

مقاله پژوهشی

## پراکنش و تحلیل تبارزایی ویروس برگ بادبزنی مو در باغات انگور استان خراسان رضوی براساس پروتئین پوششی

سارا قارونی کاردانی<sup>\*۱</sup> - محمود رضا کریمی شهری<sup>۲</sup> - فاطمه آزاد دیسفانی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۱

### چکیده

ویروس برگ باد بزنی مو (*Grapevine fanleaf virus, GFLV*) در تاکستان‌های مناطق مختلف دنیا شیوع دارد. علائم ایجاد شده توسط این ویروس اغلب در سه گروه برگ بادبزنی، موزاییک زرد و رگبرگ نواری تقسیم‌بندی شده‌اند که علت تفاوت در ایجاد علائم، به تنوع ژنتیکی جدایه‌ها نسبت داده شده است. شدت علائم ایجاد شده به جدایه‌ی ویروس، حساسیت رقم مو و شرایط محیطی بستگی دارد. در این تحقیق پراکنش و تحلیل تبارزایی ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس بررسی شد. نمونه‌ها از تاکستان‌های استان خراسان رضوی جمع‌آوری و ژن پروتئین پوششی از پنج جدایه تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین ترادف گردید. به این منظور، تعداد ۱۰۹ نمونه برگ دارای علائم از تاکستان‌ها جمع‌آوری و در آزمون الیزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی GFLV آلودگی به ویروس در ۵۸ نمونه تأیید شد. بیشترین میزان آلودگی در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه محمدیه واقع در شهرستان کاشمر بود. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ای بطول ۱۷۶۰ جفت باز مربوط به طول کامل ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس و قسمتی از انتهای ۳' ژنوم تکثیر شد. پروتئین پوششی جدایه‌های انتخاب شده در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۹۴-۹۰ و ۹۷-۹۱ درصد با جدایه‌های سایر نقاط دنیا شباهت داشت. تحلیل تبارزایی بر اساس ناحیه کدکننده پروتئین پوششی، جدایه‌های ایرانی GFLV را در شاخه‌ای مجزا از جدایه‌های سایر نقاط دنیا قرار داد. همچنین جدایه‌های شمال شرق کشور در گروهی مجزا از جدایه‌های شمال غرب کشور قرار گرفتند، که نشان‌دهنده اثر جدایی جغرافیایی در تکامل GFLV است. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر بومی بودن GFLV در ایران و گسترش احتمالی آن از این منطقه به سایر نقاط جهان است.

واژه‌های کلیدی: پراکنش، تبارزایی، خراسان رضوی، ویروس برگ بادبزنی مو

### مقدمه

به‌شمار می‌رود. این ویروس عامل بیماری برگ بادبزنی مو بوده (۱۰) و در آلودگی شدید باعث کاهش تشکیل میوه و عملکرد محصول، حتی تا ۸۰ درصد می‌شود (۳). انتقال این ویروس بطور طبیعی توسط نماتد *Xiphinema index* است. با این حال بخشی از انتشار آلودگی و شیوع آن بعلاوه تکثیر با استفاده از قلمه، پیوندک و نهال‌های آلوده می‌باشد (۹ و ۱۱). سه گروه از علائم شامل بدشکلی مسری، موزاییک زرد و رگبرگ نواری توسط بیماری برگ بادبزنی مو ایجاد می‌شود (۱۷) که این تفاوت در علائم مربوط به تنوع در ژنوم ویروس می‌باشد زیرا دو گروه از علائم در یک رقم مشاهده شده است (۱۹). یکی از منابع تنوع در ویروس‌هایی با ژنوم آر. ان. ای، پلی‌مراز ویروس است که فاقد خاصیت دوباره خوانی می‌باشد و فشار انتخاب وارد بر این جهش یافته‌ها باعث حذف ویروس و یا حفظ و افزایش این جهش‌ها خواهد بود (۴ و ۱۹). GFLV از جنس *Nepovirus* متعلق به خانواده

انگور یک محصول صنعتی و اقتصادی با ارزش است که جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات کشاورزی در سراسر دنیا و ایران دارد. بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی سالانه خسارات جبران ناپذیری به بخش کشاورزی وارد می‌کنند (۱۵ و ۱۶). ویروس برگ بادبزنی انگور (*Grapevine fanleaf virus - GFLV*) یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین ویروس‌ها از لحاظ اهمیت اقتصادی و وقوع گسترده

۱، ۲ و ۳- استادیاران پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

\*- نویسنده مسئول: (Email: s.gharooni@areeo.ac.ir)

DOI: 10.22067/JPP.2021.68789.1010

چندین تبار مستقل تشکیل شده‌اند که نشان می‌دهد تمایز بین جمعیت‌های جغرافیایی GFLV رخ داده است (۳۲). طی مطالعه در رابطه با ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی جدایه‌های GFLV ایران در سال ۲۰۱۷، تمایز بین جمعیت‌های جغرافیایی جدایه‌های ایرانی تأیید شد و علت این وضعیت پلی‌فلیتیک جمعیت ویروس را حضور طولانی مدت ویروس در منطقه، اثرات بنیان‌گذار و یا نوترکیبی دانستند (۸). طی مطالعات انجام شده توسط محققان، ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی مناسب می‌باشد (۱۸، ۲۹، ۳۳ و ۳۶) و این ناحیه از ژنوم نقش مهمی در بیولوژی ویروس و انتقال با نماتد ناقل دارد (۱۲).

با در نظر داشتن قدمت طولانی ویروس در تاکستان‌های ایران در چند سال گذشته، مطالعات مولکولی این ویروس امری ضروری است. بدین منظور ناحیه ژنومی کدکننده پروتئین پوششی برای تحلیل تبارزایی GFLV و بررسی ارتباط جدایه‌های استان با سایر جدایه‌های ویروس برگ بادبزی مو استفاده شده است. این امر می‌تواند به توسعه روش‌های تشخیصی مطمئن در برنامه تولید گیاهان عاری از ویروس، کمک کند.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌ها

در مجموع ۱۰۹ نمونه مشکوک به آلودگی به GFLV با علائم موزاییک زرد و رگبرگ‌نوازی طی دو سال متوالی در اواسط بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از تاکستان‌های استان خراسان رضوی (جدول ۱) جمع‌آوری شدند.

### ردیابی سرولوژیکی GFLV

ردیابی GFLV در نمونه‌های مثبت به روش الیزای غیر مستقیم انجام شد (۵). در نهایت پس از افزودن ماده‌ی زمینه، هر ۳۰ دقیقه یک بار میزان تغییر رنگ چاهک‌ها (جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر) با دستگاه الیزا خوان تا ۹۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. معیار مثبت بودن نمونه‌ها میزان جذبی معادل یا بالاتر از دو برابر میانگین ضریب جذب نوری چاهک‌های مربوط به نمونه‌های سالم بود (۶).

### استخراج آر. ان. ای کل و انجام آزمون آر تی پی سی آر

استخراج آر. ان. ای کل از برگ‌های گیاهان آلوده به GFLV (تشخیص داده شده در الیزا) به روش (CTAB<sup>۱</sup>) با اندکی تغییرات انجام شد (۱۲). مقدار ۲۰ میلی‌گرم از برگ آلوده به کمک ازت مایع

*Secoviridae* (۲۷) و دارای پیکره‌های ایزومتریکی است که ژنوم آن از دو قطعه آر. ان. ای تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است که آر. ان. ای ۱ و آر. ان. ای ۲ نامیده می‌شوند (۲۶ و ۳۲) و انتهای ۵' آر. ان. ای‌های ژنومی این ویروس، متصل به یک پروتئین کوچک به نام وی پی جی و انتهای ۳' نیز دارای دنباله‌ی پلی‌آدنینی می‌باشند. هر کدام از آر. ان. ای‌های ژنومی یک پلی پروتئین رمزگذاری می‌کنند. پلی پروتئین رمزگذاری شده توسط آر. ان. ای ۲ به سه پروتئین کوچک‌تر به نام‌های 2A-HP در تکثیر آر. ان. ای ۲ نقش دارد، 2BMP پروتئین حرکتی و 2CCP پروتئین پوششی (شکسته می‌شود (۳).

بر طبق آمار منتشره سال ۱۳۹۸ وزارت جهاد کشاورزی، رتبه سوم بیشترین میزان تولید از بین محصولات باغبانی در کشور مربوط به انگور با تولید حدود ۳،۳ میلیون تن و سهم ۱۴،۲ درصد از کل میزان تولید محصولات باغبانی بوده که استان‌های فارس با سهم ۱۶،۵ درصدی، همدان با سهم ۱۰،۹ درصدی، خراسان رضوی با سهم ۱۰،۴ درصدی، قزوین با سهم ۱۰،۳ درصدی و آذربایجان شرقی با سهم ۷،۱ درصدی در رتبه‌های اول تا پنجم تولیدکنندگان انگور کشور قرار داشته‌اند. این پنج استان جمعاً در حدود ۵۵،۱ درصد از کل تولید انگور کشور را تأمین نموده‌اند. سطح زیر کشت انگور در استان خراسان رضوی، در سال ۱۳۹۸، حدود ۲۷،۹۴۱ هکتار و مجموع میزان تولید دیم و آبی این محصول ۳۴۶،۴۵۵ تن بوده است (۱).

بیماری ویروس برگ بادبزی انگور تهدید عمده‌ای برای صنعت انگور به‌شمار می‌رود و در حال حاضر، استفاده از مواد تکثیری عاری از ویروس تنها راه کار مؤثر برای کنترل بیماری‌های ویروسی در تاکستان است. برای کارایی مؤثر این روش، شناسایی ویروس ضروری است. علاوه بر روش الیزا (ELISA)، آزمون رونویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (RT-PCR) رایج‌ترین روش برای تشخیص ویروس است. از آنجا که ایران یکی از سرزمین‌های اولیه کشت انگور به‌شمار می‌رود (۲۵) به‌نظر می‌رسد خواستگاه GFLV نیز ایران باشد (۳۱ و ۳۵). اولین گزارش از شیوع بیماری در ایران مربوط به سال ۱۹۷۰ میلادی است (۳۴).

تجزیه و تحلیل توالی‌ها بر اساس ژن پروتئین پوششی (Coat protein) و پروتئین حرکتی (Movement protein)، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در ژنوم جمعیت‌های GFLV نشان داده است که بیانگر این است که GFLV متشکل از واریانت‌های متفاوت در یک جمعیت شبه گونه است (۲۱ و ۲۸). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ در شمال غرب کشور طی تجزیه و تحلیل تبارزایی پروتئین حرکتی جمعیت‌های ویروس برگ بادبزی مو، نشان داد که ساختار جمعیت جدایه‌های GFLV توالی‌یابی شده از اسلوونی و ایران منوفلیتیک هستند و این ویروس از طریق تکامل مستقل در ایران به‌وجود آمده است، در حالی که جدایه‌های GFLV مربوط به فرانسه، ایتالیا و ایالات متحده از

1- Cetyl-trimethylammonium bromide

شامل یک چرخه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشته‌سازی، ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۸۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۳°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی دو میکرولیتر از Green viewer (پارس توس، ایران) الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داگ (Alphaimager Mini ProteinSimple, USA) عکس‌برداری شد.

### همسانه‌سازی محصول (RT-PCR) و تعیین توالی نوکلئوتیدی

قطعه تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز قبل از همسانه‌سازی به درون ناقل، با استفاده از کیت استخراج از ژل (GeNet Bio, Korea, Cat No: K-8000) مطابق دستور العمل شرکت سازنده از ژل آگارز، خالص‌سازی شد. همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی با استفاده از کیت pTG19-T PCR Cloning (Vivantis, Malaysia) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در ناقل پلاسمیدی pTG19 و سویه DH5α باکتری *Escherichia Coli* و به وسیله شوک حرارتی انجام شد. پس از انجام ترانسفورماسیون دو نوع پرگنه سفید و آبی رنگ بر روی محیط کشت تشکیل گردید. غربالگری پرگنه‌های سفید با استفاده از پرایمر اختصاصی و انجام کلنی پی‌سی‌آر صورت گرفت. جهت استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب از کیت استخراج پلاسمید کیاژن (Qiagen Plasmid Miniprep Kit, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای تعیین توالی قطعه همسانه‌سازی شده، مقدار ۱۰ میکرولیتر پلاسمید با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی<sup>۳</sup> به شرکت ماکروژن<sup>۴</sup> کشور کره جنوبی ارسال شدند. خوانش‌ها در دو جهت رفت و برگشت انجام شد.

برای انجام ویرایش توالی‌ها از نرم‌افزار Vector NTI Advance 11.5.3 استفاده شد (۱۴). مقایسه توالی‌ها با استفاده از الگوریتم BLAST (۲) در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) انجام شد (www.ncbi.nlm.nih.gov). جدایه‌های توالی‌یابی شده GFLV از استان خراسان رضوی به همراه دیگر توالی‌های نوکلئوتیدی GFLV ثبت شده از ایران و سایر کشورها در بانک ژن با استفاده از مدل MUSCLE در نرم‌افزار MEGA7 هم‌تراز شدند (۱۳). اگرچه توالی‌های تکثیر شده توسط RT-PCR شامل طول کامل ناحیه کد کننده پروتئین پوششی ویروس و قسمتی از انتهای<sup>۳</sup> ژنوم بود، ولی تنها توالی ژن پروتئین پوششی برای تجزیه و تحلیل تبارزایی استفاده

پودر شده و به آن ۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول و ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (1.4M NaCl, 0.1M Tris-HCl PH=7, 1% PVP<sup>۱</sup>) اضافه شده و برای ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت. نمونه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از روشین به میکروتیوب جدید منتقل شد. ۴۰۰ میکرولیتر کلروفورم به مخلوط اضافه و بعد از همگن‌سازی، به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. روشین به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و ۰/۱ حجم استات آمونیوم یک مولار و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد. میکروتیوب با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شد. رسوب با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شده، سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلیسیوس خشک شدند. در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به رسوب اضافه شد و پس از حل شدن در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

برای ساخت رشته مکمل (cDNA) ۳ میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده با ۲ میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت (CpR) با غلظت ۱۰ پیکامول و ۹/۵ میکرولیتر آب دی‌یونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر ۵x واکنش و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (MMuLV reverse transcriptase) (پارس توس، ایران) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سلیسیوس ترموسایکلر (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler, USA) قرار گرفت (۷).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده MpF (5'-AGAAGTCGCTCACGATCTGTGAGG-3') و CpR (5'-ACAAACAACACTGTGCGCC-3') برای تکثیر طول کامل ناحیه کد کننده پروتئین پوششی ویروس و قسمتی از انتهای<sup>۳</sup> ژنوم برای تمام نمونه‌های مثبت واکنش الایزا انجام شد (۱۲). از مخلوط آماده PCR (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix RED, Denmark) برای تکثیر طول کامل از ژن پروتئین پوششی GFLV استفاده شد. به این منظور ۳ میکرولیتر از cDNA حاصل از واکنش رونویسی معکوس با ۲ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی با یکدیگر مخلوط و به وسیله آب مقطر استریل حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

3- Sequencing  
4- Macrogen

1- Polyvinylpyrrolidone  
2- Polyvinylpolypyrrolidone

شدن رگبرگ‌های اصلی، تولید جوانه‌های دوگانه، کوتاه شدن میانگره‌ها و انشعابات غیرعادی در شاخه‌ها دیده شد (شکل ۱). با استفاده از آزمون‌های الایزای غیرمستقیم (Indirect-ELISA) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (RT-PCR)، در مجموع آلودگی ۵۸ نمونه مو تأیید شد. فراوانی این ویروس در نمونه‌های محمدیه بیشتر از سایر مناطق بود (جدول ۱).

شد. درخت تبارزائی برای ژن پروتئین پوششی GFLV با استفاده از روش Maximum likelihood با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap در نرم‌افزار MEGA7 رسم شد.

### نتایج و بحث

در این تحقیق تعداد ۱۰۹ نمونه مو دارای علائم از باغ‌های استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. در نمونه‌هایی که به روش الایزا و سپس روش مولکولی آلودگی آنها اثبات گردید علائم متنوعی شامل رگبرگ زردی، بدشکلی برگ‌ها، باز شدن سینوس دمبرگ، مجتمع



شکل ۱- علائم ویروس برگ بادبزی مو در تاک‌های آلوده جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی. a و b رگبرگ نواری، c. بد شکلی و باز شدن سینوس انتهای دمبرگ، d. کپهای شدن ساقه‌ها و کم شدن فاصله میانگره‌ها، e. زیکزاک‌ی شدن ساقه‌ها و کپهای شدن، f. ایجاد جوانه‌های دو قلو  
 Figure 1- Symptoms of GFLV in infected vines of Khorasan Razavi province. (a and b) Vein banding, (c) Leaf malformation and open petiolar sinus, (d) Stunting and bushy growth of shoot, (e) Zigzagged stem, (f) Double nodes in infected stem

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌های مو جمع‌آوری شده و آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو شناسایی شده توسط روش‌های الیزا و مولکولی

Table 1- Location and number of collected samples and those infected with GFLV by ELISA and molecular tests

نام شهرستان City	تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس No. infected samples	تعداد کل نمونه‌های جمع‌آوری شده No. all samples
بردسکن Bardaskan	11	27
کاشمر Kashmar	14	22
خلیل‌آباد Khalilabad	12	23
محمدیه Mohammadiyeh	19	27
نیشابور Neyshabour	2	10
تعداد کل نمونه‌ها Total samples	58	109

کشت انگور ردیابی کمترین میزان آلودگی ویروسی در گیاهان مادری و اندام‌های زایشی برای جلوگیری از انتشار آنها و احداث تاکستان‌های جدید امری ضروری می‌باشد (۳۳).

اندازه‌گیری طیف جذبی نمونه‌ها با نانودراپ نشان داد که RNA کل استخراج شده از بافت برگ با استفاده از روش CTAB دارای غلظت مناسبی است و غلظت RNA کل استخراج شده حدود ۴۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در آنها ۲-۱/۸ بود. در واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی قطعه‌ای به طول ۱۷۶۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده به GFLV شناسایی شده در روش الیزا، تکثیر شد (شکل ۲)، در حالی که در نمونه گیاه سالم هیچ‌گونه باندهی مشاهده نشد. تکثیر پروتئین پوششی ویروس در آزمون نسخه‌برداری معکوس و تأیید صحت قطعه همانندسازی شده پس از تعیین توالی، تأیید کننده آلودگی تاک‌ها به ویروس برگ بادبزنی مو می‌باشد.

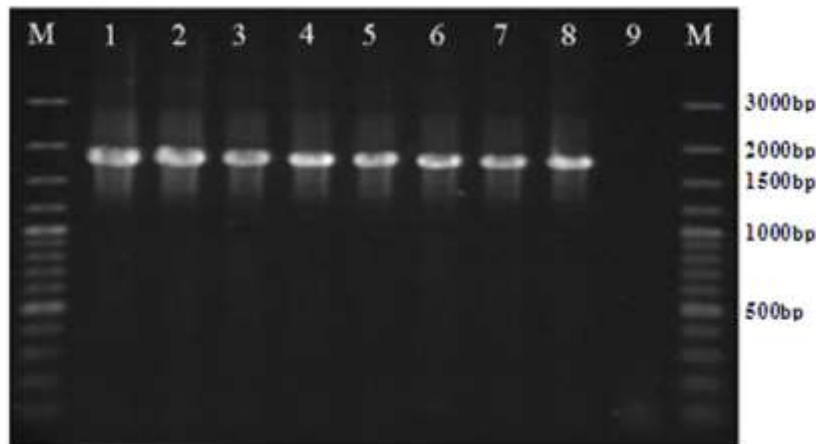
در تعداد کمی از نمونه‌ها با اینکه نشانه‌هایی از قبیل موزائیک، بدشکلی برگ‌ها، زیگزگ شدن شاخه‌ها دوقلو شدن جوانه‌ها مشاهده شد ولی در آزمون الیزا آلودگی آنها محرز نشد، هر چند در تعدادی از این نمونه‌ها آلودگی به GFLV بوسیله RT-PCR تأیید شد. این موضوع ممکن است در اثر متفاوت بودن خصوصیات سرولوژیکی در جدایه‌ها و یا کاهش غلظت ویروس در اثر شرایط محیطی نامناسب باشد یا اینکه به دلیل آلودگی به سایر ویروس‌ها باشد.

درصد آلودگی نمونه‌های ردیابی شده به (GFLV) در تابستان بسیار کمتر از نمونه‌های ردیابی شده در اواسط بهار (اردیبهشت ماه) بود. نتایج تحقیقات قبلی هم نشان می‌دهد، ردیابی (GFLV) در طول فصل رویشی به دلیل غلظت کم ویروس برگ بادبزنی در گیاهان آلوده در ماه‌های گرم سال به‌ویژه تابستان، نبود زمینه پراکنش یکنواخت ویروس در قسمت‌های مختلف گیاهی و همچنین آلودگی‌های پنهان در ارقام متحمل یا سویه‌های خفیف ویروس دچار اشکال می‌گردد. به دلیل اهمیت اقتصادی این ویروس در مناطق

جدول ۲- رس‌شمار توالی‌های ثبت شده در NCBI مربوط به جدایه‌های GFLV توالی یابی شده در تحقیق حاضر

Table 2- Accession numbers of GFLV sequences identified in this study in NCBI

محل جمع‌آوری Location	شماره دسترسی Accession numbers	میزبان Host
بردسکن Bardaskan	MW535300	Grapevine
کاشمر Kashmar	MW535301	Grapevine
خلیل‌آباد Khalilabad	MW535302	Grapevine
محمدیه Mohammadiyeh	MW535303	Grapevine
نیشابور Neyshabour	MW535304	Grapevine



شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد با جفت آغازگر اختصاصی (MpF/CpR). راهک ۱ شاهد مثبت، راهک ۲ تا ۸ نمونه‌های آلوده به GFLV جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی. راهک شماره ۹ شاهد منفی. M نشانگر مولکولی (100 bp, Fermentas)  
**Figure 2- Results of RT-PCR using GFLV specific primers (MpF/CpR). Lane 1 positive control. Lane 2-8 GFLV infected samples from Khorasan Razavi vineyards, Lane 9 negative control, M 100bp DNA ladder (Fermentas)**

ویروسی با ارقام مختلف باشد و قرار گرفتن جدایه‌های غرب و شرق کشور در شاخه‌های مجزا نشان دهنده اثر جدایی جغرافیایی در تنوع ژنتیکی و تکامل GFLV است.

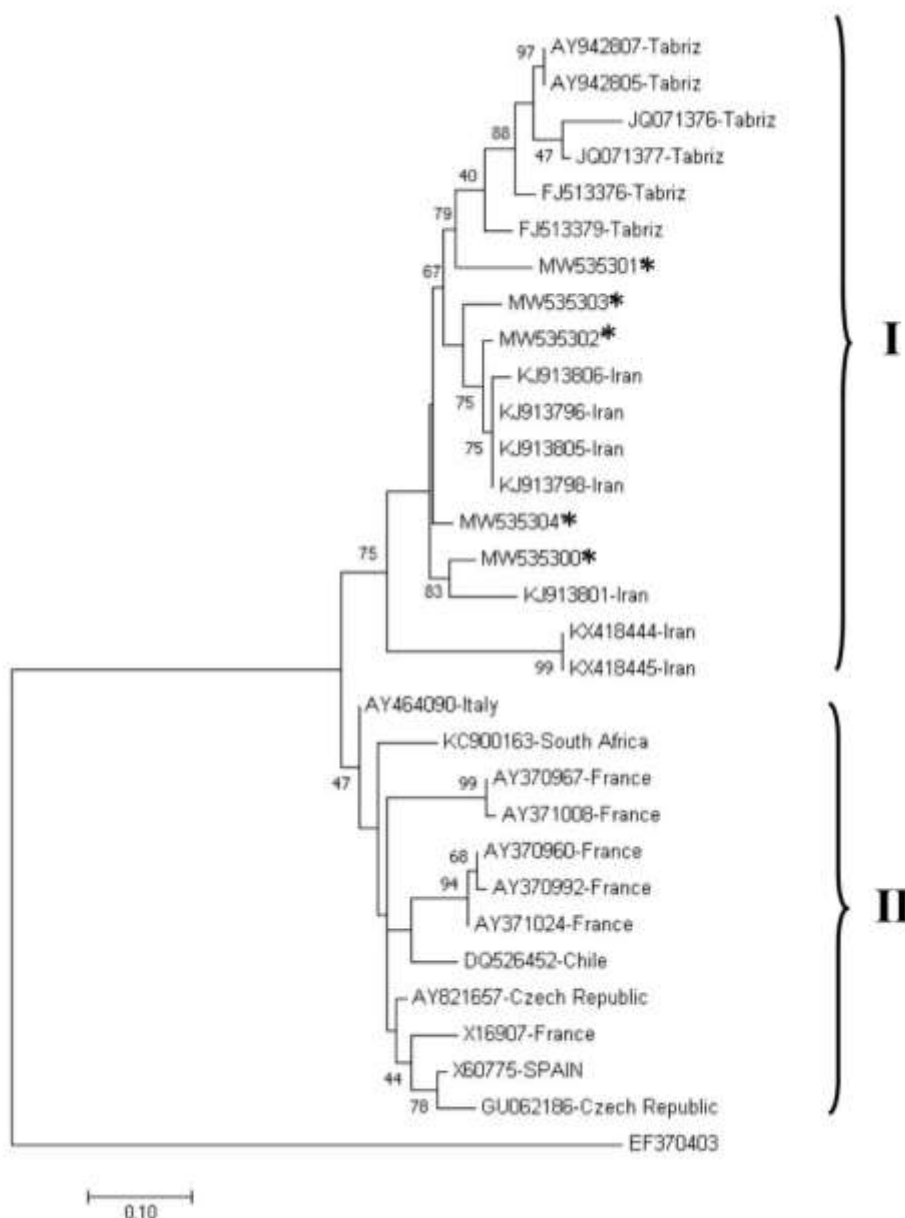
در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ بر اساس تجزیه و تحلیل تبارزایی توالی ناحیه ژنی پروتئین پوششی از ۱۸ توالی GFLV جدایه‌های سیسیلی (ایتالیا)، به همراه ۱۴ جدایه ایتالیایی دیگر، ۲ جدایه از ایران، ۲ جدایه فرانسوی، ۲ جدایه از برزیل، ۱ جدایه از شیلی، ۱ جدایه از ایالات متحده آمریکا، ۱ جدایه از اتریش و ۱ جدایه از چین برگرفته از بانک ژن نشان داد، جدایه‌های مورد بررسی در دو خوشه مجزا قرار گرفتند و جدایه‌های ایرانی GFLV جدا از سایر جدایه‌های دنیا طبقه‌بندی شدند و تنوع در میان این جدایه‌ها را عامل منشا متفاوت دانستند که احتمالاً به علت تبادل مداوم مواد تکثیری آلوده به GFLV با مناطق دیگر ایتالیا یا با سایر کشورها می‌باشد (۲۲).

در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های الایزا و RT-PCR ویروس برگ بادبزی مو در تاکستان‌های استان خراسان رضوی ردیابی شد. این ویروس در ایران در تاکستان‌های شمال غرب، شمال شرق و جنوب ردیابی و گزارش شده است (۷، ۲۰، ۳۰، ۳۱). از آنجایی که GFLV به احتمال زیاد از ایران منشا گرفته است (۲۳، ۳۱ و ۳۵)، پراکنش وسیع ویروس در این مناطق امکان‌پذیر است. یکی از راه‌های انتقال ویروس برگ بادبزی مو تکثیر قلمه‌های آلوده است. لذا، در گسترش ویروس در تاکستان‌ها نقش اساسی داشته است.

ترادف نوکلئوتیدی ۱۵۱۵ جفت‌بازی مربوط به طول کامل ژن پروتئین پوششی از قطعات همسانه‌سازی شده، جداسازی و در بانک ژن ثبت شد. رس‌شمار جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در جدول ۲ ذکر شده است.

قطعات تکثیر شده دارای ۹۴-۹۰ درصد یکسانی با جدایه‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی و ۹۷-۹۱ یکسانی در سطح آمینواسیدی بودند که نشان می‌دهد جهش‌های رخ داده در سطح نوکلئوتیدی CP ویروس، در سطح آمینواسیدی باعث تغییر قابل انتظار در آمینواسیدهای CP نشده است.

جدایه‌های GFLV در درخت تبارزایی رسم شده بر اساس توالی ناحیه ژنی پروتئین پوششی به دو گروه اصلی (گروه I و II) تقسیم‌بندی شدند (شکل ۳). جدایه‌های ایرانی GFLV، در شاخه‌ای مجزا از جدایه‌های سایر نقاط دنیا قرار گرفتند (گروه I) و سایر جدایه‌های GFLV شامل جدایه‌های اروپایی، آفریقا و آمریکای جنوبی (شیلی) در شاخه‌ای مجزا قرار گرفتند (گروه II). همچنین جدایه‌های ایرانی از دو خط سیر متفاوت پیروی می‌کردند، به طوری که جدایه‌های شرق کشور و جدایه‌های تعیین ترادف شده در تحقیق حاضر در شاخه‌ای جداگانه نسبت به جدایه‌های گزارش شده از شمال غرب ایران قرار گرفتند و این امر فرضیه منشا گرفتن ویروس از ایران را تایید می‌کند که با نتایج کارگر، سخندان بشیر، پور رحیم، نوری نژاد و همکاران (۱۲، ۲۱، ۲۴، ۳۱) و پانو و همکاران (۲۲) تطابق دارد (شکل ۳). از آنجا که ارقام مختلفی از مو در ایران وجود دارند وجود این خط سیرهای متفاوت می‌تواند دلیلی بر سازگاری واریانته‌های



شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن

رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 به روش Maximum likelihood با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شده است. Tomato ring spot virus (TRS) به‌عنوان برون گروه انتخاب شده است. توالی‌های ثبت شده در این بررسی نشان‌دار (\*) شده‌اند.

**Figure 3- Dendrogram illustrating the phylogenetic relationships between the Iranian isolates of GFLV and other GFLV sequences deposited in the GenBank**

The tree was constructed using MEGA 7 using Maximum likelihood method with 500 replicates of bootstrap test. TRSV served as an out group. (Recorded sequences in this study showed by \*).

اظهار داشتند که این عوامل می‌تواند شامل سویه ویروس، ژنوتیپ میزبان، عفونت‌های متعدد با سویه‌های مختلف GFLV، تأثیر ویروس‌های دیگر و شرایط محیطی باشد (۱۷). بر اساس یافته‌ها

علائم موزاییک زرد و رگبرگ نواری و برگ بادبزنی مشاهده شده در تاکستان‌ها مشابه با علائم گزارش شده در منابع است (۳۲). عوامل مؤثر در بروز علائم هنوز ناشناخته است. مارتلی و ساوینو (۱۹۹۰)

## سپاسگزاری

با تشکر از سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی، که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند. مقاله مذکور مستخرج از پروژه " بررسی برخی عوامل بیمارگر مهم و حشرات ناقل دخیل در عارضه زوال مو در استان خراسان رضوی " با شماره مصوب: ۹۵۱۴۱-۱۶-۴۳-۴ و شماره فروست ۵۸۸۳۶ می‌باشد.

می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت مشاهده شده در پروتئین پوششی جدایه‌های GFLV در دامنه قابل انتظار برای ویروس‌هایی با ژنوم آران‌ای تک رشته‌ای مثبت بود که این تنوع می‌تواند ناشی از خطای آنزیم‌های دخیل در تکثیر، آران‌ای پلی‌مراز وابسته به آران‌ای (RdRp) حین تکثیر و یا در اثر رخدادهای نوترکیبی باشد (۱۸).

## منابع

- Ahmadi K., Ebadzadeh H., Hatami F., Hosseinpour R., and Abdshah H. 2020. Agricultural statistics of horticultural products in 2019. Third volume. Ministry of Jihad Agriculture, Information and Communication Technology Center. 156 pages.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Andret-Link P., Schmitt-Keichinger C., Demangeat G., Komar V., and Fuchs M. 2004. The specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320: 12-22.
- Biebricher C., and Eigen M. 2006. What is a quasispecies? In *Quasispecies: Concept and Implications for Virology*, 1-31 pp.
- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 474-483.
- Dijkstra J., and Jager C.P. 1998. *Practical plant virology: protocols and exercises*. Springer-Verlag GmbH.
- Gholampour Z., Zakiaghl M., Jafarpour B., and Mehrvar M. 2015. Identification and Prevalence of Grapevine fanleaf virus in Khorasan-Razavi Vineyards. *Journal of Plant Protection* 29(3): 318-324. doi: 10.22067/jpp.v29i3.27668
- Gholampour Z., Kargar M., Zakiaghl M., Siampour M., Mehrvar M., and Izadpanah K. 2017. Dynamics of the population structure and genetic variability within Iranian isolates of grapevine fanleaf virus: evidence for polyphyletic origin. *Acta Virologica* 61(3): 324-335.
- 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.
- Kargar M., Zakiaghl M., Masoumi M., Mehrvar M., and Izadpanah K. 2017. Analysis of genetic diversity of Grapevine fanleaf virus isolate from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52(3): 375-391.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874.
- Lu G., and Moriyama E.N. 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* 5(4): 378-388.
- Martelli G.P., and Savino V. 1990. Fanleaf degeneration. In: Pearson, R.C., Goheen, A. (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 48-49.
- 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(7): 1791-1795.
- Nourinezhad Zarghani S., Shams-Bakhsh M., Zand N., Sokhandan-Bashir N., and Pazhouhandeh M. 2012. Genetic analysis of Iranian population of *Potato leafroll virus* based on ORF0. *Virus Genes* 45: 567-574.
- Nourinezhad Zarghani S.H., Shams-Bakhsh M., Sokhandan-Bashir N., and Pazhouhandeh M. 2012. Identification and detection of Iranian isolates of *grapevine fanleaf virus* using green-grafting and RT-PCR. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48(3): 381-391.
- Nourinezhad Zarghani S., Shams-Bakhsh M., Bashir N.S., and Wetzel T. 2013. Molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Phytopathology* 161(6): 419-425.



21. 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.
22. Panno S., Caruso AG., Bertacca S., Pisciotta A., Lorenzo RD., Marchione S., Matic S., and Davino S. 2021. Genetic Structure and Molecular Variability of Grapevine Fanleaf Virus in Sicily. *Agriculture* 11(6): 496. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060496>.
23. Pearson A.C., and Goheen A.C. 1988. *Compendium of Grape Diseases*. APS Press.
24. 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.
25. Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., and Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology* 72: 2357-2365.
26. Sanfacon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., van der Vlugt R., and Wetzel T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archive of Virology* 154: 899-907
27. Schneider W.L., and Roossinck M.J. 2000. Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *Journal of Virology* 74(7): 3130-3134.
28. 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.
29. Sokhandan Bashir N., 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.
30. Sokhandan Bashir N., Nikkhah Sh., and Hajizadeh M. 2007. Distinct phylogenetic positions of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran based on the movement protein gene. *Journal of General Plant Pathology* 73: 209-215.
31. 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 of Biotechnology* 9(3): 213-221.
32. Sokhandan-Bashir N., and Melcher U. 2012. Population genetic analysis of grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology* 157(10): 1919-1929.
33. 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. *General Virology* 85: 2435-2445.
34. Vuittenz A. 1970. Fanleaf of grapevine. In: N. W. Frazier (ed.). *Virus disease of small fruits and grapevine*. University of California, Berkeley 217-228.
35. 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.
36. Zhou J., Fan X., Dong Y., ping Zhang Z., Ren F., and Hu G. 2015. Detection and genetic variation analysis of Grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates in China. *Archives of Virology* 160(11): 2661-2667.



## Distribution and Phylogeny of *Grapevine fanleaf virus* in Vineyards of Khorasan Razavi Province Based on Coat Protein Region

S. Gharouni-Kardani<sup>1\*</sup>- M.R. Karimi Shahri<sup>2</sup>- F. Azad Disfani<sup>3</sup>

Received: 16-02-2021

Accepted: 02-08-2021

**Introduction:** Virus and virus-like diseases cause intensive damage in vineyards all over the world. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is one of the most economic important viruses infecting grapevine worldwide. It is a major limiting factor for grapevine productions and reduces fruit quality and shortens the longevity of grapevines in the vineyards. GFLV belongs to the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae* and has a bipartite single-stranded positive RNA genome which encapsidated in isometric particles. Both RNA molecules contain a genome-linked viral protein (VPg) at 5' end and a poly (A) tail at 3' end of genome. GFLV is transmitted naturally from grapevine to grapevine by the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* in the vineyard. Fanleaf disease causes three groups of symptoms, including malformation, vein clearing and yellowing. This difference in symptoms is related to diversity in the genome of the virus because in one cultivar can be seen both groups of symptoms. Khorasan Razavi province has the third largest area under grape cultivation in Iran in this study we studied distribution and diversity of GFLV isolates in vineyards of Khorasan Razavi province.

### Materials and Methods

#### - Plant material and virus isolates

During two consecutive growing seasons of 2019 and 2020, a survey was conducted in some of the major areas under the cultivation of grapevine in Khorasan Razavi (Kashmar, Khalilabad, Mohammadiyeh Bardaskan, Neyshabour) at the northeast of Iran. A total of 109 grapevines samples were collected and tested for GFLV infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described by Clark and Adams (1977). Total RNA was extracted from petioles of ELISA positive samples using CTAB-PVPP method and were used directly or stored at - 70 °C.

#### - Reverse transcriptase –PCR, cloning and sequencing

cDNA was synthesized by Thermoresistant MMuLV reverse transcriptase (Parstous, Iran) according to the manufacturer's protocol. RT-PCR using specific primer pairs MpF (5'- AGAAGTCGCTCACGATCTGTGAGG -3') and CpR (5'- ACAACAACACACTGTCGCC- 3') was amplified 1760 bp fragment corresponding to the complete length of coat protein and 230 nucleotides of 3' proximal end in order to detect infected samples. The RT-PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel, stained with Green viewer (Pars tous, IRAN), and visualized by UV light.

The gel extracted PCR products were cloned into, pTG19-T PCR Cloning Vector, (Vivantis, Malaysia) following the manufacturer's instructions and were transformed to *Escherichia coli* strain DH5α. Then colony-PCR using M13 and the specific primer pairs were used to confirm the recombinant clones. Random recombinant clones were selected to extract plasmid DNA using a Qiagen Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Germany). Finally, The GFLV coat protein gene has been sequenced in both directions.

**Results and Discussion:** In this study, 109 samples of symptomatic vines were collected from the vineyards of Khorasan Razavi province. 58 samples were confirmed to be infected using indirect ELISA and reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. The most symptoms in vineyards were vein banding, leaf malformation, open petiolar sinus, stunting and bushy growth of shoot, zigzagged shoot and double nodes in infected stem. The prevalence of this virus was high in the samples of Mohammadiyeh region. cDNA fragment of GFLV genome with 1760 bp in length corresponding to the GFLV coat protein gene was amplified with specific primers. Full-length sequences of the coat protein gene were recorded in the GenBank. Nucleotide sequence identities of 90-94% were found between the coat protein region of isolates of this study and that of deposited in the GenBank previously. Phylogenetic analysis carried out on the GFLV-CP gene of 5 Iranian GFLV sequences selected in this study showed that GFLV isolates of Iran and the world in the phylogenetic tree were divided into two main groups.

**Conclusion:** The virus has been detected in northwestern, northeastern and southern vineyards in Iran.

۱, 2 and 3- Assistant Professors, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

(\*- Corresponding Author Email: s.gharooni@areeo.ac.ir)

DOI: 10.22067/JPP.2021.68789.1010

Probably GFLV originated in Iran, so widespread spread of the virus in these areas is possible. The propagation of infected cuttings has played a major role in the spread of the virus in vineyards. The capsid protein gene is a conserved region and be used in the molecular phylogenetic analysis and it is the sole viral determinant of the specific transmission of GFLV by its vector. Phylogenetic analysis carried out on the GFLV-CP showed that GFLV isolates were separated into two statistically significant clusters: the first one (I) including isolates from Iran, and the second one (II) including isolates from different countries, and Iranian isolates of GFLV have distinct position in phylogentic tree. Furthermore, 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. The percentage of GFLV infected samples in summer was much lower than the samples detected in mid-spring. The results of previous research also indicated that GFLV titer in the grapevines drops during the summer hot season. High genetic diversity has been observed in coat proteins gene, this change may be due to an error in the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) enzyme during amplification or due to recombination events. Geographical area among them has a positive effect on evolution and phylogenetic relationships.

**Keywords:** Distribution, Genetic diversity, Khorasan Razavi and *Grapevine fan leaf virus*