

شناسایی مولکولی چهار ویروس مهم جنس نیپوویروس از تاکستان‌های استان زنجان

رقیه مرادی^۱، داود کولیوند^{۲*}، امید عینی^۲ و محمد حاجی‌زاده^۳

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۳)

چکیده

به منظور بررسی وضعیت ویروس‌های مهم متعلق به جنس نیپوویروس از تاکستان‌های استان زنجان، نمونه‌برداری در سال‌های زراعی ۹۴-۹۵ به صورت انتخابی از گیاهان دارای نشانه‌های مشکوک به بیماری‌های ویروسی انجام و در مجموع ۱۶۸ نمونه گیاهی دارای نشانه و بدون نشانه گردآوری شد. استخراج آر.ان.ای کل از بافت‌های برگ و آوندی ۵۷ نمونه بر اساس نشانه‌ها و مناطق نمونه‌برداری شده انجام گرفت و cDNA آن‌ها ساخته شد و سپس، آزمون پی‌سی‌آر توسط آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر (افزودن) بخشی از ژنگان (ژنوم) نیپوویروس‌های موزاییک آرایس (*Arabis mosaic virus*, ArMV)، بدشکلی انگور (*Grapevine deformation virus*, GDeV)، برگ بادبزی انگور (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) و لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ring spot virus*, ToRSV) انجام گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گویای تکثیر قطعه‌های مورد انتظار از ویروس‌های ArMV، GDeV، GFLV و ToRSV به ترتیب از ۱۵/۷، ۱۵/۷ و ۱۴ درصد نمونه‌ها بود. پس از تعیین توالی، همردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیرشده با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن و تحلیل تبارزائی توسط برنامه MEGA6، با روش Neighbor-Joining انجام شد. بررسی رابطه‌های تبارزائی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد، جدایه‌های ردیابی شده در این تحقیق با جدایه‌هایی از کشورهای مختلف هم‌گروه‌اند که در بیشتر موارد ارتباط جغرافیایی بین جدایه‌های ردیابی شده و دیگر جدایه‌ها را نشان می‌دهد. این نخستین تحقیق جامع بر اساس داده‌های مولکولی از نیپوویروس‌های مهم انگور در استان زنجان و نخستین گزارش ویروس بدشکلی انگور از این منطقه است.

واژه‌های کلیدی: آر.تی‌پی‌سی‌آر، ویروس بدشکلی مو، ویروس برگ بادبزی مو، ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی، ویروس موزاییک آرایس.

Molecular Identification of four important nepovirus from vineyards of Zanjan province

Roghayeh Moradi¹, Davoud Koolivand^{2*}, Omid Eini² and Mohammad Hajizadeh³

1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran

(Received: Dec. 12, 2017 - Accepted: May 24, 2018)

ABSTRACT

To determine incidence of nepoviruses in vineyards of zanjan province, 168 symptomatic and non-symptomatic samples were collected during season growing 2014-2015. Total RNA was extracted from the 57 leaves and green shoots of selected samples and then cDNAs were synthesized. Genomic segment of *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine deformation virus* (GDeV), *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) and *Tomato ring spot virus* (ToRSV) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. The result revealed that the expected bands were amplified at 15.7, 15.7, 10.5 and 14% of different samples belong to ArMV, GDeV, GFLV and ToRSV, respectively. Following sequencing and multiple alignment of nucleotide sequence of amplified fragments with isolates that retrieved from NCBI. Phylogenetic tree was created by MEGA6 software using Neighbour-Joining method. The result revealed that the Iranian isolates were grouped with reported isolates from different regions around the world based on geographical. This is the first comprehensive study based on molecular methods to determine grapevine nepoviruses in Zanjan province and the first report of GDeV from Zanjan based on our knowledge.

Keywords: Arabis mosaic virus, grapevine deformation virus, grapevine fanleaf virus, RT-PCR, tomato ringspot virus.

* Corresponding author E-mail: Koolivand@znu.ac.ir

مقدمه

انگور گیاهی از تیره انگور (Vitaceae) و متعلق به راسته عناب (Rhamnales)، حاوی ۱۴ جنس مختلف از جمله ویتیس (*Vitis*) است (Terral *et al.*, 2009). استان زنجان با تولید ۵/۶۶ درصد تولید بارور در کل کشور رتبه ششم تولید انگور در کشور را دارد. بنابر آمارنامه جهاد کشاورزی، در استان زنجان در سال ۱۳۹۴ مجموع سطح زیرکشت بارور و غیربارور انگور ۲۳۵ هکتار، مجموع سطح زیرکشت بارور و غیربارور انگور آبی ۱۴۹۹۷ هکتار، میزان تولید انگور ۴۰۲ تن و میزان تولید انگور آبی ۱۸۱۶۴ تن بوده است (Ministry of Agriculture, 2015).

آفات و بیماری‌های مختلف یکی از عامل‌های محدودکننده در میزان تولید و کیفیت محصول انگور هستند که در بین آن‌ها بیماری‌های متنوع ویروسی نقش بسزا و مهمی دارند. در بین ویروس‌های آلوده‌کننده تاکستان‌ها، ویروس‌های متعلق به جنس نیپوویروس بیشترین تعداد گونه‌های ویروسی آلوده‌کننده انگور را دارند. برخی از مهم‌ترین نیپوویروس‌های آلوده‌کننده تاکستان‌ها عبارت‌اند از: ویروس موزاییک آرابیس، ویروس برگ بادبزی مو، ویروس بدشکلی انگور و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی. نیپوویروس‌ها به‌طور عمده توسط نماتدها، برخی با بذر گیاهان آلوده و تعدادی با دانه گرده انتقال می‌یابند (Nakaune & Nakano, 2006; Sanfaçon *et al.*, 2009).

تا پیش از سال ۱۹۹۰ تنها ویروس شناسایی شده از انگور در ایران ویروس برگ بادبزی انگور بود (Izadpanah *et al.*, 2003). این ویروس در ایران نخستین بار توسط Parvizi (1989) از نمونه‌های گلخانه‌ای گزارش شد و در پی آن از تاکستان‌های استان فارس، شمال غرب، استان‌های آذربایجان غربی و کهگیلویه و بویراحمد، شمال شرق، استان‌های سمنان، خراسان و کردستان با روش‌های مولکولی و سرولوژیکی (سرم‌شناختی) شناسایی شد (Sokhandan Bashir *et al.*, 2007a; Sokhandan Bashir *et al.*, 2007b; Pourrahim *et al.*, 2004; Rakhshandehroo *et al.*, 2005).

ویروس موزاییک آرابیس در سال ۱۹۴۴ برای نخستین بار توسط Smith & Markham (1944) از انگلستان گزارش شد. این ویروس دامنه پراکنش گسترده‌ای در نواحی شرقی آسیا، آمریکا، آفریقا، استرالیا، روسیه، ترکیه و کانادا دارد (Cigsar *et al.*, 2003; Smith & Markham, 1944). این ویروس در ایران پراکندگی بالایی داشته و از گوجه‌فرنگی، انگور و رزکاری‌های مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Massumi *et al.*, 2009; Rakhshandehroo *et al.*, 2006).

ویروس بدشکلی انگور نخستین بار توسط Cigsar *et al.* (2003) از کولتیوار دیمیریت در ترکیه شناسایی شد. در ایران نیز این ویروس برای نخستین بار از در نمونه‌های انگور مناطق شمال‌غرب استان‌های آذربایجان غربی و شرقی و اردبیل ردیابی شد (Hajizadeh *et al.*, 2015).

نخستین گزارش از ویروس لکه حلقه‌ای گوجه‌فرنگی توسط Hewitt (1954) از کالیفرنیا ارائه و ویروس عامل آن توسط Gooding (1963) به‌عنوان استرین ToRSV شناسایی شد. ویروس لکه حلقه‌ای گوجه‌فرنگی در ایران از کشتزارهای سویا و تاکستان‌های استان‌های گلستان، مازندران، خوزستان، اردبیل، لرستان، گیاهان زینتی شمال کشور، استان‌های مرکزی و تهران، گوجه‌فرنگی کاری‌های استان‌های جنوب کشور و نیز باغ‌های سیب استان خراسان گزارش شده است (Golnaraghi *et al.*, 2004; Massumi *et al.*, 2009).

از جمله چالش‌های انگور کاری در ایران آسیب‌ها و عارضه‌های ناشی از بیماری‌های انگور است که می‌بایست در اولویت برنامه‌های مدیریتی گنجانده شود لذا شناسایی به‌هنگام و درست عامل‌های بیماری‌زا و اتخاذ تدابیر مناسب در جهت پیش‌گیری و مبارزه با این عامل‌ها ضروری بوده و عامل مؤثری در راستای جلوگیری از آسیب و زیان و دستیابی به عملکرد بالا در محصول انگور است.

با توجه به اینکه گزارش‌های منسجمی از ویروس‌های آلوده‌کننده تاکستان‌های استان زنجان بر اساس داده‌های مولکولی وجود ندارد، هدف این

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 4.1g KH_2PO_4 , 100g Sucrose, 1.5 (g BSA, 20g PVP40, 5.3g Ascorbic acid, pH 7.6 سرد هموژنیزه (همگن‌سازی) و در ۱۰۰۰ g و دمای $4^\circ C$ به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز (بخش) رویی در لوله‌های جدید به مدت ۲۰ دقیقه در $16800g$ دوباره سانتریفوژ شد. آنگاه رسوب ایجاد شده در $200 \mu l$ بافر سوسپانسیون (درروایه) کننده به حالت سوسپانسیون درآورده شد و سپس $25 \mu l$ محلول ۱۰ درصد SDS به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $60^\circ C$ قرار داده شدند. با افزودن $80 \mu l$ استات پتاسیم ۵ مولار به این لوله، به آرامی مخلوط شدند و سپس به مدت نیم ساعت درون یخ قرار داده شدند (در برخی موارد نیز به مدت یک شب در $4^\circ C$ قرار داده شدند). به دنبال آن، عمل سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در $16800g$ در $4^\circ C$ انجام گرفت. فاز رویی به لوله جدید انتقال و مقدار ۰/۱ حجم آن، استات سدیم ۳ مولار $5/2$ pH و به اندازه هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد به هر لوله افزوده و به آرامی مخلوط و لوله‌ها در دمای $20^\circ C$ به مدت یک ساعت قرار داده شدند. پس از آن، لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در $16800g$ سانتریفوژ شدند. فاز رویی دور ریخته و رسوب با اتانول سرد ۸۰ درصد شستشو شد. در مرحله نهایی آران‌ای استخراج شده توسط ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (سترون) سوسپانسیون شد و در دمای $80^\circ C$ - نگهداری شد.

ساخت دی‌ان‌ای مکمل

برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از ۵۷ نمونه آران‌ای استخراج شده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی و کیت ساخت (HyperScript™) cDNA محصول شرکت GeneAll کره جنوبی، در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. برای هر نمونه ۱ میکرولیتر از محلول ۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر این آغازگر (Random Hexamer) با ۴ میکرولیتر از آران‌ای کل (معادل ۲ میکروگرم) مخلوط و در دمای $65^\circ C$ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و در نهایت بی‌درنگ ۵ میکرولیتر از کیت ساخت (cDNA HyperScript™) به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه

پژوهش، شناسایی برخی ویروس‌های مهم جنس نیپوویروس از مناطق انگور کاری عمده استان زنجان با استفاده از روش‌های مولکولی است. از طرفی تشخیص همزمان ویروس‌های آلوده‌کننده انگور در آلودگی‌های مخلوط و به‌کارگیری روش‌های مولکولی برای شناسایی عامل‌های آلوده‌کننده به‌منظور تسریع روند تشخیص و همچنین بررسی ویژگی‌های مولکولی و ارتباط‌های تبارزائی جدایه‌های استان زنجان در مقایسه با دیگر جدایه‌های گزارش شده می‌تواند به‌عنوان الگویی برای ویروس‌های مهم این منطقه باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از برخی تاکستان‌های استان زنجان شامل شهرهای زنجان، آبر، ابهر، خرمدره، قیدار و سلطانیه در فصل‌های زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ بازدید به عمل آمد و با توجه به مشاهده نشانه‌های مشکوک به آلودگی‌های ویروسی شامل تغییر شکل برگ، زردی و موزاییک برگ، رگبرگ زردی، پیچیدگی ساقه، لکه حلقوی و بافت‌مردگی و دیگر نشانه‌های توصیف‌شده مربوط به ویروس‌های جنس نیپوویروس روی درختچه‌های انگور و همچنین برخی گیاهان بدون نشانه، ۱۶۸ نمونه گیاهی شامل برگ و ساقه گردآوری شد. مشخصات نمونه‌های گردآوری شده مانند نشانه‌های مشاهده‌شده، محل و تاریخ گردآوری یادداشت و نمونه‌های موردنظر روی یخ به آزمایشگاه برای بررسی بیشتر منتقل شدند.

استخراج آران‌ای

استخراج آران‌ای از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ‌ی یا آوندی، با روش (Rowhani et al. 1993) از ۵۷ نمونه برگ‌ی که به‌طور عمده نشانه‌های مشخصه ویروسی داشتند و برخی از نمونه‌های بدون نشانه انجام شد. انتخاب نمونه‌ها برای استخراج آران‌ای با توجه به نشانه، اندام دارای نشانه، محل گردآوری نمونه‌ها و نمونه‌های بدون نشانه بود. به همین منظور ابتدا بافت‌ها در ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (21.7g

جدایه و نوع نشانه‌های انتخاب و توسط شرکت بیونیر (Bioneer) کره جنوبی خالص‌سازی و توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده از محصولات پی‌سی‌آر با اطلاعات و توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) (جدول ۳) مقایسه شدند. سپس، داده‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی‌شده با داده‌های نوکلئوتیدی هرکدام از ویروس‌ها (جدول ۳) با جدایه‌های مربوط به آن ویروس که از پیش در پایگاه اطلاعاتی NCBI موجود بودند با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی چندگانه شدند و در نهایت برای ترسیم درخت تبارزائی مربوط به اعضای جنس نیپوویروس استفاده شدند.

نتایج

مشاهده‌های مزرعه‌ای

طی بازدید از تاکستان‌های مناطق مختلف استان زنجان در فصل‌های بهار، تابستان و پاییز سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در مجموع ۱۶۸ نمونه برگ گردآوری شد، اغلب نمونه‌ها دارای نشانه‌های مشکوک ویروسی مانند موزایک، لکه‌های کلروزه در برگ، پیچیدگی برگ، بدشکلی برگ، رگبرگ زردی، رگبرگ نواری، نکروز رگبرگ‌ها و تعداد محدودی نیز بدون نشانه بودند (شکل ۱).

در تاکستان‌ها نشانه‌های ویروسی در مواردی با شدت کم تا شدید قابل مشاهده بود. با توجه به بازدیدهای به‌عمل‌آمده از تاکستان‌های مختلف استان زنجان، بیشترین نمونه‌های نشانه‌های ویروسی، مربوط به شهرستان ابهر داشتند و اغلب نشانه‌ها در اواخر بهار و اوایل تابستان و یا اواخر تابستان و اوایل پاییز قابل مشاهده بود. با این وجود نشانه‌های مختلف در طول فصل رشدی در باغ‌های مختلف وجود داشت.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

نتایج ساخت cDNA و انجام پی‌سی‌آر ۵۷ نمونه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ArMV، GFLV، GDeV و ToRSV حاکی از تکثیر (افزودن) قطعه‌های مورد انتظار در مورد هرکدام از ویروس‌ها در آزمون پی‌سی‌آر بود (شکل ۲). نتایج پی‌سی‌آر با استفاده از

شد و میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, PC 320, Taiwan) قرار داده شدند. برنامه ساخت دی‌ان‌ا مکمل شامل یک چرخه دمایی 55°C به مدت یک ساعت برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس و یک چرخه در دمای 95°C به مدت پنج دقیقه برای غیرفعال کردن این آنزیم اجرا شد. افزون بر استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی برای ساخت دی‌ان‌ا مکمل، به‌منظور بررسی این آغازگرها، از آغازگرهای اختصاصی نیز برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل در مواردی استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

با توجه به cDNAهای ساخته‌شده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با هرکدام از آغازگرهای اختصاصی ویروس‌های متعلق به جنس نیپوویروس (شامل ویروس برگ بادبزی مو (Sokhandan *et al.*, 2011)، ویروس موزایک آرابیس، ویروس بدشکلی انگور و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی) (طراحی‌شده توسط نرم‌افزار Primer premier 6) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon, UK)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی هرکدام از ویروس‌ها (جدول ۱) با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر به‌صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C برای ۲ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در 94°C ، اتصال ۴۵ ثانیه در 48°C (GFLV)، 55°C (ArMV)، 60°C (GDeV) و 50°C (ToRSV) و بسط ۴۵ ثانیه در 72°C برای ۳۵ سیکل (چرخه) و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C انجام شد. به‌منظور بررسی نتایج به‌دست‌آمده از واکنش آرتی‌پی‌سی‌آر، ۴ میکرولیتر فرآورده تولیدی از هر واکنش پی‌سی‌آر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE 1X الکتروفورز شد.

تعیین توالی محصولات پی‌سی‌آر و رسم درخت فیلوژنی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برخی از جدایه‌ها (جدول ۲) برحسب نوع ویروس، موقعیت جغرافیایی

به ویروس موزاییک آرابیس، یک نمونه به ویروس بدشکلی برگ انگور و دو نمونه به ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی آلوده بودند. همچنین چهار نمونه به دو ویروس همزمان آلودگی نشان دادند که آلودگی همزمان ویروس برگ بادبزی مو و ویروس موزاییک آرابیس در دو نمونه و ویروس بدشکلی انگور و لکه حلقوی گوجه‌فرنگی در دو نمونه مشاهده شد. دو نمونه نیز آلودگی همزمان به سه ویروس مورد بررسی آلوده، ویروس برگ بادبزی مو، ویروس موزاییک آرابیس و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی داشتند (جدول ۲).

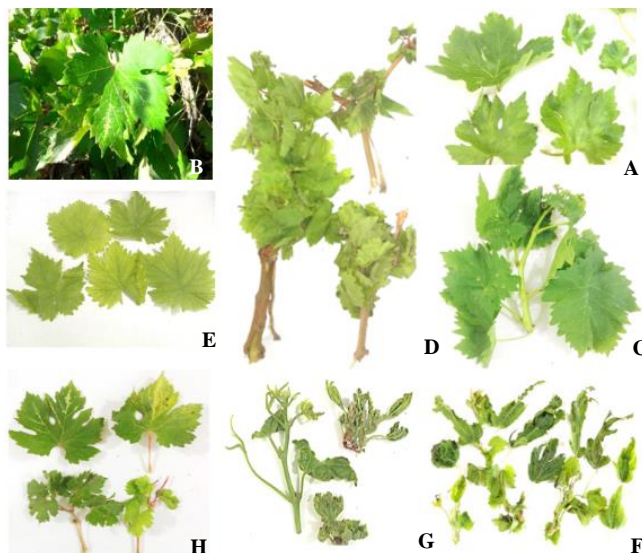
جفت آغازگر اختصاصی هر ویروس منجر به تکثیر قطعه‌هایی به طول ۷۴۰ جفت باز در ۹ نمونه (۱۵/۷٪) از نمونه‌ها) برای ArMV، ۶۸۵ جفت باز در ۹ نمونه (۱۵/۷٪) از نمونه‌ها) برای GDeV، ۱۵۱۵ جفت باز در شش نمونه (۱۰/۵٪) از نمونه‌ها) برای GFLV و ۵۰۰ جفت باز در هشت نمونه (۱۴٪) از نمونه‌ها) برای ToRSV شد (شکل ۲).

از ۵۷ نمونه گیاهی آزمایش‌شده، ده نمونه به یک ویروس منفرد آلودگی نشان دادند، در بین نمونه‌های یادشده، چهار نمونه به ویروس برگ بادبزی مو، سه نمونه

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی برخی ویروس‌های متعلق به جنس نپوویروس

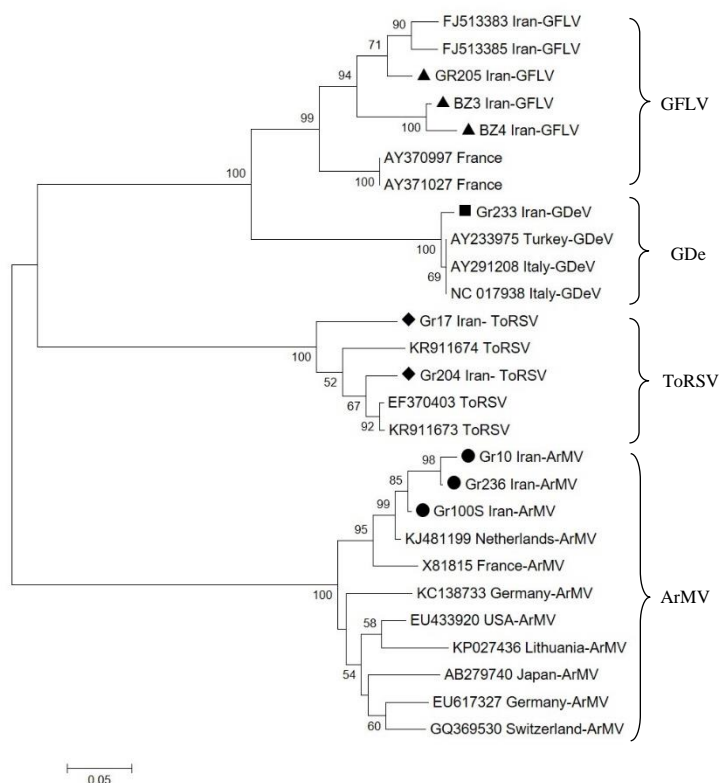
Table 1. Sequence of primers that used to detect nepovirus's memebres

Region	Length	Primer sequence	Primer	Virus	Reference
Coat Protein	740	Ar-CP-F ATCCGGCCAATGCCTTTACAGG Ar-CP-R AGAGCTGGCTGATTGTGCATC	Ar-CP-F Ar-CP-R	ArMV	This Research
Coat Protein	500	GDeV-F CACTGCGACGTGGAACAATG GDeV-R TTGTGCCAGACTCCACATG	GDeV-F GDeV-R	GDeV	This Research
Coat Protein	1515	GFLV-F ACGGCTCCGGATTAGCTGGTAGAGGAG GFLV-R GTCAAAGCTTCTAGACTGGGAAACTGG	GFLV-F GFLV-R	GFLV	Sokhandan <i>et al.</i> , 2011
Polyprotein	500	ToRSV-F GGACAAGGGCCCTTTTCACT ToRSV-R ACTCCACAGGTATACGGGCT	ToRSV-F ToRSV-R	ToRSV	This Research
Coat Protein	865	GVA-HSS7-F GACAAATGGCTCACTACG GVA-C7273-R CATCGTCTGAGGTTTCTACTAT	GVA-HSS7 GVA-C7273	GVA	This Research



شکل ۱. نشانه‌های شبه‌ویروسی در نمونه‌های مو گردآوری‌شده از مناطق مختلف استان زنجان با اشاره به ویروس ردیابی شده از هر یک. A) لکه‌های کلروزه در نمونه آلوده به ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی، B) رگبرگ روشنی در نمونه آلوده به ویروس برگ بادبزی مو، C و D) تغییر شکل برگ و کاهش اندازه در نمونه آلوده به ویروس موزاییک آرابیس، E) زردی و تغییر شکل برگ در نمونه آلوده همزمان به ویروس موزاییک آرابیس و ویروس بدشکلی انگور (F، G)، بدشکلی برگ در نمونه آلوده به ویروس بدشکلی انگور، H) رگبرگ روشنی و تغییر شکل برگ نمونه آلوده همزمان به دو ویروس موزاییک آرابیس و برگ بادبزی مو.

Figure 1. Viral-like symptoms in grapevine samples concerning detected virus. A) Chlorotic spots in infected by *Tomato ring spot virus*; B) Vein clearing in infected by *Grapevine fan leaf virus*; C and D) Leaf deformation and reduced size in infected by *Arabis mosaic virus*; E) Yellowing and leaf deformation in mixed infection by *Arabis mosaic virus* and *Grapevine deformation virus*; F and G) Vein clearing and leaf deformation in infected by *Grapevine deformation virus*; H) Mix infection by GFLV and ArMV.



شکل ۲. تحلیل تبارزائی جدایه‌های ویروس‌های برگ بادبزنی مو، بدشکلی انگور، موزاییک آرابیس و لکه حلقوی گوجه‌فرنگی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی کامل یا بخشی از ژن پروتئین پوششی با استفاده از روش Neighbour-Joining که در نرم‌افزار MEGA6 با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شده است. جدایه‌های ایرانی با نمادهای مختلف مشخص شده است.

Figure 2. Phylogenetic analysis of GFLV, ToRSV, GDeV and ArMV based on nucleotide sequences of complete or partial coat protein gene by Neighbour-Joining methods in MEGA6 software with 1000 bootstrap replicates. The new Iranian isolates showed by different symbols.

جدول ۲. آلودگی نمونه‌های گردآوری شده به ویروس‌های مختلف همراه با آلودگی‌های مخلوط

Table 2. Virus infection in different samples and mix infections

Sample	RT-PCR				Sequenced	Mix Infection	Symptoms	Region
	ToRSV	GDeV	GFLV	ArMV				
B 2	+	+				ToRSV, GDeV	RS, LD, Y	Zanjan
B 6	+	+		+		ToRSV, GDeV, ArMV	Y, LD	Abhar
BN 1			+			VC	VC	Zanjan
BP 5			+			VC	VC	Gheydar
BZ 3			+		*	VC	VC	Gheydar
BZ 4			+		*	VC	VC	Zanjan
Gr 17	+				*		CCh, Y	Soltaniyeh
Gr 10		+		+	*	GDeV + ArMV	LD,	Zanjan
Gr 204	+				*		MCCh	Abhar
Gr 220	+	+		+		ToRSV, GDeV, ArMV	LD, CCh, Y	Tarom
Gr 222	+					ToRSV	Y, RS	Mahnesan
Gr 226				+				Ab-bar
Gr 233	+	+			*	ToRSV + GDeV	LD, Y	Abhar
Gr 235		+					LD	Khoramdareh
Gr 236				+	*		MLD	Soltaniyeh
Gr 5	+	+				ToRSV+ GDeV	Y, CCh, LD	Zanjan
Gr100s				+	*			Abhar
Gr243s			+	+		GFLV+ArMV	VC, YV	Mahnesan
Na 11		+		+				Gheydar
P 24			+	+		GFLV+ArMV	VC	Zanjan
P 25		+		+		ArMV+ GDeV	LD	Zanjan

RS: Ring Spot, LD: Leaf deformation, Y: Yellowing, VC: Vein Clearing, CCh: Color Changing, MCCh: Mild Color Changing, MLD: Mild Leaf Deformation.

جدول ۳. ویژگی‌های جدایه‌های استفاده شده برای تحلیل تبارزایی (جدایه‌های این تحقیق به صورت پررنگ نشان داده شده است).

Table 3. The properties of different isolates used for phylogenetic analysis (new isolates in this research showed as Bold)

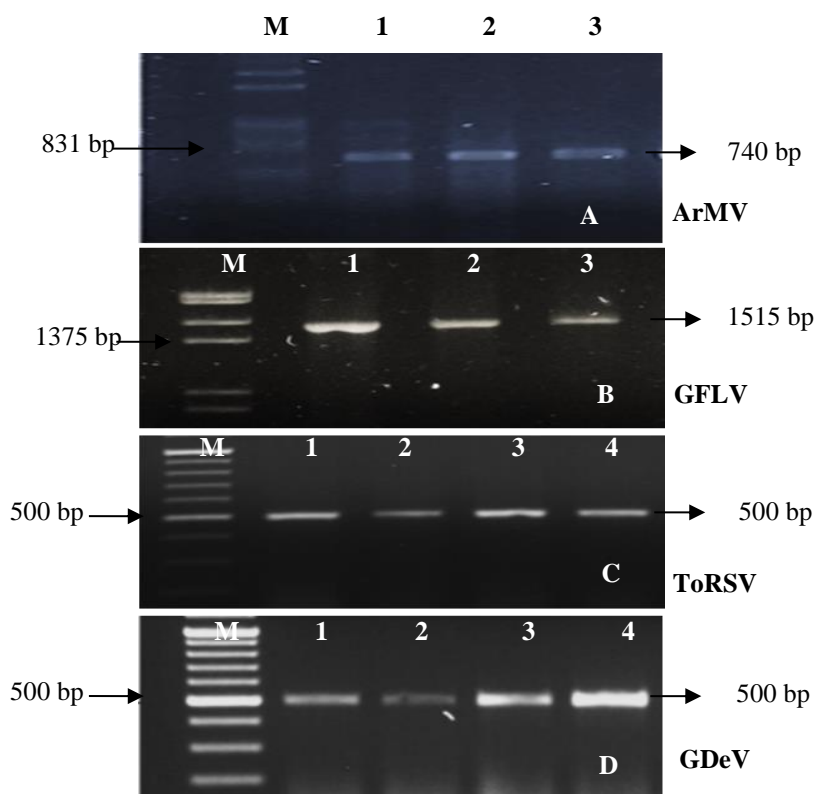
Strains	Host	Origin	GenBank Acc. No.	Virus
-	Butterbur	Japan	AB279739	ArMV
-	narcissus	Japan	AB279740	ArMV
ArMV-MD	<i>Vinca major</i>	USA	EU433920	ArMV
Lv	<i>Ligustrum vulgare</i>	Germany	EU617327	ArMV
ba	winter barley	Switzerland	GQ369530	ArMV
NW	<i>Chenopodium quinoa</i>	Germany	KC138733	ArMV
Nar-5067-1	<i>narcissus</i>	Netherlands	KJ481199	ArMV
ArMV-Lt1	<i>Crocus sp.</i>	Lithuania	KP027436	ArMV
P2-U	-	France	X81814	ArMV
P2-L	-	France	X81815	ArMV
-	-	Turkey	AY233975	GDeV
-	-	Italy	AY291208	GDeV
-	-	Italy	NC017938	GDeV
A46b	-	France	AY370997	GFLV
34d	-	France	AY371027	GFLV
MK-14	Grapevine	Iran	FJ513383	GFLV
S-4-2-2	Grapevine	Iran	FJ513385	GFLV
S-1	<i>Rubus idaeus</i>	USA	EF370403	ToRSV
Myro_CL	Plum	Chile	KR911673	ToRSV
Rasp_CL	raspberry	Iran	KR911674	ToRSV
Gr10	Grapevine	Iran (Zanjan)	MG977028	ArMV
Gr100s	Grapevine	Iran (Abhar)	MG977019	ArMV
Gr236	Grapevine	Iran (Soltaniyeh)	MG977020	ArMV
Gr233	Grapevine	Iran (Abhar)	MG977021	GDeV
BZ3	Grapevine	Iran (Gheydar)	MG977022	GFLV
BZ4	Grapevine	Iran (Zanjan)	MG977023	GFLV
Gr17	Grapevine	Iran (Tarom)	MG977024	ToRSV
Gr204	Grapevine	Iran (Abhar)	MG977025	ToRSV

نتایج تجزیه و تحلیل تبارزایی

نتیجه بلاست توالی‌های به دست آمده از قطعه‌های تکثیر شده در آزمون پی‌سی‌آر با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد، قطعه‌های تکثیر یافته، متعلق به ویروس‌های بررسی شده هستند که از آغازگر اختصاصی آن‌ها برای تکثیر بخشی از ژنگان (ژنوم) استفاده شده بود. قطعه‌های تکثیر یافته در هر چهار ویروس متعلق به ژن پروتئین پوششی کامل (ویروس برگ بادبزی مو) و یا بخشی از ژن پروتئین پوششی (ویروس موزاییک آرابیس، ویروس بدشکلی انگور و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی) بود. در مورد ویروس برگ بادبزی بیشترین شباهت با جدایه‌ای از ایران (JQ071377) بود. همچنین نتایج بلاست نشان داد، توالی‌های ویروس موزاییک آرابیس جدا شده در این تحقیق بیشترین شباهت را با جدایه Nar-5067-1 از کشور هلند دارد. شباهت ۹۷ درصدی جدایه‌های ویروس بدشکلی انگور مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی با جدایه‌ای از کشور ترکیه (AY233975) مشاهده شد. همچنین، توالی‌های به دست آمده بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی بیشترین شباهت را با ۹۶ درصد با جدایه‌ای از کشور آمریکا (EF370403) داشتند.

در تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنیک (تبارزایی) بر اساس ژن پروتئین پوششی ویروس‌های مورد بررسی، جدایه‌های مربوط به هر گونه در یک زیرشاخه جداگانه

قرار گرفتند (شکل ۳). در ویروس برگ بادبزی مو دو زیرشاخه درونی به دست آمد که جدایه‌هایی این تحقیق با جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزی مو در یک زیرشاخه قرار گرفتند و جدایه‌هایی از فرانسه در زیرشاخه دیگری گروه‌بندی شدند. جدایه‌های ویروس بدشکلی انگور در یک شاخه اصلی جداگانه نزدیک به شاخه مربوط به جدایه‌های ویروس برگ بادبزی قرار گرفتند که با ارزش بوت استرپ ۱۰۰ از یکدیگر متمایز شدند. این شاخه شامل جدایه‌های ویروس بدشکلی انگور از کشور ترکیه و ایتالیا بود که یک زیرشاخه مستقل را تشکیل دادند و تنها جدایه ایرانی ویروس بدشکلی انگور در یک زیرشاخه درونی مجزا قرار گرفت. همچنین ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی نیز تشکیل شاخه مجزا همراه با جدایه‌های ایرانی این تحقیق و جدایه‌هایی از کشورهای آمریکا و کانادا داد. افزون بر این، جدایه‌های ویروس موزاییک آرابیس تشکیل یک شاخه اصلی منفرد را داد که حاوی جدایه‌های از کشورهای مختلف از جمله هلند، فرانسه، آمریکا، ژاپن و سوئیس بود. با توجه به نتایج درخت تبارزایی، جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک آرابیس همراه با جدایه‌هایی از هلند و فرانسه در یک زیرشاخه درونی مجزا گروه‌بندی شدند و دیگر جدایه‌ها از مناطق مختلف مانند آمریکا، ژاپن آلمان و لیتوانی در یک زیرشاخه درونی دیگر مستقر شدند.



شکل ۳. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به ویروس‌های ردیابی شده از مو در ژل آگارز ۱ درصد (A) مارکر DNA Lambda، ۱، ۲ و ۳: قطعه‌های DNA تکثیرشده در RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر بخشی از منطقه رمزکننده پروتئین پوششی ویروس موزایک آرابیس؛ (B) مارکر DNA Lambda، ۱، ۲ و ۳- قطعه‌های DNA تکثیرشده در RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر منطقه رمزکننده پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو؛ (C) مارکر DNA 100bp Ladder Plus، ۱، ۲، ۳ و ۴- قطعه‌های DNA تکثیرشده در RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر بخشی از منطقه رمزکننده پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی؛ (D) مارکر DNA 100bp Ladder Plus، ۱، ۲، ۳ و ۴- قطعه‌های DNA تکثیرشده در RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر بخشی از منطقه رمزکننده پروتئین پوششی ویروس بدشکلی انگور

Figure 3. Electrophoresis of RT-PCR product in 1% agarose gel

A) M: DNA lambda marker, 1, 2, 3: amplified DNA by specific primers corresponding to partial coat protein of ArMV; B) M: DNA 100bp Ladder Plus, 1, 2, 3, 4: amplified DNA by specific primers corresponding to coat protein of GFLV; C) M: DNA 100bp Ladder Plus, 1, 2, 3, 4: amplified DNA by specific primers corresponding to partial coat protein of ToRSV; D) M: DNA 100bp Ladder Plus, 1, 2, 3, 4: amplified DNA by specific primers corresponding to partial coat protein of GDeV.

(Dolati-Baneh *et al.*, 2014). از میان ویروس‌های متعددی که انگور را آلوده می‌کنند ویروس برگ بادبزی انگور به‌عنوان ویروس اندمیک (بومی) در بیشتر مناطق کشت انگور شناسایی و گزارش شده‌اند که زیان اقتصادی زیادی را به این محصول وارد می‌کنند. نشانه‌های عمده در نمونه‌هایی که آلودگی آن‌ها به ویروس برگ بادبزی مشخص شد، شامل نشانه‌های رگبرگ زردی بود (شکل ۱). بدشکلی برگ همراه با پیچش و پارگی برگ در آلودگی به ویروس بدشکلی و نشانه‌های لکه حلقوی زردرنگ در ویروس

بحث

مشاهده‌های صحرائی این تحقیق گویای تنوع نشانه‌های ویروسی در تاکستان‌های مناطق مورد بررسی بود. تنوع نشانه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده وجود جدایه‌های متنوع ویروس و همچنین پاسخ‌های متنوع رقم‌های مختلف انگور در مناطق متفاوت باشد (Cseh *et al.*, 2012). از طرفی برخی از مناطق استان زنجان تاکستان‌هایی دارد که قدمت بسیار زیادی در حدود صد سال داشته و از نظر ذخایر ژنتیکی و ژن‌های مقاومت می‌تواند اهمیت بسیار بالایی داشته باشد

آلودگی کم نمونه‌های ردیابی شده می‌تواند مربوط به زمان نمونه‌برداری و همچنین آغازگرهای استفاده شده باشد. نتایج تحقیقات پیشین نیز نشان می‌دهد، ردیابی ویروس برگ بادبزی در طول فصل رویشی به دلیل غلظت کم ویروس برگ بادبزی در گیاهان آلوده در ماه‌های گرم سال به‌ویژه تابستان، نبود زمینه پراکنش یکنواخت ویروس در بخش‌های مختلف گیاهی و نیز آلودگی‌های پنهان در رقم (وارتیه)‌های متحمل یا سویه‌های ملایم ویروس دچار اشکال می‌شود. به دلیل اهمیت اقتصادی این ویروس در مناطق کشت انگور ردیابی کمترین میزان آلودگی ویروسی در گیاهان مادری و اندام‌های زایشی برای جلوگیری از انتشار آن‌ها و احداث تاکستان‌های جدید امری ضروری است (Vigne *et al.*, 2004).

اگرچه مشاهده‌شده که در ردیابی ویروس برگ بادبزی انگور کارایی آرتی پی‌سی‌آر نسبت به الایزا و دیگر روش‌های سرولوژیکی بیشتر است (Osman *et al.*, 2013). گاهی در برخی از جدایه‌ها به دلیل تأثیر تنوع ژنومی ویروس، ردیابی از طریق آرتی پی‌سی‌آر نیز دچار اشکال می‌شود که این مورد ناشی از وجود مواد بازدارنده و نبود تطابق ترادف آغازگرها با توالی ژنوم ویروس است (Rowhani *et al.*, 1993).

همانندسازی بخشی از پروتئین پوششی در آزمون آرتی پی‌سی‌آر و تأیید درستی قطعه همانندسازی‌شده پس از تعیین توالی مؤید آلودگی انگورها به ویروس برگ بادبزی انگور بود. نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با بانک ژن نشان داد، قطعه همانندسازی‌شده در واکنش RT-PCR قسمتی از پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی انگور است. جدایه‌های تعیین توالی شده ۹۷-۸۱ درصد شباهت با جدایه‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی دارند. ضمن اینکه نتایج این تحقیق نیز بیانگر گسترش وسیع این ویروس در تاکستان‌های زنان بود. جدایه‌های تعیین ترادف‌شده با دیگر جدایه‌های گزارش شده از ایران نزدیک بوده در یک زیرگروه قرار می‌گیرند.

همان‌طور که در نتایج مشخص شده است، میزان نمونه‌های آلوده به ArMV در مقایسه با دیگر ویروس‌ها

عامل لکه حلقوی گوجه‌فرنگی مشاهده شد (شکل ۱). در آلودگی به ویروس موزاییک آرابیس تغییر شکل و زردی برگ‌ها دیده شد (شکل ۱). لازم به یادآوری است برای بررسی نشانه‌های منحصربه‌فرد هر ویروس باید بررسی‌های روی بیماری‌زایی و نشانه‌های هر کدام از ویروس‌ها به‌صورت جداگانه و بدون هر نوع ویروس و یا بیمارگر زنده و غیرزنده بررسی شود. به همین دلیل نشانه‌های مشاهده‌شده در شکل ۱ تنها مربوط به همان ویروس ردیابی شده نیست و ممکن است دیگر عامل‌های بیمارگر زنده مانند دیگر ویروس‌ها و حتی پروکاریوت‌ها و قارچ‌ها و یا عامل‌های غیرزنده مانند کمبودهای مواد غذایی، شرایط محیطی مانند بارش تگرگ و ... در نشانه‌ها نقش داشته باشند. شکل ۱ نمونه‌هایی را نشان می‌دهد که ویروس و یا ویروس‌های مورد نظر از آن‌ها شناسایی شده‌اند و برای بررسی تخصصی نشانه‌های هر ویروس و اثر آلودگی همزمان آن‌ها نیاز به بررسی‌های دقیق‌تر است.

در مورد برخی از نمونه‌ها به‌رغم مشاهده نشانه‌ها در مشاهده‌های اولیه، نتیجه بررسی آلودگی به ویروس برای تعدادی از نمونه‌ها منفی بود. ممکن است شرایط محیطی نامطلوب موجب کاهش غلظت ویروسی شود، میزبان با دیگر ویروس‌ها آلوده شده باشد یا غالبیت دیگر ویروس‌های بیمارگر چنین نشانه‌هایی را در گیاه ایجاد کرده باشد. روش‌های مولکولی مانند RT-PCR و انتخاب آغازگرهای اختصاصی روش حساس و دقیق برای ردیابی ویروس‌های انگور بوده و این روش می‌تواند در برنامه صدور گواهی سلامت انگور نقش داشته باشد لذا، روش‌های زیادی برای استخراج موفق و با کیفیت بالای آران‌ای از انگور بهینه‌سازی شده است (Osman *et al.*, 2013).

در نمونه‌های مورد بررسی، بیشترین میزان آلودگی به ترتیب ویروس موزاییک آرابیس، ویروس بدشکلی انگور، ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی بودند. بیشترین میزان آلودگی به ویروس بدشکلی انگور (GDeV) و ویروس موزاییک آرابیس (ArMV) در بین نمونه‌های گردآوری شده از شهرستان ابهر بود. با توجه به اینکه بیماری برگ بادبزی مو معمولاً در تاکستان‌ها به‌صورت اندمیک وجود دارد یکی از دلایل درصد

آلودگی، مدیریت نشدن ناقلان و سم‌پاشی به‌هنگام درختان توسط حشره‌کش‌ها می‌تواند از دلایل گسترش آلودگی ویروسی در مناطق مختلف استان باشد. مناطقی که شرایط آب‌وهوایی سردتری دارند به‌دلیل فعالیت کمتر ناقلین، در مقایسه با مناطق گرم وضعیت آلودگی کمتر و یا بدون آلودگی را از خود نشان می‌دهند. مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج به‌دست‌آمده توسط دیگر محققان (Rakhshandehroo *et al.*, 2005) نشان داد، میانگین میزان آلودگی استان زنجان میزان بالایی داشت.

همانندسازی بخشی از پروتئین پوششی در آزمون آرتی‌پی سی‌آر و تایید صحت قطعه همانندسازی شده پس از تعیین توالی بیانگر آلودگی انگورها به ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی بود. نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با بانک ژن نشان داد، قطعه همانندسازی شده در واکنش RT-PCR قسمتی از پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی است. نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد، جدایه‌های تعیین توالی شده ۹۸-۸۵ درصد شباهت با جدایه‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی دارند. جدایه‌های تعیین ترادف شده در این تحقیق در یک زیرگروه مجزا قرار می‌گیرند.

به‌نظر می‌رسد که متداول بودن آلودگی‌های چندگانه در انگور، مربوط به زندگی طولانی گیاه، عملیات انگور کاری و انتشار و انتقال از طریق ناقلان حشره‌ای باشد (Goszczyński *et al.*, 2008; Kimura & Sinha, 2008). آزمون آلودگی‌های مخلوط به ویروس‌های بررسی شده نشانگر حضور همزمان ویروس‌های مختلف است که در جدول ۲ مشخص شده است. آلودگی مخلوط ویروس‌های مختلف انگور نیز توسط دیگر محققان در انگور گزارش شده است (Cseh *et al.*, 2012; Rakhshandehroo *et al.*, 2005).

نتیجه‌گیری کلی

باوجود اینکه برخی از ویروس‌های یادشده با روش سرولوژیک پیشتر از منطقه زنجان گزارش شده است، اما نتایج تحقیق بر اساس داده‌های مولکولی و تعیین

بالاست. شاید دلیل میزان آلودگی، آب‌وهوای معتدل تا سرد، انتشار توسط پایه‌ها، قدمت بسیار طولانی باغ‌های انگور که از پایه‌های آن‌ها برای تکثیر در دیگر مناطق استفاده شده و احتمالاً تنوع گونه‌های میزبان در مناطق مورد بررسی باشد. همچنین مشخص شده است که این ویروس‌ها با آب‌وهوای خنک و مرطوب در اروپا سازگاری زیادی در مقایسه با آب‌وهوای گرم و خشک دارد (Dostsadigh *et al.*, 2011).

ناقلان نماتدی مؤثر در انتقال ویروس موزاییک آرابیس و دیگر نیپوویروس‌ها در کشور گزارش شده است (Mojtahedi *et al.*, 1998). نمادهای ناقل نیپوویروس‌ها بیشتر در خاک‌های رسوبی و فشرده حضور دارند.

همانندسازی بخشی از پروتئین پوششی در آزمون آرتی‌پی سی‌آر و تایید صحت قطعه همانندسازی شده پس از تعیین توالی مؤید آلودگی انگورها به ویروس آرابیس موزاییک بود. نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با بانک ژن نشان داد، قطعه همانندسازی شده در واکنش RT-PCR قسمتی از پروتئین پوششی ویروس موزاییک آرابیس است. جدایه‌های تعیین توالی شده ۹۷-۸۱ درصد شباهت با جدایه‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی دارند. جدایه‌های تعیین ترادف شده در این تحقیق با جدایه‌های گزارش شده از هلند در یک زیرگروه قرار می‌گیرند.

بررسی بیشتر توالی‌های نوکلئوتیدی استرین (سویه)‌های ویروس آرابیس موزاییک موجود در مناطق مورد نمونه‌برداری در این تحقیقات امکان بررسی میزان حساسیت میزبان و نیز سازگاری میزبان به این ویروس و نیز مباحث احتمالی در مورد سابقه حضور ویروس در میزبان انگور را فراهم می‌سازد توصیه می‌شود تا منابع مقاومت به ویروس موزاییک آرابیس انگور در رقم‌های مقاوم و امکان استفاده از آن‌ها در برنامه‌های مدیریتی و کنترل بیماری در تاکستان‌ها بررسی شود.

این احتمال وجود دارد که استفاده نکردن از قلمه‌های سالم، عدم استفاده از رقم‌های مقاوم‌تر، از بین نبردن منابع آلودگی در تاکستان‌ها، وجین نکردن علف‌های هرز میزبان به‌منظور از بین بردن چرخه

توالی بخشی از ژن پروتئین پوششی به صورت جامع در مناطق عمده استان زنجان انجام شده است که بیانگر ارتباط تبارزائی این ویروس‌ها با دیگر جدایه‌های گزارش شده از ایران و جهان است. افزون بر این، با توجه به منابع موجود ویروس بدشکلی انگور (GDeV) به عنوان نخستین گزارش از حضور این ویروس در منطقه زنجان است که با جدایه‌هایی از ترکیه و ایتالیا شباهت دارد.

REFERENCES

1. Anonamous, Ministry of Agriculture. (2015). Retrieved Novembre, 2015. From: <http://www.maj.ir>. (in Farsi)
2. Cigsar, I., Digiario, M., Gokalp, K., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., De Stradis, A., Boscia, D., Martell, G. (2003). Grapevine deformation virus, a novel nepovirus from Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 85, 183-191.
3. Cseh, E., Takács, A., Kocsis, L. & Gáborjányi, R. (2012). General properties of grapevine viruses occurring in Hungary. *Journal of Central European Agriculture*, 13, 0-0.
4. Dolati-Baneh, H., Mohammadi, S. A., Abdollahi-Mandoulakani, B. & Rahmanpour, S. (2014). Association analysis for morphological traits in grapevine using SSR and AFLP markers. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 6, 45-60.
5. Dostsadigh, H., Rakhshanderoo, F. & Shamsbakhsh M. (2011). Distribution of Arabis Mosaic Virus (ArMV) on Grapevines and Roses in Western and Eastern Azarbaijan Provinces. *Journal of Plant Protection*, 34, 59-74. (in Farsi)
6. Golnaraghi, A., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S. & Ghasemi, A. (2004). Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. *Plant Disease* 88, 1069-1074.
7. Gooding, G. V. (1963). Purification and serology of a virus associated with the Grape yellow vein disease. *Phytopathology* 53.
8. Goszczynski, D., Du Preez, J. & Burger, J. (2008). Molecular divergence of *Grapevine virus A* (GVA) variants associated with Shiraz disease in South Africa. *Virus Research*, 138, 105-110.
9. Hajizadeh, M., Torchetti, E., Sokhandan-Bashir, N., Navarro, B., Doulati-Baneh, H., Martelli, G. & Hewitt, W. B. (1954). Some virus and virus-like diseases of grapevines. Bulletin Department of Agriculture, California 43, 47-64.
10. 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.
11. Kimura, S. & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 105.
12. Massumi, H., Shaabani, M., Pour, A. H., Heydarnejad, J. & Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease*, 93, 67-72.
13. Mojtahedi, H., Sturhan, D., Akhiani, A. & Barooti, S. (1980). *Xiphinema species* in Iranian vineyards. *Nematology of Mediterranean*, 8, 165-170.
14. Nakaune, R. & Nakano, M. (2006). Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*, 134, 244-249.
15. Osman, F., Hodzic, E., Omanska-Klusek, A., Olineka, T. & Rowhani, A. (2013). Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A*, *B* and *D*. *Journal of Virological Methods*, 194, 138-145.
16. Parvizi, R. (1989). Occurrence of grapevine fanleaf disease in vineyards of Ourmia. *Proceedings of the 9th Iranian Plant Protection Congress*, Mashhad, Iran.
17. Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Farzadfar, S., Rakhshandehro, F. & Golnaraghi, A. (2004). Occurrence of *Arabis mosaic virus* and *Grapevine leaf roll associated virus-3* on Grapevines in Iran. *Plant Disease*, 88, 424-424.
18. Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamani Zadeh, H., Rezaee, S. & Mohammadi, M. (2005). Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology*, 153, 480-484.
19. Rakhshandehroo, F., Zamani Zadeh, H., Modarresi, A. & Hajmansoor, S. (2006). Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. *Plant Disease*, 90, 975-975.
20. Rowhani, A., Chay, C., Golino, D. & Falk, B. (1993). Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83, 749-758.
21. Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., Van der Vlugt, R. & Wetzels, 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.

22. Smith, K. M. & Markham, R. (1944). Two new viruses affecting Tobacco and other plants. *Phytopathology*, 34.
23. Sokhandan Bashir, N., Nikkhah, S. & Hajizadeh, M. (2007a). Distinct phylogenetic positions of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran based on the movement protein gene. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 209-215.
24. Sokhandan, N., Pashaei, A. & 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, 213-221.
25. Sokhandan Bashir, N. S., Zarghani, S. N. & Hejazi, M. S. (2007b). Diversity of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Virus Research*, 128, 144-148.
26. Terral, J.-F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.-B., Jung, C. & Fabre, L. (2009). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105, 443-455.
27. Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & 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.