه شد. لازم به ذکر است که توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder) به توالی‌های آمینواسیدی ترجمه شدند. جهت تعیین موقعیت تاکسونومیکی، درخت تبارزائی با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (v. 10.2.1) (Kumar *et al*. 2018) و دو روش (ML) Maximum-Likelihood و Neighbor-Joining(NJ) بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) رسم شد. همچنین جهت بررسی امکان وقوع نوترکیبی از روش‌های قرار داده شده در نرم‌افزار RDP4 (v.4.95) نظیر RDP ، BOOTSCAN، MAXCHI، GENECO و SISCAN استفاده شد (Martin *et al*. 2015). در این مطالعه رویدادهای شناسایی شده زمانی به عنوان نوترکیب مورد قبول قرار می‌گیرند که حداقل توسط سه روش با *P*-Value کمتر از 10^{-5} تائید شوند (Martin *et al*. 2015).

مایه‌زنی مکانیکی گیاه محک در شرایط گلخانه‌ای با نمونه آلوده به LYSV

جهت بررسی خصوصیات زیستی ویروس، مایه‌زنی مکانیکی برگ‌های جوان گیاه سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) با استفاده از نمونه‌های مثبت ارزیابی شده در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۲۳-۲۰ درجه سلسیوس، هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور)، عاری از آلودگی حشرات ناقل با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار) و PH برابر هفت انجام شد. جهت تکمیل مطالعات مولکولی ویروس، از برگ‌های آلوده و دارای علائم سلمه تره تعدادی در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس و تعدادی دیگر نیز پس از خشک کردن در دمای اتاق، در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

نتایج و بحث

نتیجه مایه‌زنی جدایه LYSV-AE65 بر روی گیاه محک

به منظور تکثیر، نگهداری و مطالعه پاسخ میزبانی جدایه LYSV-AE65 از نظر زمان بروز و نوع علائم، این جدایه روی گیاه محک *C. quinoa* مایه‌زنی مکانیکی شد. پس از گذشت ۱۰-۷ روز از اولین مایه‌زنی، علائم روی برگ‌های جوان گیاه سلمه به صورت نقاط سبزرد ظاهر شد. ثبت نتیجه بررسی‌ها تا ۲۸ روز بعد از ظهور علائم نشان‌دهنده افزایش تعداد نقاط سبزرد و گاهی زرد شدن کامل برگ‌ها بود. نتایج بدست آمده با نتایج بررسی‌های پیشین پژوهشگران مطابقت داشت (شکل ۱) (Bos 1983; Lot *et al.* 1998). اما لازم به ذکر است که به‌دلیل اینکه در غالب آلودگی‌های سیر دو ویروس OYDV و LYSV به صورت آلودگی مخلوط مشاهد می‌شوند، وجود دو نوع لکه از نظر اندازه و شکل بر روی برگ‌های کنوپودیوم دور از انتظار نبوده (شکل ۱)، اما تفکیک و انتساب لکه‌های ریز و درشت به یک ویروس خاص عملا به‌علت عدم وجود میزبان افتراقی مناسب سخت یا غیر ممکن می‌باشد. همچنین در بررسی منابع انجام شده بر روی LYSV، میزبان افتراقی مناسبی که توانایی تفکیک صد در صدی این ویروس را دارا باشد ذکر نشده و به‌طور کلی کار بیولوژیک بر روی LYSV محدود بوده که نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد. در نتیجه با توجه به احتمال آلودگی مخلوط خصوصا همراه بودن OYDV با LYSV، جهت تایید آلودگی کنوپودیوم‌های تلقیح شده از آزمون RT-PCR با جفت آغازگر اختصاصی (CP FULL F/R LYSV) (جدول ۱) و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

ردیابی LYSV با استفاده از آزمون RT-PCR

در این مطالعه نمونه‌های برگی سیر جمع‌آوری شده از مزارع با علائم کلروز نواری، موزائیک و بدشکلی به‌منظور بررسی وجود LYSV مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی اولیه روی قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای عمومی نواحی CI و NIb، به ترتیب وجود قطعاتی به طول ۷۰۰ و ۳۵۰ جفت بازی را در ۱۵ نمونه جمع‌آوری‌شده از میان ۲۸ نمونه تایید نمود. آنالیز نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی بخشی از قطعات ژنومی CI و NIb نشان دهنده آلودگی تنها سه نمونه به LYSV بود، که دو نمونه برگی سیر از یک مزرعه و نمونه دیگر از مزرعه مجاور آن جمع‌آوری شده بود. هر سه نمونه دارای علائم مشابه وجود نوارهای کلروتیک نامنظم و منقطع در سطح برگ سیر بودند. در هیچ کدام از این دو مزرعه علائم کوتولگی و بدشکلی مشاهده نشد. از سوی دیگر نتایج حاصل آنالیز ژنومی، نشان‌دهنده آلودگی ۱۲ نمونه دیگر سیر به OYDV بود.

بررسی توالی کامل ژن‌های CI و CP، آنالیزهای تبارزائی و بررسی نوترکیبی در جدایه LYSV-AE65

از میان سه نمونه برگی سیر آلوده به LYSV، نمونه‌ای با نام LYSV-AE65 جهت انجام بررسی‌های تکمیلی این ویروس شامل تعیین موقعیت تبارزائی جدایه ایرانی بر اساس دو ناحیه ژنی CI و CP و همچنین بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در این جدایه انتخاب شد. نتیجه واکنش RT-PCR جدایه LYSV-AE65 با دو جفت آغازگر اختصاصی CI F/R و CP FULL F/R (جدول ۱)، تکثیر قطعاتی به طول ۱۹۰۵ و ۸۶۴ جفت بازی بود (شکل ۲)، در حالیکه در چاهک حاوی محصول واکنش سیر سالم هیچ گونه باندی مشاهده نشد. به منظور تعیین خصوصیات مولکولی و تعیین موقعیت تبارزائی جدایه ایرانی، نمونه LYSV-AE65 پس از همسانه‌سازی و اطمینان از صحت آن توسط شرکت ماکروژن کره‌جنوبی توالی‌یابی شد.

در مرحله اول نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمده از ناحیه CI نشان داد که طول توالی استنتاجی مربوط به این ژن، یک قطعه ۱۹۰۵ جفت بازی و توالی کامل ژن CI بوده که کد کننده ۶۳۵ آمینواسید می‌باشد. در ترادف آمینو اسیدی پیش‌بینی شده CI جدایه LYSV-AE65 موتیف اتصال دهنده نوکلئوتیدی $G_{85}AVGSGKST_{93}$، موتیف $V_{303}ATNIIENGVTL_{314}$ با فعالیت هیدرولیزNTP (نوکلئوتید تری فسفات)، موتیف RNA هلیکازی $D_{174}ECH_{177}$ و موتیف $G_{347}ERIQRMGRVGR_{358}$ با فعالیت ATPase یافت شدند. این

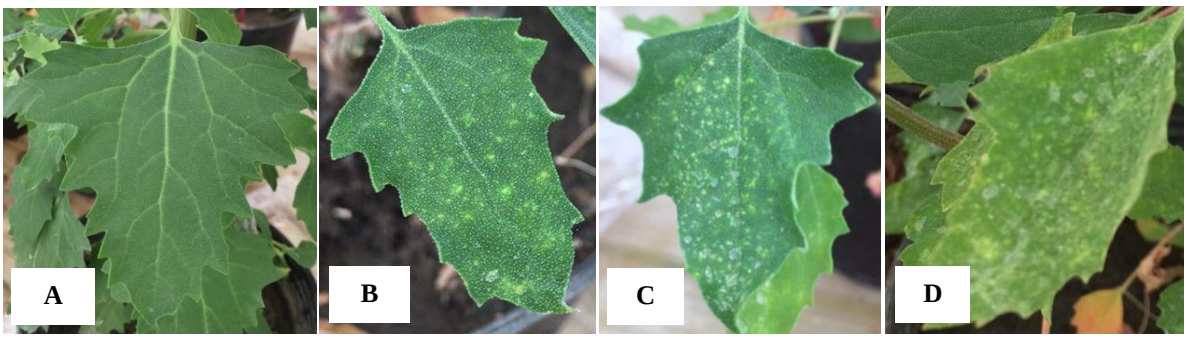
موتیف‌ها با سایر موتیف‌های حفاظت شده در پوتی‌ویروس‌ها مطابقت داشت (Riechmann *et al*. 1992; Fernández *et al*. 1997; Fairman-Williams *et al*. 2010). لازم به ذکر است که وجود هر چهار موتیف علاوه بر جدایه LYSV-AE65، در جدایه‌های منتخب از بانک ژن از سایر نقاط دنیا نیز بدون تغییر مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه جدایه LYSV-AE65 با سایر جدایه‌های LYSV، ثبت شده در بانک ژن با استفاده از برنامه BLASTn موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، نشان‌دهنده بالاترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی ۹۲/۶۵٪ و آمینواسیدی ۹۹٪/۰۶ به‌ترتیب با جدایه‌های چینی G11-2 (MN059450) و G15 (MN059452) بود. همچنین نتایج حاصل از همردیف سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنی CI جدایه LYSV-AE65 با ۲۱ جدایه منتخب از بانک ژن، با استفاده از برنامه Clustal Omega، نشان‌دهنده دامنه یکسانی ۹۲/۴۹-۸۰/۴۷٪ بود (جدول ۱). به‌طوریکه جدایه LYSV-AE65 دارای بالاترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی با جدایه G3-3 (MN059438) از چین بوده و این در حالی است که این جدایه پائین‌ترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی را با دو جدایه استرالیایی SW3.5 (JQ899450) و AG1 (JX429967) نشان داد (جدول ۱).

با استفاده از نرم افزار MEGA X و ترسیم دندروگرام حاصل از هم‌ردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی، تبارزایی ژن CI جدایه LYSV-AE65 به همراه ۲۱ جدایه منتخب از بانک ژن، مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج نشان‌دهنده شکل‌گیری دو گروه مجزا از هم (I, II) بر اساس ژن CI بود. در دندروگرام رسم شده جدایه ایرانی به همراه دو جدایه از چین (MN059504 و MN059438) و یک جدایه از هریک از کشورهای استرالیا (HQ258895)، اسپانیا (JX429965) و مکزیک (KF597283) در گروه II و در زیرگروه b قرار گرفت (شکل ۳)، که نشان‌دهنده روابط تبارزائی نزدیک این جدایه‌ها با یکدیگر می‌باشد و این در حالی است که زیرگروه a دربرگیرنده دو جدایه چینی (MN059538 و NC-004011) و یک جدایه از هند (MT731491) بود. با توجه به هم‌گروه شدن جدایه‌هایی از مناطق مختلف جهان در دو گروه I و II و عدم مشاهده تفکیک میزبانی در دندروگرام رسم شده، گروه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس ژن CI با نزدیکی جغرافیایی و تفکیک میزبانی مطابقت نداشت. بررسی تبارزائی این جدایه‌ها بر مبنای توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده CI گروه‌بندی یکسانی را با توالی نوکلئوتیدی نشان داد. همچنین نتیجه بررسی وقوع نوترکیبی در این ناحیه ژنی در جدایه مورد مطالعه هیچ گونه نوترکیبی را نشان نداد.

همچنین در ادامه مطالعه، نتیجه هم‌ردیف‌سازی قطعات نوکلئوتیدی حاصل از تعیین ترادف ناحیه CP، قطعه‌ای به اندازه ۸۶۴ جفت باز بود که کد کننده پروتئینی به اندازه ۲۸۸ آمینواسید می‌باشد. مقایسه ترادف حاصل با سایر ترادف‌های موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه BLASTn موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان‌دهنده بالاترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی ۹۵/۸۳٪ با دو جدایه چینی G3-3 (MN059438) و G3-2 (MN059437) بود و این در حالی است که جدایه LYSV-AE65 دارای بالاترین درصد یکسانی آمینواسیدی ۹۷/۵۷ ٪ با جدایه‌های چینی G3-3 (MN059438)، G3-2 (MN059437) و G77 (MN059504) بود. همچنین نتایج حاصل از همردیف سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنی CP جدایه LYSV-AE65 با ۳۷ جدایه منتخب از بانک ژن، با استفاده از برنامه Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)، نشان‌دهنده دامنه یکسانی ۹۵/۸۳-۸۰/۴۴٪ بود، به‌طوریکه جدایه LYSV-AE65 دارای بالاترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی با جدایه G3-3 (MN059438) از چین می‌باشد، همچنین این جدایه پایین‌ترین درصد یکسانی نوکلئوتیدی را با جدایه چینی G110 (MN059547) دارا بود. درخت تبارزائی ترسیم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن CP جدایه ایرانی LYSV به همراه ۳۷ جدایه منتخب از بانک ژن توسط نرم افزار MEGA X، روش ML و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار، نشان‌دهنده شکل‌گیری دو گروه اصلی A و B بود که هریک به ترتیب به ۴ و ۲ زیر گروه تقسیم‌بندی شدند (شکل ۴). جدایه ایرانی در گروه A زیرگروه A-I و در کنار جدایه‌هایی از چین (MN059480، MN059504، MN059438، AB194641، NC-004011، MN059550، MN059552، MN059538)، مکزیک (KF597283)، استرالیا (HQ258895)، اسپانیا (JX429965)، کره جنوبی (AB194633) و هند (MT731491) قرار گرفت که بیانگر روابط فیلوژنتیک نزدیک این جدایه‌ها با یکدیگر می‌باشد و این در حالی است که جدایه‌های میانمار (AB551622)، چین (AJ409304، MT731492، MN059541) و هند (KP168261) در زیرگروه A-II، جدایه برزیل (AF228415) و چین (GU373816) در زیرگروه A-III و تک جدایه مکزیک (DQ841554) در زیرگروه A-IV قرار گرفتند. تمام جدایه‌های تشکیل‌دهنده گروه A از میزبان سیر جدا شده اند. اما گروه B براساس تفاوت‌های میزبانی به دو زیرگروه

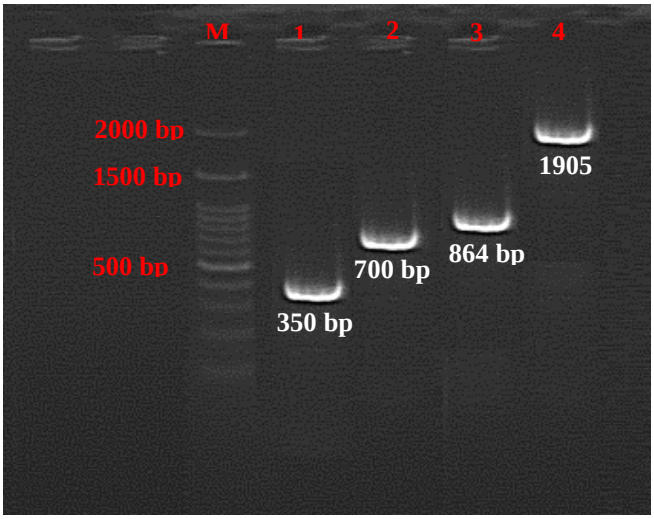
تقسیم‌بندی شد، به‌طوریکه دو جدایه ژاپنی (AB194625) و هلندی (AB194628) از میزبان تره‌فرنگی (*Allium porrum*)، زیرگروه B-I را تشکیل دادند، در حالیکه زیر گروه B-II دربرگیرنده ۱۴ جدایه از میزبان سیر می‌باشد. بررسی تبارزائی این جدایه‌ها بر مبنای توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده CP گروه‌بندی یکسانی را با توالی نوکلئوتیدی نشان داد. به استثناء قرار گرفتن تمامی جدایه‌های ژاپن در گروه B، گروه‌بندی تبارزائی با جدایی جغرافیایی هم‌خوانی نداشت. با توجه به عدم انطباق نزدیکی جغرافیایی و گروه‌بندی فیلوژنتیک در هر دو دندروگرام رسم شده (CI و CP)، به نظر می‌رسد انتشار گسترده و جهانی LYSV را نمی‌توان تنها به ناقلین شته‌ای نسبت داد و با این شرایط احتمال دخیل بودن انسان و نقش صادرات و واردات حبه‌های سیر آلوده، که تنها روش تکثیر میزبان می‌باشد در گسترش آلودگی تقویت می‌شود. همچنین یکسان بودن میزبان در غالب جدایه‌ها و همچنین قرار گرفتن دو جدایه تره‌فرنگی درکنار جدایه‌های سیر در گروه B در دندروگرام حاصل از CP، نشان دهنده عدم تطابق گروه‌بندی فیلوژنتیک با جدایی میزبانی بود. در بررسی نواحی حفاظت‌شده در ژن CP جدایه LYSV-AE65، موتیف حفاظت شده D_6AG_8 در انتهای آمینی پروتئین پوششی بدون هیچ گونه تغییری مشاهده شد. از آنجایی‌که که این موتیف نقش مهمی در انتقال ویروس توسط شته ناقل دارد به‌نظر می‌رسد جدایه LYSV-AE65 می‌تواند به صورت کارآمدی توسط ناقلین شته‌ای منتقل شود (Maciel *et al*. 2011; Nigam *et al*. 2019). همچنین سه موتیف حفاظت شده دیگر شامل $M_{137}VWCIENGTSP_{147}$، $A_{220}FDF_{223}$ و $Q_{240}MKAAA_{245}$ که در CP اغلب پوتی‌ویروس‌ها قابل مشاهده است (Maciel *et al*. 2011; Nigam *et al*. 2019) ، در این جدایه نیز یافت شد. نتیجه بررسی این موتیف‌ها در توالی‌های آمینواسیدی پیش‌بینی شده جدایه‌های منتخب از بانک ژن نیز وجود هر چهار موتیف را بدون هرگونه تغییری تایید نمود. اما نتیجه حاصل از بررسی وقوع نوترکیبی در جدایه LYSV-AE65 در ناحیه CP هیچ‌گونه نوترکیبی را نشان نداد.

متأسفانه تاکنون اطلاعاتی در مورد توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی LYSV از سایر مناطق کشور در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت نرسیده است، بنابراین بررسی و تجزیه و تحلیل همسانی و میزان شباهت میان جدایه‌های ایرانی با یکدیگر امکان پذیر نبوده است. بر اساس دانش ما این مطالعه اولین شناسایی مولکولی LYSV در ایران می‌باشد، که در آن توالی کامل ژن‌های CI و CP تعیین شد. این بررسی می‌تواند به عنوان زیربنایی برای آغاز مطالعات تکمیلی و تدوین استراتژی صحیح مدیریتی ویروس نوار زرد تره فرنگی در کشور باشد.



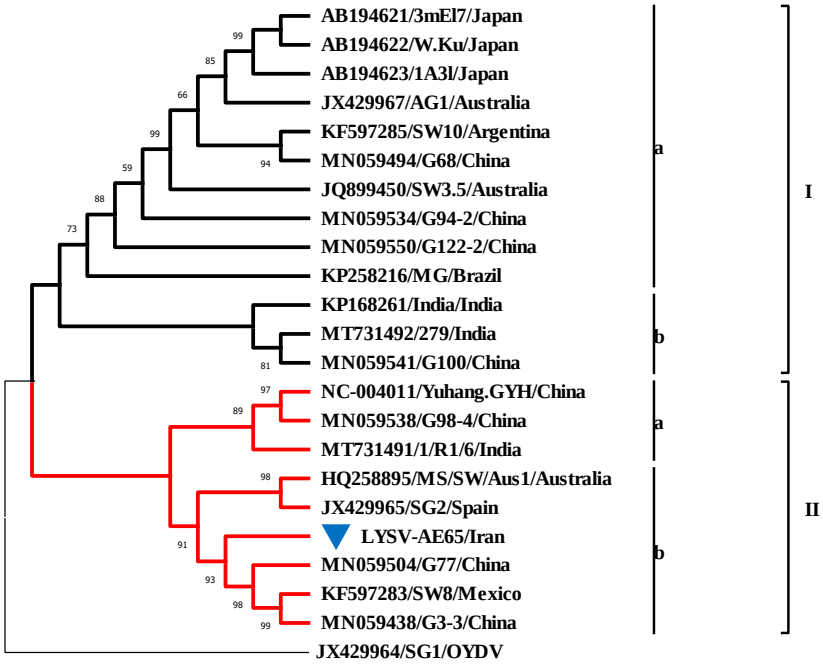
شکل ۱. مایه‌زنی مکانیکی جدایه LYSV-AE65 بر روی برگ‌های جوان *Chenopodium quinoa*. **A.** مشاهده برگ سالم گیاه سلمه، **B-D.** بروز علائم به صورت نقاط سبزرد به ترتیب بعد از هفت، پانزده و بیست و دو روز از زمان مایه‌زنی.

Figure 1. Mechanical inoculation of *Chenopodium quinoa* with LYSV-AE65 isolate. **A.** Healthy *C. quinoa* leaves, **B-D.** Chlorotic local lesions on *C. quinoa* leaves at 7, 15 and 22 days after inoculation, respectively.



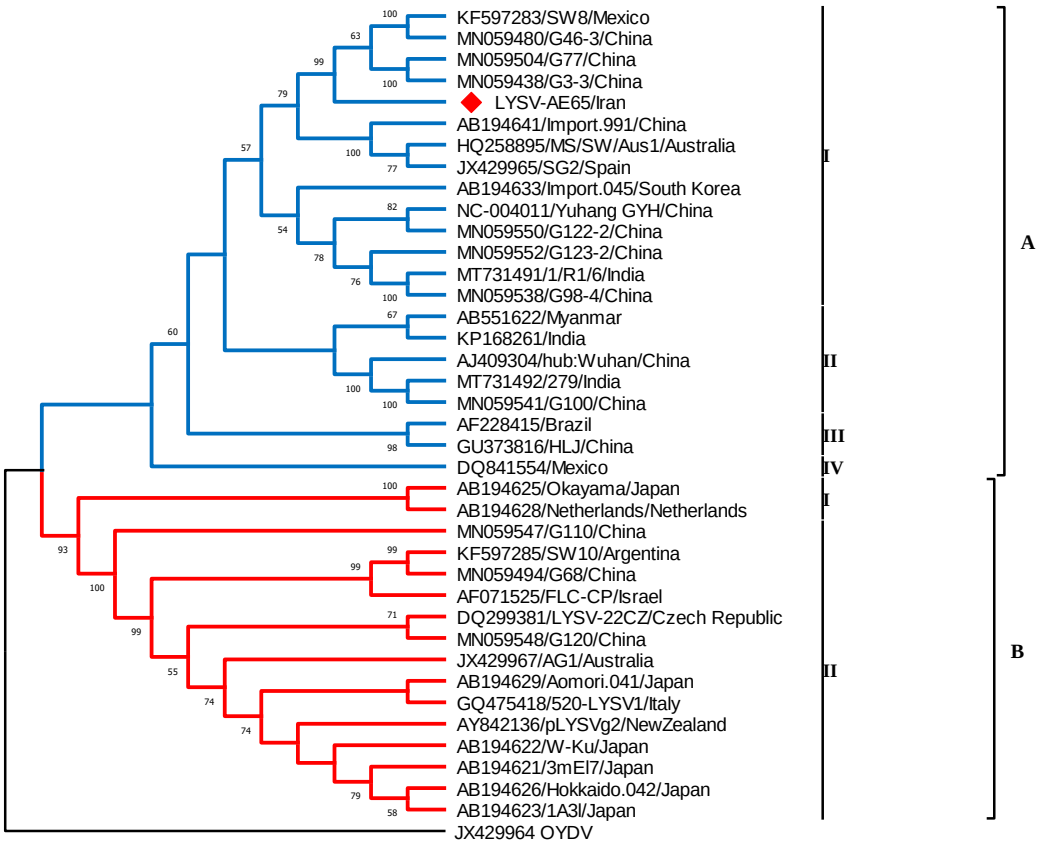
شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصولات PCR متعلق به بخشی از نواحی ژنی NIb (چاهک شماره ۱) و CI (چاهک شماره ۲) جدایه LYSV-AE65، به‌ترتیب تکثیر شده با دو جفت آغازگر عمومی پوتی‌ویروسی NIbF/Rev و CIFor/Rev و ناحیه کامل ژن‌های CP (چاهک شماره ۳) و CI (چاهک شماره ۴)، به‌ترتیب تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی CP FULL F/R و CI F/R در ژل آگارز ۱٪ نشان داده شده است. در چاهک M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Thermo Fisher Scientific, USA) قابل مشاهده است.

Figure 2. Electrophoresis pattern of PCR products of partial LYSV NIb (lane 1) and CI (lane 2) regions, using the *Potyvirus* degenerate primer pairs of NIbF/Rev and CIFor/Rev, respectively and complete LYSV CP (lane 3) and CI (lane 4) genomic regions using specific primer pairs of CP FULL F/R and CI F/R, respectively. Lane M shows 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).



شکل ۳. درخت تبارزایی بر اساس ترادف کامل نوکلئوتیدی ژن CI مربوط به جدایه مورد مطالعه در این تحقیق (LYSV-AE65) و قطعه مشابه ۲۱ جدایه منتخب از بانک ژن با استفاده از روش Maximum-Likelihood و ارزیابی Bootstrap با تعداد ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. جدایه اسپانیایی ویروس کوتولگی زرد پیاز (SG1: JX429964) به عنوان عضو برون گروه (Outgroup) انتخاب شد. انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ از شکل حذف شدند.

Figure 3. Maximum-Likelihood phylogenetic tree based on the complete nucleotide sequences of CI gene, showing the relationship of LYSV-AE65 isolate identified in this study with 21 selected LYSV sequence in the GenBank. Bootstrap values on each branch were supported by 1000 replicates. Only values greater than 50% were shown. A Spanish *Onion yellow dwarf virus* (SG1: JX429964) isolate was used as out-group.



شکل ۴. درخت تبارزایی رسم شده با روش Maximum- Likelihood (ML) با استفاده از توالی کامل نوکلئوتیدی منطقه رمز کننده CP مربوط به جدایه مورد مطالعه در این تحقیق (LYSV-AE65) و جدایه‌های منتخب *Leek yellow stripe virus* از بانک ژن از سایر نقاط دنیا. اعداد نمایش داده شده بر روی هر گره (node) نشان‌دهنده درصد Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار می‌باشد. انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ حذف شده‌اند.

Figure 4. The maximum likelihood (ML) tree based on the nucleotide sequence of complete coat protein coding region of *Leek yellow stripe virus* (LYSV), showing phylogenetic relationships of the Iranian isolate (LYSV-AE65) with others from different parts of the world. Bootstrap values on each branch were supported by 1000 replicates. Values of lower than 50 are collapsed.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR به منظور شناسایی LYSV.

Table 1. PCR primers used for the LYSV detection by RT-PCR.

Primer Code	Primer Sequence (5′ to 3′)	Annealing temperature	Size of amplified fragment (bp)	Reference
NIB2-F/ NIB3-R	**F-** GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA **R-** TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC	45˚C	350 bp	Zheng *et al*. 2010
CIFor/ CIRev	**F-**GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC **R-**ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC	52˚C	700 bp	Ha *et al*. 2008
CIF/R	**F-**GCCTTTCGACAAGCTAAATGAC **R-**GGTGTYGCTGAAACYTTRAG	60˚C	1905 bp	Gupta *et al*. 2017
CP FULL F/R	**F-**GCTGGTGAGGAGATTGATG **R-**CTGCATATGCGCACCATC	58˚C	864 bp	Gupta *et al*. 2017

References

Barg E, Lesemann DE, Vetten HJ, Green SK, 1997. Viruses of alliums and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Horticulturae* 433: 607–616.

Bos L, 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae* 127: 11–29.

Fairman-Williams ME, Guenther U, Jankowsky E, 2010. SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current Opinion in Structural Biology* 20: 313–324.

Fernández A, Guo HS, Sáenz P, Simón-Buela L, Cedrón MGD, *et al.*, 1997. The motif V of *Plum pox potyvirus* CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research* 25 (11): 4474–4480.

Gupta N, Islam S, Sharma SK, Baranwal VK, 2017. Complete genome sequence of an isolate of *Leek yellow stripe* from garlic in India. *Journal of Plant Pathology* 99 (3): 793–797.

Ha C, Coombs S, Revill PA, Harding RM, Vu M, *et al.*, 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology* 153: 25–36.

Katis NI, Maliogka VI, Dovas CI, 2012. Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. *Advances in Virus Research* 84: 163–208.

Kebede Y, Singh J, Majumder S, 2020. Molecular characterization of the partial coat protein gene of an *Onion yellow dwarf virus* isolate detected in garlic (*Allium sativum* L.) from the West Shewa zone of Ethiopia. *Journal of Plant Protection Research* 60 (1): 106–111.

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: 1547–1549.

Lot H, Chevelon V, Souche S, Dellecolle B. 1998. Effects of *Onion yellow dwarf virus* and *Leek yellow dwarf virus* on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82:1381–1385.

Lunello P, Ducasse DA, Helguera M, Nome SF, Conci VC, 2002. An Argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84 (1):11–17.

Lunello P, Ducasse D, Conci V, 2005. Improved PCR detection of potyviruses in Allium species. *European Journal of Plant Pathology* 112: 371–378.

Maciel SC, Da Silva RF, Reis MS, Jadão AS, Rosa DD, *et al.*, 2011. Characterization of a new *Potyvirus* causing mosaic and flower variegation in *Catharanthus roseus* in Brazil. *Scientia Agricola* 68 (6): 687–690.

Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B, 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1 vev003.

Nigam D, LaTourrette K, Souza PFN, Garcia-Ruiz H, 2019. Genome-Wide Variation in potyviruses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1439.

Riechmann JL, Laín S, García JA, 1992. Highlights and prospects of *Potyvirus* molecular biology. *Journal of General Virology* 73 (Pt 1): 1–16.

Santosa AI, Ertunc F, 2020. Identifcation, molecular detection and phylogenetic analysis of four viruses infecting *Allium cepa* in Ankara Province, Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 127: 561–569.

Shahraeen N, Lesemann DE, Ghotbi T, 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *OEPP/EPPO Bulletin* 38: 131–135.

Vučurović I, Nikolić D, Radović N, Vučurović A, Ristić D, *et al.*, 2017. Incidence and distribution of *Leek yellow stripe virus* in Allium crops in Serbia. *Journal Pesticides and Phytomedicine* 32 (3-4): 145–155.

Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ, Gibbs AJ, 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology* 59: 211–220.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)