

## تحلیل تبارزائی ویروس ای مو (*Grapevine virus A*) از باغات انگور استان خراسان رضوی براساس بخشی از چارچوب ژنی ORF5

سارا قارونی کاردانی<sup>۱</sup>، محمود رضا کریمی شهری<sup>۱</sup>، سمیرا پاکباز<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، مشهد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. [s.gharooni@areeo.ac.ir](mailto:s.gharooni@areeo.ac.ir)

دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹

### چکیده

ویروس ای مو (*Grapevine virus A*; GVA) از اعضای جنس *Vitivirus* و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد روگوز (چروکیدگی) چوب در مو است. در طول سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰، مجموعاً ۷۹ نمونه برگ‌های دارای علائم زردی و قرمزی برگ و زوال در تاکستان‌های استان خراسان رضوی (بردسکن، کاشمر، خلیل‌آباد و محمدیه)، جمع‌آوری شد. آلودگی اولیه نمونه‌ها به GVA با استفاده از آزمون الیزا مستقیم بررسی و تایید نهایی نتایج با آزمون RT-PCR و توسط آغازگرهای اختصاصی پروتئین p10 (ORF5) انجام شد. استخراج RNA از ترشه‌های پوست سبز ساقه و برگ‌های جوان مو، با استفاده از بافر CTAB انجام شد. GVA در ۱۴ نمونه، توسط آزمون الیزا تشخیص داده شد و با استفاده از RT-PCR، در ۱۴ نمونه قطعه‌ای به طول ۲۳۸ جفت باز از پروتئین p10 تکثیر شد. محصولات تکثیر شده از چهار نمونه پس از خالص‌سازی از ژل، به حامل pTG19-T الحاق و پلاسمیدهای نوترکیب پس از انتخاب، در هر دو جهت توالی‌یابی شدند. ترادف‌های به‌دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه و شباهت نوکلئوتیدی ۸۵/۷-۹۵ درصد بود. درخت تبارزائی بر پایه پروتئین p10 نشان داد که چهار گروه اصلی وجود دارند و جدایه‌های خراسان رضوی در گروه چهارم قرار می‌گیرند. مقایسه توالی پروتئین p10 جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌ها نشان داد که منطقه پایداری در ناحیه N-ترمینال وجود دارد که شامل موتیف غنی از آرژینین و سپس موتیف انگشت‌روی است. در استان خراسان رضوی مطالعات زیادی روی سایر ویروس‌های مو صورت گرفته است، اما این اولین مطالعه در خصوص تبارزائی جدایه‌های GVA در تاکستان‌های استان خراسان رضوی می‌باشد.

کلمات کلیدی: الیزا، تحلیل تبارزائی، موتیف، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، ORF5

## Phylogenetic analysis of *Grapevine virus A* virus from the vineyards of Khorasan Razavi province based on partial ORF5 gene

Sara Gharouni-Kardani<sup>1</sup>, Mahmoud Reza Karimi Shahri<sup>1</sup>, Samira Pakbaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. <sup>2</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. [s.gharooni@areeo.ac.ir](mailto:s.gharooni@areeo.ac.ir)

Received: 22 July 2023

Revised: 05 September 2023

Accepted: 20 September 2023

### Abstract

*Grapevine virus A* (GVA) belongs to *Vitivirus* genus and is one of the most important causes of wood rugose in grapes. During the years 2019 to 2021, a total of 79 leaf samples showing symptoms of leaf yellowing and reddening from vineyards of Khorasan Razavi Province (including Bardaskan, Kashmar, Khalilabad, and Mohammadiyah) were collected. The initial infection of the samples to GVA was directly checked using an ELISA test, and the final confirmation of results was performed by RT-PCR with specific primers. Total RNA extraction was performed from scraped bark of young stems using CTAB method. GVA was detected in 14 samples through the ELISA test, and a fragment of 238 base pairs from the p10 protein was amplified in these 14 samples using RT-PCR. The amplified products from four samples were ligated into the pTG19-T vector, and the recombinant plasmids were sequenced bidirectionally. The obtained sequences were compared with the other GVA sequences in GenBank using BlastN tool and the nucleotide similarity was 85.7-95%. The phylogenetic tree based on p10 protein showed there are four main groups, and Khorasan Razavi isolates classified within the fourth group. Comparison of p10-protein sequence of Iranian isolates with other isolates showed there is a conserved region in N-terminal region, which includes an arginine-rich motif followed by a zinc-finger motif. There have been many studies on other viruses of grape in this province, but this is the first study on the phylogeny of GVA isolates in the vineyards of Khorasan Razavi province.

**Keywords:** ELISA, Motif, ORF5, Phylogenetic analysis, RT-PCR.

### How to cite:

Gharouni-kardani S, Karimi shahri M, Pakbaz S, 2024. Phylogenetic analysis of *Grapevine virus A* from the vineyards of Khorasan Razavi province based on partial ORF5 gene. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 13 (1): 73-84.

## مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از قدیمی‌ترین و گسترده‌ترین محصولات میوه‌ای در جهان است. بر اساس داده‌های در دسترس تا اوایل سال ۲۰۲۰، ۸۶ ویروس در گونه‌های *Vitis* شناسایی شده است که برخی از این ویروس‌ها با شیوع بسیار بالا همراه بوده‌اند، اما برخی دیگر از این ویروس‌ها به عنوان پاتوژن‌های غیر محتمل برای انگور شناخته شده‌اند (Fuchs 2020). ویروس‌ها می‌توانند تأثیرات منفی بر رشد و طول عمر گیاه داشته باشند و همچنین کیفیت و عملکرد محصولات انگور را تحت تأثیر قرار دهند (Naidu et al. 2014).

ویروس ای مو (*GVA*, *Grapevine virus A*) یکی از مهم‌ترین و تأثیرگذارترین ویروس‌هایی است که در سراسر جهان شناخته شده است و بیماری‌هایی مانند روگوز چوب *Rugose wood* (RW) و بیماری ساقه شیاری کوبر انگور *Kober stem grooving* (KSG) را ایجاد می‌کند (Minafra et al. 2000). این ویروس از جنس *Vitivirus* متعلق به زیرخانواده *Trivirinae* و خانواده *Betaflexiviridae* است (Adams et al. 2017). دارای ذرات رشته‌ای خمش پذیر به طول ۸۰۰ نانومتر و قطر ۱۱-۱۲ نانومتر است. ژنوم این ویروس شامل یک رشته RNA تک‌رشته با قطبیت مثبت (+ssRNA) و پنج چارچوب ژنی (ORFs) است. ORF1 مسئول ساخت پلی‌مرز RNA وابسته به RNA (RdRp) با وزن مولکولی ۱۹۴ کیلودالتون است. ORF2 پروتئینی را کد می‌کند که به نظر می‌رسد در انتقال ویروس به وسیله شپشک‌ها نقش داشته باشد (Alabi et al. 2014). ORF3 پروتئین حرکتی (MP) با وزن مولکولی ۳۱ کیلو دالتون را کد گذاری می‌کند. ORF4 کدکننده پروتئین پوششی (CP) با وزن مولکولی ۲۱٫۵ کیلودالتون و در نهایت، ORF5 پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون به نام p10 را تولید می‌کند (Galiakparov et al. 2003; Brumin et al. 2009).

ویروس ای مو می‌تواند علائم مختلفی را در مو ایجاد کند، مانند کاهش توان گیاه، تغییر شکل برگ، زردی و قرمزی، زوال، روگوز چوب و ساقه آبله‌ای. همچنین، این ویروس می‌تواند بر عملکرد مو تأثیر منفی بگذارد و کیفیت و میزان تولید انگور را کاهش دهد (Moradi et al. 2017). روگوز چوب مجموعه‌ای از بیماری‌های قابل انتقال با پیوند است که در پایه و پیوندک مشاهده می‌شود و در نهایت مرگ زود هنگام گیاه را در پی دارد. در ایتالیا این ویروس بین ۵ تا ۲۲ درصد به

محصول خسارت می‌زند (Martelli et al. 2001). *GVA* می‌تواند به وسیله شپشک‌ها به صورت نیمه‌پایا و نیز از طریق پیوند و انتقال مکانیکی بر روی میزبان‌های آزمایشی مختلف منتقل شود (La Notte et al. 1997; Yoshikawa et al. 2008).

جدایه‌های *GVA* از مناطق مختلف جهان، از جمله آفریقای جنوبی، اردن و آمریکا گزارش شده‌اند و بررسی‌ها نشان داده‌اند که توالی‌های *RdRp* و *CP* آن‌ها دارای تنوع قابل توجهی هستند (Wang Luo et al. 2013). بر اساس تحلیل شباهت نوکلئوتیدی در بخش پایانی ژنوم *GVA*، شامل بخشی از ORF3 (پروتئین حرکتی، MP)، توالی کامل ORF4 (پروتئین پوششی، CP)، توالی کامل ORF5 و بخشی از 3'UTR، مشخص شد که جدایه‌های *GVA* به سه گروه (I، II، III) تقسیم می‌شوند (Goszczyński & Jooste 2003a). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های کامل *CP* جدایه‌های ویروس توسط Alabi et al. (2014) انجام شده و جدایه‌ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند. (Glasa & Predajna 2016) جدایه‌های *GVA* را بر اساس قسمتی از توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های *CP* و ORF5 به چهار گروه فیلوژنتیک دسته‌بندی کردند.

ویروس *GVA* در ایران برای اولین بار با استفاده از روش RT-PCR و از مناطق فارس و خوزستان گزارش شد (Habibi et al. 2003). بررسی شیوع و توزیع ویروس‌های انگور در ایران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که بیشترین شیوع را GFLV با ۱۱/۱٪ داشته است و سپس GFKV (۸/۶٪) و GVA (۸/۴٪) در جایگاه‌های دوم و سوم قرار گرفتند (Rakhshandehroo et al. 2005). *GVA* از مناطق تولید انگور استان‌های فارس، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، کهگیلویه و بویراحمد و زنجان نیز گزارش شده است (Moradi et al. 2017; Rastgou et al. 2022). برای تشخیص این ویروس، از روش‌های ELISA و RT-PCR به همراه توالی‌یابی (ORF1 (RdRp) و ORF4 (CP) استفاده شده است (Afsharifar et al. 2009; Habili et al. 2003; Moradi et al. 2017).

تحلیل تبارزایی بر اساس توالی ژن پوششی توسط (Moradi et al. 2017) سه گروه اصلی (I، II، III) شناسایی شد. جدایه‌های توالی‌یابی شده پژوهش فوق در گروه I قرار داشتند و همراه با جدایه‌های دیگر از مناطق جغرافیایی مختلف مانند فلسطین اشغالی، ایتالیا، جمهوری چک، اردن، آمریکا و آفریقای جنوبی هم‌گروه بودند. این مطالعه، بر اساس توالی کامل ژن پوششی، اولین گزارش تشخیص و تحلیل تبارزایی جدایه‌های

را نشان می‌دادند ۱۴۰۰ به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تشخیص اولیه نمونه‌های آلوده به ویروس GVA، از روش الایزا مستقیم (Direct-ELISA) با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی GVA (Agdia, Italy) استفاده شد. آنتی‌بادی اختصاصی به نسبت ۱/۱۰۰۰ در بافر پوششی (حاوی ۱/۵ گرم  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ، ۹۳/۲ گرم  $\text{NaHCO}_3$  و ۰/۲ گرم  $\text{NaN}_3$  در یک لیتر آب مقطر  $\text{pH}=9/6$ ) رقیق شد و به هر چاهک پلیت اضافه شد. پس از شستشو، عصاره‌گیری برگ‌های جوان با استفاده از بافر تریس-اسید کلریدریک (شامل ۶۰ گرم تریس، ۸ گرم  $\text{NaCl}$ ، ۲۰ گرم PVP، ۱۰ گرم PEG-6000، ۰/۲ گرم  $\text{NaN}_3$  و ۰/۵ میلی لیتر Tween20 در یک لیتر آب مقطر استریل  $\text{pH}=7/6$ ) به نسبت ۱/۱۰ انجام شد و پس از زلال سازی، عصاره در چاهک‌ها ریخته شد. در چاهک‌ها آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-conjugate) که به نسبت یک در هزار در بافر کانجوگیت (بافر آنتی‌بادی حاوی ۳ درصد شیر کم چرب) رقیق شده بود، پس از شست و شو ریخته شد. بافر سوبسترا (۹۷ میلی لیتر دی اتانول آمین، و ۰/۲ گرم نیتریت سدیم در یک لیتر آب مقطر استریل  $\text{pH}=9/6$ ) به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نوری چاهک‌ها در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان (Elisa-reader) مدل (BioTek-ELX808، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

از ۱۴ نمونه‌ای که با آزمون الایزا به عنوان نمونه‌های آلوده به ویروس تایید شده بودند، برای استخراج آر. ان. آی کل استفاده شد. از تراشه‌های پوست، ساقه و برگ‌های جوان مو، با روش بهینه‌سازی شده CTAB-PVPP برای استخراج ماده ژنتیکی مو استفاده شد (Gholampour & Zakiaghl 2016).

برای سنتز رشته مکمل (cDNA)، چهار میکرولیتر از آر. ان. آی کل با یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت و پنج میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب دردمای ۶۵ درجه به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. سپس دو میکرولیتر مخلوط dNTPs، چهار میکرولیتر بافر ۵x واکنش و دو میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (Thermo-resistant H-MMuLV RT, parstous) و دو میکرولیتر آب دیونیزه به مخلوط اضافه می‌شود و میکروتیوب در ترموسایکلر ابتدا در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سپس دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار می‌گیرد.

GVA از باغات انگور ایران بود. پروتئین p10 برای GVA اهمیت زیادی دارد و به عنوان یک پروتئین متصل به RNA عمل می‌کند و دارای موتیف غنی از آرژنین و همچنین یک موتیف انگشت روی (zinc-finger) است (Galiakparov *et al.* 2003). برای مطالعه و بررسی دقیق‌تر این ناحیه در جدایه‌های ایرانی ویروس، این ژن مورد مطالعه قرار گرفت.

بر طبق آمار منتشره سال ۱۴۰۰ وزارت جهاد کشاورزی، رتبه سوم بیشترین میزان تولید از بین محصولات باغبانی در کشور مربوط به انگور با تولید حدود ۲/۸ میلیون تن و سهم ۱۲/۴ درصد از کل میزان تولید محصولات باغبانی بوده که استان‌های همدان با سهم ۱۵/۵ درصدی، فارس با سهم ۱۴/۸ درصدی، خراسان رضوی با سهم ۱۲/۶ درصدی، قزوین با سهم ۹/۱ درصدی و آذربایجان شرقی با سهم ۵/۹ درصدی در رتبه‌های اول تا پنجم تولیدکنندگان انگور کشور قرار داشته‌اند. این پنج استان جمعاً در حدود ۵۷/۹ درصد از کل تولید انگور کشور را تأمین نموده‌اند. سطح زیر کشت انگور در استان خراسان رضوی، در سال ۱۴۰۰، حدود ۲۶/۲۴۰ هکتار و مجموع میزان تولید دیم و آبی این محصول ۳۵۰/۵۳۵ تن بوده است (Ministry of Information and Communication Technology Center Statistics 2022).

در استان خراسان رضوی بعنوان سومین تولیدکننده انگور در ایران بررسی‌هایی درباره سایر ویروس‌های موثر بر مو صورت گرفته است، اما تحقیقات خاص درباره تبارزایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های GVA در باغات این استان موجود نیست. این اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی این ویروس از استان خراسان رضوی می‌باشد. با عنایت به گسترش کشت و توسعه باغات انگور در ایران، ویروس‌های مو می‌توانند منجر به کاهش عملکرد و کیفیت محصول شوند. بنابراین، درک توزیع و تنوع ژنتیکی GVA و سایر ویروس‌های انگور در ایران می‌تواند به ارائه استراتژی‌های مدیریت و پیشگیری از بیماری در تاکستان‌های کشور کمک کند.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۷۹ نمونه برگ مو از تاکستان‌های استان خراسان رضوی (بردسکن، کاشمر، خلیل‌آباد و محمدیه) در شمال شرق ایران در طول بهار و اوایل پاییز سال‌های ۱۳۹۸ تا جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها که علائم تغییر شکل برگ، زردی و قرمزی

ویرایش توالی‌ها با استفاده از نرم افزار ( Biomatters, Geneious prime 2019 (Auckland, New Zealand انجام شد. توالی‌های به‌دست آمده به شکل فایل‌های با فرمت Fasta و Text آماده شد. توالی‌های تعیین شده با توالی‌های GVA موجود در پایگاه داده GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از BLASTn مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل شباهت توالی نوکلئوتیدی و هم‌ردیف‌سازی چندگانه با استفاده از MAFFT نسخه ۷ انجام شد. پس از انتخاب بهترین مدل توسط نرم‌افزار MEGA7، بازسازی درخت تبارزایی به روش Maximum-Likelihood (ML) با مقادیر بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت. توالی‌های هم‌ردیف شده آمینو اسیدی جهت یافتن موتیف‌های حفاظت شده، با وب سایت وب‌لوگو (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) تجزیه و تحلیل شد (Crooks et al, 2004).

## نتایج

در طی سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰، نمونه‌های انگور با علائم شبیه به ویروس از تاکستان‌های خراسان رضوی شامل بردسکن، کاشمر، خلیل‌آباد و محمدیه در شمال‌شرق ایران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). شایع‌ترین علائم مشاهده شده در تاکستان‌ها شامل تغییر شکل برگ، زردی و قرمزی بود. از آنجایی که این ویروس ممکن است به همراه سایر ویروس‌ها در یک کمپلکس ظاهر شود، شناسایی GVA صرفاً بر اساس علائم ایجاد شده در انگور امکان‌پذیر نیست. برای شناسایی دقیق ویروس، لازم است از یک یا چند روش تشخیصی توصیه شده استفاده شود (Meng et al. 2017; Zherdev et al. 2018).

سپس این نمونه‌ها توسط RT-PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای مخصوص ORF5 تایید شدند. قطعه ژنومی مورد انتظار با طول ۲۳۸ جفت باز متناظر با قسمتی از توالی ORF5 تکثیر شد، در حالی که از گیاهان کنترل (گیاهان سالم) هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۲).

قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ORF5 برای چهار جدایه با شماره‌های دسترسی OP870156 تا OP870159 در بانک ژن ثبت شدند. این جدایه‌ها به ترتیب از خلیل‌آباد، کاشمر، محمدیه و بردسکن جداسازی شده‌اند (جدول ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (5'-AGGTCCACGTTTGTCTAAG-3')/R (5'-CATCGTCTGAGGTTTCTA-3') برای تکثیر قسمتی از ژن ORF5 انجام شد (Mackenzie et al. 1997). حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر آب، سه میکرولیتر از cDNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط آماده کیت PCR (Ampliqon Red Dye Master Mix, Denmark) بود.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز شامل یک چرخه در دمای ۹۵°C به مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشته‌سازی، ۵۴°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler, USA) انجام گردید.

محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی دو میکرولیتر از Green viewer الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک (Alphaimager Mini ProteinSimple, USA) عکس‌برداری شد.

چهار نمونه از ۱۴ نمونه که در آزمون مولکولی باند داده بودند، مربوط به ۴ شهرستان مختلف، برای توالی‌یابی انتخاب شدند. قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج ژل جداسازی شد. سپس قطعه ژنوم خالص‌سازی شده به پلاسمید pTG19 (Vivantis, Malaysia) الحاق و با استفاده از شوک حرارتی به سویه DH5 $\alpha$  از باکتری *Escherichia coli* انتقال یافت. غربالگری به روش کلونی‌های سفید و آبی در محیط کشت انجام شد. کلونی‌های سفید با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کلونی پی سی آر برای غربالگری نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Qiagen Plasmid Miniprep Kit, Germany) براساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند. برای تعیین توالی (Sequencing) قطعه کلون شده، ۱۰ میکرولیتر پلاسمید با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به شرکت ماکروژن (Macrogen) در کره جنوبی برای توالی‌بندی نوکلئوتیدی ارسال شدند. توالی‌یابی در هر دو جهت رفت و برگشت انجام شد.



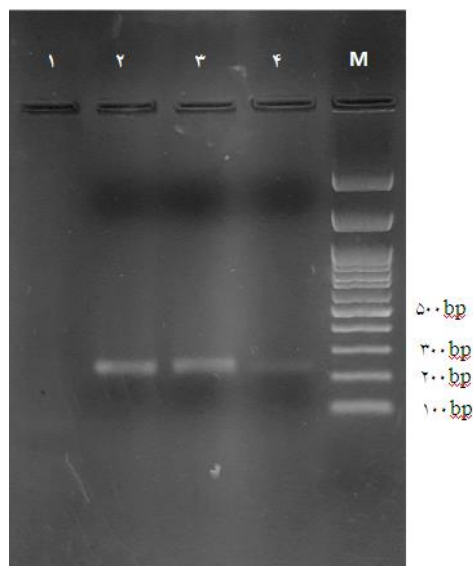
شکل ۱. علائم ویروسی مشاهده شده در نمونه‌های آلوده به GVA در تاکستان‌های استان خراسان رضوی شامل تغییر شکل برگ، زردی و قرمزی (سمت چپ). رشد ناهمگن ساقه و وجود نواحی سبز در بین بافت چوبی ساقه (سمت راست).

**Figure 1.** The viral symptoms observed in vineyards (*Vitis vinifera*) of Khorasan Razavi infected with *Grapevine virus A*, include leaf deformation, yellowing, and reddening (left). Uneven development of stem (right).

جدول ۱. مناطق نمونه برداری و تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس ای انگور.

**Table 1.** Sampling areas and the number of samples infected with *Grapevine virus A*.

Province	City	Collection date	Number of samples collected	Number of infected samples in ELISA	Number of infected samples in PCR	Host
Razavi	Khalilabad	22-Agu-2021	20	2	2	Grapevine ( <i>Vitis vinifera</i> )
	Kashmar	12-Sep-2021	20	3	3	Grapevine ( <i>Vitis vinifera</i> )
Khorasan	Mohammadiyah	22-Agu-2021	20	5	5	Grapevine ( <i>Vitis vinifera</i> )
	Bardaskan	30-Sep-2021	19	4	4	Grapevine ( <i>Vitis vinifera</i> )
Total			79	14	14	



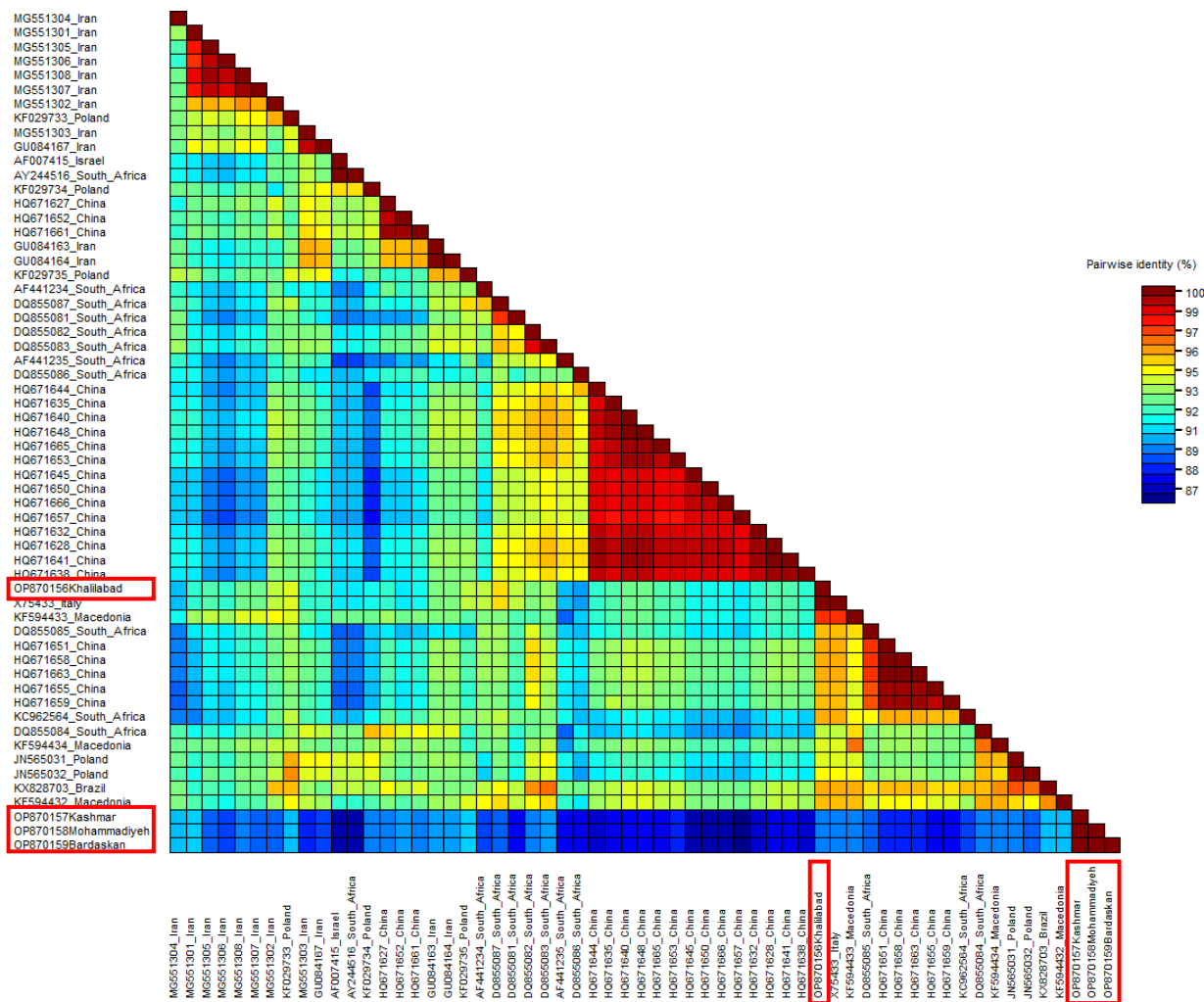
شکل ۲. الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد با جفت آغازگر اختصاصی (GVA-F/ GVA-R). راهک ۱ شاهد منفی. راهک ۲ و ۳ نمونه‌های آلوده به GVA جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی. راهک شماره ۴ شاهد مثبت. M نشانگر مولکولی (100 bp).

**Figure 2.** Results of RT-PCR using GVA specific primers (GVA-F/ GVA-R). Lane 1 negative control. Lane 2-3 GVA infected samples from Khorasan Razavi vineyards, Lane 4 positive control, M 100bp DNA ladder.

جدول ۲. راس شمار توالی‌های جدایه‌های GVA ثبت شده در NCBI جدایه‌های توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر با علامت • مشخص شده‌اند.

**Table 2.** Accession numbers of GVA sequences identified in NCBI. Strains sequenced in this study (showed with ●).

Accession no.	Host	origin
● OP870156	<i>Vitis vinifera</i>	Iran- Khalilabad
● OP870157	<i>Vitis vinifera</i>	Iran- Kashmar
● OP870158	<i>Vitis vinifera</i>	Iran- Mohammadiyah
● OP870159	<i>Vitis vinifera</i>	Iran- Bardaskan
MG551301	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551302	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551303	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551304	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551305	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551306	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551307	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
MG551308	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
GU084163	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
GU084164	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
GU084167	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
Y07764	<i>Nicotiana occidentalis</i>	Italy
X75433	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Italy
HQ671645	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671650	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671657	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671638	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671666	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671644	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671628	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671641	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671635	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671632	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671653	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671648	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671640	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671663	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671651	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671659	<i>Vitis vinifera</i> L. x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671655	<i>Vitis vinifera</i> L. x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671658	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671627	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671652	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671661	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
HQ671665	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	China
DQ855081	<i>Vitis vinifera</i> cv. Shiraz	South Africa
DQ855082	<i>Vitis vinifera</i> cv. Cinsaut Blanc	South Africa
DQ855083	<i>Vitis vinifera</i> cv. Merlot	South Africa
DQ855087	<i>Vitis vinifera</i> cv. Merlot	South Africa
AF441235	<i>Nicotiana benthamiana</i>	South Africa
DQ855086	<i>Vitis vinifera</i> cv. Shiraz	South Africa
AF441234	<i>Nicotiana benthamiana</i>	South Africa
DQ855084	<i>Vitis vinifera</i> cv. Shiraz	South Africa
DQ855085	<i>Vitis vinifera</i> cv. Shiraz	South Africa
KC962564	<i>Vitis vinifera</i> cv. Shiraz	South Africa
AY244516	<i>Nicotiana benthamiana</i>	South Africa
KF594433	<i>Vitis vinifera</i> Frankovka variety	Macedonia
KF594434	<i>Vitis vinifera</i> Vranec variety	Macedonia
KF594432	<i>Vitis vinifera</i> Vranec variety	Macedonia
KX828703	<i>Vitis vinifera</i> cv. Trajadura	Brazil
AF007415	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Israel
KF029735	<i>Vitis vinifera</i>	Poland
KF029733	<i>Vitis vinifera</i>	Poland
KF029734	<i>Vitis vinifera</i>	Poland
KF029736	<i>Vitis vinifera</i>	Poland
JN565032	<i>Vitis vinifera</i>	Poland
JN565031	<i>Vitis vinifera</i>	Poland



شکل ۳. ماتریکس مقایسه دو به دو ترادف‌های نوکلئوتیدی بخشی از ژن ORF5 چهار جدایه ایرانی (حلقه قرمز رنگ) با ۴۳ جدایه منتخب از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

**Figure 3.** Pair-by-pair comparison matrix of partial ORF5 sequence of four Iranian isolates (red circle) with 43 selected isolates from gene bank using SDT v1.2 software.

و یک جدایه از چین (HQ671657) و بالاترین همسانی (۹۵٪) بین جدایه خلیل آباد و یک جدایه از آفریقای جنوبی (DQ855087) رخ داد (شکل ۳).

تحلیل تبارزائی قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ORF5 بین جدایه‌های ایرانی که در این مطالعه تعیین شده است، همراه با جدایه‌های گزارش شده از قبل در ایران و ۴۹ جدایه موجود در بانک ژن (جدول ۳)، به چهار گروه اصلی منجر شد (شکل ۴). در این تحلیل، جدایی جغرافیایی بین جدایه‌های جدید ایرانی و سایر جدایه ها مشاهده شد. جدایه‌های کاشمر، محمدیه و بردسکن در این مطالعه مستقل به عنوان گروه چهار جدایه تعریف شدند، در حالی که جدایه خلیل آباد با جدایه‌های غرب ایران و جدایه‌های متنوعی از قاره‌های مختلف در گروه یک خوشه‌بندی شد. جدایه‌های جنوب ایران نیز در یک خوشه مجزا

مقایسه توالی‌ها نشان داد که آن‌ها با هم شباهت بالایی دارند و درصد‌های همسانی نوکلئوتیدی آنها بین ۸۹/۱ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. بالاترین سطح همسانی نوکلئوتیدی مربوط به جدایه‌های کاشمر، محمدیه و بردسکن بود که با هم ۹۹/۶٪ همسانی داشتند، در حالی که جدایه خلیل آباد با آن‌ها تنها ۸۹/۱٪ همسانی داشت. همچنین، همسانی توالی‌های این جدایه‌های جدید ایرانی با سه جدایه گزارش شده از جنوب ایران (GU084163 تا GU084167) بین ۸۸/۲٪ تا ۹۲/۹٪ و با هشت جدایه گزارش شده از غرب ایران (MG551301 تا MG551308) بین ۸۸/۲٪ تا ۹۳/۷٪ بود و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بین ۸۵/۷٪ تا ۹۵٪ همسانی داشتند. با توجه به توالی‌های GVA ثبت شده در بانک ژن، پایین‌ترین همسانی (۸۵/۷٪) بین جدایه‌های کاشمر، محمدیه و بردسکن

علائم شایع GVA در مناطق مورد بررسی شامل پیچیدگی برگ، زرد شدن برگ و قرمز شدن برگ بودند، که این علائم قبلاً در تاکستان‌های استان‌های فارس، آذربایجان شرقی و غربی، کردستان، کهگیلویه و بویراحمد، و زنجان توصیف شده بودند (CABI, 2022). با استفاده از توالی‌های قسمتی از ژن ORF5 از چهار جدایه GVA حاصل از این تحقیق با سایر جدایه‌های دنیا، درخت تبارزائی بازسازی شد و چهار گروه متمایز شناسایی شدند. نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی که از ORFهای مختلف از جمله توالی کامل CP، RDRP و قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن CP و ORF5 استفاده کرده بودند، که جدایه‌های GVA را به چهار گروه تقسیم کرده بودند، هم‌خوانی داشتند (Rakhshandehroo et al. 2005; Afsharifar et al. 2009; Predajna & Glasa 2016). با توجه به تحقیقات انجام شده، یک نکته جالب درباره ویروس GVA این است که جدایه‌های گزارش شده از مناطق جنوب و سپس جدایه‌های غرب ایران با جدایه‌های جهانی بیشترین شباهت را از لحاظ تبارزائی دارند (Moradi et al. 2017; Rastgou et al. 2022). این میزان شباهت نشان می‌دهد که این جدایه‌ها با جدایه‌های جهانی در یک منشأ تبارزائی مشترک قرار دارند. از طرف دیگر، جدایه‌های شرقی کشور، مسیر تکاملی متفاوتی را طی کرده و ارتباط دورتری با جدایه‌های جهانی و جدایه‌های ایران دارند. به عبارت دیگر، جدایه‌های شرقی ایران از جدایه‌های جهانی و دیگر جدایه‌های ایرانی جدا شده‌اند و مسیر تکامل مستقل خود را دنبال کرده‌اند. همچنین، مشخص شده است که جدایی جغرافیایی در تکامل و فیلوژنی ویروس GVA تأثیر مثبتی دارد، به این معنی که مناطق جغرافیایی متفاوت می‌توانند به شکلی مشخص بر روی تکامل ویروس تأثیر بگذارند.

همراه با جدایه‌هایی از چین و آفریقا قرار گرفتند و گروه دوم عمدتاً شامل جدایه‌های چین به همراه جدایه‌های از آفریقای جنوبی بودند.

با استفاده از نرم‌افزار Weblogo، هم‌ردیف‌سازی چند توالی پروتئینی (۷۹ اسید آمینه) قسمتی از ژن ORF5 نشان داد که اسیدآمینه‌های حفاظت شده قابل توجهی در این پروتئین وجود دارد. در بخش N-ترمینال این پروتئین‌ها، یک موتیف غنی از آرژنین (ARM: KRRRARR) و همچنین یک موتیف انگشت روی (zinc-finger) (C-X-C-X4 (GAIM)-H-X4 (NNKD)-) مشاهده می‌شود (شکل ۵).

## بحث

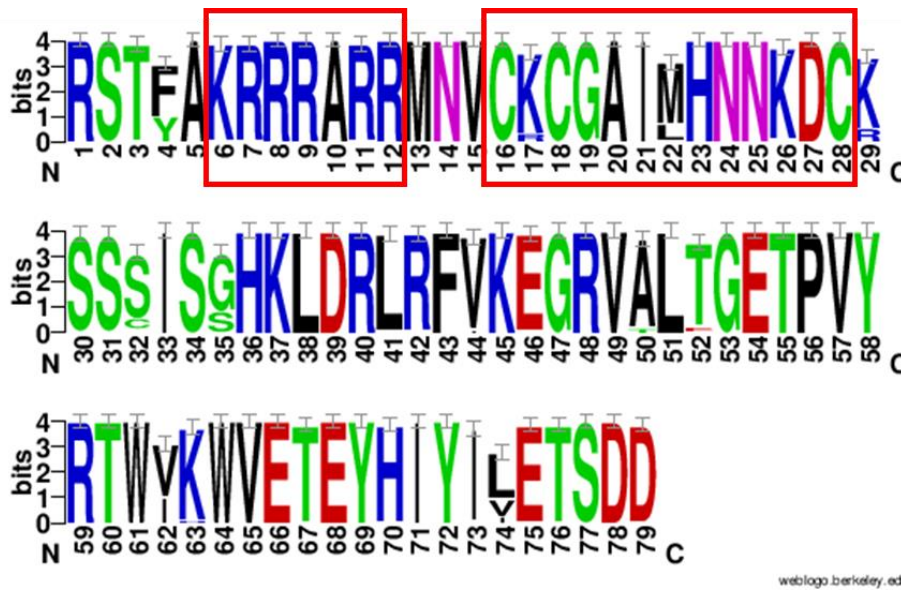
در این مطالعه، با استفاده از روش‌های ELISA و RT-PCR و با استفاده از آغازگرهایی که قسمتی از ژن ORF5 را تکثیر می‌کنند، ویروس GVA در تاکستان‌های خراسان رضوی (بردسکن، کاشمر، خلیل‌آباد و محمدیه) در شمال‌شرق ایران تشخیص داده شد. انتقال بیماری‌های ویروسی از طریق استفاده از قلمه‌های آلوده در روند تأسیس تاکستان‌های جدید و عدم وجود سیستم‌های کنترل کارآمد برای انتقال و کاشت قلمه‌های بیماری‌زدایی شده، باعث گسترش ویروس‌ها می‌شود (Poojari et al. 2020). به دلیل عدم وجود ترکیبات شیمیایی موثر برای کنترل ویروس‌ها، نرخ تکامل سریع آن‌ها از طریق جهش و نوترکیبی ژنتیکی، سازگاری آسان آن‌ها با شرایط محیطی و نقض مقاومت ژنتیکی گیاهی، مدیریت بیماری‌های ویروسی در مو بسیار دشوار است (Crnogorac et al. 2021). به همین دلیل، تشخیص ویروس/ویروئیدهای آلوده‌کننده مو به خصوص از منظر عملکرد کشاورزی پایدار اکولوژیک و حفظ محیط زیست بسیار مهم است (Rastgou et al. 2022).





شکل ۴. درخت تبارزائی جدایه‌های GVA بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی قسمتی از ژن ORF5 (۲۳۸ جفت باز) با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 بازسازی شد. مقادیر بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) بر شاخه‌ها نشان داده شده است. مقادیر بوت‌استرپ کمتر از ۵۰ نمایش داده نشده‌اند. ویروس دی مو (GVD) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. جدایه‌های ایرانی GVA به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

**Figure 4.** ML phylogenetic tree of partial ORF5 sequences using MEGA7 software (238bp), rooted by a GVD isolate. Bootstrap values (1000 replicates) are shown on the branches. Bootstrap values less than 50 are not displayed. Four clades, namely, 1 (purple), 2 (blue), 3 (green) and 4 (red) are shown. Iranian GVA strains are highlighted in red.



شکل ۵. نمایش هم‌ردیف‌سازی قسمتی از توالی پروتئین P10 جدایه‌های جدید GVA ایران توسط نرم افزار Weblogo.

**Figure 5.** Weblogo depicting the multiple sequence alignment of the partial p10 protein sequences of the new GVA isolates collected in Iran.

راهکارهای مؤثرتری برای تشخیص و مدیریت GVA کمک خواهند کرد.

#### سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی به خاطر حمایت مالی از این پروژه و بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای اجرای پژوهش در آزمایشگاه ویروس‌شناسی و پروکاریوت‌های گیاهی، اعلام می‌نمایند. 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 فرست ۵۸۸۳۶ می‌باشد.

#### References

Adams MJ, Candresse T, Hammond J, Kreuze JF, Martelli GP, *et al.*, 2017. *Betaflexiviridae*; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV); Elsevier: Waltham, MA, USA. Available online: <http://ictv.global/report> (accessed on 12 April 2020).

Afsharifar AR, Kamali M, Harighi B, Kamangar SB,

موقعیت‌های حفاظت شده در پروتئین P10 تعیین شد و تحلیل وب‌لوگو نشان داد که در قسمت N-ترمینال این پروتئین، یک موتیف غنی از آرژنین (ARM: KRRRARR) و یک موتیف انگشت روی (zinc-finger) وجود دارد. نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی که نشان داده‌اند موتیف غنی از آرژنین، مسئول فعالیت اتصال به RNA این پروتئین است، هم‌خوانی داشتند ( Jooste & Goszczynski 2003b; Galiakparov *et al.* 2003).

در حال حاضر، نیاز به تحقیقات بیشتر برای بررسی تنوع جمعیتی بین جدایه‌های GVA در مناطق مختلف ایران در طول چند سال وجود دارد. این تحقیقات باید با در نظر گرفتن اندازه نمونه و بخش‌های مختلف ژنوم ویروس که باید مورد تجزیه و تحلیل توالی قرار گیرند، انجام شوند تا شواهد بیشتری درباره مکانیسم‌های تکاملی GVA ارائه دهند، از جمله انتخاب مثبت و منفی، ترکیب ژنتیکی و تأثیر تبادل مواد گیاهی آلوده بین مناطق جغرافیایی مختلف. این یافته‌ها به توسعه

Roumi V, *et al.*, 2009. Preliminary survey of grapevine viruses in Kurdistan province (West of Iran). In Proceedings of the Extended Abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France pp 114–115.

Alabi OJ, Rwahnih MA, Mekuria TA, Naidu RA, 2014. Genetic diversity of *Grapevine Virus A* in Washington and California vineyards. *Phytopathology* 104(5): 548–60.

Brumin M, Stukalov S, Haviv S, Muruganantham M,

- Moskovitz Y, *et al.*, 2009. Post-transcriptional gene silencing and virus resistance in *Nicotiana benthamiana* expressing a *Grapevine Virus A* minireplicon. *Transgenic Research* 18: 331–45.
- CABI, 2022. *Grapevine virus A* (grapevine *Closterovirus*), CABI Compendium. CABI International. doi: 10.1079/cabicompdiem. 26189.
- Crnogorac A, Panno S, Mandić A, Gašpar M, Caruso AG, *et al.*, 2021. Survey of five major grapevine viruses infecting Blatina and Žilavka cultivars in Bosnia and Herzegovina. *Plos One* 16(1): e0245959.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE, 2004. Web Logo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14(6): 1188–90.
- 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(3): 643–53.
- Galiakparov N, Tanne E, Sela I, Gafny R, 2003. Functional analysis of the *grapevine virus A* genome. *Virology* 306(1): 42–50.
- Gholampour Z, Zakiaghil M, 2016. Comparison of RNA Extraction Methods for the Identification of *Grapevine fan leaf virus*. *Journal of Plant Protection* 30(1): 127–33.
- Goszczynski DE, Jooste AE, 2003a. Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 397–403.
- Goszczynski DE, Jooste AE, 2003b. Identification of grapevines infected with divergent variants of *Grapevine Virus A* using variant-specific RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 112(1-2): 157–64.
- Habili N, Afsharifar A, Symons RH, 2003. First detection of an Ampelovirus, a Maculavirus and two vitiviruses in Iranian table grapes. In Proceedings of the Extended Abstracts 14th Meeting ICVG, Locorotondo, Italy pp. 12–17.
- La Notte P, Buzkan N, Choueiri E, Minafra A, Martelli GP, 1997. Acquisition and transmission of *Grapevine Virus A* by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology* 1: 79–85.
- MacKenzie DJ, 1997. A standard protocol for the detection of viruses and viroids using a reverse transcription-polymerase chain reaction technique. Document CPHBT-RT PCR1. 00. The Canadian Food Inspection Agency.
- Martelli GP, 2001. Virus diseases of grapevine. eLS 1–13.
- Meng B, Martelli GP, Golino DA, Fuchs M, 2017. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management.* Switzerland, Springer, pp. 698
- Minafra A, 2000. Rugose wood of grapevines. Extended abstract ts, 30–34. In proceedings of the 13th meeting of icvg, Adelaide, Australia, 12–17 March 2000.
- Ministry of Information and Communication Technology Center Statistics, 2022. Agricultural statistics of horticultural products in 2022. Third volume. Ministry of Jihad Agriculture, Information and Communication Technology Center. 307 pages
- Moradi R, Koolivand D, Eini O, Hajizadeh M, 2017. Phylogenetic analysis of two Iranian *Grapevine Virus A* isolates using coat protein gene sequence. *Iranian Journal of Genetic Plant Breed* 6: 48–57.
- Naidu R, Rowhani A, Fuchs M, Golino D, Martelli GP, 2014. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease* 98: 1172–1185.
- Poojari S, Moreau DL, Kahl D, Ritchie M, Ali S, Úrbez-Torres JR, 2020. Disease incidence and genetic variability of economically important grapevine viruses in Nova Scotia. *Can. Journal of Plant Pathology* 42: 584–594.
- Predajna L, Glasa M, 2016. Partial sequence analysis of geographically close *Grapevine Virus A* isolates reveals their high regional variability and an intra-isolate heterogeneity. *Journal of Phytopathology* 164: 427–431.
- Rakhshandehroo F, Pourrahim R, Zadeh H Z, Rezaee S, Mohammadi M, 2005. Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology* 153 (7/8): 480–484
- Rastgou M, Roumi V, Noris E, Matić S, Ercisli S, 2022.

- Phylogenetic marker selection and protein sequence analysis of the ORF5 gene product of grapevine virus A. *Plants* 11(9): 1118.
- Roumi V, Afsharifar A, Izadpanah K, 2006. Identification, distribution and prevalence of grapevine leafroll associated viruses and *Grapevine Virus A* in Iran and their rate of incidence in grapevine cultivars. Iran. *Journal of Plant Pathology* 42(223): 240.
- Statistical yearbook of Jihad-Agriculture, 2022, ONLINE: <https://www.maj.ir/Dorsapax/userfiles/Sub65/amarbaghi1400.pdf> (In persian)
- Wang Luo S, Wei X, Zheng W, Dou Y, Cai X, 2013. Calculation of evolutionary correlation between individual genes and full-length genome: A method useful for choosing phylogenetic markers for molecular epidemiology. *Plos One* 8: e81106.
- Yoshikawa N, 2008. Capillovirus, Foveavirus, Trichovirus, Vitivirus, 3rd ed; Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, Eds. *Encyclopedia of Virology*, Academic Press, Cambridge, MA, USA. 419–427.
- Zherdev AV, Vinogradova SV, Byzova NA, Porotikova EV, Kamionskaya AM, *et al*, 2018. Methods for the diagnosis of grapevine viral infections: A review. *Agriculture* 8(12): 195.



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