

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*) در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد

مریم کارگر^۱، محمد زکی عقل^{۲*}، محمود معصومی^۳، محسن مهرور^۲ و کرامت‌اله ایزدپناه^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۶)

چکیده

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) متعلق به جنس *Nepovirus* از خانواده *Secoviridae* است. این ویروس عامل یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی مو در سراسر دنیا است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی GFLV در تاکستان‌های استان فارس و کهگیلویه و بویراحمد از درختان مو و علفهای هرز موجود در تاکستان‌ها نمونه برداری شد. با استفاده از آنتی‌بادی جدایه ایرانی ویروس، در آزمون الیزا علاوه بر تاک در گیاهان مرغ، علف هفت بند، قیاق و تمشک نیز GFLV ردیابی شد. از مایه زنی مکانیکی ویروس از میزبانهای مختلف در برگ‌های جدید سلمه تره (*Chenopodium quinoa*) لکه‌های کلروتیک و رگبرگ روشنی تولید شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس به طور کامل تکثیر و به روش RT-PCR-RFLP تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بررسی شد. هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با اندونوکلاز TaqI جدایه‌های GFLV از منطقه مورد آزمایش را در ۱۱ گروه ژنوتیپی قرار داد. نتایج آنالیزهای فیلوژنی براساس ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های ایرانی GFLV در شاخه‌ای مجزا از جدایه‌های سایر نقاط دنیا قرار دارند. جدایه‌های تعیین ترادف شده در این تحقیق به همراه جدایه‌های شرق کشور در گروهی مجزا از جدایه‌های غرب کشور قرار گرفتند که نشان دهنده اثر جدایی جغرافیایی در تکامل GFLV است.

کلیدواژه: تنوع ژنتیکی، ویروس برگ بادبزنی مو، RFLP، فارس، کهگیلویه و بویراحمد

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zakiagh@ferdowsi.um.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استادیار مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۴. استاد مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Analysis of genetic diversity of *Grapevine fanleaf virus* isolate from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces

M. Kargar¹, M. Zakiaghl², M. Masoumi³, M. Mehrvar², and K. Izadpanah⁴

(Received: 6.1.2016; Accepted: 16.7.2016)

Abstract

Grapevine fanleaf virus belongs to the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae*. It causes an important disease of grapevine worldwide. To determine the genetic diversity of GFLV in Southern Iran, samples of grapevine and weeds were collected from vineyards in Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. ELISA using specific antibody of GFLV showed that grapevine, bermudagrass, knotweed, Johnson grass and raspberry plants are natural reservoir hosts of GFLV. In mechanical inoculation of different isolates of GFLV to *Chenopodium quinoa*, mosaic, leaf malformation and sharpening of leaf edges were developed in inoculated plants. Complete length of GFLV coat protein gene amplified in RT-PCR using specific primers was subjected to RFLP analysis using *TaqI* endonuclease. It was shown that GFLV isolates belong to 11 haplotypes. Phylogentic analysis based on the nucleotide sequence of the coat protein gene showed that Iranian isolates of GFLV have distinct position in phylogentic tree. Moreover, evidence of divergent evolution was observed between isolates from northwest, northeast and south of Iran. It confirms that genetic makeup of GFLV may be affected by geographical isolation.

Keywords: Genetic diversity, *grapevine fanleaf virus*, RFLP, Fars, Kohgiluyeh-Boyer Ahmad

* Corresponding author's E-mail: zakiaghl@ferdowsi.um.ac.ir

1. Former M.Sc. student of plant pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University, Iran
2. Assist. Professors. Plant Pathology, Collage of Agriculture, Ferdowsi University, Iran
3. Assist. Professor. Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Iran
4. Professor. Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Iran

مقدمه

مقاومت به شرایط محیطی میشود (Vuittenz 1970).

بیماری برگ بادبزنی مو از ناحیه پارس قدیم و به احتمال زیاد ایران منشاء گرفته و به وسیله مواد گیاهی آلوده در سراسر دنیا پخش شده است (Zaki-Aghl and Izadpanah 2003). ویروس برگ باد بزنی مو در طبیعت توسط نماتود *Xiphinema index* منتقل میشود (Esmenjaud and Adab 1994). البته امکان گسترش آلودگی به وسیله قلمه، پیوندک و نهال آلوده به ویروس نیز امکان پذیر می‌باشد (Harrison and Murrant 1977, Hewitt et al. 1958).

مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۴ جدایه GFLV از کالیفرنیا به روش IC-RT-PCR-RFLP مشخص کرد که جمعیت‌های GFLV به فرم شبه گونه (Quasispecies) هستند و تنوع در ژن پروتئین پوششی در دو سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بترتیب ۱۳ و ۹ درصد است (Naraghi-Arani et al. 2001). Vigne و همکاران در سال ۲۰۰۴، ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ۳۴۷ جدایه GFLV از درختان انگور طبیعی و تراریخت را با استفاده از روش IC-RT-PCR-RFLP و آنالیز توالی ژن پروتئین پوششی مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که ساختار جمعیت ۵۵ درصد از جدایه‌ها شامل یک هاپلوتیپ غالب می‌باشد (Vigne et al. 2004). با بررسی تنوع ژنتیکی ویروس برگ بادبزنی مو براساس ژن پروتئین پوششی در ایران مشخص شد که توالی پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی GFLV با سایر جدایه‌های گزارش شده از این ویروس متفاوت است. همچنین ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های ایرانی نیز با جدایه‌های موجود در بانک ژن تنها دارای ۸۱-۸۷ درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدی است. بنابراین در آنالیز فیلوژنی براساس ژن پروتئین پوششی یا پروتئین حرکتی، جدایه‌های ایرانی GFLV در شاخه‌ای مجزا قرار

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی مو می‌باشد (Martelli 1993). این بیماری گسترش جهانی دارد و تقریباً در تمام مناطق معتدل جهان که در آن *Vitis vinifera* یا پایه‌های مادری آن کشت می‌شود، وجود دارد و خسارت حاصل از این ویروس تا کاهش عملکرد ۸۰ درصدی نیز گزارش شده است (Martelli 1993, Ritzenthaler et al. 1991).

ویروس برگ بادبزنی مو در جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* از راسته *Picornavirales* قرار دارد. این خانواده دارای دو زیر خانواده *Comovirinae* و *Sequivirinae* است که نپوویروس‌ها در زیر خانواده *Comovirinae* قرار می‌گیرند (King et al. 2012). پیکره‌های GFLV جور ترا (Isometric) به قطر حدود ۲۸ نانومتر می‌باشد. ژنوم ویروس شامل دو قطعه آر ان ای تک لا با قطبیت مثبت است که در انتهای ۵' دارای پروتئین متصل به ژنوم (Viral protein genome linked, VPg) و در انتهای ۳'، دارای دنباله آدنوزین (Poly A) هستند.

علائم بیماری شامل بدشکلی برگ‌ها، باز شدن سینوس دمبرگ، مجتمع شدن رگبرگ‌های اصلی، تولید جوانه‌های دوگانه، کوتاه شدن میانگره‌ها، انشعابات غیر عادی در شاخه‌ها، ریزش حبه در خوشه‌ها و عدم یکنواختی در اندازه حبه‌ها می‌باشد (Zaki-Aghl and Izadpanah 2003). تنوع علائم GFLV به علت وجود سویه‌های مختلف ویروس شامل برگ بادبزنی، موزائیک زرد و رگبرگ نواری می‌باشد (Vuittenz 1970). ویروس برگ باد بزنی مو موجب زوال و مرگ درختچه‌های مو، کاهش دوره ثمردهی، کاهش قدرت جوانه‌زنی قلمه‌ها و کاهش

تعیین آلودگی نمونه‌ها به GFLV

جهت شناسایی اولیه و ردیابی GFLV در نمونه‌ها، از آزمون الایزای غیر مستقیم و آنتی سرم تهیه شده بر علیه جدایه ی ایرانی ویروس (Zaki-Hampton et al. 1990) استفاده شد. مقاداری از برگهای جوان در ۵ حجم بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته ۷/۲ حاوی ۲ درصد پلی وینیل پیرولیدون (PVP-40) عصاره گیری شدند. پس از انجام مراحل الایزا، میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزای خوان (ELISA Reader; StatFax 2100, Awareness Technology Inc.) اندازه گیری و ثبت گردید.

نمونه‌هایی که میزان جذب آنها از آستانه محاسبه شده بر اساس فرمول $1/1(\bar{X} + 3SD)$ (\bar{X} میانگین جذب سالم) بیشتر بود، به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

مایه‌زنی مکانیکی

از بین نمونه‌هایی که در آزمون الیزا آلوده ارزیابی شده بودند، تعداد دوازده جدایه انتخاب و به روش مکانیکی بر روی گیاه سلمک (*Chenopodium quinoa*) در مرحله چهار برگگی مایه‌زنی شدند. بافر عصاره گیری شامل بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ حاوی ۲ درصد پلی وینیل پیرولیدون (PVP-40) بود. عصاره گیری با افزودن ۵ برابر حجم بافر و مایه‌زنی به کمک پودر کاربوراندوم انجام شد. در تیمار شاهد برگ‌های سلمک با بافر عصاره گیری و پودر کاربوراندوم مایه‌زنی شدند.

استخراج نوکلئیک اسید

استخراج آرآن ۱ از برگ‌های جوان مو با استفاده از (Cetyl-trimethylammonium bromide) CTAB انجام شد.

می‌گیرند (Sokhandan Bashir, Pourrahim et al. 2007, Sokhandan Bashir et al. 2011, et al. 2012, Sokhandan bashir and Hajizadeh 2007). با توجه به سطح زیر کشت وسیع مو در کشور و توجه به این نکته که احتمالاً منشأ این ویروس ایران است و همچنین تنوع زیاد و مسیر تکاملی مجزای جدایه‌های ایرانی (Sokhandan Bashir et al. 2007, Pourrahim et al. 2007, Sokhandan Bashir et al. 2011, Sokhandan Bashir et al. 2012, al. 2012, bashir and Hajizadeh 2007) و از طرفی فقدان اطلاع از ژنوتیپ‌های ویروس برگ باد بزنی مو در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویر احمد، تحقیق کنونی برای شناسایی و تعیین پراکنش و تعیین تنوع ژنتیکی این ویروس با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از تاکستان‌ها

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی GFLV در استان‌های فارس و کهگیلویه- بویر احمد، در مهر ماه و اردیبهشت ماه سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از تاکستان‌های آبی استان فارس (شیراز، بوانات، سعادتشهر، اقلید، کوار) و استان کهگیلویه و بویراحمد (سی سخت) بازدید و نمونه‌برداری بصورت تصادفی انجام شد. همچنین جهت بررسی دامنه میزبانی طبیعی GFLV از علف‌های هرز موجود در تاکستان‌ها نیز نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات ظاهری به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد و در طولانی مدت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و یا به صورت خشک نگه داری شدند.

جدول ۱. ترادف آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر ژن پروتئین پوششی GFLV

Table 1. Sequence of specific primers used for amplification of GFLV coat protein

Primers پرایمر	Sequence (5' to 3') توالی (5'-3')	Nucleotide position in RNA2 موقعیت در RNA2
MpF	AGAAGTCGCTCACGATCTGTGAGG	1961-1984
CpR	ACGGATCCACAAACAACACACTGTCGCC	3685-3712
DetF	CGGCAGACTGGCAAGCTGT	437-456
DetR	GGTCCAGTTTAATTGCCATCCA	1438-1460

مبنای ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو استفاده شد (جدول ۱). جفت آغازگر DetF/R بر مبنای کلیه ترادفهای ویروس برگ بادبزنی موجود در بانک ژن طراحی شده و قادر به شناسایی تمامی ژنوتیپهای GFLV است در حالیکه جفت آغازگر MpF/CpR بطور اختصاصی برای همانند سازی طول کامل ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس طراحی شده است.

در واکنش ترانویسی معکوس ۳ میکرولیتر از آر ان ای استخراج شده با ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس و ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد، سپس لوله‌ها برای ۱ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. به هر لوله ۴ میکرولیتر بافر واکنش، ۲ میکرولیتر از مخلوط ۲۵ میلی مولار نوکلئوتیدها و ۱ میکرولیتر آنزیم RT (۵U/μL) اضافه شده و لوله‌ها برای یک ساعت در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و با قرار دادن لوله‌ها در ۹۵ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه واکنش متوقف شد.

از مخلوط آماده Red Ampliqon PCR mix (Denmark) برای همانندسازی ژن کد کننده پروتئین پوششی GFLV استفاده شد. به این منظور ۳ میکرولیتر از cDNA با دو میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. پروفایل دمایی لازم برای تکثیر ژن

۲۰ میلی گرم از بافت آلوده، خرد شده و به آن ۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول، ۰/۰۵ گرم PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) و ۷۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (۱۰ میلی مولار از تریس-اسید کلریدریک با اسیدیته ۸، ۱۰ میلی مولار از EDTA، ۲۰۰ میلی مولار از گوانیدین تیو سیانات، ۲ درصد CTAB، یک درصد PVP و ۱/۵ مولار نمک طعام) اضافه شده و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس همگنه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و ۵۰۰ میکرولیتر از روشین به لوله جدید منتقل و یک حجم بافر استخراج گرم و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شده و بعد از همگن سازی دوباره به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس روشین به لوله جدید منتقل و ۰/۱ حجم استات آمونیوم ۷ مولار و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و بعد از آن با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با یک میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شده و در ۷۰ میکرو لیتر آب مقطر سترون حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانویسی معکوس (RT-PCR)

برای شناسایی GFLV از آغازگرهای طراحی شده بر

جدول ۲. برنامه PCR برای تکثیر طول کامل ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو.

Table 2. PCR parameter used for amplification of full length of GFLV coat protein

Step مرحله	No. cycle تعداد سیکل	Temp. (°C) دما	Time زمان
Initial Denaturation	1	94	3 min.
Denaturation		94	30 sec.
Annealing	35	56	45 sec.
Extension		72	60 sec
Final extension	1	72	10 min.

استفاده از کیت (QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل خالص سازی شدند. همسانه سازی ژن با استفاده از کیت Ins/TA Clone PCR Cloning Kit™, (Fermentas) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. خوانش توالی نوکلئوتیدی با استفاده از آغازگرهای عمومی pUC-m13 در هر دو رشته توسط کمپانی ماکروژن (کره جنوبی) صورت گرفت.

نتایج

شناسایی GFLV در تاکستانها

از میان ۵۰۴ نمونه برگ مو و ۱۸۰ نمونه از علفهای هرز (مرغ، قیاق، علف هفت بند و تمشک) از تاکستان های آبی استان فارس و کهگیلویه و بویر احمد که با آزمون الیزا بررسی شدند، ۲۶۶ نمونه مو (۵۲/۷۷ درصد از نمونهها) و ۸۶ نمونه از علفهای هرز (۴۷/۷۷ درصد از نمونهها) آلوده به GFLV شناخته شدند (جدول ۳). ویروس برگ باد بزنی مو در تمام مناطق بررسی شده ردیابی شد. میزان آلودگی در مناطق مختلف، متفاوت بود. شهرستانهای بوانات، سی سخت و شیراز به ترتیب با ۷۱، ۶۵ و ۴۱ درصد آلودگی جزء آلودهترین مناطق نمونه برداری شده بودند. کمترین میزان آلودگی در شهرستان سعادتشهر با ۱۷ درصد آلودگی در نمونهها

کد کننده پروتئین پوششی GFLV در جدول ۲ ذکر شده است.

محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز شده و به وسیله دستگاه Gel documentation (Syngene- UK) عکسبرداری شد. تخمین طول قطعات تکثیر شده به کمک نشانگر مولکولی انجام شد.

بررسی چندشکلی حاصل از هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های GFLV براساس پراکندگی جغرافیایی آنها انتخاب شدند. طول کامل ژن پروتئین پوششی ویروس تکثیر شده و هضم آنزیمی^۱ آن بوسیله اندونوکلاز (Vivantis- TaqI) در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد مطابق دستورالعمل سازنده آنزیم انجام شد. برای مشاهده الگوی حاصل، از الکتروفورز در ژل آگاروز دو درصد استفاده شد و گروه بندی اولیه جدایه ها انجام و از هر گروه یک نمونه تعیین توالی شد.

همسانه سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

قطعات تکثیر شده در PCR قبل از همسانه سازی با

¹ Restriction enzyme digestion

جدول ۳. فراوانی GFLV در مو و میزبانهای غیر مو در مناطق مختلف استانهای فارس و کهگیلویه و بویر احمد

Table 3. Prevalence of GFLV in Vitis and non-Vitis hosts in different regions of Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces

City	Plant	No. samples	No. infected samples	%infected
شهرستان	گیاه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده	% نمونه آلوده
Shiraz	Grapevine	143	64	44.75
	Bermudagrass	33	19	57.57
	Johnsongrass	26	12	46.15
	Knotweed	16	5	31.25
	Raspberry	9	4	44.44
Bavanat	Grapevine	136	97	71.32
	Bermudagrass	14	10	71.42
	Johnsongrass	13	8	61.53
	Knotweed	8	2	25
Saadat-shahr	Grapevine	47	8	17.02
	Bermudagrass	5	0	0
	Knotweed	6	0	0
Kavar	Grapevine	17	5	29.41
	Bermudagrass	8	3	37.5
Eghlid	Grapevine	38	11	28.94
Sisakht	Grapevine	123	81	65.85
	Bermudagrass	19	10	52.63
	Knotweed	10	3	30
	Johnsongrass	6	4	66.66
	Raspberry	7	6	85.71
Total		684	352	

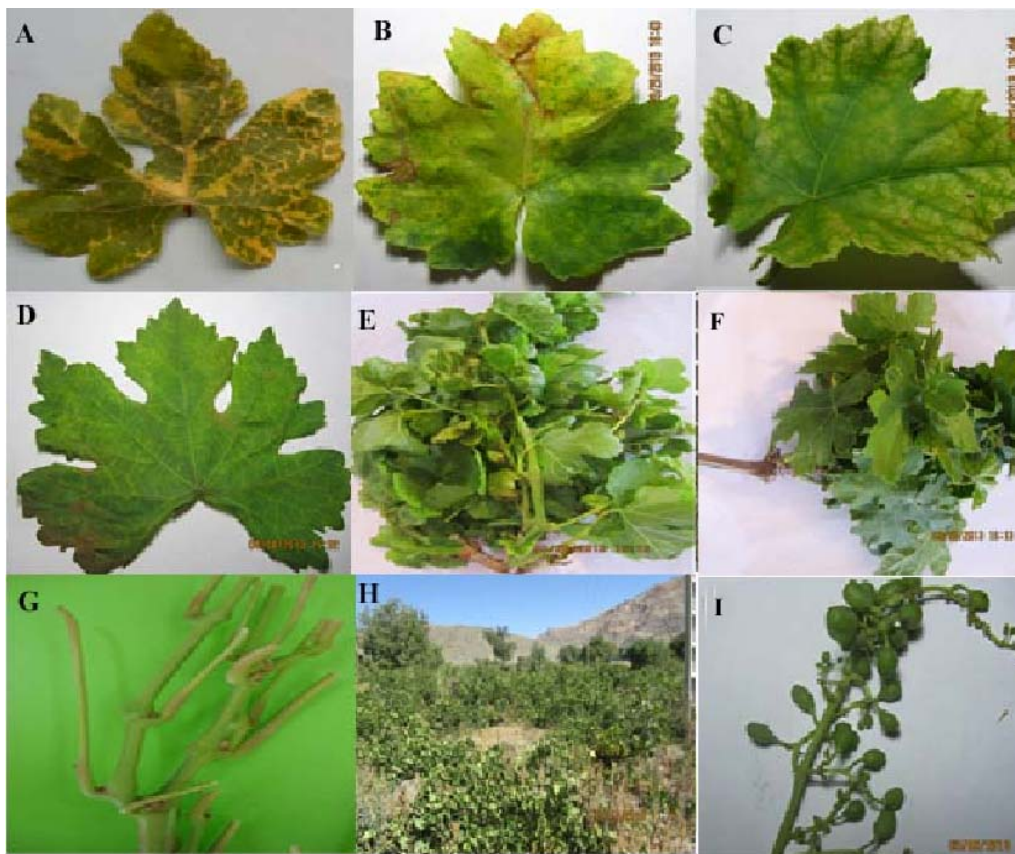
مشاهده شد.

خلاف علائم برگ، علائم شاخسارها در تعداد بیشتری از تاک‌ها قابل مشاهده بود. در تاک‌های آلوده به GFLV خوشه‌ها تنک‌تر و تعداد آن‌ها کمتر از گیاهان سالم بود. در هنگام بلوغ نیز حبه‌ها دارای اندازه یکسانی نبودند (شکل ۱).

در تعدادی از نمونه‌ها اگر چه علائمی از قبیل بدشکلی برگ‌ها، موزائیک، کوتاهی میانگره‌ها، زیگزگ شدن شاخه‌ها و دوقلو شدن جوانه‌ها مشاهده شد لیکن در آزمون الیزا آلودگی آنها محرز نشد، هر چند در تعدادی از این نمونه‌ها آلودگی به GFLV بوسیله RT-PCR تایید شد. این موضوع ممکن است در اثر خصوصیات سرولوژیکی متفاوت در جدایه‌های ویروس برگ بادبزی مو و یا کاهش غلظت ویروس در اثر شرایط محیطی نامناسب باشد یا اینکه ناشی از آلودگی به ویروس دیگری باشد. چنین

در بررسی دامنه میزبانی طبیعی، آلودگی به GFLV در گیاهان مرغ (*Cynodon dactylon* L Pers)، قیاق (*L Pers*)، علف هفت بند (*Sorghum halepense* L)، و تمشک (*Rubus caesius* L) ردیابی شد (جدول ۳).

تاک‌های آلوده دارای علائم برگ‌گی شامل باز شدن سینوس قاعده برگ، رگ نواری سبز، زردی یا سبزدی در اطراف رگبرگ اصلی، عدم تقارن پهنک و بدشکلی برگ و موزائیک مشاهده شد. علائم رگ نواری بیشتر در برگ‌های پایینی و مسن گیاه قابل مشاهده بود. کوتولگی و زوال تاک‌های آلوده، زیگزگ شدن میانگره‌ها و کپه‌ای شدن ساقه‌ها، کم شدن فاصله میانگره‌ها و ایجاد جوانه‌های دو قلو در شاخه تاک‌های آلوده به GFLV مشاهده گردید. بر



شکل ۱. علائم GFLV در برگها، شاخه و میوه تاکهای آلوده. (A) رگ نواری، (B) موزاییک، (C) بدشکلی برگ، (D) باز شدن سینوس انتهایی دمبرگ، (E، F) کوتولگی و کپه ای شدن ساقه‌ها، (I) تنک شدن خوشه‌ها و رشد ناهمگون جبهه‌ها، (G) کم شدن فاصله میانگره‌ها و ایجاد جوانه‌های دو قلو، (H) زوال تاک‌های آلوده

Fig. 1. Symptoms of GFLV in leaves, shoot and fruits of infected grapevine. (A) vein banding, (B) mosaic, (C) leaf malformation, (D) open petiolar sinus, (E, F) Stunting and bushy growth of shoot, (I) poor fruit set with abnormal berries, (G) shortening of internodes and double nodes in infected shoot, (H) decline.

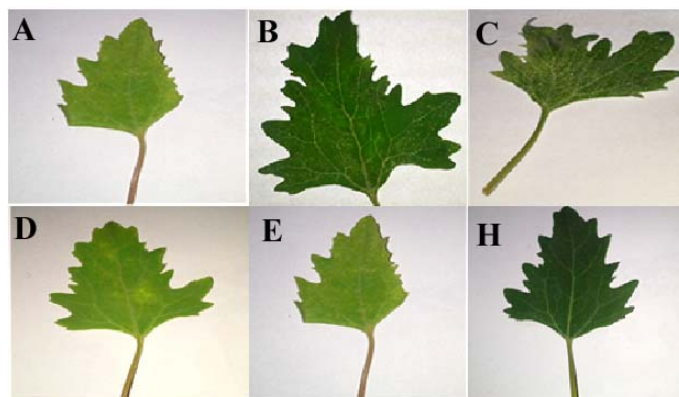
عصاره مایه زنی شده متفاوت بود و در گیاهانی که با عصاره‌های مرغ و انگور مایه زنی شده بودند شدت و تنوع علائم نسبت به سایر جدایه‌ها بیشتر بود. در آزمون RT-PCR نیز آلودگی گیاهان سلمه تره به GFLV تایید شد (شکل ۳).

آنالیز محصول PCR

در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز با ترانویسی معکوس و با استفاده از آغازگرهای DetF/DetR قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز از ژن پروتئین پوششی

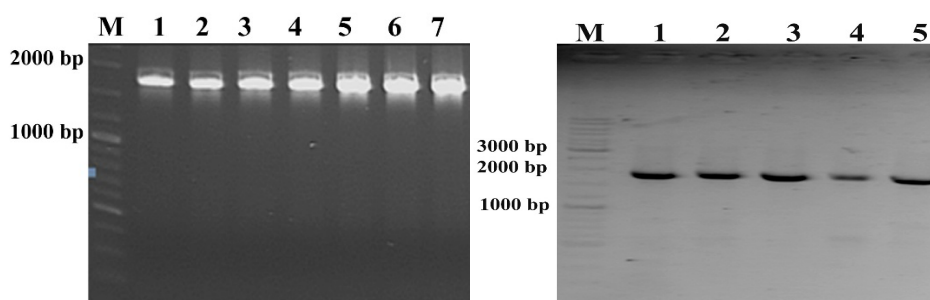
مشاهداتی نشان می‌دهد که صرفاً اتکا به علائم ظاهری برای اطمینان از سلامت قلمه‌ها و گیاهان کافی نیست و ضرورتاً باید از تکنیک‌های تشخیصی با دقت بالا همچون RT-PCR برای تأیید سلامت گیاهان تکثیری بهره گرفته شود.

جدایه‌های GFLV از تاک، مرغ، قیاق، تمشک و علف هفت بند که بروی سلمه تره مایه زنی شدند، ۱۴ روز بعد از مایه زنی علائمی از قبیل رگبرگ روشنی، بدشکلی برگ، موزاییک و تیز شدن زوایای برگ را در گیاهان سلمه تره ایجاد کردند (شکل ۲). نوع و شدت علائم با توجه به منبع



شکل ۲. علائم GFLV از میزبانهای مختلف در برگ‌های سلمه تره مایه زنی شده. (A) بدشکلی برگ و موزائیک در سلمه تره مایه زنی شده با عصاره تاک، (B) رگبرگ روشنی و تیز شدن زوایای اطراف برگ در سلمه تره مایه زنی شده با عصاره مرغ، (C) بدشکلی برگ، موزائیک در سلمه تره مایه زنی شده با عصاره تمشک، (D) تیز شدن زوایای اطراف برگ و موزائیک در سلمه تره مایه زنی شده با عصاره هفت بند، (E) بدشکلی برگ و موزائیک در سلمه تره مایه زنی شده با عصاره قیاق، (H) سلمه تره سالم

Fig. 2. Symptoms of GFLV from different hosts in inoculated *Chenopodium quinoa*. (A) mosaic and leaf malformation induced by grapevine isolate, (B) vein clearing and leaf edge sharpening induced by bermudagrass isolate, (C) mosaic and severe leaf malformation induced by raspberry isolate, (D) mosaic and leaf edge sharpening induced by knotweed isolate, (E) mosaic and leaf malformation induced by johnsongrass isolate, (H) healthy *Ch. quinoa*.



شکل ۳. نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای MpF/CpR از میزبانهای مختلف و گیاهان سلمه تره مایه زنی شده با عصاره گیاهان آلوده به GFLV. سمت چپ: راهک ۱ و ۲: تاک، راهک ۳ و ۴: مرغ، راهک ۵: قیاق، راهک ۶: علف هفت بند، راهک ۷: تمشک، سمت راست: ۱: سلمه تره مایه زنی شده با عصاره تاک، ۲: سلمه تره مایه زنی شده با عصاره مرغ، ۳: سلمه تره مایه زنی شده با عصاره تمشک، ۴: سلمه تره مایه زنی شده با عصاره هفت بند، ۵: سلمه تره مایه زنی شده با عصاره قیاق، (M: Gene ruler DNA ladder mix (Fermentas)

Fig. 3. Results of RT-PCR using GFLV MpF/CpR specific primers from various hosts and *Chenopodium quinoa* plants inoculated with different infected hosts of GFLV. Left: Lanes 1&2: grapevine, 3&4: Bermudagrass, 5: Johnsongrass, 6: Knotweed, 7: Raspberry; Right: Lanes 1: Grapevine isolate, 2: Bermudagrass isolate, 3: Raspberry isolate, 4: Knotweed isolate, 5: Johnsongrass isolate; M: Gene ruler DNA ladder mix (Fermentas).

به منظور تکثیر طول کامل ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو، از نمونه‌های مو و علف‌های هرز که با جفت آغازگرهای DetR/DetF آلودگی آنها تایید شده بود،

ویروس برگ بادبزنی مو از نمونه‌های تاک و علف‌های هرز تکثیر شد درحالی‌که از گیاه سالم قطعه‌ای همانند سازی نشد (شکل ۴).

جدول ۴: مشخصات جدایه های GFLV مورد استفاده در هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی

Table 4. Characteristics of GFLV isolates used in RFLP analysis of the coat protein gene

No.	Host	Location
شماره	میزبان	محل جمع آوری
1	grapevine (Z36)	Shiraz
2	bermudagrass (L3)	Shiraz
3	grapevine (V46)	Bavanat
4	raspberry (T4)	Sisakht
5	grapevine (V17)	Bavanat
6	grapevine (V20)	Bavanat
7	grapevine (V39)	Bavanat
8	grapevine (R18)	Sisakht
9	grapevine (Z14)	Shiraz
10	bermudagrass (L1)	Shiraz
11	bermudagrass (M4)	Bavanat

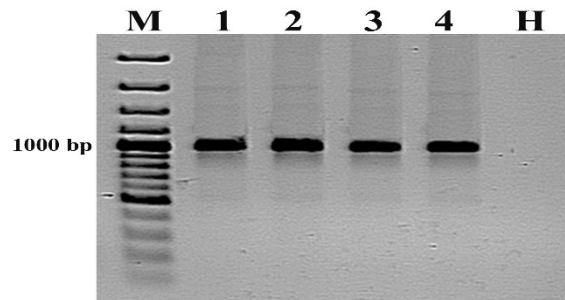
جدول ۵: گروه بندی جدایه های GFLV بر اساس قطعات حاصل

از هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی بوسیله اندونوکلاز TaqI

Table 5. Clustering of GFLV isolates based on RFLP fragments of the coat protein gene digested by TaqI endonuclease

group	No. fragment	Fragment size	Isolate
گروه	تعداد قطعات	اندازه قطعات	جدایه ها
G1	4	1083-284-275-229	1
G2	3	1030-259-230	2
G3	3	1156-390-275-284	3
G2	3	1156-390-280	4
G3	3	1150-510-289	5a
G3	3	1150-510-250	5b
G4	3	1110-540-250	6a
G5	3	990-290-260	6b
G7	4	1160-290-260-150	7
G8	1	1628	8a
G9	2	1430-250	8b
G4	3	1130-580-210	8c
G10	3	1200-330-300	9a
G10	3	1200-330-270	9b
G11	3	1250-300-270	10
G11	3	1270-300-260	11

غلظت کمتر مشاهده شد (شکل ۵ خطوط ۵، ۶، ۸ و ۹). در حالیکه در نمونه هایی که مجموع قطعات حدود ۱۷۰۰ جفت باز بود غلظت باندهای مشاهده شده بر روی ژل تقریباً یکسان بود. از مقایسه نقوش الکتروفورزی حاصل



شکل ۴: نتیجه الکتروفورز محصول آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای DetF / DetR. راهک ۱-۴: تاک های جمع آوری شده از استان فارس و کهگیلویه و بویر احمد، H: مو سالم، M:

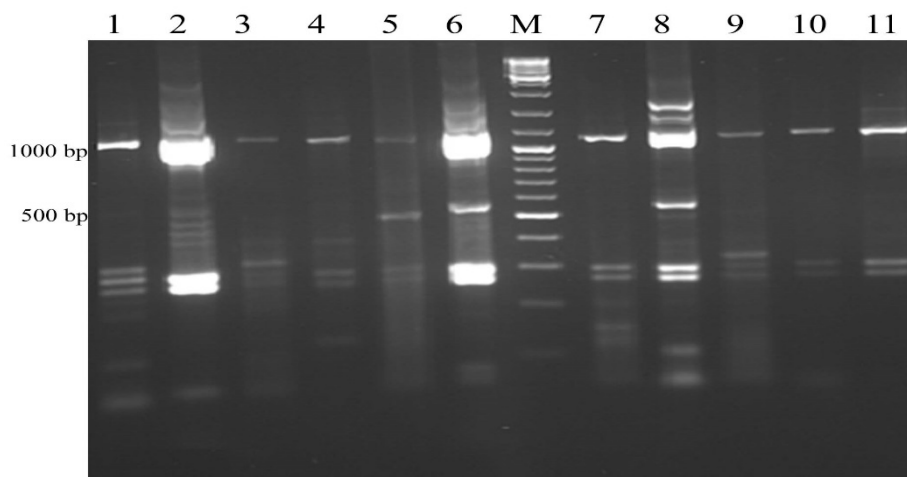
Gene ruler DNA ladder mix, Fermentas
Fig. 4. Electrophoresis pattern of RT-PCR products using DetF/DetR primer pair. Lanes 1-4: grapevine samples collected from vineyards of Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces, H: healthy grapevine, M: Gene ruler DNA ladder mix, Fermentas.

استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی MpF/CpR قطعه ای بطول ۱۷۶۰ جفت باز مربوط به توالی کامل ژن پروتئین پوششی بطول ۱۵۱۵ نوکلئوتید و ۲۳۰ نوکلئوتید از انتهای ۳' آر ان ای شماره ۲ GFLV را تکثیر کردند (شکل ۳).

بررسی پلی مورفیسم در ژن پروتئین پوششی GFLV به

روش RT-PCR-RFLP

قطعه ۱۷۶۰ جفت بازی تکثیر شده با آغازگرهای MpF/CpR از ۱۱ جدایه GFLV (جدول ۴) پس از برش با آنزیم برشی TaqI در ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. نقوش الکتروفورزی حاصل از هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده در جدایه های مختلف متغیر و در برخی از جدایه ها منحصر به فرد بود. با ترسیم خط رگرسیون بین میزان حرکت در الکتروفورز و طول قطعات، طول هر یک از قطعات حاصل از هضم آنزیمی محاسبه شد (جدول ۵). در برخی از جدایه ها مجموع قطعات بیشتر از ۱۷۶۰ جفت باز بود و باندهایی با شدت زیاد همراه با باندهایی با



شکل ۵. نقوش الکتروفورزی حاصل از هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی GFLV با آنزیم برشی *TaqI*. M: Gene ruler DNA ladder mix, Fermentas. مشخصات نمونه مربوط به هر راهک در جدول ۵ ذکر شده است.

Fig. 5. RFLP pattern of the fragments of GFLV coat protein gene after digestion with *TaqI* endonuclease. M: Gene ruler DNA ladder mix, Fermentas. See Table 5 for characteristics of samples (1-11).

است و زیرگروه دوم شامل جدایه‌هایی از شمال غرب کشور است. گروه دوم شامل جدایه‌هایی از ایران، فرانسه و شیلی است. در بین جدایه‌های ایرانی جدایی جغرافیایی بر روابط فیلوژنی بین جدایه‌ها تاثیر گذار بود به نحوی که جدایه‌های شمال شرق کشور در زیر شاخه‌ی Ia و جدایه‌های گزارش شده از شمال غرب ایران که در زیر شاخه Ib قرار دارند. ولی براساس درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه توالی آمینواسیدی جدایه‌ها مشخص شد که جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی شباهت زیادی با یکدیگر دارند.

آنالیز ترادف ژن پروتئین پوششی

جدایه‌های توالی یابی شده در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی با یکدیگر به طور میانگین ۸۹/۶۹ درصد شباهت داشتند و میانگین تفاوت آن‌ها با یکدیگر ۹/۳۲ درصد بود. میزان تشابه جدایه‌های توالی یابی شده در این تحقیق با جدایه‌های موجود در بانک ژن ۸۹/۲۲ درصد بود.

مشخص شد که جدایه‌های GFLV از استان فارس و کهگیلویه و بویر احمد در ۱۱ گروه ژنوتیپی مجزا قرار می‌گیرند (جدول ۵).

آنالیز فیلوژنی

رسم درخت فیلوژنی ۷ جدایه‌ی توالی یابی شده در این تحقیق به همراه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی ۷۲ جدایه ایرانی و ۲۶ جدایه از سایر نقاط دنیا موجود در بانک ژن (جدول ۶) در نرم افزار MEGA 5.1 به روش Neighbor-Joining و مدل Maximum composite likelihood و با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی انجام شد (شکل ۶).

در درخت فیلوژنی ترسیم شده جدایه‌های ویروس برگ باد بزنی مو در دو گروه مجزا با ضریب بوت استرپ بالا (Bootstrap= ۹۵) قرار گرفتند. گروه اول که شامل جدایه‌های ایرانی است به دو زیر گروه تقسیم می‌شود، زیر گروه اول شامل جدایه‌های شمال شرق و تعدادی از جدایه‌های جنوب ایران، تعیین ترادف شده در این تحقیق

جدول ۶: رس شمار ۷۲ جدایه ایرانی و ۲۶ جدایه از سایر نقاط دنیا موجود در بانک ژن استفاده شده در آنالیز فیلوژنی

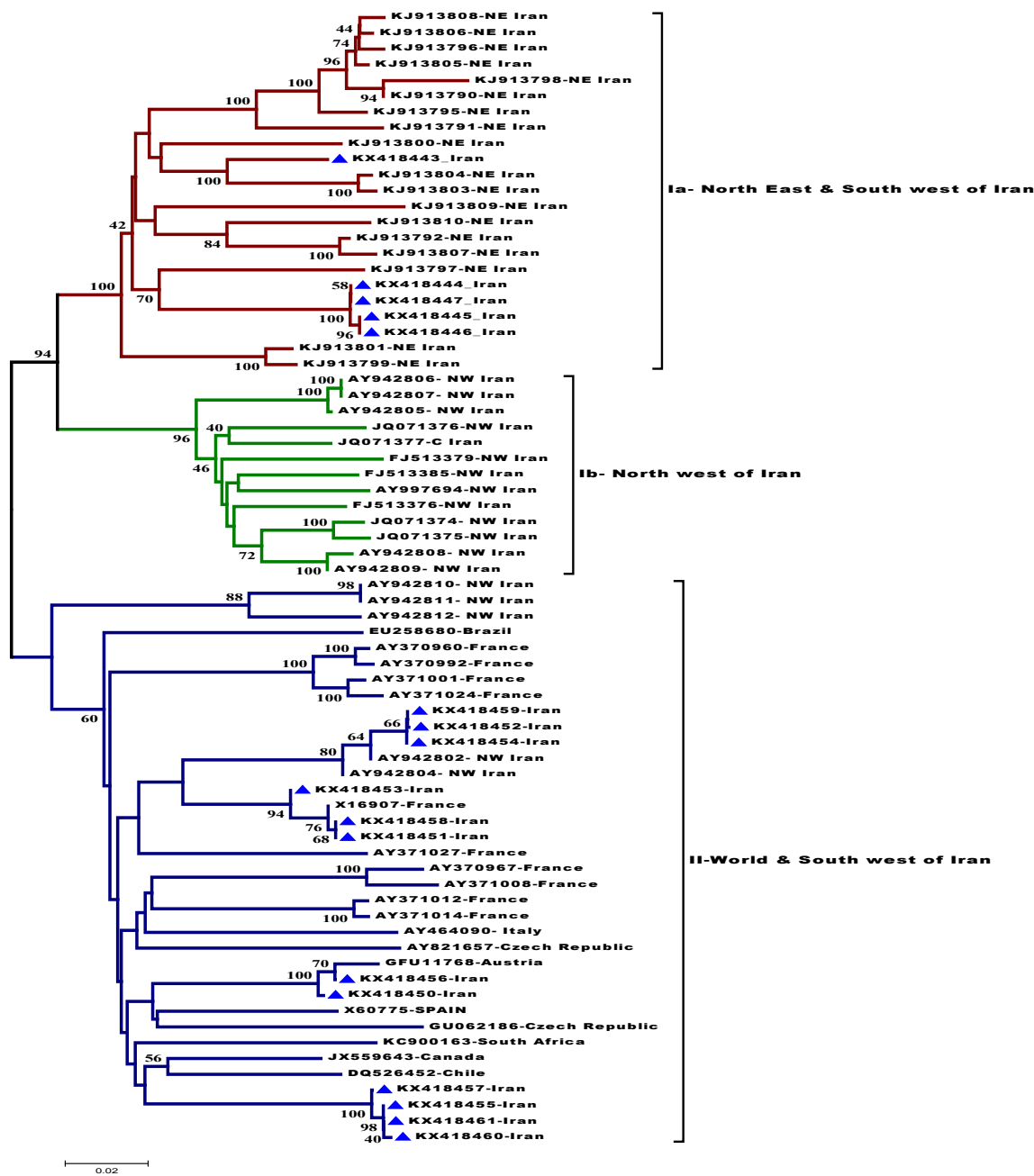
Table 6. Accession numbers of 72 Iranian GFLV isolates and 26 isolates of GFLV from other countries used in phylogenetic analyses

Accession Number	Location	Reference
DQ513332, DQ513335, DQ513336, DQ513334, DQ513333	Iran	Pourrahim <i>et al.</i> 2007
AY997697, AY997694, FJ513385, FJ513380, FJ513381, FJ513383, FJ513376, FJ513377, FJ513378, FJ513379, FJ513386, AY942813, AY942812, AY942811, AY942810, AY942809, AY942808, AY942807, AY942806, AY942805, AY942804, AY942802	Iran	Sokhandan Bashir <i>et al.</i> 2012, 2011, 2007
JQ071375, JQ071377, JQ071374, JQ071376	Iran	Genbank
KJ913810, KJ913809, KJ913808, KJ913807, KJ913806, KJ913789, KJ913790, KJ913791, KJ913792, KJ913793, KJ913794, KJ913795, KJ913796, KJ913797, KJ913798, KJ913799, KJ913800, KJ913801, KJ913802, KJ913803, KJ913804, KJ913805	Iran	Genbank
KX418443, KX418444, KX418445, KX418446, KX418447, KX418448, KX418449	Iran	This study
KX418450, KX418451, KX418452, KX418454, KX418453, KX418459, KX418455, KX418456, KX418457, KX418458, KX418461, KX418460	Iran	This study
AY370954, AY371026, AY371025, AY371027, AY371024, AY371014, AY371012, AY371008, AY371001, AY370998, AY370992, AY370986, AY370982, AY370980, AY370973, AY370970, AY370967, AY370960	France	Vigne <i>et al.</i> 2004
GU062186	Czech Republic	Genbank
EU258681, EU258680	Brazil	Genbank
EU038294	Brazil	Genbank
GFU11768	Austria	Genbank
DQ526452	Chile	Genbank

در سطح آمینواسیدی جدایه‌های توالی یابی شده در این تحقیق با یکدیگر به طور میانگین ۹۱/۱۳ درصد شباهت داشتند و تفاوت آن‌ها با یکدیگر ۶/۲ درصد بود. جدایه‌های توالی یابی شده در این تحقیق با جدایه‌های موجود در بانک ژن در سطح آمینواسیدی ۹۲/۹۱ شباهت داشتند.

در سطح آمینواسیدی میزان شباهت جدایه‌های ایرانی با یکدیگر ۹۵/۲۹ و با جدایه‌های موجود در بانک ژن ۹۵/۴۰ است. جدایه‌های جنوب ایران با یکدیگر ۹۴/۷۷ شباهت داشتند در حالیکه میزان شباهت در درون زیرگروه‌های جنوب ایران با یکدیگر ۹۸/۲۲ درصد بود. میزان شباهت جدایه‌های جنوب ایران با سایر جدایه‌های ایران، جدایه‌های شمال غرب و شمال شرق به ترتیب ۹۵/۵۳، ۹۵/۷۶ و ۹۲/۲۱ درصد بود.

در سطح نوکلئوتیدی شباهت جدایه‌های ایرانی با یکدیگر ۸۸/۲۷ و با جدایه موجود در بانک ژن ۸۹/۴۳ درصد بود. جدایه‌های ایران شامل جدایه‌هایی از شمال غرب، شمال شرق و جنوب می‌باشد که جدایه‌های جنوب براساس آنالیز فیلوژنی قابل تقسیم به دو زیر گروه هستند. در یک زیرگروه جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق و در زیرگروه دیگر جدایه‌های تعیین توالی شده به وسیله زکی عقل و ایزد پناه (منتشر نشده) قرار دارند. میزان شباهت اعضای این دو زیرگروه با یکدیگر ۹۲/۰۸ می‌باشد و درصد شباهت اعضای زیر گروه دوم جدایه‌های جنوب با یکدیگر ۹۴/۴۸ بود. میزان شباهت بین کل جدایه‌های جنوب با جدایه‌های ایران، شمال غرب و شمال شرق در سطح نوکلئوتیدی به ترتیب ۹۰/۱۷، ۹۱/۰۵ و ۹۱/۶۸ درصد می‌باشد.



شکل ۶. درخت فیلوژنی نشان دهنده رابطه جدایه‌های ایرانی و برخی از جدایه‌های ویروس برگ بادبزنی مو موجود در بانک ژن. رسم درخت با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در نرم افزار MEGA5.2 به روش Neighbor Joining و با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شده است. مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در جدول ۶ ذکر شده است. جدایه‌های توالی یابی شده در این تحقیق با ▲ مشخص شده است.

Fig. 6. Phylogenetic tree representing relationship of Iranian isolates of GFLV with those deposited in the GenBank. Tree was constructed using nucleotide sequence of GFLV coat protein gene in MEGA ver. 5.2 by Neighbor Joining method with 1000 replicates in bootstrap test. Characteristics of isolates were summarized in table 6. Isolates which sequenced in this study marked by ▲.

(1978).

آلودگی به GFLV به غیر از تاک در گیاهان مرغ، علف هفت بند، تمشک و قیاق به وسیله آزمون‌های الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تایید شد و این گیاهان به عنوان میزبان‌های طبیعی GFLV معرفی میشوند. آلودگی گیاهان مرغ، علف هفت بند، تمشک و قیاق به GFLV پیش‌تر نیز گزارش شده است (Gholampour *et al.* 2014).

مهمی برای حفظ و تغییر و تنوع ویروس در طبیعت و نقش مهمی در بیولوژی و اپیدمی ویروس دارند. مایه‌زنی جدایه‌های GFLV از مو، مرغ، قیاق، تمشک و علف هفت بند در سلمه تره تولید علائم بد شکلی برگ، تیز شدن زوایای برگ، رگبرگ روشنی و موزائیک با شدت‌های مختلفی شد. تفاوت ۸ تا ۱۰ درصد در سطح نوکلئوتیدی یا ۲ تا ۴ درصد در سطح آمینواسیدی در GFLV می‌تواند باعث تنوع در علائم GFLV در سلمه تره شود (Naraghi-Arani *et al.* 2001).

با توجه به اهمیت ژن پروتئین پوششی GFLV در بیولوژی ویروس این ژن ناحیه‌ای مناسب در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی ویروس است (Naraghi-Arani *et al.* 2001, Hull, 2002, 2007, Sokhandan Bashir *et al.* 2011, 2012, Vigne *et al.* 2004). لذا در این تحقیق از ترادف ژن پروتئین پوششی GFLV برای بررسی تنوع ژنتیکی به روش RT-PCR-RFLP استفاده شد. روش RT-PCR-RFLP هرچند تغییرات ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی را نشان نمی‌دهد اما یک تصویر کیفی مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارائه میکند (Naraghi-Arani *et al.* 2001, Vigne *et al.* 2004).

براساس نتایج RT-PCR-RFLP قطعه ۱۷۶۰ جفت بازی، جدایه‌های مورد بررسی در ۱۱ گروه ژنوتیپی مجزا

در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های ELISA و RT-PCR ویروس برگ باد بزی مو در بسیاری از تاکستان‌های استان فارس و کهگیلویه و بویر احمد ردیابی شد. این ویروس در ایران گسترش وسیعی دارد و قبلاً در تاکستان‌های شمال غرب، شمال شرق و جنوب ردیابی شده است (Gholampour, Ebrahim-ghomi *et al.* 2005, Nourinejad Zarghani *et al.* 2014, *et al.* 2014, Sokhandan bashir and Hajizadeh 2007) از آنجایی که GFLV در ناحیه ایران قدیم (Ancient Persia) و به احتمال زیاد ایران کنونی منشاء گرفته است، پراکنش وسیع ویروس در این مناطق چندان دور از ذهن نیست. یکی از راه‌های انتقال ویروس برگ باد بزی مو تکثیر قلمه‌های آلوده است (Hewitt *et al.* 1970). احتمالاً این روش در گسترش وسیع ویروس در ایران نقش اساسی داشته به طوری که اغلب تاکستان‌های ایران آلوده به GFLV هستند.

علائم مشاهده شده در تاکستان‌های آلوده به GFLV مشابه با علائم گزارش شده سویه برگ باد بزی مو باشد (Vuittenz 1970, Martelli 1993). همچنین علائم رگ نواری در برگ‌ها ناشی از سویه رگ نواری GFLV است (Hewitt *et al.* 1970) و در تعدادی از تاک‌ها علائم سویه موزائیک زرد مشاهده شد. بروز علائم موزائیک زرد در تاک‌های آلوده به GFLV نیازمند آب و هوای معتدل تر و میزبان حساس‌تر است (Taylor and Raski 1964). تنوع علائم در تاکستان‌ها ناشی از وجود سویه‌های مختلف ویروس برگ باد بزی مو می‌باشد. بسیاری از تاک‌های آلوده به GFLV در عین حال فاقد علائم واضحی بودند این امر ممکن است ناشی از متحمل بودن واریته‌های *V. vinifera* به بیماری برگ باد بزی مو باشد (Martelli

(Sokhandan Bashir *et al.* 2011, Zarghani *et al.* 2015) و پور رحیم و همکاران (Pourrahim *et al.* 2007) تطابق دارد. قرار گرفتن جدایه‌های غرب و شرق کشور در شاخه‌های مجزا نشان دهنده اثر جدایی جغرافیایی در تنوع ژنتیکی و تکامل GFLV است.

در درخت فیلوژنی براساس پروتئین پوششی اغلب جدایه‌های تعیین ترادف شده از استان فارس و کهگیلویه و بویر احمد در این تحقیق به همراه جدایه‌های شرق کشور در یک گروه قرار گرفتند. این در حالی است که جدایه‌های تعیین ترادف شده توسط زکی عقل و ایزد پناه (۲۰۰۶) مطالعات منتشر نشده) از جنوب با جدایه‌های سایر نقاط دنیا در یک گروه قرار گرفتند. آغاز گره‌های مورد استفاده در این تحقیق براساس ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی GFLV طراحی شده است در حالی که آغازگرهای مورد استفاده توسط زکی عقل و ایزدپناه براساس ژن پروتئین پوششی جدایه مرجع (GFLV-F13) طراحی شده بود که احتمالاً در تقسیم جدایه‌های جنوب به دو گروه مجزا اثر دارد. قرار گرفتن جدایه‌های جنوب کشور در دو گروه مجزا نشان دهنده وجود ژنوتیپ‌های مختلف (Naraghi- Arani *et al.* 2001, Vigne *et al.* 2004) و واگرا در جمعیت‌های GFLV جنوب غرب کشور دارد که با مفهوم quasispecies منطبق می‌باشد.

قرار گرفتند. در سال ۱۳۹۳ غلامپور و زکی عقل با استفاده از هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی با آنزیم برشی TaqI جدایه‌های GFLV از شمال شرق ایران را با همین روش در ۱۸ گروه متفاوت دسته بندی کردند. در بعضی از جدایه‌ها بیش از یک ژنوتیپ غالب ردیابی شد به نحوی که اندازه مجموع قطعات بیش از ۱۷۶۰ جفت باز بود این امر نشان دهنده وجود جمعیت‌های quasispecies در منبع آلودگی است. که با نتایج نراقی ارانی (Naraghi- Arani *et al.* 2001) تطابق دارد.

جدایه‌های ایرانی GFLV با جدایه‌های سایر نقاط دنیا ۹۵/۴۰±۱/۷۲ درصد در سطح نوکلئوتیدی و ۸۹/۴۳±۲/۳۶ درصد در سطح آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی شباهت داشتند. GFLV دارای تنوع ژنتیکی بالایی است (Sanchez Serghini *et al.* 1990, *et al.* 1991) و نرخ تنوع پذیری آن در سطح نوکلئوتیدی ۱۱ تا ۱۳ درصد و در سطح آمینو اسیدی ۴ تا ۹ درصد گزارش شده است (Naraghi-Arani *et al.* 2001, Nourinejhad Zarghani *et al.* 2013, Vigne *et al.* 2004).

مطالعه فیلوژنی براساس ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های ایرانی مسیر تکامل جداگانه‌ای را طی کرده و در شاخه‌ای مجزا از سایر جدایه‌های دنیا قرار می‌گیرند این امر که تایید کننده فرضیه‌ی منشا گرفتن ویروس از ایران است با نتایج سخندان بشیر و همکاران (Nourinejhad

منابع

- Ebrahim-ghomi M., Shamsbakhsh M. and Purrahim R. 2005. Study on the Status of Three Grapevine Viruses in North-Eastern Vineyards of Iran. Iranian Journal of Pests and Plant Disease 75: 109-120.
- Esmenjaud D. and Adab P. 1994. Detection of a region of the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus* by RT-PCR in the nematode vector *Xiphinema index*. Plant Disease 78: 1087-1090.
- Fuchs M., Pink M., Etienne L., Walter B. and Pink L. 1991. Characterization and detection of *Grapevine fanleaf virus* by using cDNA probes. Phytopathology 81: 559-565.
- Gambino G., Perrone I. and Griabudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different

- tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19: 520–525.
- Gholampour Z., Zakiagh M., Jafarpour B. and Mehrvar M. 2014. Analysis of genetic diversity in coat protein gene of *grapevine fanleaf virus* in north east of Iran. 21st Iranian Plant Protection Congress. Page: 371.
- Hampton R., Ball E. and De Boer S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. Aps PRESS, 388 pages. Convert, R. and Martin, R., Indirect ELISA. Pp: 179-197.
- Harrison B.D. and Murrant A.F. 1977. Nematode transmissibility of pseudorecombinant isolates of *Tomato black ring virus*. *Annals of Applied Biology* 86: 209-212.
- Hewitt W. B., Raski D. J. and Goheen A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48: 586-595.
- Hewitt W. B., Martelli G. P., Dias H. F. and Taylor R. H. 1970. *Grapevine fanleaf virus*. C. M. I/ A. A. B. Descriptions of Plant Viruses. No. 28.
- Hull R. 2002. Matthews' Plant Virology, 4th, Academic Press, London.
- Izadpanah K., Zaki-Aghl M. and Rowhani A. 2003b. Non-vitis hosts of *grapevine fanleaf virus* and their possible epidemiological significance. Proc. 14th ICVG Conference. Locorotondo, Italy. Page 210.
- Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y. P., Daubert S. D. and Rowhani A. 2003a. Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. *Plant Disease* 87: 1179-1182.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B. and Lefkowitz E. J. 2012. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press publications.
- Martelli G. P. 1978. Nematode-borne viruses of grapevine, their epidemiology and control. *Nematol. Medit.* 6: 1-27.
- Martelli G. P. 1993. Grapevine degeneration-fanleaf. In: Martelli G.P. (ed.). Graft-transmissible Diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis, pp. 9-18. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Naraghi-Arani P., Daubert S. and Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of General Virology* 82: 1791-1795.
- Nourinejad Zarghani Sh., Shams-Bakhsh M., Sokhandan Bashir N. and Wetzel T. 2013. Molecular Characterization of Whole Genomic RNA2 From Iranian Isolates of Grapevine Fanleaf Virus. *Journal of Phytopathology* 161: 419-425.
- Nourinejad Zarghani S., Karimi M., Nourinejad Zarghani A. and Hossein Zadeh M. R. 2015. Genetic diversity of and selection pressure on grapevine fanleaf virus movement protein in Iranian isolates. *Plant Protection* 38: 38-49.
- Pourrahim R., Farzadfar S., Golnaraghi A. R. and Ahoonmanesh A. 2007. Partial molecular characterization of some *Grapevine fanleaf virus* isolates from North-east of Iran. *Journal of Phytopathology* 155: 754-757.
- Raski D. J., Goheen A. C., Lider L. A. and Meredith C. P. 1983. Strategies against *grapevine fanleaf virus* and its nematode vector. *Plant Disease*. 67: 335-339.
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M. and Fucks L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Grapevine fanleaf nepovirus*. *Journal of General Virology* 72: 2357-2365.
- Rowhani A., Manangas M. A., Lile L. S., Daubert S. D. and Golino D. A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347-352.
- Sanchez F., Chay C. M., Borja M. T., Rowhani A., Romero J., Bruening G. and Ponz F. 1991. cDNA sequence of the capsid protein gene and 3 untranslated region of fanleaf isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Nucleic Acid Research* 19: 5440.
- Serghini M. A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B. and Pinck L. 1990. RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology* 71: 1433-1441.
- Sokhandan Bashir N., 2012. Population genetic analysis of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Virology* 157: 1919-1929.
- Sokhandan Bashir N., Pashaei A. and Doulati-Baneh H. 2011. Characterization of the full length coat protein gene of Iranian *Grapevine fanleaf virus* isolates, genetic variation and phylogenetic analysis. *Iranian Journal Biotechnology* 9: 213-221.

- Sokhandan bashir N. and Hajizadeh M. 2007. Survey for *Grapevine fanleaf virus* in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. *Australasian Plant Pathology* 36: 46-52.
- Taylor C. E. and Raski D. J. 1964. On the transmission of *grapevine fanleaf virus* by *Xiphinema index*. *Nematologica* 10: 489-495.
- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S. and Fuchs M. 2004. Population structure and genetic diversity within *Grapevine fanleaf virus* isolates from a naturally infected vineyard: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology* 85: 2435-2445.
- Vuittenz A. 1970. Fanleaf of grapevine. In: N W. Frazier (eds.). *Virus disease of small fruits and grapevine*. University of California, Berkeley, pp. 217-228.
- Zaki-Aghl M. and Izadpanah K. 2003. Serological and molecular identification of *grapevine fanleaf virus* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 39: 161-171.