



Research Article

Phylogenetic status of *Grapevine fanleaf virus* isolate of Lorestan province of Iran

Samira Pakbaz[✉], Mostafa Darvishnia, Arezoo Naghavi
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture,
Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 02.07.2022

Accepted: 04.09.2022

Pakbaz S, Darvishnia M, Naghavi A (2022) Phylogenetic status of *Grapevine fanleaf virus* isolate of Lorestan province of Iran. *Plant Pathology Science* 11(1):1-12.
Doi: 10.2982/PPS.11.1.1

Abstract

Introduction: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is a major grapevine infecting virus in the world. **Materials and Methods:** Grapes showing GFLV signs were sampled from the suburbs of the city of Khorramabad in Lorestan Province of Iran in spring 2020 and RT-PCR test was performed to amplify their GFLV-CP gene and the product was sequenced. **Results:** Specific primers were able to amplify a 1515 bp fragment of the CP gene. Based on the nucleotide sequence of this fragment, GFLV was first identified in this region. The nucleotide sequence similarity of this isolate was detected at 89.14-95.64% with other isolates in the NCBI library. Also, the phylogenetic tree of these isolates, based on the genomic CP region, grouped GFLV isolates into two groups I and II. The Lorestan GFLV isolate was placed in a subgroup in Group I together with GFLV isolates from the northwestern part of Iran and the Takestan isolate, and isolates from other countries were grouped in a separate subgroup of this group. Also in the phylogenetic tree, the Northeast isolates and the Fars and Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad province isolates were classified in Group II. **Conclusion:** The results of this research indicate that the virus is endemic and that its likely origin was in Iran and then spread to other parts of the world. The impact of geographic segregation on the evolution of GFLV can also be deduced.

Keywords: GFLV, RT-PCR, Sequencing

✉ Corresponding author: pakbaz.s@lu.ac.ir

مقاله پژوهشی

جایگاه نسب‌شناسی جدایه استان لرستان ایران ویروس برگ بادبزنی انگور

سمیرا پاکباز[✉]، مصطفی درویش‌نیا، آرزو نقوی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸

پاکباز س، درویش‌نیا م، نقوی ا (۱۴۰۰) جایگاه نسب‌شناسی جدایه استان لرستان ایران ویروس برگ بادبزنی انگور. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۱(۱): ۱-۱۲. Doi: 10.2982/PPS.11.1.1

چکیده

مقدمه: ویروس برگ بادبزنی (GFLV) یک ویروس مهم آلوده کننده انگور در جهان است. **مواد و روش‌ها:** انگورهای دارای نشانه GFLV از حومه شهر خرم‌آباد در استان لرستان ایران، در بهار ۱۳۹۹ نمونه‌برداری شدند و آزمون RT-PCR جهت تکثیر ژن GFLV-CP آنها انجام و محصول واکنش توالی‌یابی شد. **یافته‌ها:** آغازگرهای اختصاصی توانستند قطعه‌ای به طول ۱۵۱۵ bp مربوط به ژن CP را تکثیر کنند. بر اساس توالی نوکلئوتیدی این قطعه، GFLV برای نخستین بار در این منطقه شناسایی شد. تشابه ترادف نوکلئوتیدی این جدایه به میزان ۹۵/۶۴-۸۹/۱۴ درصد با دیگر جدایه‌های موجود در بانک ژن NCBI تشخیص داده شد. همچنین در درخت نسب‌شناسی این جدایه‌ها بر اساس ناحیه ژنومی CP، جدایه‌های GFLV در دو گروه I و II خوشه‌بندی شدند. جدایه لرستان GFLV همراه با جدایه‌های GFLV متعلق به ناحیه شمال غربی کشور و جدایه شهر تاکستان در یک زیرشاخه در گروه I قرار گرفتند و جدایه‌های مربوط به سایر کشورها نیز در این گروه در یک زیرشاخه مجزا قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های شرق کشور و استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد نیز در گروه II و در زیرشاخه‌های متفاوت قرار گرفتند. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این پژوهش بیانگر بومی بودن ویروس، خاستگاه احتمالی آن از ایران و سپس گسترش آن به سایر نقاط دنیا و نیز اثر جدایی جغرافیایی در تکامل GFLV می‌باشد.

واژگان کلیدی: توالی‌یابی، GFLV، RT-PCR

Introduction

مقدمه

انگور با نام علمی *Vitis vinifera* L. یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین محصولات باغی است که به طور وسیع در سطح جهانی کشت می‌شود و مصارف گوناگونی دارد (Reisch et al. 2012). بیماری‌های گیاهی یکی از عوامل محدودکننده در میزان تولید و کیفیت محصول انگور هستند که در بین آن‌ها بیماری‌های ویروسی نقش مهمی دارند. تاکنون ۸۶ عامل ویروسی آلوده‌کننده انگور در سراسر دنیا

[✉] نویسنده مسول: pakbaz.s@lu.ac.ir

شناسایی شده‌اند که ۱۵ عامل آن در جنس *Nepovirus* قرار دارند و یکی از مخرب‌ترین و شایع‌ترین آن‌ها ویروس برگ بادبزنی انگور (*Grapevine fanleaf virus, GFLV*) می‌باشد (Fuchs 2020). این ویروس به راسته *Picornavirales*، خانواده *Secoviridae*، زیرخانواده *Comovirinae* و زیرگروه A جنس *Nepovirus* تعلق دارد و یک عضو با دو پیکره ایزومتریکی و ژنوم دو بخشی از نوع RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت می‌باشد (Sanfacon et al. 2009). انتهای ۵' ژنوم متصل به پروتیین VPG و انتهای ۳' ژنوم نیز دارای دنباله پلی آدنینی می‌باشد. هر کدام از RNA های ژنومی یک پلی پروتیین رمزگذاری می‌کنند. پلی پروتیین مربوط به RNA2 به سه پروتیین کوچک‌تر شامل $2A^{HP}$ ، $2B^{MP}$ و $2C^{CP}$ شکسته می‌شود که به ترتیب به عنوان پروتیین مداخله کننده در تکثیر، پروتیین حرکتی و پروتیین پوششی شناخته می‌شوند (Sanfacon et al. 2009, Andert-Link et al. 2004).

ویروس برگ بادبزنی به دلیل باز شدن سینوس دمبرگ و نزدیک شدن رگبرگ‌های اصلی، ظاهری شبیه بادبزنی در برگ ایجاد می‌کند. انتقال طبیعی ویروس تنها از طریق نماتد *Xiphinema index* می‌باشد؛ اما اصلی‌ترین شیوه انتقال ویروس، قلمه‌های آلوده هستند (Andert-Link et al. 2004). میزان خسارت این بیماری بر اساس میزان تحمل و حساسیت میزبان متفاوت بوده و در ارقام متحمل باعث کاهش جزئی محصول، کاهش کیفیت میوه و عمر تاکستان‌ها، اختلال در توانایی ریشه برای جذب مواد می‌شود و در ارقام حساس ممکن است تا بیش از ۸۰ درصد کل محصول را از بین ببرد (Sanfacon et al. 2009, Andert-Link et al. 2004).

GFLV اولین بار در سال ۱۸۸۳ از اتریش و از *V. vinifera* گزارش شد و بعدها گفته شد که منشأ این ویروس از ایران قدیم بوده است و تصور می‌شود که عامل بیماری از طریق قلمه‌های آلوده به سایر نقاط جهان انتقال یافته باشد (Vuittenez 1970). این ویروس از اکثر نقاط دنیا گزارش شده است (Martelli 1990 and Savino 1990) و در ایران نیز نخستین بار در سال ۱۹۸۹ توسط پرویزی گزارش شد (Parvizi 1989) و پس از آن از تاکستانهای استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، سمنان، کردستان، کرج، زنجان و دیگر مناطق با روشهای سرولوژیکی و مولکولی شناسایی شد (Izadpanah et al. 2003, Rakhshandehroo et al. 2005, Moradi et al. 2018). در استان خراسان رضوی علاوه بر ردیابی ویروس از باغات انگور و علف‌های هرز مرغ و علف هفت بند، گیاهان قیاق، یونجه‌باغی و بارهنگ برای اولین بار به عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس معرفی شدند (Gholampour et al. 2017).

با توجه به اهمیت انگور به عنوان یکی از محصولات باغی و اقتصادی رده اول در استان لرستان و نظر به اینکه تاکنون هیچگونه گزارشی در مورد ویروسهای آلوده‌کننده تاکستان‌های استان در دسترس نیست و به دلیل سابقه حضور این ویروس‌ها در تاکستان‌های اکثر نقاط کشور، در پژوهش حاضر به

شناسایی و ردیابی ویروس برگ بادبزنی انگور، یکی از شایعترین ویروس‌های آلوده کننده انگور در تاکستان‌های عمده شهرستان خرم‌آباد و نیز تجزیه و تحلیل تبارزائی آن پرداخته خواهد شد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

چهل و چهار نمونه برگ مشکوک به آلودگی GFLV با نشانه زردی، موزاییک، رگبرگ‌روشنی، بدشکلی و باز شدن سینوس دمبرگ در بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ از تاکستان‌های عمده شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری شد. پس از ثبت تاریخ و محل نمونه‌برداری، نمونه‌ها روی یخ و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند. بخشی از هر نمونه جهت انجام آزمایشات استفاده شد و بخشی دیگر برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۷۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از برگ‌های دارای نشانه و مشکوک به GFLV به دو روش انجام شد: (a) کیت غیرستونی استخراج RNA شرکت دنایست آسیا و طبق دستورالعمل شرکت، (b) روش CTAB با اندکی تغییرات (Kargar et al. 2017). بافر استخراج در این روش حاوی 1.4M NaCl, 0.1M Tris-HCl PH=7, 1% PVP 40, 2% CTAB بود.

آزمون RT-PCR

تشکیل cDNA با استفاده از کیت تجاری Easy cDNA kit شرکت پارس طوس زیست فن‌آور انجام شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ نانوگرم از RNA کل استخراج شده به همراه ۱۰ پیکومول آغازگر اختصاصی برگشت (ترادف آغازگر در پاراگراف بعدی آمده است) در حجم ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد و بلافاصله به مدت دو دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس به میزان دو میکرولیتر dNTP (۱۰ mM)، چهار میکرولیتر 5X Buffer، ۲۰ واحد آنزیم Ribonuclease inhibitor و ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV به مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۴۷ درجه سلسیوس قرار داد شد. سپس میکروتیوب‌ها جهت توقف فعالیت آنزیم به مدت پنج دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دو میکرولیتر از cDNA و در حضور آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت مربوط به توالی کامل ژن پروتیین پوششی (CP) GFLV-F (5'- ACGGATCCGGATTAGCTGGTAGAGGAG -3') و GFLV-R (5' - GTCAAAGCTTCTAGACTGGGAAACTGG -3') انجام پذیرفت (Moradi et al. 2018).

جهت انجام این واکنش از کیت 2x PCRBio Taq Mix Red شرکت PCR Bio systems انگلیس استفاده شد. محلول پایه واکنش شامل همه مواد مورد نیاز برای تکثیر به جز cDNA و آغازگرهای اختصاصی بود. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه به منظور واسرشت‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس و گسترش رشته جدید در ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی بود. محصولات تکثیر شده در واکنش RT-PCR، برای بررسی اندازه و کیفیت در ژل آگارز یک درصد و بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و از نشانگر مولکولی 100 جفت باز شرکت پیشگام به عنوان استاندارد جهت تعیین اندازه قطعات تکثیر شده استفاده شد. همچنین در یک واکنش PCR از آب مقطر استریل به جای cDNA و به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی و رسم درخت نسب‌شناسی (Phylogenetic)

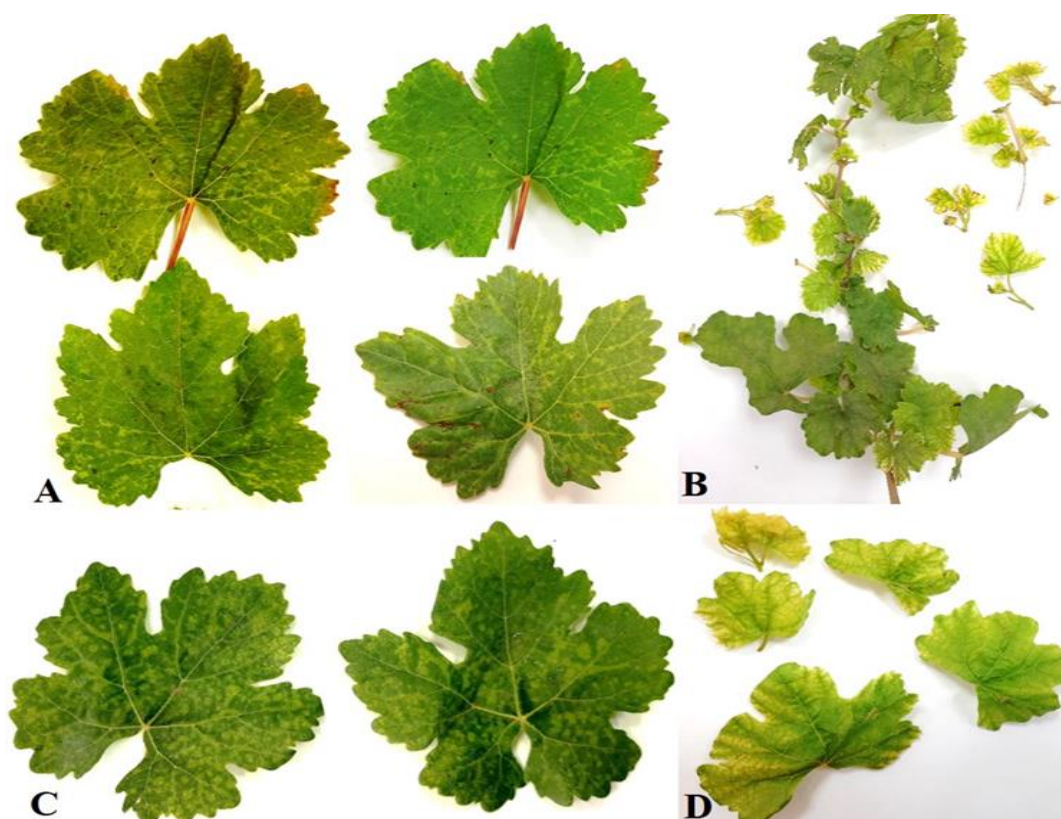
از بین جدایه‌های مورد مطالعه، یک جدایه جهت خالص‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی دریافت شده ابتدا با برنامه Chromas بازبینی و جهت تأیید به کمک ابزار Blastn با دیگر ترادف‌های ثبت شده در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. پس از تأیید صحت ویروس، به منظور مطالعه ناحیه ژن پروتیین پوششی GFLV و تعیین جایگاه این جدایه در مقایسه با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، درخت نسب‌شناسی با استفاده از نرم افزار MEGA7 و با روش Neighbor-Joining (NJ) و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap رسم شد. همچنین جهت هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، از توالی‌های ثبت شده مربوط به ناحیه GFLV-CP در بانک ژن که مربوط به میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی متفاوت بودند، استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های ژنومی (Multiple sequence alignment) با استفاده از ابزار ClustalW در نرم‌افزار MEGA7 صورت گرفت.

Results and Discussion

یافته‌ها و بحث

نشانه‌های بیماری

نشانه‌های موزاییک، زردی، لکه‌های کلروتیک، ریزبرگی، بدشکلی، رگبرگ‌روشنی، باز شدن سینوس دمبرگ و کپه‌ای شده در انگورها دیده می‌شدند (شکل ۱) که با توجه به تنوع نشانه به نظر می‌رسد علاوه بر GFLV و ویروس‌های متعلق به جنس *Nepovirus*، این تاکستان‌ها به دیگر ویروس‌های آلوده کننده انگور نیز آلوده باشند. در مطالعه‌ای در استان خراسان‌رضوی، در نمونه‌های جمع‌آوری شده از



شکل ۱. نشانه‌های مشاهده شده در نمونه‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌های شهر خرم‌آباد. (A) رگبرگ روشن، (B) زیگزاجی شدن ساقه‌ها، کم شدن فاصله میان‌گره‌ها و کپه‌ای شدن انتهای ساقه و ریزبرگی، (C) لکه‌های کلروتیک، زردی، بدشکلی و باز شدن سینوس دمبرگ.

Figure 1. Symptoms of collected samples from the vineyards of Khorramabad. A) Vein clearing, B) Zigzagged stems, shortening of internodes and bushy growth and leaf stunting, C) Chlorotic spots, D) Yellowing, leaf malformation, and opening of the petiole sinus.

باغ‌های استان که به کمک آزمایش‌های مولکولی آلودگی آنها به GFLV اثبات شده بود، نشانه متنوعی شامل رگبرگ‌زردی، بدشکلی برگ‌ها، باز شدن سینوس دمبرگ، مجتمع شدن رگبرگ‌های اصلی، تولید جوانه‌های دوگانه، کوتاه شدن میان‌گره‌ها و انشعابات غیرعادی در شاخه‌ها دیده شد (Gharouni et al. 2022).

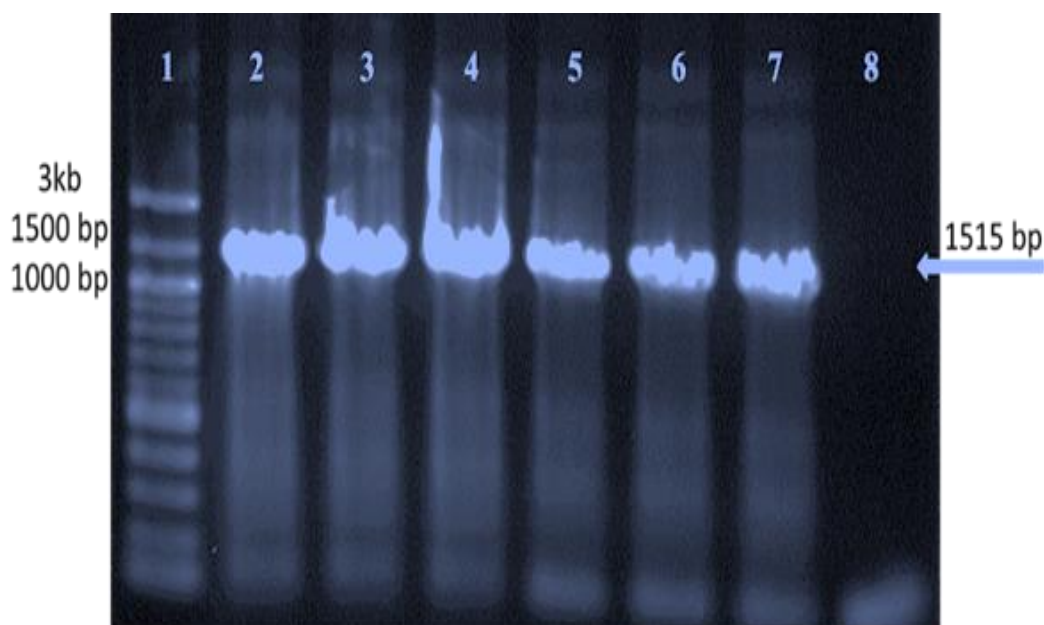
کیفیت RNA استخراج شده

RNA استخراج شده از برگ و دمبرگ انگور با استفاده از کیت غیرستونی استخراج RNA شرکت دنایست آسیا نسبت به روش CTAB غلظت و کیفیت کمتری داشت؛ بنابراین از RNA استخراج شده به کمک روش CTAB برای انجام آزمون RT-PCR استفاده شد. این روش علی‌رغم غلظت پایین

GFLV در برگ‌های انگور، توانست RNA را با کیفیت بهتری استخراج کند. از آنجا که وجود مقادیر زیاد ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها در بافت‌های انگور از چالش‌های استخراج اسید نوکلئیک با کیفیت بالا از این گیاه است، در پژوهشی چهار روش استخراج RNA جهت ردیابی GFLV با هم مقایسه شدند. در بین روش‌های مورد مقایسه اختلاف زیادی در یافته‌ها مشاهده شد، به نحوی که بعضی از روش‌ها قادر به شناسایی ویروس در بافت آلوده نبودند. روشی که بافر استخراج آن حاوی CTAB-PVPP بود، بر اساس روش‌های اسپکتروفوتومتری و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس بیشترین غلظت و بالاترین کیفیت اسید نوکلئیک را در پی داشت (Gholampour and Zakiaghl 2016).

یافته‌های آزمون RT-PCR و تعیین ترادف جدایه‌های ویروس

در واکنش RT-PCR، آغازگرهای اختصاصی توانستند قطعه‌ای حدود ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به ژن پروتیین پوششی GFLV را در نمونه‌های دارای نشانه تکثیر کنند (شکل ۲) که با یافته‌ها Moradi et al. (2018) در ردیابی GFLV از تاکستان‌های استان زنجان مطابقت داشت. پس از توالی‌یابی قطعه تکثیر شده ۱۵۱۵ جفت بازی در شرکت ماکروژن کره جنوبی، استفاده از ابزار نوکلئوتید بلاست Blastn نشان داد که جدایه مورد بررسی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP متعلق به GFLV بوده و از قابلیت بررسی فیلوژنتیکی مناسبی با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن برخوردار می‌باشد.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد. چاهک ۱، نشانگر مولکولی (100 bp). چاهک ۲ تا ۷، نمونه‌های آلوده به GFLV. چاهک ۸، شاهد منفی.

Figure 2. Electrophoretic patterns of RT-PCR product in 1% agarose gel. Lane 1, 100bp DNA ladder. Lane 2-7, GFLV infected samples. Lane 8, Negative control.

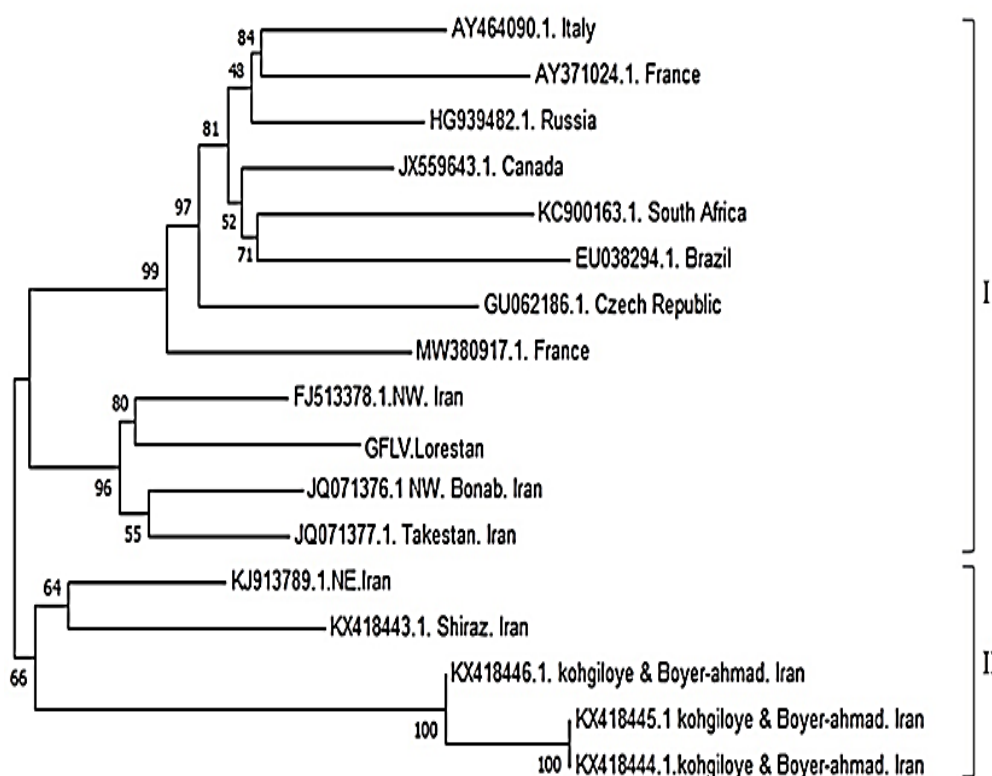
جدایه مورد مطالعه دارای ۹۵/۶۴-۸۹/۱۴ درصد تشابه نوکلئوتیدی با دیگر توالی‌های ثبت شده از این ناحیه در NCBI بود. یافته‌ها به دست آمده از مقایسه توالی‌ها در Blastn، بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی را بین جدایه لرستان و جدایه‌های ثبت شده از ناحیه شمال غربی ایران در بانک ژن نشان داد. جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی و مشخص نمودن منشاء تکاملی، هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی ژن پروتیین پوششی جدایه لرستان به همراه توالی نوکلئوتیدی متناظر ۱۶ جدایه دیگر از GFLV موجود در بانک ژن از ایران و سایر نقاط دنیا (جدول ۱) به کمک ابزار ClustalW انجام شد و درخت نسب شناسی بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتیین پوششی با روش Joining-Neighbor با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار رسم گردید.

بر این اساس، جدایه‌های مورد بررسی در درخت نسب شناسی در دو گروه I و II قرار گرفتند که هر گروه دارای دو زیرشاخه بود (شکل ۳). جدایه‌های غیرایرانی و مربوط به سایر کشورهای دنیا مانند آفریقای جنوبی، برزیل، روسیه، جدایه‌های اروپایی (فرانسه، ایتالیا و جمهوری چک) و کانادا در گروه I و به طور مجزا در یک زیرشاخه قرار گرفتند. جدایه توالی‌یابی شده از شهر خرم‌آباد (GFLV. Lorestan)

جدول ۱. شماره دسترسی و مشخصات ۱۶ جدایه GFLV موجود در بانک ژن NCBI استفاده شده در آنالیز نسب‌شناسی جدایه استان لرستان ایران.

Table 1. Accession number and characteristics of 16 GFLV isolates from NCBI Gen bank used in the phylogenetic analyses of Lorestan Province of Iran isolate.

شماره دسترسی	محل جمع‌آوری	میزبان	جدایه
Accession Number	Location	Host	Isolate
KX418446.1	Sisakht. Iran	Raspberry	Rubus2
KX418445.1	Sisakht. Iran	Raspberry	Rubus1
KX418444.1	Sisakht. Iran	Vitis vinifera	K1
KX418443.1	Shiraz, Iran	Vitis vinifera	K3
JQ071377.1	Takestan, Iran	Vitis vinifera	Takestan
FJ513378.1	NW. Iran	Vitis vinifera	MG-28
KJ913789.1	NE. Iran	Vitis vinifera	G4
JQ071376.1	Bonab. Iran	Vitis vinifera	Bonab
AY371024.1	France	Vitis vinifera	B9a
MW380917.1	France	Vitis vinifera	IC-MaA2354
HG939482.1	Russia	Vitis vinifera	Urs11
JX559643.1	Canada	Vitis vinifera	3138-07
EU038294.1	Brazil	Vitis vinifera	RS
GU062186.1	Czech Republic	Vitis vinifera	KML51
KC900163.1	South Africa	Vitis vinifera	SACH44
AY464090.1	Italy	Xiphinema index	-



شکل ۳. درخت نسب‌شناسی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی ویروس برگ بادبزنی انگور جدایه لرستان و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن NCBI. رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 به روش Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شده است.

Figure 3. Phylogenetic tree drawn based on the nucleotide sequence of coat protein gene of GFLV Lorestan isolate and some isolates in NCBI Gen bank. The tree was constructed by MEGA7 using Neighbor-Joining method with 1000 replicates of the bootstrap test.

در کنار جدایه‌های ایرانی شامل جدایه‌های ثبت شده از ناحیه شمال غربی - NW (شهرهای تبریز و بناب) و نیز تاکستان، در یک زیرشاخه جداگانه در گروه I قرار گرفت. این مدل گروه‌بندی، فرضیه منشأ گرفتن ویروس از ایران را تأیید می‌کند و با یافته‌ها سایر پژوهش‌های انجام شده (Pourrahim et al. 2007, Kargar et al. 2017, Nourinezhad et al. 2012, Panno et al. 2021) مطابقت دارد.

همچنین مطالعه‌ای در شمال غرب کشور با تجزیه و تحلیل تبارزائی ژن پروتئین حرکتی جمعیت‌های ویروس برگ بادبزنی انگور، نشان داد که ساختار جمعیت جدایه‌های GFLV توالی‌یابی شده از اسلوونی و ایران منوفیلتیک هستند و این ویروس از طریق تکامل مستقل در ایران به وجود آمده است (Sokhandan and Melcher 2012).

در گروه II جدایه‌های مربوط به ناحیه شمال شرقی ایران (NE)، استان‌های فارس (شهر شیراز) و کهگیلویه و بویراحمد (شهر سی سخت) قرار گرفتند که جدایه‌های متعلق به سی سخت در زیرشاخه مجزایی در این گروه طبقه‌بندی شدند. گروه‌بندی مجزای جدایه‌های مناطق ناحیه غرب و شرق کشور، نشان‌دهنده اثر جدایی جغرافیایی در تنوع ژنتیکی و تکامل GFLV است و با یافته‌ها پژوهش‌های گذشته مطابقت دارد. به طوری که در مطالعه‌ای که در استان فارس و کهگیلویه و بویراحمد صورت گرفت، یافته‌ها آنالیزهای نسب شناسی بر اساس ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های ایرانی GFLV در شاخه‌ای مجزا از جدایه‌های سایر نقاط دنیا قرار دارند و جدایه‌های تعیین ترادف شده در تحقیق مذکور به همراه دیگر جدایه‌های شرق کشور در گروهی مجزا از جدایه‌های غرب کشور قرار گرفتند (Kargar et al. 2017). در مطالعه دیگری روی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی جدایه‌های GFLV ایران، تمایز بین جمعیت‌های جغرافیایی جدایه‌های ایرانی تأیید شد و علت وضعیت پلی‌فیلتیک جمعیت ویروس را حضور طولانی مدت ویروس در منطقه، اثرات بنیان‌گذار و یا نوترکیبی دانستند (Gholampour et al. 2017). همچنین در مطالعه‌ای در استان خراسان رضوی، پس از تأیید آلودگی نمونه‌ها به GFLV به کمک آزمون الایزا، از آغازگرهای اختصاصی مربوط به طول کامل ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس و قسمتی از انتهای ۳' ژنوم برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی استفاده و قطعه‌ای به طول ۱۷۶۰ جفت باز تکثیر شد. میزان تشابه نوکلئوتیدی بر اساس ژن پروتئین پوششی نسبت به جدایه‌های سایر نقاط دنیا ۹۴-۹۰ درصد بود. تحلیل تبارزائی بر اساس ناحیه CP، 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 جدایی جغرافیایی در جمعیت‌های GFLV و بومی بودن آن است (Gharouni et al. 2022).

Conclusion

نتیجه‌گیری

ویروس برگ بادبزی انگور با استفاده از آزمون RT-PCR، برای نخستین بار در تاکستانهای حومه شهر خرم‌آباد در این پژوهش ردیابی شد. با توجه به اهمیت ژن پروتئین پوششی در زیست‌شناسی و تنوع ژنتیکی GFLV، این ژن جهت تحلیل تبارزایی، تکثیر و توالی‌یابی شد. در درخت نسب‌شناسی به دست آمده، جدایه مورد مطالعه GFLV در لرستان در کنار جدایه‌های ایرانی مانند جدایه‌های شمال غربی و تاکستان در یک زیرشاخه مجزا از جدایه‌های غیرایرانی قرار گرفت. همچنین جدایه‌های شرق کشور در کنار جدایه‌های استان فارس و کهگیلویه و بویراحمد در یک گروه جداگانه طبقه‌بندی شدند.

References

منابع

1. Andert-Link P, Laporte C, Valat L, Ritzenthaler C, Demangeat G, Ving E, Laval V, Pfeiffer P, Stussi-Garaud C, Fuchs M (2004) *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* 86:183-195.
2. Fuchs M (2020) Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology* 102:643-653.
3. Gharouni S, Karimishahri M, Azaddisfani F (2022) Distribution and Phylogeny of *Grapevine fanleaf virus* in Vineyards of Khorasan Razavi Province Based on Coat Protein Region, *Journal of Plant Protection* 35:421-431. (In Persian with English Abstract).
4. Gholampour Z, Kargar M, Zakiaghl M, Siampour M, Mehrvar M, Izadpanah K (2017) Dynamics of the population structure and genetic variability within Iranian isolates of *Grapevine fanleaf virus*: evidence for polyphyletic origin. *Acta Virologica*, 61:324-335.
5. Gholampour Z, Zaki-Aghl M (2016) Comparison of RNA Extraction Methods for the Identification of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Plant Protection* 30:127-133. (In Persian with English Abstract).
6. Izadpanah K, Zaki-Aghl M, Zhang Y, Daubert S, Rowhani A (2003) Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. *Plant Disease* 87:1179–1182.
7. Kargar M, Zakiaghl M, Masoumi M, Mehrvar M, Izadpanah K (2017) Analysis of genetic diversity of *Grapevine fanleaf virus* isolate from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52:375-391. (In Persian with English Abstract).
8. Martelli GP, Savino V (1990) Fanleaf Degeneration. PP.48-49. In: RC Pearson, A Goheen (eds.). *Compendium of Grape Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
9. Moradi R, Koolivand D, Eini O, Hajizadeh M (2018) Molecular Identification of four important *Nepovirus* from vineyards of Zanzan province, *Iranian Journal of Plant Protection Science* 49:99-110. (In Persian with English Abstract).
10. Nourinezhad Zarghani SH, Shams-Bakhsh M, Sokhandan-Bashir N, Pazhouhandeh M (2012) Identification and detection of Iranian isolates of *Grapevine fanleaf virus* using green-grafting and RT-PCR. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48:381-391. (In Persian with English Abstract).
11. Panno S, Caruso AG, Bertacca S, Pisciotta A, Lorenzo RD, Marchione S, Matic S, Davino S (2021) Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* in Sicily. *Agriculture* 11:496.
12. Parvizi R (1989) Incidence of *Grapevine fanleaf virus* in Uromia. *Proceed 9th Plant Protection Congress*. Iran, Mashhad. P.164.
13. Pourrahim R, Farzadfar S, Golnaraghi AR, Ahoonmanesh A (2007) Partial molecular characterization of some *Grapevine fanleaf virus* isolates from North-east of Iran. *Journal of Phytopathology* 155:754-757.

14. Rakhshandehroo F, Pourrahim R, Zamanizadeh H, Rezaee S, Mohammadi M (2005) Incidence and distribution of viruses Infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology* 153:480-484.
15. Reisch BI, Owens CL, Cousins PS (2012) Grape. In *Fruit Breeding*. Springer, Boston, MA. 225-262.
16. Sanfacon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, Vlugt vander R, 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. *Archives of Virology* 154:899-907.
17. Sokhandan-Bashir N, Melcher U (2012) Population genetic analysis of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Virology* 157:1919-1929.
18. Vuittenez A (1970) Fanleaf of Grapevine. Pp.217-228. In: NW Frazier (ed.). *Virus Disease of Small Fruits and Grapevine*. University of California, Berkley.