

تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر ژن پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو در جدایه‌های ایرانی

شاهین نوری نژاد زرقانی^{۱*}، محمود کریمی^۲، امین نوری نژاد زرقانی^۳ و محمد رضا حسین زاده^۴

^{۱*} - نویسنده مسوول: استادیار گروه حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی، پریس ابوریحان دانشگاه تهران (sh_nourinejhad@ut.ac.ir)

^۲ - دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد دامغان

^۳ - گروه مکانیک دانشگاه صنعتی ارومیه

^۴ - گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد بجنورد

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۴ تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۳۱

چکیده

پروتئین حرکتی در ویروس‌های گیاهی نقش‌های متعددی بویژه حرکت از یک سلول - به - سلول را برای ایجاد آلودگی سیستمیک بر عهده دارد. پروتئین حرکتی در ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus, GFLV*) با ایجاد ساختارهای لوله‌ای شکل در پلاسمادسماتاها مسوول انتقال سلول - به - سلول ویروس در گیاهان میزبان است. در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی ژن پروتئین حرکتی *GFLV* در جدایه‌های ایرانی جمع‌آوری شده از تاکستان‌های استان‌های مرکزی، آذربایجان شرقی، آذربایجان - غربی، زنجان، اردبیل و قزوین بررسی شد. بعلاوه فشار انتخاب وارد شده بر آنها تخمین زده شد. به این منظور تعداد ۲۴۶ نمونه به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند که از میان آنها ۳۳ نمونه توسط آزمون *DAS-ELISA* آلوده به *GFLV* تشخیص داده شدند. ژن پروتئین حرکتی طی آزمون آر تی - پی سی آر تکثیر و سپس تعیین توالی شد. نتایج آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که حداقل دو دودمان از جدایه‌های ویروس برگ بادبزنی مو براساس توالی پروتئین حرکتی در ایران وجود دارند. داده‌های حاصل از تعیین توالی این ژن نشان داد که اندازه ژن پروتئین حرکتی در تمامی جدایه‌های بررسی شده این ویروس ثابت و ۱۰۴۴ نوکلئوتید است که حاکی از عدم تحمل این ژن به رخدادهای حذف یا اضافه می‌باشد. پارامترهای ژنتیک جمعیت نشان داد که ژن پروتئین حرکتی در جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های این ویروس تحت فشار انتخاب منفی شدیدی قرار دارد، اما میزان این فشار بطور یکنواخت بر روی این ژن توزیع نشده است.

کلید واژه‌ها: *GFLV*، ژنتیک جمعیت، فیلوژنی

مقدمه

حرکت سلول - به - سلول باید از پلاسمادسماتاها عبور کند و این در حالی است که قطر پلاسمادسماتا حدود ۱/۵ نانومتر است. این اندازه به قدری کوچک است که حتی ژنوم ویروس‌های گیاهی نمی‌تواند از آن عبور کند

ویروس‌های گیاهی برای ایجاد آلودگی می‌بایست پس از تکثیر در سلول مایه‌زنی شده به سلول‌های اطراف و در نهایت در کل گیاه حرکت کرده و آلودگی سیستمیک ایجاد کنند. لذا ویروس در گام نخست برای

ویروس و یا حفظ و انباشت این جهش‌ها خواهد بود (بیریش و ایگن^{۱۲}، ۲۰۰۶؛ نوری نژاد زرقانی و همکاران^{۱۳}، ۲۰۱۲). GFLV از جنس *Nepovirus* متعلق به خانواده Secoviridae (سانفاچون و همکاران^{۱۴}، ۲۰۰۹) و دارای پیکره‌های ایزومتریک است که ژنوم آن از دو قطعه آران‌ای تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است که آران‌ای ۱- و آران‌ای ۲- نامیده می‌شوند (ریتزنتالر و همکاران^{۱۵}، ۱۹۹۱؛ سرگینی و همکاران^{۱۶}، ۱۹۹۰). انتهای ۵' آران‌ای‌های ژنومی این ویروس متصل به یک پروتئین کوچک به نام وی پی-جی^{۱۷} و انتهای ۳' نیز دارای دنباله‌ی پلی آدنینی^{۱۸} می‌باشند. هر کدام از آران‌ای‌های ژنومی یک پلی پروتئین رمز می‌کنند. پلی پروتئین رمز شده توسط آران‌ای ۲- به سه پروتئین کوچکتر بنام‌های 2A^{HP} (در تکثیر آران‌ای-۲ نقش دارد)، 2B^{MP} (پروتئین حرکتی) و 2C^{CP} (پروتئین پوششی) شکسته می‌شود (آندرت-لینک و همکاران، ۲۰۰۴).

از آنجا که ایران یکی از سرزمین‌های اولیه کشت انگور به شمار می‌رود (پیرسون و گوهرین^{۱۹}، ۱۹۸۸) به نظر می‌رسد خاستگاه GFLV نیز فلات ایران باشد (وویتنز^{۲۰}، ۱۹۷۰؛ سخندان بشیر و همکاران^{۲۱}، ۲۰۰۷b). با در نظر داشتن قدمت طولانی ویروس در تاکستان‌های ایران در چند سال گذشته مطالعات بر روی ساختار ژنتیکی این ویروس آغاز شده است و اطلاعات در مورد پروتئین پوششی^{۲۲} جدایه‌های ایرانی GFLV بررسی شده است (سخندان بشیر و همکاران، ۲۰۰۷b و ۲۰۱۱) و به تازگی آران‌ای-۲ آن به طور کامل تعیین توالی شده

(هال^۱، ۲۰۰۲). از اینرو ویروس‌های گیاهی پروتئینی بنام پروتئین حرکتی^۲ را رمز می‌کنند که در ویروس‌های با ژنوم آران‌ای تک لای مثبت^۳ به رشته آران‌ای ویروس چسبیده، با از بین بردن ساختارهای ثانویه و تعامل با پلاسمادسماتای میزبان باعث افزایش قطر آن می‌شود. بدنبال آن انتقال سلول-به-سلول خود و آران‌ای ژنومی ویروس را هدایت و در نهایت منجر به آلودگی سلول-های مجاور می‌شود (هال، ۲۰۰۲). بعلاوه پروتئین حرکتی بعنوان تعیین کننده میزبانی نیز محسوب می‌شود (دیجک ستارا و جاگر^۴، ۱۹۹۸). ویروس‌های گیاهی یا بصورت آران‌ای از پلاسمادسماتاها عبور می‌کنند و یا با ایجاد ساختارهای لوله‌ای شکل و بصورت ویروئون از درون این لوله‌ها عبور می‌کنند (لوکاس^۵، ۲۰۰۶). یکی از ویروس‌هایی که از استراتژی دوم استفاده می‌کند ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) است. این ویروس عامل بیماری برگ بادبزنی مو بوده (هویت و همکاران^۶، ۱۹۷۰) و می‌تواند تا ۸۰ درصد محصول را از بین ببرد (آندرت-لینک و همکاران^۷، ۲۰۰۴). بیماری برگ بادبزنی مو سه گروه از علائم شامل بدشکلی مسری^۸، موزاییک زرد^۹ و رگبرگ نواری^{۱۰} را ایجاد می‌کند (مارتلی و ساوینو^{۱۱}، ۱۹۸۸) که این تفاوت در علائم مربوط به تنوع در ژنوم ویروس می‌باشد چراکه در یک رقم می‌توان هر دو گروه از علائم را مشاهده کرد (نوری نژاد زرقانی و همکاران، ۱۳۹۱). یکی از منابع این تنوع در ویروس‌هایی با ژنوم آران‌ای، پلی-مرز ویروسی است که فاقد خاصیت تصحیح می‌باشد و فشار انتخاب وارد بر این جهش‌یافته‌ها باعث حذف

12- Biebricher & Eigen
13- Nourinejhad Zarghani *et al.*
14- Sanfaçon *et al.*
15- Ritzenthaler *et al.*
16- Serghini *et al.*
17- VPg (viral protein genome-linked)
18- poly A
19- Pearson & Goheen
20- Vuittenz
21- Sokhandan-Bashir *et al.*
22- coat protein

1- Hull, 2002
2- movement protein
3- positive-sense single stranded RNA viruses
4- Dijkstra & Jager
5- Lucas
6- Hewitt
7- Andret-Link *et al.*
8- infectious malformation
9- yellow mosaic
10- vein banding
11- Martelli & Savino

علایم توصیف شده توسط (مارتلی و ساوینو، ۱۹۸۸) جمع آوری شدند.

ردیابی سرولوژیکی GFLV

برای ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک از DAS-ELISA و کیت اختصاصی تهیه شده توسط شرکت بیوربا^۲ و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. در نهایت پس از افزودن ماده‌ی زمینه^۳، هر ۱۵ دقیقه یک بار میزان تغییر رنگ چاهک‌ها (جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر) با دستگاه الیزا خوان تا ۹۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. معیار مثبت بودن نمونه‌ها میزان جذبی معادل یا بالاتر از دو برابر میانگین ضریب جذب نوری چاهک‌های مربوط به نمونه‌های منفی بود (دیجک ستارا و جاگر^۴، ۱۹۹۸).

انجام آزمون آر تی-پی سی آر^۵

ابتدا استخراج آران‌ای کل از برگ‌های گیاهان آلوده به GFLV (تشخیص داده شده در الیزا) به روش روحانی و همکاران^۶ (۱۹۹۳) صورت گرفت. مقدار یکصد نانوگرم از آران‌ای استخراج شده توسط کیت SuperScript[®] III Reverse Transcriptase از شرکت لایف تکنولوژی^۷ با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش و براساس روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش بر اساس ترادف آران‌ای-۲ جدایه‌های ایرانی GFLV (شماره JQ071374 تا JQ071377) و با استفاده از نرم افزار Primer3^۸ انجام شد.

است (نوری نژاد زرقانی و همکاران ۲۰۱۳). اما اطلاعات اندکی در مورد پروتئین حرکتی این ویروس در جدایه‌های ایرانی وجود دارد و محدود به تعیین توالی آن در چند جدایه از استان آذربایجان شرقی می‌باشد (سخندان بشیر و همکاران، ۲۰۰۷a). یکی از دلایل این امر نبود آغازگرهای کارآمد و نبود اطلاعات در مورد توالی‌های جدایه‌های ایرانی بود، لذا سعی شد تا آغازگرهای دژنه^۱ بر اساس توالی جدایه‌های دیگر نقاط جهان برای تکثیر پروتئین حرکتی ارایه شود ولی این آغازگرها نیز همراه با تکثیر قطعات غیر اختصاصی بودند (سخندان بشیر و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به تعیین توالی کامل آران‌ای-۲ این ویروس در جدایه‌های ایرانی امکان طراحی آغازگرهای اختصاصی‌تر و کارآمدتر برای مطالعه این ژن در جدایه‌های ایرانی فراهم شد (نوری نژاد زرقانی، ۲۰۱۳). از این رو در این پژوهش با طراحی آغازگرهای اختصاصی، ژن پروتئین حرکتی در جدایه‌های ایرانی GFLV جمع آوری شده از چند استان کشور تکثیر، تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر بخش‌های آن بررسی شد تا با مطالعه ژنتیک جمعیت این ویروس و مقایسه آن با سایر جمعیت‌های موجود در کشورهای دیگر ضمن بررسی وجود شواهد جدید در مورد خاستگاه GFLV، کارایی احتمالی استفاده از این ژن برای ایجاد ارقام مقاوم نیز در مقایسه با سایر ژن‌های GFLV مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

نمونه‌های مشکوک به آلودگی طی دو سال متوالی در اواسط بهار و طی تابستان سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ از تاکستان‌های شبستر، شیرامین، ملکان، بناب و حومه تبریز (استان آذربایجان شرقی)، ارومیه (استان آذربایجان غربی)، تاکستان (استان قزوین)، اردبیل (استان اردبیل)، زنجان (استان زنجان) و اراک (استان مرکزی) بر اساس

2- Bioreba
3- substrate (4-nitrophenyl phosphate)
4- Dijkstra & Jager
5- RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)
6- Rowhani *et al.*
7- Life Technology
8- <http://biotools.umassmed.edu/bicapps/primer3> www.cgi

1- degenerate primers

DnaSP version 5.10 (لیبرادو و روزاس^۸، ۲۰۰۹) برای محاسبه فشار انتخاب وارد بر بخش‌های مختلف ژن پروتئین حرکتی و محاسبه پارامترهای ژنتیک جمعیت استفاده شدند. رس‌شماره‌های^۹ توالی‌های مورد استفاده در این آنالیزها در جدول ۱ آورده شده‌اند. از جدایه‌ی *Arabidopsis mosaic virus-NW* به عنوان جدایه‌ی خارج از گروه^{۱۰} در تجزیه و تحلیل داده‌های فیلوژنتیکی استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمون DAS-ELISA با پادتن چند همسانه‌ای ویژه‌ی GFLV بر روی ۲۴۶ نمونه، آلودگی به بیماری را در ۳۳ نمونه ردیابی کرد که مشخصات این نمونه‌ها بطور خلاصه در جدول ۲ آورده شده است. واکنش مثبت در آزمون الیزا (با پادتن اختصاصی GFLV) بیانگر وجود این ویروس در تاکستان‌های شمال غرب و مرکزی ایران بود. علایم گروه موزاییک زردی و رگ نوری در تاکستان‌های مورد بررسی مشاهده شد. این علایم با علایم توصیف شده توسط مارتلی و ساوینو (۱۹۸۸) مطابقت داشتند.

اندازه‌ی قطعات تکثیر شده در آر تی-پی سی آر با جفت آغازگر G2B.BamHI.as/G2B.EcoRI.as بر روی نمونه‌های الیزای مثبت با اندازه‌ی قطعه‌ی مورد انتظار مطابقت داشت (شکل ۱). به علاوه برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده و عدم تکثیر اسیدنوکلئیک گیاهی، از یک نمونه‌ی الیزا منفی آر ان ای کل استخراج و به عنوان کنترل منفی، در واکنش‌های آر تی-پی سی آر استفاده شد. در هیچ یک از واکنش‌های انجام یافته بر روی نمونه‌ی منفی قطعه‌ای سنتز نشد.

در این تحقیق از آغازگر پیش رو -5' GFLV-2B-f: CTCTCACGGTTCGAGCTYAATCTMG GCTCG-3' و آغازگر پس رو -5' GFLV-2B-r: GCRGATGGTTCGWACYRCYGGKGG GCA-3' و بر اساس غلظت‌ها و دماهای توصیه شده توسط نوری نژاد زرقانی و همکاران (۱۳۹۱) استفاده شد. بررسی نتایج آر تی-پی سی آر توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد در بافر TAE انجام شد.

همسانه‌سازی محصولات آر تی-پی سی آر و تعیین توالی نوکلئوتیدی

برای همسانه‌سازی ژن پروتئین حرکتی در جدایه‌های ایرانی GFLV، از کیت InsTAcloneTM PCR Cloning Kit و حامل pTZ57R ساخت شرکت فرمنتاس^۱ استفاده شد.

مراحل اتصال محصولات آر تی-پی سی آر و تولید سلول‌های مستعد^۲ بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پلاسمیدهای نو ترکیب مورد نظر برای تعیین توالی به شرکت فور بیس لب^۳ (آلمان) ارسال شدند. هر نمونه حداقل سه بار تعیین توالی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های نوکلئوتیدی به دست آمده از واکنش‌های تعیین توالی توسط نرم افزار BioEdit (هل، ۱۹۹۹) مونتاژ و با استفاده از نرم افزار GeneDoc ver. 2.6.002 (نیکولاس و نیکولاس^۴، ۱۹۹۷) زیرهم چینی^۵ شدند. برای رسم درخت‌های فیلوژنی از نرم افزار MEGA5 (کومار و همکاران^۶، ۲۰۰۸) و برای بررسی نو ترکیبی بین جدایه‌ها از نرم افزار Recombination Detection Program version 3 (RDP3) (هیث و همکاران^۷، ۲۰۰۶) استفاده شد. نرم افزار

- 1- Fermentas
- 2- competent cells
- 3- 4BaseLab
- 4- Nicholas & Nicholas
- 5- alignment
- 6- Kumar *et al.*
- 7- Heath *et al.*

- 8- Librado & Rozas
- 9- Accession numbers
- 10- out-group

جدول ۱- رس شماره‌ها و سایر مشخصات جدایه‌های ویروس برگ بادبزی مو مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

نام جدایه	رس شماره	کشور	وارثه مو
F13	NC_003623	France	Muscat
Nw	AY017338	Germany	Huxel
ArMV-NW	AY017339	Germany	Pinot gris
A 17a	AY780899	France	Chardonnay
A17b	AY780900	France	Chardonnay
A17d	AY780901	France	Chardonnay
A 10a	AY780902	France	Chardonnay
B 19a	AY780903	France	Chardonnay
Vol45c 1	DQ922652	Slovenia	Volovnik
Vol47c 1	DQ922653	Slovenia	Volovnik
Vol50c 2	DQ922661	Slovenia	Volovnik
Vol52c 1	DQ922667	Slovenia	Volovnik
Vol54c 1	DQ922668	Slovenia	Volovnik
Vol54c 2	DQ922669	Slovenia	Volovnik
Vol55c 3	DQ922673	Slovenia	Volovnik
Vol57c 3	DQ922676	Slovenia	Volovnik
Vol57c 5	DQ922678	Slovenia	Volovnik
GHu	EF426852	Hungary	Gloriae Hungariae
La3-6	Fj831678	Iran	Tabriz
WACH911	GQ332364	USA	Chardonnay
WAPN165	GQ332365	USA	Pinot noir
WAPN6132	GQ332366	USA	Pinot noir
WAPN57	GQ332367	USA	Pinot noir
WAPN173	GQ332368	USA	Pinot noir
WAPN8133	GQ332369	USA	Pinot noir
WAME1492	GQ332370	USA	Merlot
WACF2142	GQ332371	USA	Cabernet franc
WACF2142	GQ332371	USA	Cabernet franc
CAZINA1	GU972571	USA	Zinfandel
CAZINA2	GU972572	USA	Zinfandel
CAZINA3	GU972573	USA	Zinfandel
CAZINA4	GU972574	USA	Zinfandel
CAZINA4	GU972574	USA	Zinfandel
CAZINA5	GU972575	USA	Zinfandel
CACSB2	GU972577	USA	Cabernet Sauvignon
CACSB5	GU972580	USA	Cabernet Sauvignon
CACSC1	GU972581	USA	Cabernet Sauvignon
CACSC2	GU972582	USA	Cabernet Sauvignon
CACSC3	GU972583	USA	Cabernet Sauvignon
CACSC4	GU972584	USA	Cabernet Sauvignon

داشت که این اندازه در تمامی جدایه‌های GFLV تعیین توالی شده ثابت بوده (سخندان بشیر و همکاران، ۲۰۰۹ و a ۲۰۰۷؛ اولیور و همکاران^۱، ۲۰۱۰) و احتمالاً نشان دهنده‌ی این است که تغییر در اندازه‌ی این ژن احتمالاً برای ویروس مخرب است و هیچ گونه رخداد حذف یا

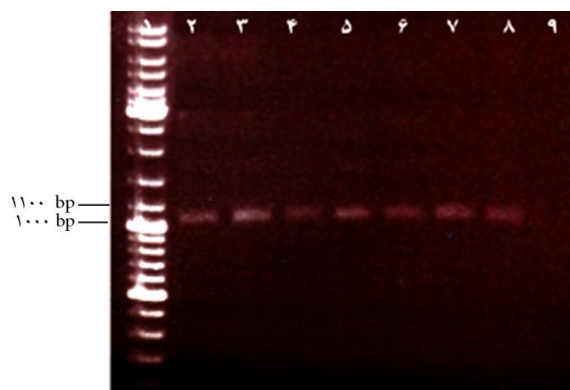
بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که قطعات سنتز شده در آر تی-پی سی آر مربوط به اسید نوکلئیک گیاهی نبوده‌اند. تعیین توالی قطعات تکثیر شده صحت جداسازی و تکثیر ژن پروتئین حرکتی را نشان داد. داده‌های حاصل از تعیین توالی ژن پروتئین حرکتی GFLV در هفت جدایه‌ی تعیین توالی شده در این پژوهش در پایگاه اطلاعاتی GenBank به ثبت رسانیده شده‌اند. ژن پروتئین حرکتی تکثیر شده در تمامی جدایه‌ها ۱۰۴۴ نوکلئوتید طول

1- Oliver *et al.*

نوری نژاد زرقانی و همکاران: تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر ژن...

جدول ۲- تعداد نمونه‌های برگ مو جمع آوری شده بر حسب محل و گروه علائم مشاهده شده.

محل نمونه برداری	تعداد نمونه‌ی جمع آوری شده	تعداد نمونه‌ی مثبت در الیزا	نوع علائم
ملکان	۳۰	۳	رگبرگ نواری
بناب	۲۸	۵	رگبرگ نواری
تبریز و حومه	۱۸	۲	رگبرگ نواری
شیرامین	۱۹	۲	موزاییک زردی
ارومیه	۲۰	۳	موزاییک زردی
زنجان	۲۴	۳	رگبرگ نواری
شبستر	۲۵	۵	موزاییک زردی
اراک	۳۷	۳	موزاییک زردی
اردبیل	۲۳	۳	موزاییک زردی
قزوین	۲۲	۴	رگبرگ نواری
جمع	۲۴۶	۳۳	



شکل ۱- الکتروفورز محصولات آرئی-پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پروتئین حرکتی GFLV (GFLV-2B-f) و GFLV-2B-r) در ژل آگارز یک درصد. چاهک ۱: مارکر GeneRuler DNA Ladder Mix از شرکت فرمتاس با شماره کاتالوگ (SM0331)، چاهک‌های ۲ تا ۸ به ترتیب نمونه‌های: Ir3- Ir4-Zanjan, Ir6-Bonab, Ir1-Qazvine, Ir2-Arak, Ir5-Ardabil, Ir7-Urmia و Ir3-Shir-Amin و چاهک ۹ کنترل منفی می‌باشند.

به عبارت دیگر ژن پروتئین حرکتی GFLV بر اساس داده‌های بدست آمده ۲۲/۳ درصد در سطح اسیدهای نوکلئیک تنوع داشت. مقایسات دوبدوی توالی‌های ژن پروتئین حرکتی در سطح اسیدهای آمینه نیز نشان داد جدایه‌های تعیین توالی شده در این مطالعه ۹۸/۸-۹۵/۶ درصد تشابه داشتند. بیشترین تشابه را جدایه‌های Ir3-Shir-Amin و Ir7-Urmia با Ir6-Bonab ۹۸/۹ درصد و کمترین تشابه را جدایه‌های Ir6-Bonab و Ir5-Ardabil داشتند. این جدایه‌ها با جدایه‌ی GFLV-F13 ۹۶/۷۲-۹۵/۱ درصد تشابه داشتند. در کل دامنه تشابهات ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های GFLV در سطح اسیدهای آمینه ۹۹/۷-۸۷/۹ درصد تعیین شد.

اضافه در این ژن برای ویروس قابل تحمل نیست. فشار انتخاب منفی شدید بر روی این ژن نیز می‌تواند موید این فرضیه باشد. نتایج مقایسات دوبدوی ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های تعیین توالی شده در سطح اسیدهای نوکلئیک در این پژوهش مشخص کرد که بیشترین تشابه را جدایه‌های Ir4-Zanjan و Ir6-Bonab با ۹۹/۴ درصد و کمترین تشابه را دو جدایه‌ی Ir6-Bonab و Ir5-Ardabil با ۹۲/۳ درصد با یکدیگر داشتند. این جدایه‌ها با جدایه‌ی مرجع (GFLV-F13) ۸۷/۷-۸۶ درصد مشابهت داشتند. دامنه تشابهات ژن پروتئین حرکتی در بین تمامی جدایه‌های GFLV در این مطالعه ۹۹/۷-۷۷/۷ درصد در سطح اسیدهای نوکلئیک تعیین شد.

گروه AA-GIII شامل چهار زیرگروه می‌باشد که دو زیر گروه AA-GIII-A و AA-GIII-B شامل جدایه‌های لهستان، زیرگروه AA-GIII-C شامل برخی از جدایه‌های امریکایی (WAPN165، WACH911، WAPN6132) و زیرگروه AA-G III-D شامل برخی از جدایه‌های ایرانی (Ir1-Qazvin، Ir6-Bonab، Ir4-Zanjan و KJ18) بود. بقیه‌ی جدایه‌های ایرانی به همراه سایر جدایه‌های اروپایی و امریکایی در خوشه اصلی سوم قرار داشتند (شکل ۳).

شایان ذکر است که در درخت‌های ترسیم شده بر اساس ژن پروتئین حرکتی سه جدایه‌ی امریکایی CACSC3، CACSC4 و CAZINA3 به همراه جدایه‌ی GHu از مجارستان در هر دو شجره، در یک گروه مستقل و نزدیک به جدایه‌ی ArMV-NW قرار گرفتند. شرایط مشابهی برای جدایه‌های La3-6 و La208-I1C1 از ایران مشاهده شد.

از بین سایر جدایه‌های ایرانی نیز جدایه‌های Ir4-Zanjan، Ir6-Bonab، Ir1-Qazvin و KJ18 در یک گروه (به عنوان گروه اصلی یا زیرگروه) مجزا از دیگر جدایه‌های ایرانی قرار گرفتند. با توجه به این داده‌ها می‌توان گفت که جدایه‌های ایرانی حداقل دارای دو خط سیر تکاملی متفاوتند که در نتیجه این جدایه‌ها و نیز سایر جدایه‌های GFLV را نمی‌توان بر اساس منطقه جغرافیایی تقسیم بندی نمود. لذا برای تعیین استراتژی کنترلی برای این ویروس باید به این مهم توجه داشت. تنوع ژنتیکی گزارش شده برای پروتئین پوششی GFLV حداکثر ۱۷ درصد می‌باشد (اولیور و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین تنوع ژنتیکی پروتئین حرکتی GFLV بیشتر از پروتئین پوششی آن می‌باشد.

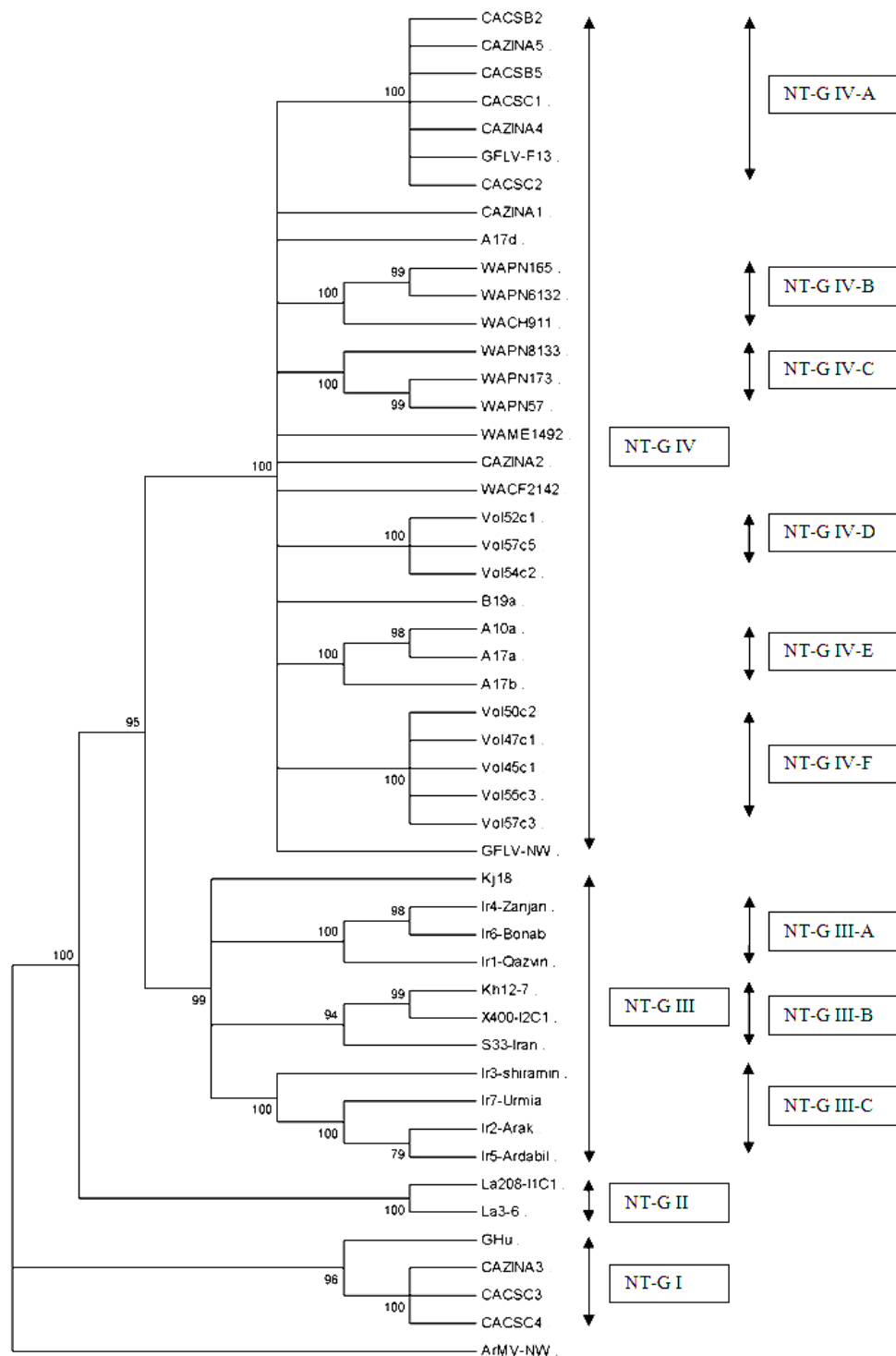
داده‌های حاصل از نتایج تخمین پارامترهای جمعیتی براساس ژن پروتئین حرکتی در جدول ۳ آورده شده‌اند. نسبت P_i/P_j برای تمامی جدایه‌های GFLV کمتر از یک بود. این بدان معناست که فشار انتخاب وارده بر پروتئین حرکتی از نوع منفی است. الیور و همکاران این فشار انتخاب را بر روی جدایه‌های امریکایی ۰/۰۲۴۳ تا ۰/۰۶۹۳ (الیور و همکاران، ۲۰۱۰) و سخندان و ملچر^۲ (۲۰۱۲)

جدایه‌های GFLV در درخت ترسیم شده بر اساس توالی اسیدهای نوکلئیک ژن پروتئین حرکتی به چهار گروه اصلی تقسیم بندی شدند. سه جدایه‌ی امریکایی CACSC3، CACSC4 و CAZINA3 به همراه جدایه‌ی GHu از مجارستان در یک خوشه مستقل (NT-GI^۱) و نزدیک به جدایه‌ی ArMV-NW قرار گرفتند. جدایه‌های La3-6 و La208-I1C1 هر دو از ایران در خوشه‌ی دوم (NT-GII)، جدایه‌های تعیین توالی شده در این مطالعه یعنی Ir5-، Ir3-Shiramin، Ir7-Urmia، Ir2-Arak، Ardabil، Ir4-Zanjan، Ir6-Bonab، Ir1-Qazvin به همراه بقیه جدایه‌های ایرانی Kh12-7، X400-I2C1، S33-Iran و KJ18 در خوشه سوم (NT-GIII) و سایر جدایه‌های GFLV شامل جدایه‌های اروپایی (فرانسه، آلمان، اسلونی) و جدایه‌های امریکایی در خوشه چهارم (NT-GIV) قرار گرفتند (شکل ۲). همانطور که گفته شد جدایه‌های ایرانی در دو گروه NT-GII و NT-GIII و مجزا از جدایه‌های کشورهای دیگر قرار گرفتند. گروه NT-GIII متشکل از جدایه‌های ایرانی خود شامل سه زیرگروه بود. جدایه‌ی اراک (Ir2-Arak)، اردبیل (Ir5-Ardabil)، ارومیه (Ir7-Urmia) و شیرامین (Ir3-Shiramin) در زیر گروه NT-GIII-C، جدایه‌های (S33-Iran، X400-I2C1) و Kh12-7 در زیرگروه NT-GIII-B و جدایه‌های زنجان (Ir4-Zanjan)، بناب (Ir6-Bonab) و قزوین (Ir1-Qazvin) در گروه NT-GIII-A قرار گرفتند.

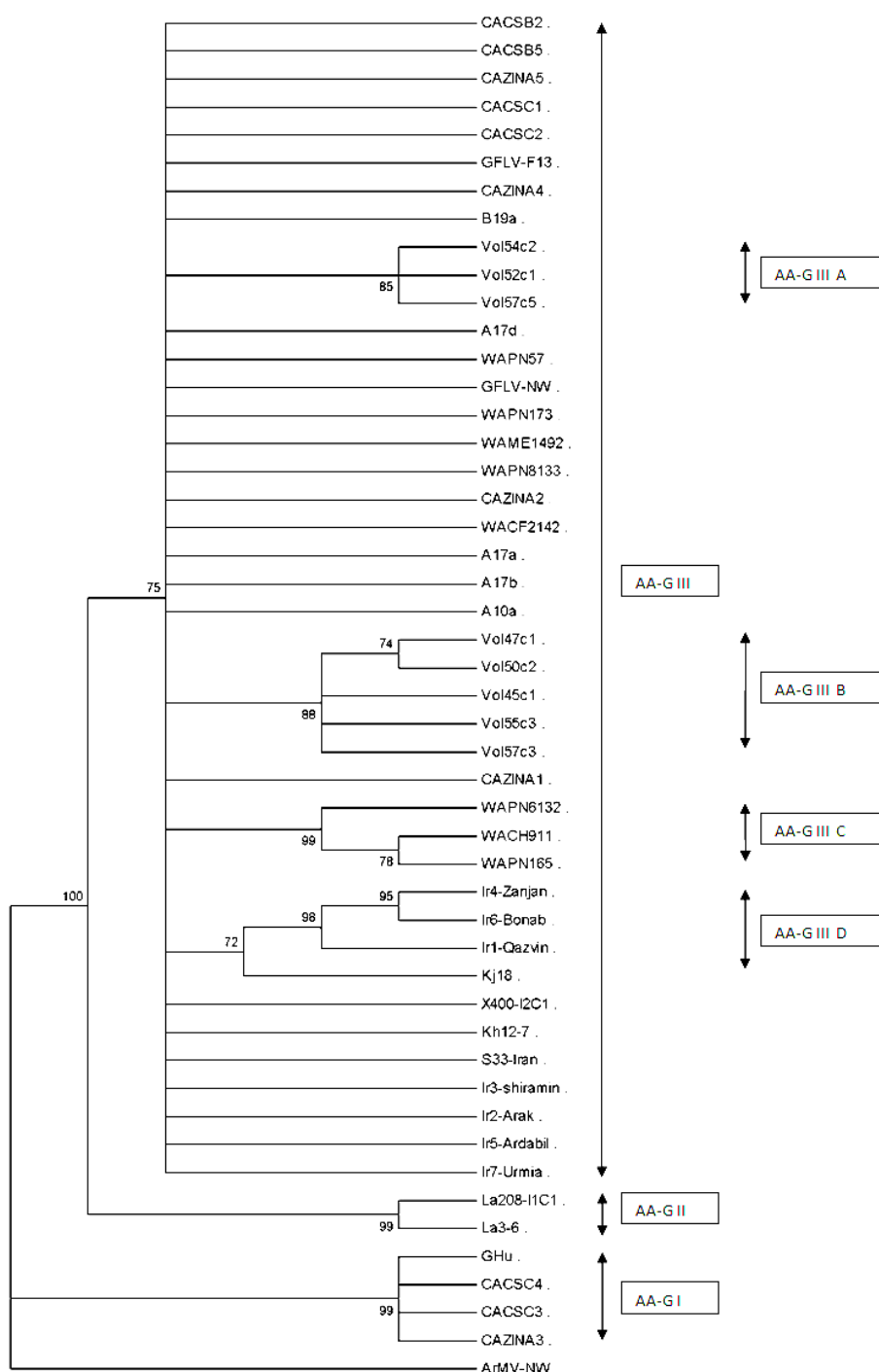
جدایه‌ی مرجع یعنی F13 از فرانسه نیز در میان جدایه‌های امریکایی قرار گرفت. تمامی جدایه‌های GFLV در درخت ترسیم شده بر اساس توالی اسیدهای آمینه ژن پروتئین حرکتی به سه گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۳). جدایه‌های CAZINA3، CACSC3 و CACSC4 به همراه GHu در گروه AA-GI، جدایه‌های La3-6 و La208-I1C1 در گروه AA-GII و سایر جدایه‌های GFLV که شامل جدایه‌های ایرانی نیز بود در گروه AA-GIII قرار گرفتند.

1- NT stands for nucleotide based tree, G refers Group and I stands for Latin number 1,

نوری نژاد زرقانی و همکاران: تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر ژن...



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده براساس توالی اسیدهای نوکلئیک پروتئین حرکتی جدایه‌های GFLV. شاخه‌هایی با بوت استرپ کمتر از ۷۵ درصد با هم ادغام شده‌اند. NT: گروه‌های ایجاد شده بر اساس توالی اسیدهای نوکلئیک؛ G: از اول کلمه Group گرفته شده؛ اعداد یونانی نشان دهنده گروه‌ها هستند. زیرگروه‌های مربوط به گروه‌های اصلی در انتهای سمت راست شکل و در درون مستطیل آورده شده‌اند و شماره زیرگروه پس از یک خط از شماره گروه اصلی آورده شده است. پیکان‌ها محدودی هر یک از گروه‌های اصلی یا زیرگروه‌ها را نشان می‌دهند.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس توالی اسیدهای آمینه پیش بینی شده پروتئین حرکتی جداپه‌های GFLV. شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۷۵ درصد با هم ادغام شده‌اند. AA: گروه‌های ایجاد شده بر اساس توالی آمینو اسیدی؛ G: از اول کلمه Group گرفته شده؛ و اعداد یونانی نشان دهنده شماره‌ی گروه‌ها هستند. زیرگروه‌های مربوط به گروه‌های اصلی در انتهای سمت راست شکل و در درون مستطیل و شماره زیرگروه پس از یک خط از شماره گروه اصلی آورده شده‌اند. پیکان‌ها محدوده‌ی هر یک از گروه‌های اصلی یا زیرگروه‌ها را نشان می‌دهند.

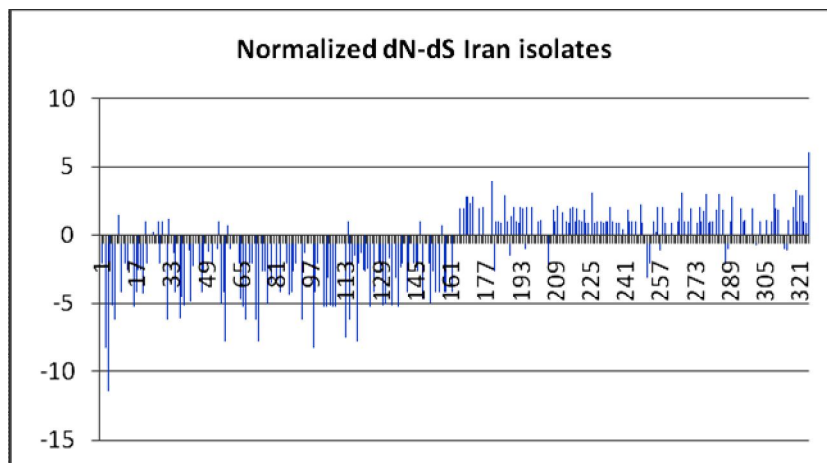
نوری نژاد زرقانی و همکاران: تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر ژن...

روی تک تک اسید آمینه‌ها نیز اندازه‌گیری شد و نشان داد که میزان فشار انتخاب در طول ژن پروتئین حرکتی یکسان نیست (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ مشخص است انتهای آمینی پروتئین حرکتی تحت فشار انتخاب منفی و انتهای کربوکسیلی دارای فشار انتخاب مثبت است. در جدایه‌های ایرانی اسید آمینه‌های شماره ۳، ۵۶، ۷۲ و ۹۸ تحت فشار انتخاب منفی شدید قرار دارند که بنظر می‌رسد این اسید آمینه‌ها نقش مهمی را در ایفای نقش یا نقش‌های پروتئین حرکتی داشته باشند. مطالعات بیشتری در این زمینه می‌بایست انجام گیرد تا دلیل تفاوت آن معلوم شود.

این فشار را ۰/۰۴۵ تخمین زده‌اند. فشار انتخاب بر روی پروتئین حرکتی در پژوهش حاضر ۰/۰۴۲ تخمین زده شد که نشان دهنده فشار منفی و شدید بر روی این ژن می‌باشد. دلیل این فشار شدید اهمیت این پروتئین در چرخه تکثیری و بیماری‌زایی ویروس می‌تواند باشد. از آنجا که اندازه این ژن در تمامی جدایه‌های GFLV گزارش شده از سراسر دنیا ثابت است و هیچ رخداد حذف و اضافه‌ای سه تایی که با حفظ چارچوب خواندنی باشد نیز در این ژن رخ نداده است، می‌تواند به ساختار سه بعدی این پروتئین و موتیف‌های احتمالی آن مربوط باشد و کوچکترین تغییر احتمالی در این جایگاه‌ها توسط فشار انتخاب منفی اصلاح یا حذف می‌شوند. این فشار بر

جدول ۳- نتایج تخمین پارامترهای جمعیتی براساس ژن پروتئین حرکتی GFLV. N: تعداد نمونه، S: تعداد جایگاه‌های افتراقی، Θ : تنوع ژنتیکی بر اساس فرمول واترسون، Pi_T : تنوع نوکلئوتید، Pi_a : تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسید آمینه نشده‌اند، Pi_s : تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسید آمینه شده‌اند.

منطقه جغرافیایی	N	S	Θ_w	Pi_T	Pi_a	Pi_s	Pi_a/Pi_s
جدایه‌های ایرانی	۱۳	۲۷۷	$0.08566 \pm$ (0.03238)	$0.09006 \pm$ (0.01441)	۰/۰۲۱۲۲	۰/۳۷۵۹۳	۰/۰۵۶
جدایه‌های اروپایی	۱۶	۳۴۳	$0.09901 \pm$ (0.00125)	$0.10075 \pm$ (0.01478)	۰/۰۱۷۷۷	۰/۴۶۶۹۰	۰/۰۳۸
جدایه‌های آمریکایی	۱۹	۳۴۰	$0.09318 \pm$ (0.09318)	$0.10946 \pm$ (0.01378)	۰/۰۲۷۱۲	۰/۳۵۵۰۳	۰/۰۵۷
تمامی جدایه‌ها	۴۸	۴۶۸	$0.10120 \pm$ (0.02829)	$0.12560 \pm$ (0.0698)	۰/۰۲۶۰۰	۰/۶۱۵۸۷	۰/۰۴۲



شکل ۴- فشار انتخاب موجود بر روی آمینواسیدهای پروتئین حرکتی جدایه‌های ایرانی GFLV. محور طولی شماره مربوط به اسید آمینه‌ها را نشان می‌دهد و محور عرض‌ها dN-dS) جهش‌های خاموش و dN: جهش‌هایی که منجر به تغییر اسید آمینه شده‌اند) نرمال شده را نشان می‌دهد.

تخصصی این واریانت‌های ویروسی با ارقام مختلف باشد. از سوی دیگر وجود فشار انتخاب مثبت در انتهای کربوکسیل پروتئین حرکتی در جدایه‌های ایرانی نشان از تثبیت برخی جهش‌ها در این ناحیه و افزایش کارایی پروتئین حرکتی و سازگاری بیشتر این پروتئین با میزبان در ایران شده است. این امر به همراه رخدادهای نوترکیبی گزارش شده نشان از قدمت بالای ویروس در تاجکستان‌های ایران دارد و به احتمال زیاد جدایه‌هایی از این ویروس از ایران به سایر نقاط جهان توسط قلمه‌های آلوده انتقال داده شده باشند و در آنجا با شرایط محیطی سازگار شده باشند چرا که برخی از آنها بصورت کلاسترهای مجزا در شکل‌های ۲ و ۳ قرار گرفته‌اند و دارای تنوع ژنتیکی و رخدادهای نوترکیبی بین خود شده‌اند (نوری نژاد زرقانی و همکاران، ۲۰۱۳). از آنجا که تنوع ژن پروتئین حرکتی بیشتر از ژن پروتئین پوششی است توصیه می‌شود در صورت استفاده از مقاومت ناشی از بیمارگر^۲ از پروتئین حرکتی استفاده نشود و بجای آن بهتر است از پروتئین پوششی استفاده شود.

آنالیزهای نوترکیبی انجام شده روی ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های GFLV، رخداد نوترکیبی جدیدی را مشخص نکرد ولی آنالیزهای انجام شده و گزارش‌های قبلی را تایید نمود. برای جزئیات بیشتر به منبع رجوع شود (نوری نژاد زرقانی و همکاران، ۲۰۱۳).

در کل تنوع ژنتیکی مشاهده شده در پروتئین حرکتی GFLV در دامنه‌ی قابل انتظار برای ویروس‌هایی با ژنوم آران‌ای تک رشته‌ای مثبت بود (دافی و همکاران^۱، ۲۰۰۸). این تنوع می‌تواند ناشی از خطای آنزیم آران‌ای پلیمرز وابسته به آران‌ای (RdRp) حین همانندسازی و یا در اثر رخدادهای نوترکیبی (نوری نژاد زرقانی و همکاران، ۲۰۱۳) باشد. این جهش یافته‌ها در صورتیکه با کاهش کارایی در چرخه تکثیر یا بیماریزایی مواجه شوند توسط فشار انتخاب منفی شدید حاکم بر روی این ژن حذف می‌شوند. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن در بین جدایه‌ها دارای خط سیر تکاملی متفاوت بود و حداقل از چهار خط سیر تکاملی تشکیل شده است که جدایه‌های ایرانی حداقل دارای دو خط سیر متفاوت بودند. از آنجا که ارقام مختلفی از مو در ایران وجود دارند وجود این خط سیرهای متفاوت می‌تواند دلیلی بر سازگاری

منابع

۱. نوری نژاد زرقانی، ش.، شمس بخش، م.، سخندان بشیر، ن. و پژوهنده، م. ۱۳۹۱. شناسایی و ردیابی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادیزنی مو با استفاده از پیوند سبز و آر تی-پی سی آر. بیماری‌های گیاهی، ۴۸: ۳۹۱-۳۸۱.
2. Andret-Link, P., Valat, L., Demangeat, G., Vigne, E., and Fuchs, M. 2004. *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* 86: 183-195.
3. Biebricher, C., and Eigen, M. 2006. What is a quasispecies? In *Quasispecies: Concept and Implications for Virology*, 1-31 pp.
4. Dijkstra, J., and Jager, C.P. 1998. *Practical plant virology: protocols and exercises*. Springer-Verlag GmbH.
5. Heath, L., Van Der Walt, E., Varsani, A., and Martin, D.P. 2006. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *Journal of Virology*, 80: 11827-11832.
6. Hewitt, W., Martelli, G., Dias, H., and Taylor, R. 1970. Grapevine fanleaf virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, p. 28.
7. Hull, R. 2002. *Matthews' plant virology*. Academic Press, San Diego.
8. Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.
9. Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
10. Lucas, W.J. 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344: 169-184.
11. Martelli, G., and Savino, V. 1988. Fanleaf degeneration. In *Compendium of Grape Diseases*, ed. Pearson, R., and Goheen, A.:48-49. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, MN. 48-49 pp.
12. Nicholas, K.B., and Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Available in: <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
13. Nourinejad Zarghani, S., Shams-Bakhsh, M., Bashir, N.S., and Wetzal, T. 2013. molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of grapevine fanleaf virus. *Journal of Phytopathology*, 161 (6), 419-425.
14. Nourinejad Zarghani, S., Shams-Bakhsh, M., Zand, N., Sokhandan-Bashir, N., and Pazhouhandeh, M. 2012. Genetic analysis of Iranian population of Potato leafroll virus based on ORF0. *Virus Genes*, 45: 567-574.

15. Oliver, J.E., Vigne, E., and Fuchs, M. 2010. Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research*, 152: 30-40.
16. Pearson, R., C. 1988. Compendium of Grape Diseases. In Pearson, R., and Goheen, A., (eds.), American Phytopathological Society (APS) Press. Saint Paul, MN. 121 pp.
17. Ritzenthaler, C., Viry, M., Pinck, M., Margis, R., Fuchs, M., and Pinck, L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72: 2357.
18. Rowhani, A., Chay, C., Golino, D., and Falk, B. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83: 749-758.
19. Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R., and Wetzel, T. 2009. *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Archives of Virology*, 154: 899-907.
20. Serghini, M.A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B., and Pinck, L. 1990. RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology*, 71: 1433-1441.
21. Sokhandan Bashir, N., Khabbazi, A.D., and Torabi, E. 2009. Isolation of the gene coding for movement protein from Grapevine fanleaf virus. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7:258-261, 263.
22. Sokhandan-Bashir, N., and Melcher, U. 2012. Population genetic analysis of grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 157: 1919-1929.
23. Sokhandan Bashir, N., Nikkhah, S., and 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 Bashir, N., Nourinejhad Zarghani, S., and Hejazi, M.S. 2007b. Diversity of grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Virus Research*, 128: 144-148.
25. Sokhandan Bashir, N., Pashaei, A., and Doulati-Baneh, H. 2011. Characterization of the full length coat protein gene of Iranian grapevine fanleaf virus isolates, genetic variation and phylogenetic analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9: 213-221.
26. Vuittenz, A. 1970. Fanleaf of grapevine. In Frazier, N. W. (ed.), *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevine*. University of California, Berkeley, 217-228.