

A Phylogenetic Analysis of HC-Pro Protein in Iranian Isolates of *Bean Yellow Mosaic Virus*

Ali Baradar

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-University of Rafsanjan, Iran, eng.baradar@gmail.com

Ahmad Hosseini*

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-University of Rafsanjan, Iran, hosseini@vru.ac.ir

Samin Hosseini

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-University of Rafsanjan, Iran, saminhf1@gmail.com

Somayeh Abdani babaki

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-University of Rafsanjan, Iran, somayeab2015@gmail.com

Abstract

Introduction: *Bean Yellow Mosaic Virus* (BYMV) belonging to *Potyvirus* genus and *Potyviridae* family has a worldwide distribution and a broad host range. In the present study, the phylogenetic relationships of eight virus isolates isolated from different geographical regions of Iran (East Azerbaijan, Ardabil, Ghazvin, Zanjan, Hamadan, Khuzestan, Fars, and Kerman) during the 2017 and 2018 growing seasons were compared with other isolates that were available in the GenBank.

Materials and methods: Plants leaves with viral symptoms were sampled from faba bean fields of different geographical regions of Iran and were transferred to the laboratory. Then, to detect the virus-infected samples, first, DAS-ELISA test was performed using specific antisera. Then, the total RNA of the infected samples was extracted and HC-pro region of selected isolates was amplified and sequenced. Sequence evaluation, phylogenetic relationships, protein structure analysis, and the recombination detection of HC-pro region of the selected isolates were performed using various software.

Results: The selected Iranian isolates were placed in two separate monophyletic groups in the reconstructed phylogenetic tree. Five isolates collected from East Azerbaijan, Ghazvin, Zanjan, Fars, and Kerman and two Australian and Japanese isolates, all isolated from faba bean, were clustered in a monophyletic group. The isolates collected from Ardabil, Hamadan, and Khuzestan, with two other Iranian isolates available in the GenBank, two Indian isolates, and two Japanese isolates were clustered in another group. According to the recombination detection analysis, none of the selected Iranian isolates has been detected as a recombinant isolate.

Discussion and conclusion: Understanding the genetic and recombinant changes of the viral population is an important prerequisite for the efficient diagnosis, effective management, and long-term disease control. The results are helpful in developing strategies that lead to BYMV resistance and may be effective in the future if the disease becomes widespread in line with adopting management strategies.

Key words: Phylogenetic Analysis, Taxonomy, HC-Pro, BYMV

* Corresponding author

Received: January 12, 2020 / **Accepted:** June 7, 2020

فصل نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ۳۴، تابستان ۱۳۹۹، صص ۵۵-۷۰
نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۰/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۸

doi: [10.22108/BJM.2020.120883.1262](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.120883.1262)

تحلیل فیلوژنتیکی پروتئین HC-Pro جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک زرد لوبیا

علی برادر: دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران، eng.baradar@gmail.com
احمد حسینی*: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران، hosseini@vru.ac.ir
ثمین حسینی: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران، saminhf1@gmail.com
سمیه عبدانی بابکی: کارشناس ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران، somayeab2015@gmail.com

چکیده

مقدمه: ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*) به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* تعلق دارد و دارای پراکنندگی جهانی گسترده و دامنه میزبانی وسیع است. در پژوهش حاضر، روابط فیلوژنتیکی ۸ جدایه این ویروس که در سال‌های زراعی ۹۶ و ۹۷ از مناطق جغرافیایی مختلف ایران (آذربایجان شرقی، اردبیل، قزوین، زنجان، همدان، خوزستان، فارس و کرمان) از روی باقلا جدا شده بودند، در مقایسه با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: برگ‌های گیاهان دارای نشانه‌های ویروسی از مزارع باقلای نواحی مختلف ایران نمونه برداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس موزاییک زرد لوبیا، ابتدا از آزمون داس الیزا و آنتی‌بادی اختصاصی ویروس استفاده شد؛ سپس RNA کل نمونه‌های آلوده استخراج و ناحیه HC-Pro جدایه‌های انتخابی تکثیر و توالی‌یابی شد. ارزیابی توالی، بررسی روابط فیلوژنتیکی، بررسی ساختار پروتئینی و همچنین شناسایی وقوع نوترکیبی در ناحیه HC جدایه‌های BYMV انتخابی با نرم‌افزارهای مختلف انجام شد.

نتایج: در درخت فیلوژنتیکی رسم شده، جدایه‌های ایرانی در دو گروه مونوفیلیتیک مجزا قرار گرفتند؛ به طوری که پنج جدایه آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان، فارس و کرمان در کنار دو جدایه از استرالیا و ژاپن که همگی از روی باقلا جدا شده بودند، در یک گروه جای گرفتند و جدایه‌های اردبیل، همدان و خوزستان به همراه دو جدایه دیگر ایرانی موجود در بانک ژن، دو جدایه از هند و دو جدایه از ژاپن در گروه دیگر قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمون نوترکیبی، هیچ کدام از جدایه‌های ایرانی جمع‌آوری شده در پژوهش حاضر، جدایه نوترکیب تشخیص داده نشدند.

بحث و نتیجه‌گیری: درک تغییرات ژنتیکی و نوترکیبی جمعیت ویروسی پیش‌نیاز مهمی برای تشخیص کارآمد، مدیریت مؤثر و کنترل بیماری در درازمدت است. قطعاً نتایج در توسعه راهکارهایی کاربرد دارند که به مقاومت در برابر BYMV منتج می‌شوند و چنانچه این بیماری در آینده همه‌گیر شود، می‌توانند در راستای اتخاذ راهبردهای مدیریتی اثربخش باشند.

واژه‌های کلیدی: تحلیل فیلوژنتیکی، آرایه‌بندی، HC-Pro، BYMV

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

ویروس موزاییک زرد لوییا^۱ (BYMV) به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* تعلق دارد. ویروس یادشده دارای RNA تک‌رشته‌ای مثبت است و از طریق چندین گونه شته به شکل ناپایا منتقل می‌شود. اگرچه خسارت آلودگی با BYMV سبب نابودی گیاه نمی‌شود، میزان عملکرد آن را کاهش می‌دهد (۱). نشانه‌های بیماری ناشی از ویروس BYMV در گیاهان آلوده متغیر است و به طور درخور توجهی تحت تأثیر استرین ویروس و ژنوتیپ گیاه قرار دارد. مهم‌ترین نشانه‌هایی که این ویروس ایجاد می‌کند، عبارتند از: موزاییک، کوچک شدن، پیچیدگی و بدشکلی برگ‌ها (۲). مشابه بسیاری از پوتی ویروس‌ها، ویروس موزاییک زرد لوییا گسترش جهانی وسیعی دارد و تعداد زیادی از میزبان‌های گیاهی را آلوده و خسارت اقتصادی مهمی را به انواع گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای وارد می‌کند. ویروس موزاییک زرد لوییا دارای استرین‌ها یا پاتوتیپ‌های بسیاری در طبیعت است که از نظر ویژگی‌های زیستی مانند دامنه میزبانی و شدت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند (۳). نخستین گزارش BYMV در ایران را کایزر^۲ و همکاران (۱۹۶۸) از روی گیاهانی مانند نخود ایرانی، نخودفرنگی، عدس، لوییا و باقلا ارائه کردند (۴). تاکنون ویروس BYMV از استان‌های کرمان، هرمزگان، تهران، فارس، خوزستان، گیلان، مازندران، کرمانشاه، اصفهان، البرز و لرستان از روی باقلا (۵) و (۶)، آفتابگردان (۷)، زعفران (۸) و همچنین از پدازه‌های گلابول (۹) گزارش شده است.

ویروس موزاییک زرد لوییا (مانند سایر اعضای خانواده *Potyviridae*) پلی‌پروتئینی را کد می‌کند که

به ۱۰ پروتئین با عملکرد مشخص تقسیم می‌شود (۱۰). پروتئین‌هایی که ژنوم BYMV کد می‌کند، از قسمت ۵ به ۳ به ترتیب عبارتند از: P1، HC-Pro، P3، 6K1، CI، 6K2، VPg، NIa، NIB و CP (۱۱)؛ همچنین یک قاب خواندنی باز^۳ (ORF) کوتاه در سیترون P3 با عنوان PIPPO^۴ و با حفاظت‌شدگی زیاد گزارش شده است (۱۲). پروتئین HC یکی از پروتئین‌هایی است که ویروس کد می‌کند، چندین عملکرد دارد و در بسیاری از مراحل چرخه آلودگی با ویروس دخیل است (۱۳). این پروتئین دارای حفاظت‌شدگی زیادی بین اعضای جنس *Potyvirus* است و آغازگرهای طراحی شده بر اساس ناحیه HC-Pro می‌توانند تمام گونه‌های *Potyvirus* را شناسایی کنند (۱۴). بر اساس پیش‌بینی‌های ساختاری، پروتئین HC به سه ناحیه کاربردی تقسیم می‌شود: ناحیه‌های انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی که هر کدام تقریباً ۱۰۰ آمینو اسید دارند و ناحیه مرکزی که حدود ۲۵۰ آمینو اسید را پوشش می‌دهد و شامل دامنه‌ای (حدود ۱۰۰ آمینو اسید) است که سبب اتصال ناحیه مرکزی و انتهای کربوکسیلی می‌شود. ابتدا این پروتئین به شکل مؤلفه کمکی برای انتقال پوتی ویروس‌ها به واسطه شته از گیاهی به گیاه دیگر شناسایی شد. بر اساس پژوهش‌های انجام شده، احتمالاً ژن یادشده به شکل پلی بین استایلت شته و ویروس عمل می‌کند (۱۵). تاکنون پنج عملکرد مختلف برای پروتئین HC ذکر شده است: انتقال ویروس از طریق شته، تکثیر RNA، حرکت سیستمیک، سرکوب خاموشی RNA و عمل به شکل پروتئیناز (۱۶ و ۱۷). با توجه به اهمیت پروتئین HC به عنوان ناحیه‌ای با عملکرد چندگانه و انجام‌نشده مطالعه‌ای روی ساختار این پروتئین در جدایه‌های

اختصاصی 1370For (CTM⁴CARATGGAGAAAY¹CCYGC) و (CCAAAGTTCCAATCACCACC) 2340R تکثیر شد (۱۹). واکنش RT-PCR برای تولید cDNA در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ابتدا میکروتیوب‌های حاوی ۴ میکرولیتر Reverse transcriptase buffer 10X (۱ میکرولیتر 10 dNTPs mmol/ul) (تهیه شده از شرکت یکتا تجهیز آزما)، ۱ میکرولیتر آغازگر (2340R (10pmol/ul)، ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, T-100) و سپس روی یخ قرار داده شدند؛ در مرحله بعد، هر کدام از آنزیم‌های (MuMLV Reverse transcriptase (RT) و RNase inhibitor (40U/ul) به میزان ۰/۵ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (1.5 mM MgCl₂) ساخت شرکت ویراژن، ۱ میکرولیتر آغازگر (10 pmol/ul) و ۵ میکرولیتر cDNA در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه گرمایی واکنش PCR به شکل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد و بسط به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد تنظیم شد و در نهایت، بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. کیفیت قطعه‌های تکثیر شده حاصل از

ایرانی، در پژوهش حاضر به بررسی ویژگی‌های ساختاری و فیلوژنتیکی ناحیه HC-Pro در جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف ایران پرداخته و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

ردیابی و شناسایی ویروس موزاییک زرد لوبیا در مزارع باقلا: در فصل‌های زراعی ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷، برگ‌های گیاهان دارای نشانه‌های ویروسی از مزارع باقلای استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل، زنجان، قزوین، همدان، خوزستان، فارس و کرمان به طور جداگانه و با ثبت نام محل و تاریخ نمونه‌برداری در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. آزمون داس الیزا^۵ با بهره‌گیری از آنتی‌بادی اختصاصی چندهمسانه‌ای BYMV که از مؤسسه Bioreba تهیه شد، طبق دستورعمل کلارک^۶ و آدامز^۷ (۱۹۷۷) برای تشخیص BYMV در نمونه‌ها استفاده شد (۱۸). پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه، نتایج با دستگاه الیزاخوان^۸ Epoch (BioTech) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند و یک نمونه آلوده به ویروس از هر منطقه برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد.

استخراج RNA کل گیاه، تکثیر و توالی‌یابی ناحیه HC-Pro جدایه‌های انتخابی: RNA کل ۸ نمونه انتخابی آلوده به BYMV با استفاده از کیت Top Plant and Fungi RNA Purification kit (شرکت توپازژن، ایران) بر اساس دستورعمل شرکت سازنده استخراج شد. ناحیه HC-Pro جدایه‌های بررسی شده به روش مولکولی RT-PCR و به کمک جفت آغازگر

جدایه‌های ایرانی با برنامه ترجمه EXPASY (https://web.expasy.org/translate) به توالی آمینواسیدی تبدیل شدند. نرم‌افزار MAFFT v.7 با تنظیمات پیش فرض برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی استفاده شد (۲۰). فایل هم‌ردیف‌سازی شده به‌طور دستی با برنامه Mesquite v.3.04 بازبینی شد (۲۱). به‌منظور مشاهده توالی‌های حفاظت‌شده بین توالی‌های هم‌ردیف‌سازی‌شده، توالی‌های یادشده با برنامه Weblogo.v.2.8.2 به تصویر کشیده شدند (۲۲).

واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر Tris-Borate-EDTA) پس از اطمینان یافتن از خالص بودن قطعه تکثیر شده به طول حدود ۱۱۰۰ جفت باز، ناحیه مدنظر تکثیر شده از جدایه‌های مختلف برای تعیین توالی به شرکت توپازژن ارسال شد.

بررسی توالی ناحیه HC-Pro در جدایه‌های

BYMV: به‌منظور مقایسه توالی جدایه‌های بررسی شده با سایر جدایه‌ها، تمام جدایه‌هایی که توالی HC-Pro آنها ثبت شده بود، از بانک ژن برداشت شدند. ویژگی‌های جدایه‌ها به‌طور خلاصه در جدول ۱ بیان شده‌اند. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده از

جدول ۱- جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف ایران و بانک ژن

نام جدایه	رأس‌شمار	سال	کشور	شهر	میزبان
2Fa	MN117959	2017	Iran	Fasa	Broad bean
6T	MN117966	2017	Iran	Tabriz	Broad bean
FB	HG970867	1998	Australia	-	Faba Bean
90.2	AB439731	1990	Japan	-	Faba Bean
1Z	MN117962	2018	Iran	Zanjan	Broad bean
2Gh	MN117963	2018	Iran	Ghazvin	Broad bean
50G	MN117961	2018	Iran	Giroft	Broad bean
28KH	MN117960	2017	Iran	Dezfol	Broad bean
4A	MN117965	2017	Iran	Ardabil	Broad bean
BYMVS	U47033	1996	Australia	-	-
BYSun	KT934334	2012	Iran	Esfahan	Sunflower
GPK	KR065420	2010	Iran	Karaj	Gladiolus
Gla	AB439729	2008	Japan	-	Gladiolus
Vfaba4	KF155423	2013	India	-	Faba Bean
Glad20	KF155422	2013	India	-	Gladiolus
G1	AB439730	2008	Japan	-	Gladiolus
Vfaba2	KF155424	2013	India	-	Faba Bean
Lisianthus	AM884180	2007	Taiwan	-	Eustoma
GDD	AY192568	2002	USA	-	Gladiolus
CKGL5	KF155420	2013	India	-	Gladiolus
RM	KJ922618	2013	India	-	Pea
RRM	KJ872537	2013	India	-	Soybean
Glad7	KF155421	2013	India	-	Gladiolus
GB2	AB079888	2002	Japan	-	-
RM3	KJ994279	2014	India	-	Pea
CKGL3	KF155414	2013	India	-	Gladiolus
MB4	NC_003492	1996	Japan	-	-
RM4	KJ994280	2014	India	-	Pea
CKGL2	KM114059	2012	India	-	Gladiolus
RM2	KJ994278	2014	India	-	Pea

R3	KJ734282	2014	India	-	Pea
92.1	AB439732	1991	Japan	-	Trifolium
LPexFB	HG970868	1998	Australia	-	Faba Bean
LP	HG970866	1998	Australia	-	Lupinis
SW9	KF632713	2012	Australia	-	Diuris
GB32A	HG970854	2011	Australia	-	Lupinis
ES69C	HG970856	2011	Australia	-	Lupinis
SW3.2	JX156423	2011	Australia	-	Diuris
AR87C	HG970863	2011	Australia	-	Lupinis
LMBNN	HG970855	1998	Australia	-	Lupinis
MD6	HG970849	2011	Australia	-	Lupinis
MD7	HG970850	2011	Australia	-	Lupinis
ES11A	HG970859	2011	Australia	-	Lupinis
GB42C	HG970853	2011	Australia	-	Lupinis
MD1	HG970847	2011	Australia	-	Lupinis
ES67C	HG970857	2011	Australia	-	Lupinis
ES55C	HG970858	2011	Australia	-	Lupinis
PN77C	HG970862	2011	Australia	-	Lupinis
PN80A	HG970861	2011	Australia	-	Lupinis
PN83A	HG970860	2011	Australia	-	Lupinis
GB17A	HG970852	2011	Australia	-	Lupinis
AR98C	HG970864	2011	Australia	-	Lupinis
AR93C	HG970865	2011	Australia	-	Lupinis
NG1	HG970869	2012	Australia	-	Lupinis
KP2	JX173278	2011	Australia	-	Diuris
SP1	HG970851	2011	Australia	-	Lupinis
Fr	FJ492961	2008	South Korea	-	Freesia
CKGL1	KF155409	2012	India	-	Gladiolus
IbG	AB079887	2002	Japan	-	-
M11	AB079886	2002	Japan	-	-
MD5	HG970848	2011	Australia	-	Lupinis
CS	AB373203	2007	Japan	-	-
Alaska	GQ181115	2008	USA	-	Trifolium
CYVV	HG970870	2012	Australia	-	Trifolium
3H	MN117964	2018	Iran	Hamadan	Broad bean

بررسی شده در پژوهش حاضر با سایر جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن (جدول ۱)، درخت فیلوژنی به روش Maximum Likelihood و بر اساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی با برنامه IQtree v.1.6 رسم شد (۲۴)؛ این برنامه بهترین و مناسب‌ترین مدل برای رسم درخت فیلوژنی را به‌طور خودکار انتخاب می‌کند.

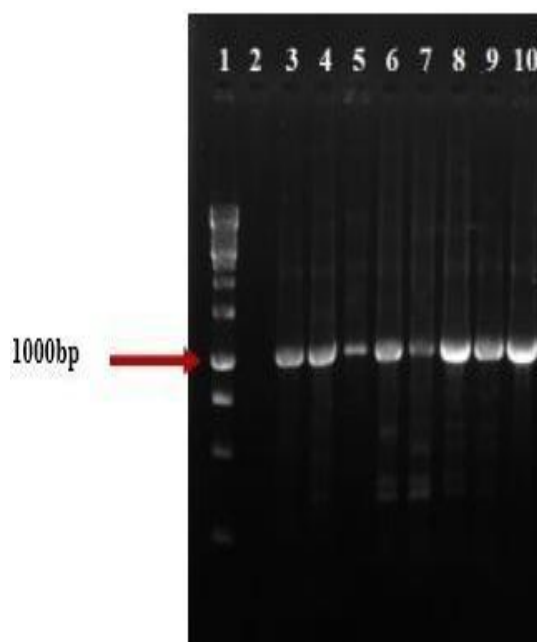
بررسی ساختار پروتئینی توالی‌های BYMV: ساختار پروتئینی جدایه‌های بررسی شده با برنامه Pfam^{۱۱} ارزیابی شد. به‌منظور بررسی میزان حفاظت شدگی ژن

بررسی امکان نوترکیبی در جدایه‌های BYMV

انتخابی: شش برنامه مختلف موجود در بسته نرم‌افزار RDP v.4 (RDP، GENECONV، BOOTSCAN)، با تنظیمات MAXCHI، SISCAN و 3SEQ) پیش فرض برای بررسی احتمال نوترکیبی بین توالی‌های نوکلئوتیدی بررسی شده استفاده شدند. توالی‌هایی که دست کم با سه برنامه با P value کمتر از 10^{-6} شناسایی شدند، توالی‌های نوترکیب در نظر گرفته شدند (۲۳).

بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های BYMV:

به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های



شکل ۱- الکتروفورز محصولات آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای 1370For و 2340Rev روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با Red-safe: راهک ۱: DNA Ladder (1kb)، راهک ۲: شاهد منفی، راهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰: نمونه باقلای جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف ایران (آذربایجان شرقی، اردبیل، قزوین، زنجان، همدان، خوزستان، فارس و کرمان)

نتایج بررسی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن به کمک برنامه بلاست نشان دادند جدایه‌های 2Fa و 50G بیشترین شباهت را به ترتیب به میزان ۹۸/۱۱ و ۹۷/۶۹ درصد با جدایه استرالیایی FB جدا شده از باقلا نشان می‌دهند. جدایه‌های 28KH، 3H و 4A بیشترین شباهت را به ترتیب به میزان ۹۷/۶۹، ۹۲/۸۹ و ۹۸/۱۵ درصد با دیگر جدایه ایرانی (Bysun) جدا شده از آفتابگردان نشان دادند. دو جدایه 1Z و 2Gh به ترتیب به میزان ۹۷/۳۴ و ۹۶/۱۶ درصد با جدایه ژاپنی 90.2 جدا شده از باقلا شباهت داشتند و جدایه 6T به میزان ۹۴/۱۱ درصد با جدایه آمریکایی GDD جدا شده از گلابول مشابهت نشان داد.

HC-Pro، ساختاری کریستالی مربوط به بخش انتهایی کربوکسیلی پروتئین یادشده موجود در بانک داده پروتئینی (PDB) با شماره شناسه 3RNV انتخاب شد؛ ساختار یادشده به ویروس موزاییک شلغم تعلق داشت و به روش تفرق اشعه ایکس تعیین شده بود (۲۵). توالی‌های پروتئینی موجود که در بخش‌های پیش هم‌ردیف‌سازی شدند، با برنامه تحت وب Consurf (<http://consurf.tau.ac.il>) روی ساختار کریستالی پروتئین 3RNV هم‌ردیف‌سازی شدند.

نتایج و بحث

تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ناحیه HC-Pro: به منظور

بررسی ساختار HC-Pro در جدایه‌های ایرانی BYMV، یک جدایه از هر استان که در آزمون الیزا مثبت شده بود، انتخاب شد. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه HC-Pro به تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۱۱۰۰ جفت باز منجر شد. نتایج تکثیر ژن HC-Pro روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ مشاهده می‌شوند. توالی‌های ۸ جدایه بررسی شده با نام‌های 2Fa، 28KH، 50G، 1Z، 2Gh، 3H، 4A و 6T به ترتیب به استان‌های فارس، خوزستان، کرمان، زنجان، قزوین، همدان، اردبیل و تبریز تعلق داشتند.

بررسی ساختار توالی جدایه‌های HC-Pro: توالی

نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی انتخابی پس از ترجمه به توالی آمینواسید، با استفاده از برنامه Pfam بررسی شد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، ساختار پروتئینی ۸ توالی بررسی شده از ناحیه‌ای با عملکرد پتیداز و متعلق به گروه HC-Pro تشکیل شده است.

جدول ۲- بررسی عملکرد پروتئین HC-Pro جدایه‌های ایرانی با استفاده از برنامه Pfam

Isolate	Family/Description	Alignment		HMM		Bit score	E-value
		Start	End	Start	End		
2Fa	Peptidase C6/ Helper component proteinase	3	230	113	338	183.4	7.2e-54
28KH	Peptidase C6/ Helper component proteinase	2	292	112	400	261.1	1.9e-77
50G	Peptidase C6/ Helper component proteinase	3	299	121	414	272.1	8.7e-81
1Z	Peptidase C6/ Helper component proteinase	3	306	139	440	315.1	7.5e-94
2Gh	Peptidase C6/ Helper component proteinase	7	337	112	440	330.1	2.1e-98
3H	Peptidase C6/ Helper component proteinase	16	228	139	349	151.2	4.1e-44
4A	Peptidase C6/ Helper component proteinase	9	339	112	440	327.6	1.2e-97
6T	Peptidase C6/ Helper component proteinase	6	264	112	368	234.1	2.9e-69

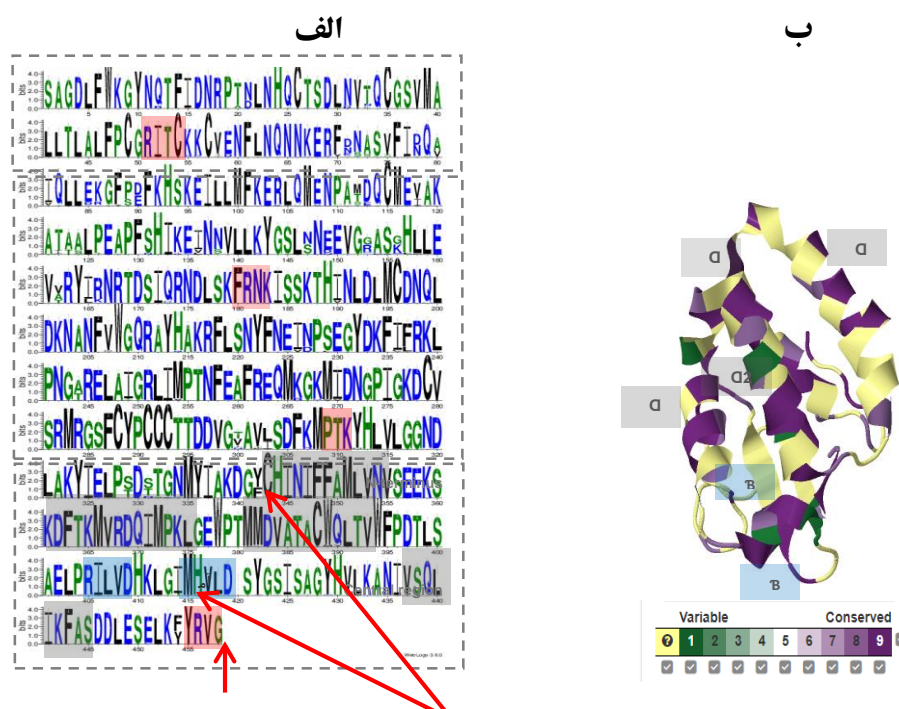
بخش دوم پروتئین یا ناحیه مرکزی شامل آمینواسیدهای موقعیت‌های ۱۰۰ تا ۳۰۰ است. همان‌طور که در شکل ۲، الف مشخص شده است، دو توالی حفظ‌شده PTK و FRNK در این ناحیه وجود دارند. در پژوهش‌های انجام‌شده به نقش این توالی‌ها به ترتیب در انتقال شته از طریق واکنش با پروتئین پوششی (۲۹) و در بازدارندگی خاموشی ژن (۳۰) در برخی پوتی‌ویروس‌ها اشاره شده است.

ناحیه انتهایی کربوکسیلی در بخش انتهایی پروتئین قرار دارد و شامل ۱۰۰ آمینواسید است. ویژگی پروتئین‌های پروتئین HC که از نوع سیستمین است، از جمله ویژگی‌های این ناحیه است. ناحیه انتهایی کربوکسیلی خاصیت خودبرشی دارد و بر فعالیت بازدارندگی خاموشی ژن تأثیرگذار است (۳۱). ناحیه حفظ‌شده YXVG در انتهای توالی پروتئین HC به‌عنوان توالی ناحیه خودبرشی در پوتی‌ویروس‌های مختلف شناسایی شده است (۳۲)؛ این توالی در جدایه‌های ویروس موزاییک زرد لوبیا به‌شکل توالی حفظ‌شده YRVG با رنگ قرمز در شکل ۲، الف مشخص شده است. دو آمینواسید هیستیدین و سیستمین که برای فعالیت

تاکنون توالی پروتئین HC مربوط به ۵۴ جدایه BYMV در بانک ژن ثبت شده است. توالی‌های آمینواسیدی ثبت‌شده به همراه ۸ توالی ایرانی بررسی شده در پژوهش حاضر پس از هم‌ردیف‌سازی با برنامه وب‌لوگو^{۱۲} به تصویر کشیده شدند (شکل ۲، الف). همان‌طور که شکل ۲، الف نشان می‌دهد نخستین ناحیه پروتئین که شامل آمینواسیدهای موقعیت‌های ۱ تا ۱۰۰ هستند، ناحیه انتهایی آمینی نامیده می‌شود (۲۶). ناحیه انتهایی آمینی در انتقال شته اهمیت دارد، اما نقشی در آلوده‌سازی و حیات ویروس ندارد (۲۷). در پژوهش‌های انجام‌شده، ناحیه حفاظت‌شده KITC در بخش انتهایی آمینی پوتی‌ویروس‌ها، ناحیه مهمی معرفی شده است که برای اتصال استایلت شته ناقل و انتقال ویروس ضروری است. همان‌طور که در شکل ۲، الف مشخص شده است، جدایه‌های بررسی‌شده ویروس موزاییک زرد لوبیا به‌جای KITC، توالی RITC را دارند. نتایج فلاسینسکی^{۱۳} و همکاران نشان دادند اگرچه آرژنین در تعداد کمی از پوتی‌ویروس‌ها مانند ویروس موزاییک زرد لوبیا جایگزین لیزین می‌شود، خاصیت انتقال با شته حفظ می‌شود (۲۸).

الف) مشخص شده است. صفحه‌های بتا بین مارپیچ سوم و چهارم و پشت سرهم قرار گرفته‌اند. دو آمینواسید ضروری در فعالیت کاتالیتیک سیستمین و هیستیدین به ترتیب در بخش‌های ابتدایی مارپیچ آلفای اول و صفحه بتای دوم قرار گرفته‌اند. همان‌طور که در شکل سه‌بعدی مشاهده می‌شود، اتصال انتهای سه مارپیچ شماره‌های ۱، ۲ و ۳ از یک سو و اتصال به صفحه بتای ۲ از سوی دیگر که به هم باند شده‌اند، مانع پذیرش پیش‌ماده جدید به پروتئین برای ایجاد برش می‌شود؛ این ویژگی ساختاری سبب ایجاد فعالیت خودبرشی می‌شود (۲۵).

خودبرشی پروتئین HC ضروری هستند (۳۳)، در توالی‌های بررسی شده به شکل حفظ شده وجود دارند و با پیکان در شکل ۲، الف مشخص شده‌اند. به منظور بررسی بهتر و کسب اطلاعات بیشتر درباره ساختار ناحیه انتهایی کربوکسیلی، توالی‌های بررسی شده در پژوهش حاضر روی ساختار سه‌بعدی این ناحیه که به ویروس موزاییک شلغم تعلق داشت، هم‌ردیف‌سازی شدند (شکل ۲، ب). همان‌طور که مشاهده می‌شود، ناحیه انتهایی کربوکسیلی از چهار مارپیچ آلفا و دو صفحه بتا تشکیل شده است؛ موقعیت این نواحی به ترتیب به شکل مربع خاکستری و آبی روی وب‌لوگو (شکل ۲،



شکل ۲- الف. نمایی کلی از هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های آمینواسیدی پروتئین HC-Pro جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن با برنامه وب‌لوگو که به سه بخش ناحیه انتهایی آمینی یا N-terminal، ناحیه مرکزی یا Central region و ناحیه انتهایی کربوکسیلی یا C-terminal تقسیم می‌شوند. موتیف‌های مسئول انتقال شته و بازدارندگی خاموشی، ناحیه خودبرشی با رنگ قرمز، محل مارپیچ‌های آلفا و صفحه‌های بتا به ترتیب با رنگ‌های خاکستری و آبی مشخص شده‌اند. ب. طرح حفاظت‌شدگی توالی‌های پروتئینی HC-Pro هم‌ردیف‌سازی روی ساختار سه‌بعدی پروتئینی موجود در PDB با شماره شناسه 3RNV با استفاده از برنامه Consurf

جدول ۳ مشاهده می‌شود، نوترکیبی در جدایه 28KH جدا شده از استان خوزستان با دو برنامه GENECONV و 3Sec شناسایی شد و نکته درخور توجه این است که جدایه ایرانی BYSun جدا شده از آفتابگردان والد اصلی معرفی شده است؛ اما از آنجاکه این نوترکیبی تنها با دو روش شناسایی شده است، چندان قابل اعتماد نیست و می‌توان نتیجه گرفت هیچ کدام از جدایه‌های ایرانی بررسی شده نوترکیب نیستند. در زمینه سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن نیز با توجه به نتایج و همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، جدایه‌های CKGL3، M11، RM2 و GDD بر اساس معیارهای نتایج نوترکیبی، جدایه‌های نوترکیب هستند. مطالعه‌های انجام شده تغییر شرایط میزبانی و اقلیمی و در نتیجه آن، تغییر شدید ژنوم به منظور سازگاری با شرایط جدید را منشأ پیدایش بسیاری از گونه‌های ویروسی عنوان می‌کنند.

بررسی احتمال نوترکیبی: نوترکیبی از پدیده‌های رایج در چرخه تکثیر ویروس هاست (۳۴ و ۳۵). نوترکیبی‌های ژنتیکی نقش مهمی را در خطاهای فیلوژنتیکی ایفا می‌کنند. معمولاً پدیده نوترکیبی بین جدایه‌های یک پوتی ویروس بسیار متداول است، ولی با شدت کمتر بین گونه‌های مختلف نیز اتفاق می‌افتد (۳۶). معمولاً پدیده نوترکیبی بین جدایه‌های یک گونه پوتی ویروسی سبب جابه‌جایی قطعه‌های ژنومی می‌شود؛ البته وقوع آن بین جنس‌های مختلف به ندرت گزارش شده است. به منظور بررسی این پدیده زیستی در ژنوم جدایه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر، پس از هم‌ردیف‌سازی این توالی‌ها با سایر جدایه‌های انتخابی موجود در بانک ژن و با الگوریتم‌های مختلف، از نرم‌افزار RDP4 استفاده شد. در حالتی وجود نوترکیبی پذیرفته می‌شود که دست کم با سه روش با P value کمتر از 10^{-6} شناسایی شود (۲۳). همان‌طور که در

جدول ۳- بررسی وقوع نوترکیبی در توالی HC-Pro جدایه‌های BYMV با استفاده از برنامه RDP

	Recomb.	Major ^۱ parent	Minor ^۱ parent	Detection method / Pvalue						
				R	G	B	M	C	S	T
1	CKGL3	Gla	CKGL2	2.2*10 ⁻¹⁸	1.7*10 ⁻¹³	6.8*10 ⁻¹³	9.5*10 ⁻¹⁵	2.2*10 ⁻⁰⁴	9.7*10 ⁻⁴⁶	4.4*10 ⁻¹⁵
2	M11	BYSun	SW9	1.9*10 ⁻⁰⁵	2*10 ⁻⁰²	-	1.2*10 ⁻⁰⁷	1.5*10 ⁻⁰⁷	3.2*10 ⁻⁵⁰	4.4*10 ⁻²⁸
3	RM2	Glad7	Unknown	5*10 ⁻⁰⁴	5.2*10 ⁻⁰³	3.2*10 ⁻⁰³	4.5*10 ⁻⁰⁸	-	3.1*10 ⁻¹⁵	3.4*10 ⁻¹²
4	RM2	Gla	CKGL2	3.8*10 ⁻⁰⁵	-	-	3.8*10 ⁻⁰⁴	-	5.4*10 ⁻³⁰	6.3*10 ⁻⁰⁴
5	RM3	RM2	RM	-	-	-	2.5*10 ⁻⁰²	-	9.4*10 ⁻¹³	-
6	MB4	CKGL2	BYSun	-	4.9*10 ⁻⁰⁵	-	-	-	-	1.3*10 ⁻⁰⁴
7	GDD	Gla	KP2	1.9*10 ⁻⁰⁴	2.4*10 ⁻⁰³	-	3.5*10 ⁻⁰³	9.2*10 ⁻⁰³	1.9*10 ⁻¹⁴	8.9*10 ⁻⁰⁴
8	28KH	BYSun	Unknown	-	1*10 ⁻⁰³	-	-	-	-	2.2*10 ⁻⁰²
9	Lisianthus	BYMVS	CKGL2	-	-	-	-	-	-	6.7*10 ⁻⁰²

توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی برآورد شده با برنامه مدل‌یاب موجود در نرم‌افزار IQtree به ترتیب مدل‌های TIM2+F+I+G4 و FLU+G4 بودند. درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی HC-Pro به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴

بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های BYMV: به منظور بررسی روابط فیلوژنی جدایه‌های بررسی شده با سایر جدایه‌های موجود، پس از حذف توالی‌های نوترکیب، از برنامه IQtree استفاده شد. بهترین مدل‌ها برای رسم درخت فیلوژنی بر اساس

این جدایه‌ها که توالی کامل آنها نیز وجود دارد، در گروه I کهو و همکاران (۲۰۱۴) قرار گرفته‌اند (۳۴) و هیچ کدام از جدایه‌های یادشده در پژوهش ویلی و همکاران (۲۰۰۸) استفاده نشده‌اند (۳۸).

گروه ۲ شامل یک جدایه از کشور ژاپن است که در گروه‌های III کهو و همکاران (۲۰۱۴) (۳۷) و Monocot ویلی و همکاران (۲۰۰۸) (۳۸) قرار گرفته است.

در گروه ۳، پنج جدایه ایرانی بررسی شده در پژوهش حاضر و دو جدایه از استرالیا و ژاپن قرار گرفته‌اند که همگی از روی باقلا جدا شده‌اند. جدایه‌های استرالیا و ژاپن در طبقه‌بندی‌های انجام شده به ترتیب به گروه VII کهو و همکاران (۲۰۱۴) و Broad Bean ویلی و همکاران (۲۰۰۸) تعلق دارند (۳۷ و ۳۸).

در گروه ۵، سه جدایه اردبیل، همدان و خوزستان همراه با دو جدایه ایرانی موجود در بانک ژن جدا شده از آفتابگردان و گلایول و دو جدایه از هند (گلایول و باقلا) و دو جدایه از ژاپن (گلایول و شبدر) جای گرفته‌اند. بر اساس تقسیم‌بندی‌های انجام شده، جدایه ایرانی آفتابگردان و جدایه استرالیایی S و ژاپنی ۹۲/۱ در گروه V، دو جدایه LP و LPexFB استرالیایی جدا شده از Lupine در گروه VI، جدایه گلایول هند Gla در گروه III و جدایه Vfaba2 در گروه IV کهو و همکاران (۲۰۱۴) قرار گرفته‌اند (۳۷). در درختی که ویلی و همکاران (۲۰۰۸) رسم کرده‌اند (۳۸)، جدایه S به گروه Broad Bean تعلق گرفته است.

جدایه آمریکایی Alaska جدا شده از شبدر و جدایه CS ژاپن در گروه ۶ قرار گرفته‌اند؛ جدایه CS در گروه IX کهو و همکاران (۲۰۱۴) و Pea ویلی و همکاران (۲۰۰۸) قرار گرفته است (۳۷ و ۳۸). در کنار گروه‌های

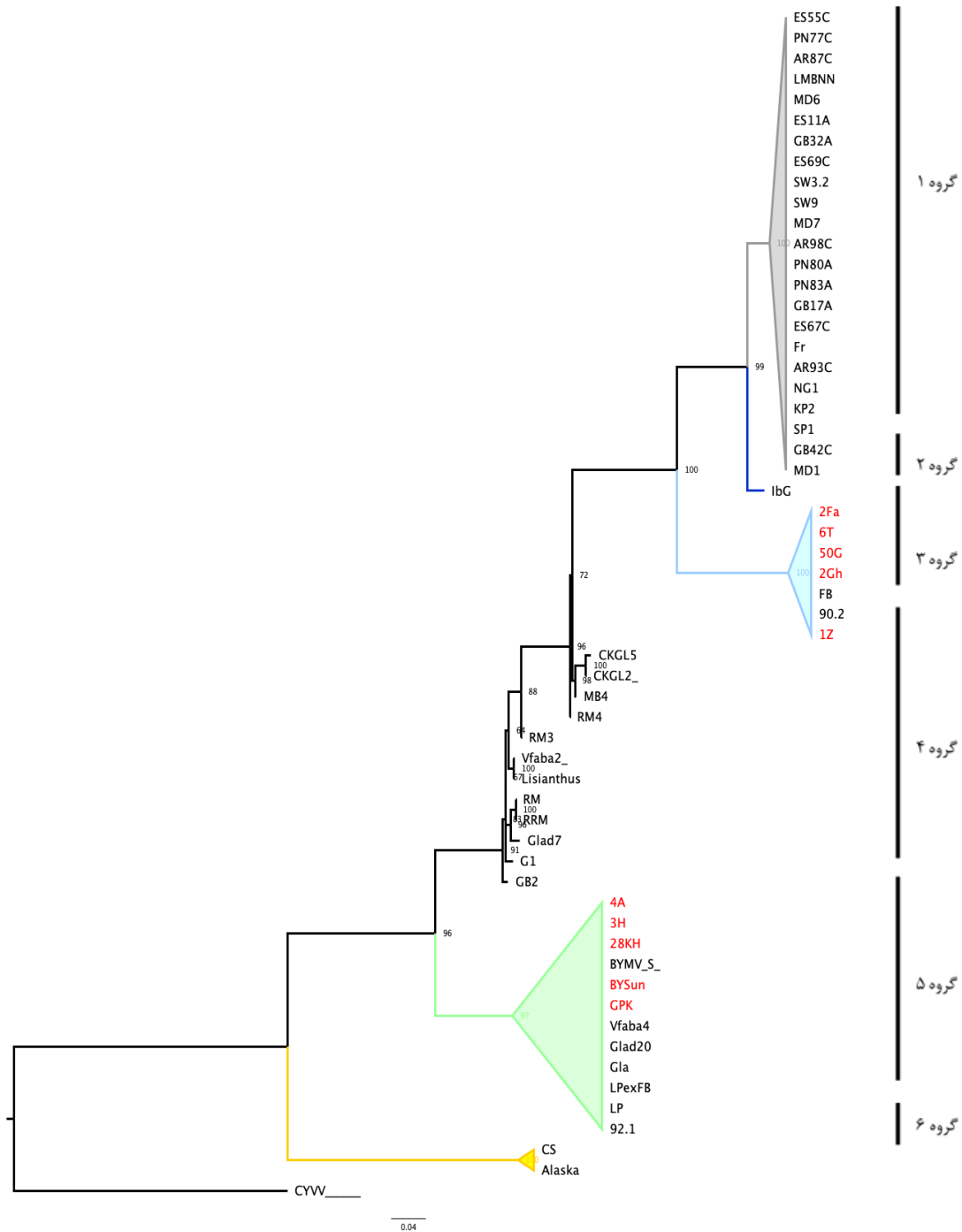
نمایش داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، شش گروه کلی در هر دو درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی HC-Pro وجود دارند که با شماره‌های ۱ تا ۶ نام گذاری شده‌اند. همه نمونه‌ها به جز ۱۵ جدایه موجود در گروه ۴، در پنج گروه مونوفیلیتیک با بوت‌استرپ بیش از ۹۶ درصد در درخت رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی و بیش از ۸۰ درصد بر اساس توالی پروتئینی قرار گرفتند. بوت‌استرپ درخت رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی بیشتر از توالی آمینواسیدی و ترتیب گروه‌های تشکیل شده در درخت رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با یکدیگر متفاوت است.

تقسیم‌بندی انجام شده در پژوهش حاضر بر اساس توالی پروتئینی HC-Pro با تقسیم‌بندی انجام شده بر اساس توالی کل ژنوم (کهو^{۱۶} و همکاران، ۲۰۱۴) و توالی ناحیه CP (ویلی^{۱۷} و همکاران، ۲۰۰۸) مطابقت کامل ندارد (۳۷ و ۳۸). در طبقه‌بندی ویلی و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس ناحیه CP، جدایه‌ها در هفت گروه Broad bean، W، General، Monocot، Canna و Lupine قرار گرفته‌اند. نتایج این پژوهش نشان دادند بین گروه‌های فیلوژنتیکی، میزبان و منطقه جغرافیایی ارتباط وجود دارد (۳۸). در بررسی کهو و همکاران (۲۰۱۴) بر اساس توالی کامل ژنوم BYMV، گروه‌های مونوفیلیتیک تشکیل شده با اعداد لاتین از I تا IX نام گذاری شده‌اند. با توجه به نتایج پژوهش یادشده، ارتباطی بین گروه‌های فیلوژنتیکی، میزبان و جغرافیا مشاهده نمی‌شود (۳۴).

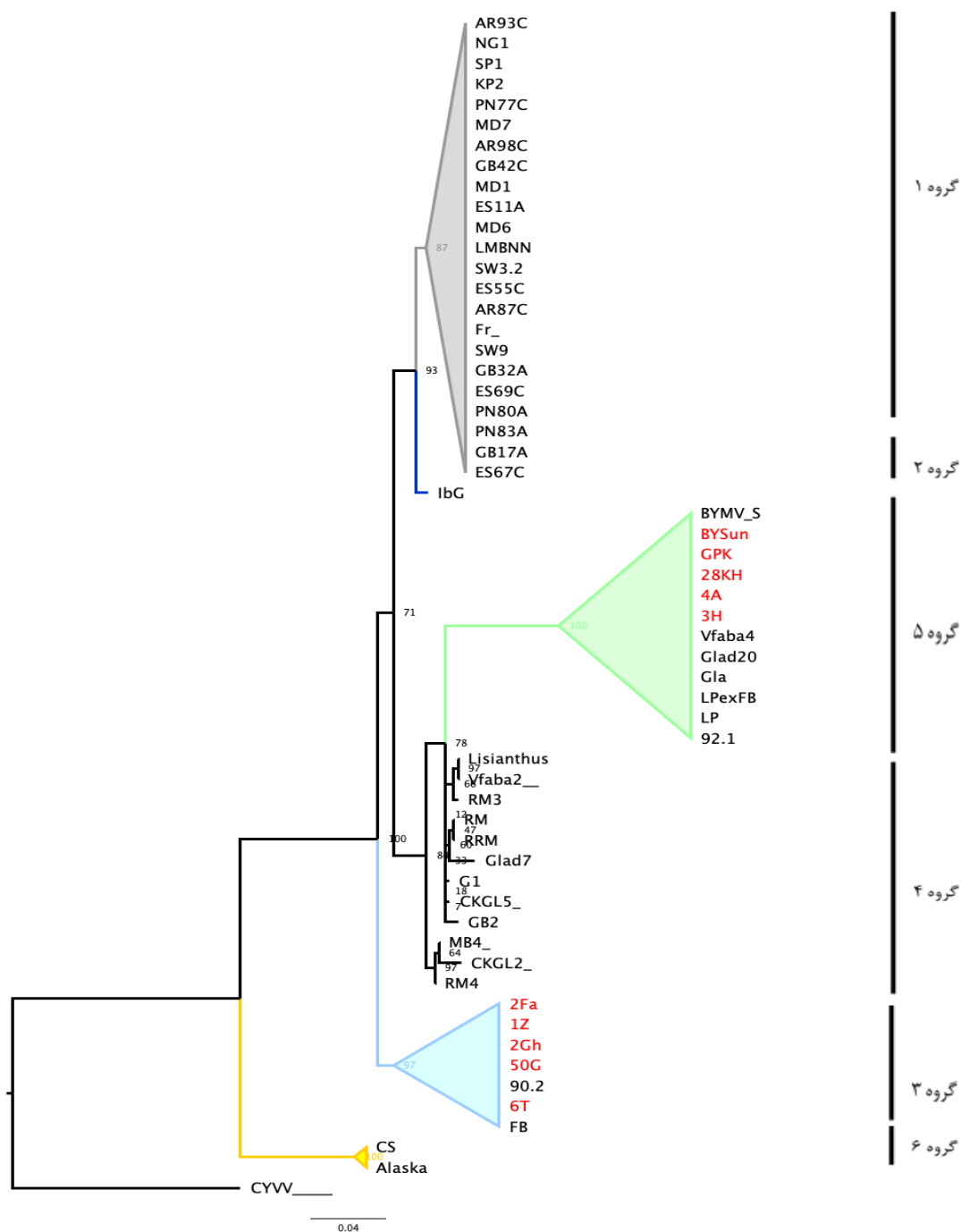
در درخت‌های رسم شده در شکل‌های ۳ و ۴، جدایه‌های استرالیایی که از گیاه لوبیای مصری (Lupin) جداسازی شده‌اند، در گروه ۱ قرار گرفته‌اند. تعدادی از

گلاپول) در کنار هم قرار گرفته‌اند، اما گروه مونوفیلتیک ایجاد نکرده‌اند؛ این دسته با عنوان گروه ۴ در شکل‌های ۳ و ۴ نام‌گذاری شده است.

مونوفیلتیک یادشده، ده جدایه از کشور هند (جداشده از نخود، گلاپول، باقلا و سویا)، یک جدایه تایوانی (Eustoma)، سه جدایه ژاپنی و یک جدایه آمریکایی



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک ۵۸ جدایه BYMV همراه با گروه‌های ادغام‌شده؛ درخت بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه HC-Pro با نرم‌افزار IQtree رسم شده و CYVV برای ریشه به کار رفته است. جدایه‌های ایرانی با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک ۵۸ جدایه BYMV همراه با گروه‌های ادغام‌شده درخت بر اساس توالی آمینواسید ناحیه HC-Pro با نرم‌افزار IQtree رسم شده و CYVV برای ریشه به کار رفته است. جدایه‌های ایرانی با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

نتیجه‌گیری

دارای کاربرد روزافزون است و یکی از مناسب‌ترین داده‌ها برای این پژوهش‌ها، به‌کاربردن توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی است. معمولاً توالی‌های

تحلیل مقایسه‌ای توالی‌ها در سیستماتیک و زیست‌شناسی به‌منظور درک بهتر مسیرهای تکاملی

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان در قالب رساله دکتری و بخشی از آن در قالب فرصت مطالعاتی در دانشگاه بولونیا (UNIBO) در کشور ایتالیا انجام شده است.

References

- (1) Kyrychenko AM., Antipov IO., Hrynychuk KV. Phylogenetic analysis of Ukrainian BYMV isolates from soybeans and beans. *Cytology and Genetics* 2017; 51(3): 173-178.
- (2) Luo H., Wylie SJ., Coutts B., Jones RA., Jones MG. A virus of an isolated indigenous flora spreads naturally to an introduced crop species. *Annals of Applied Biology* 2011; 159(3): 339-347.
- (3) Bos L. Bean yellow mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses* 1970; 40: 8.
- (4) Kaiser WJ., Mueller KE., Danesh D. An outbreak of broad bean disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 1968; 4: 1.
- (5) Davoodi Z., Hosseini S., Hosseini A. Occurrence and detection of bean yellow mosaic virus in faba bean fields of Kerman province. *Agricultural Biotechnology* 2014; 5: 73-75.
- (6) Baradar A., Hosseini A., Hosseini S., Abdani Babaki S. The first report of the bean yellow mosaic virus incidence in broad bean fields of Hormozgan province. *Proceedings of the 23rd Iranian Plant Protection Congress, Gorgan University, Gorgan, Iran* 2018; 656-657.
- (7) Rabiee S., Hosseini S., Hosseini A. Occurrence and distribution of some sunflower viruses from sunflower fields in Kerman and Isfahan provinces, Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2015; 48(3): 223-228.

نوکلئوتیدی اطلاعات بسیار ارزشمندی را برای مقایسه گونه‌های نزدیک به هم یا جدایه‌های یک گونه ویروسی در خود جای داده‌اند (۳۹). در پژوهش حاضر به بررسی مولکولی و فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک زرد لوبیا و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی پرداخته شد. بر اساس نتایج، توالی جدایه‌های ایرانی BYMV جدا شده از باقلا سطوح متفاوتی از تنوع را در سطح ژن HC-Pro نشان می‌دهند. در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی، ۸ جدایه ایرانی BYMV بررسی شده در پژوهش حاضر در دو خوشه‌بندی مجزا قرار گرفتند؛ به طوری که گروه اول شامل جدایه‌های ایرانی جمع‌آوری شده از فارس، تبریز، قزوین، جیرفت و زنجان و گروه دوم شامل جدایه‌های جمع‌آوری شده از اردبیل، همدان و خوزستان بودند. ترتیب جدایه‌ها و گروه‌بندی مشاهده شده در درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی HC-Pro، تفاوت‌هایی با درخت رسم شده بر اساس ژن CP در مطالعه‌های گذشته (۳۸) دارد؛ این تفاوت‌ها نشان می‌دهند تاریخچه تکاملی این دو ژن در طول زمان متفاوت است. نتایج پژوهش حاضر، ایجاد نشدن نوترکیبی در ساختار ژن HC-Pro در جدایه‌های ایرانی بررسی شده را نشان می‌دهند. درک تغییرات ژنتیکی و نوترکیبی جمعیت ویروسی پیش‌نیاز مهمی برای تشخیص کارآمد، مدیریت مؤثر و کنترل بیماری در درازمدت است (۴۰). قطعاً نتایج پژوهش حاضر در توسعه راهبردهایی تأثیر دارند که به مقاومت در برابر BYMV منتج می‌شوند و چنانچه این بیماری در آینده همه‌گیر شود، می‌توانند در راستای اتخاذ راهبردهای مدیریتی اثربخش باشند.

- (8) Dorrigiv R., Mehrvar M., Jafarpour B., Zakiaghl M. New host records for *Bean yellow mosaic virus* in Iran. 21st Iranian Plant Protection Congress, Urmia University, Urmia, Iran 2014; 387.
- (9) Sharifi Nezamabad P., Koochi Habibi M., Dizadji A., Kalantari S., Ranjbar Aghdam M. Biological characteristics and phylogenetic Iranian isolates of gladiolus Bean yellow mosaic virus. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 2014; 45(1): 13-27.
- (10) Al-Saleh MA., Al-Shahwan IM., Amer MA., Abdalla OA. Etiology of a mosaic disease of radish and lettuce and sequencing of the coat protein gene of the causal agent in Saudi Arabia. *International Journal of Virology* 2009; 5: 131-142.
- (11) Waltermann A., Maiss E. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in *plum pox virus*-infected *nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 2006; 87(8): 2381-2386.
- (12) Chung BY., Miller WA., Atkins JF., Firth AE. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(15): 5897-5902.
- (13) Rajamäki ML., Mäki-Valkama T., Mäkinen K., Valkonen JP. 3 Infection with *Potyvirus*s. In *Annual Plant Reviews, Plant- Pathogen Interactions* 2004; 11: 68-91.
- (14) Ha C., Coombs S., Reville PA., Harding RM., Vu M., Dale JL. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of *Potyvirus*s. *Archives of Virology* 2008; 153(1): 25-36.
- (15) Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron P. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(26): 23753-61.
- (16) Maia IG., Haenni AL., Bernardi F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* 1996; 77(7): 1335-41.
- (17) Urcuqui-Inchima, S. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 2001; 74: 157-175.
- (18) Clark MF., Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 1977; 34(3): 475-83.
- (19) Nakazono-Nagaoka E., Sato C., Kosaka Y., Natsuaki T. Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of *Bean yellow mosaic virus* by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology* 2004; 70(6): 359-62.
- (20) Katoh K., Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30(4): 772-780.
- (21) Maddison WP., Maddison DR. Mesquite, a modular system for evolutionary analysis, Version 2.75. Retrieved from <http://mesquiteproject.org/> On: 03 December 2011.
- (22) Crooks GE., Hon G., Chandonia JM., Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004; 14(6): 1188-1190.
- (23) Martin DP., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1(1): 1-5.
- (24) Nguyen LT., Schmidt HA., Von Haeseler A., Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2014; 32(1): 268-274.
- (25) Guo B., Lin J., Ye K. Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of *Potyvirus* helper-component proteinase.

- Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(24): 21937-21943.
- (26) Hasiów-Jaroszewska B., Fares MA., Elena SF. Molecular evolution of viral multifunctional proteins: The case of *Potyvirus* HC-Pro. *Journal of Molecular Evolution* 2014; 78(1): 75-86.
- (27) Dolja VV., Herndon KL., Pirone TP., Carrington JC. Spontaneous mutagenesis of a plant *potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *Journal of Virology* 1993; 67(10): 5968-5975.
- (28) Flasinski S., Cassidy BG. *Potyvirus* aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Archives of Virology* 1998; 143(11): 2159-2172.
- (29) Peng Y., Kadoury D., Gal-On A., Huet H., Wang Y., Raccach B. Mutations in the HC-Pro gene of *zucchini yellow mosaic potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* 1998; 79(4): 897-904.
- (30) Shibolet YM., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitham SA., Gal-On A. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 2007; 81(23): 13135-13148.
- (31) Torres-Barceló C., Martín S., Daròs JA., Elena SF. From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the *Tobacco etch potyvirus* HC-Pro. *Genetics* 2008; 180(2): 1039-1049.
- (32) Carrington JC., Herndon KL. Characterization of the potyviral HC-Pro autoproteolytic cleavage site. *Virology* 1992; 187(1): 308-315.
- (33) Cronin S., Verchot J., Haldeman-Cahill R., Schaad MC., Carrington JC. Long-distance movement factor: a transport function of the *potyvirus* helper component proteinase. *The Plant Cell* 1995; 7(5): 549-559.
- (34) Gutiérrez P., Mesa HJ., Marín MM. Genome sequence of a divergent Colombian isolate of *Potato virus V* (PVV) infecting *Solanum phureja*. *Acta virologica* 2016; 60(1): 49-54.
- (35) Zhu F., Sun Y., Wang Y., Pan H., Wang F., Zhang X., Zhang Y., Liu J. Molecular characterization of the complete genome of three basal-BR isolates of *Turnip mosaic virus* infecting *Raphanus sativus* in China. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(6): 888.
- (36) Gibbs AJ., Ohshima K., Yasaka R., Mohammadi M., Gibbs MJ., Jones RA. The phylogenetics of the global population of *Potato virus Y* and its necrogenic recombinants. *Virus Evolution* 2017; 3(1): vex002.
- (37) Kehoe MA., Coutts BA., Buirchell BJ., Jones RA. Plant virology and next generation sequencing: experiences with a *Potyvirus*. *PLoS One* 2014; 9(8): e104580.
- (38) Wylie SJ., Coutts BA., Jones MG., Jones RA. Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: relationship between the seven groups found and their hosts and origins. *Plant Disease* 2008; 92(12): 1596-1603.
- (39) Yang Z., Rannala B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics* 2012; 13(5): 303.
- (40) Balasubramanian V., Sukanya RS., Anuradha C., Selvarajan R. Population structure of *Banana bract mosaic virus* reveals recombination and negative selection in the helper component protease (HC-Pro) gene. *Virus Disease* 2014; 25(4): 460-466.
-
- ^۱- Bean yellow mosaic virus
^۲- Kaiser
^۳- Open reading frame
^۴- *Pretty interesting Potyvirus ORF*
^۵- DAS-ELISA

۶- Clark

۷- Adams

۸- ELISA reader

۹- M: هیچ کدام از بازها (شکاف)

۱۰- Y: سیتوزین یا اوراسیل

۱۱- Protein families database

۱۲- Weblogo

۱۳- Flasinski

۱۴- Minor parent: توالی که سهم کمتری در ساخت توالی

نوترکیب دارد.

۱۵- Major parent: توالی که سهم بیشتری در ساخت توالی

نوترکیب دارد.

۱۶- Kehoe

۱۷- Wylie