

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس برگ بادبزنی مو در تاکستان‌های استان خراسان رضوی

زهره غلامپور¹ - محمد زکی عقل^{2*} - بهروز جعفر پور³ - محسن مهرور⁴

تاریخ دریافت: 1392/08/09

تاریخ پذیرش: 1394/03/24

چکیده

بیماری برگ بادبزنی توسط ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی مو است که موجب خسارت جبران ناپذیری در تاکستان‌ها می‌شود. به منظور تعیین پراکنش این ویروس در تاکستان‌های استان خراسان رضوی در طی سال‌های 1391 و 1392 تعداد 280 نمونه برگ از تاکستان‌های عمده استان خراسان رضوی به‌صورت تصادفی جمع‌آوری شد. با استفاده از آنتی بادی جدایه ایرانی ویروس در آزمون الیزا آلودگی به GFLV در 187 نمونه تایید گردید. بیشترین میزان آلودگی در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان کاشمر با 90 درصد آلودگی بود. میزان آلودگی در سایر مناطق بین 32 تا 63 درصد متغیر بود. با مایه زنی عصاره تاک‌های آلوده به سلمه تره تولید لکه‌های کلروتیک و رگبرگ روشنی در برگ‌های جدید شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده قطعه‌ای به طول 1000 جفت باز از پروتئین پوششی ویروس تکثیر شد. نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با بانک ژن نشان داد که جدایه‌های تعیین توالی شده دارای 90-92 درصد شباهت با ایزوله‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی هستند. نتایج بیانگر گسترش وسیع این ویروس در تاکستان‌های استان خراسان رضوی می‌باشد.

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

مقدمه

سینوس انتهایی برگ، رگبرگ نواری و موزائیک، زیگزاگ شدن شاخه‌ها، کوتولگی میانگره‌ها، تولید جوانه‌های دوتائی، ریزش حبه‌ها و عدم همزمانی در رسیدن حبه‌ها و کاهش کیفیت محصول است (3). در گیاهان آلوده تنوع زیادی از لحاظ نوع و شدت علائم مشاهده می‌شود. این ویروس دارای سه نژاد برگ بادبزنی، موزائیک زرد و رگبرگ نواری بوده که باعث بروز علائم مختلفی می‌شوند (2). هم‌چنین آلودگی مخلوط به ژنوتیپ‌های مختلف عامل بیماری به عنوان دلیلی بر تنوع علائم ذکر شده است (25).

منشا این بیماری در تاکستان‌های ایران قدیم بوده و ویروس توسط مواد گیاهی آلوده به سایر مناطق منتشر شده است (25). دامنه میزبانی طبیعی ویروس عمدتاً شامل مو می‌باشد هرچند که این ویروس از گیاهان علفی مانند مرغ، علف هفت بند و کدوی وحشی نیز گزارش شده است (13 و 18). انتقال این ویروس در طبیعت توسط نماتد *Xiphinema index* صورت می‌گیرد (5) با این حال مهم‌ترین راه انتقال بیماری استفاده از قلمه، پیوندک و نهال‌های آلوده می‌باشد (10). بهترین روش کنترل بیماری، استفاده از قلمه‌های عاری از ویروس در احداث تاکستان‌های جدید و جلوگیری از انتشار قلمه‌های آلوده می‌باشد که مستلزم ردیابی دقیق عامل بیماری است.

روش‌های شناسایی ویروس‌ها شامل تشخیص بر اساس علائم موجود در مزرعه، خصوصیات بیولوژیک، بررسی با میکروسکوپ الکترونی، روش‌های سرولوژیکی مانند الیزا و روش‌های مولکولی مانند

ویروس برگ بادبزنی مو از مخرب‌ترین بیماری‌های مو در سراسر جهان می‌باشد که خسارت آن تا 85 درصد محصول نیز می‌رسد (14). این بیماری از اکثر مناطق معتدل جهان که در آن *Vitis vinifera* و یا پایه‌های مادری آن کشت می‌شود، گزارش شده است (15، 19 و 22).

ویروس برگ بادبزنی (*Grapevine fanleaf virus*; GFLV) از جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* است. پیکره‌های این ویروس بیست وجهی با قطر حدود 28-30 نانومتر است. ژنوم ویروس از دو قطعه آر. ان. ای تک لا یا قطبیت مثبت تشکیل شده که در انتهای 5' دارای پروتئین متصل به ژنوم (VPG) و در انتهای 3' دارای دنباله آدنین (poly A) هستند. هریک از قطعات ژنوم، یک پلی پروتئین را کد می‌کند که پس از شکسته شدن پروتئین‌های کاربردی را تولید می‌کند (23). همانندسازی و بیماریزایی ویروس توسط RNA1 انجام شده و RNA2 عمدتاً تولید پروتئین‌های حرکتی و پوششی می‌کند.

علائم بیماری شامل بدشکلی برگ، بادبزنی شدن یا باز شدن

1، 2، 3 و 4- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، استادیار، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* - نویسنده مسئول: (Email: zakiaghl@ferdowsi.um.ac.ir)

ویروس (9 و 25) انجام شد. برگ‌های جوان در 5 برابر بافر فسفات پتاسیم عصاره‌گیری شده و پس از زلال‌سازی مقدماتی عصاره در چاهک ریخته شد پس از افزودن ماده زمینه، میزان تغییر رنگ چاهک‌ها در طول موج 405 نانومتر و با استفاده از دستگاه الیزا خوان (ELISA Reader) اندازه‌گیری و ثبت گردید. نمونه‌هایی که میزان جذب آن‌ها از آستانه محاسبه شده بر اساس فرمول $\bar{X} + 3sd + 10\%$ میانگین جذب سالم) بیشتر بود، به عنوان آلوده در نظر گرفته شدند.

انتقال ویروس به گیاه محک

تعدادی از جدایه‌هایی که در آزمون الیزا آلوده ارزیابی شدند بر روی گیاه سلمک (*Chenopodium quinoa*) در مرحله چهارم برگ‌ی مایه‌زنی شد. بافر عصاره‌گیری شامل بافر فسفات پتاسیم 0/1 مولار با اسیدیته 7/2 حاوی 2 درصد پلی وینیل پیرولیدون (PVP-40) بود. برای عصاره‌گیری یک گرم از بافت برگ مو با پنج میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری سرد مخلوط شد. پیش از مایه‌زنی ابتدا سطح برگ‌ها با مقدار اندکی آب خیس شد و پس از پاشیدن کاربوراندیم بر روی آن‌ها، عصاره بر روی برگ‌ها تلقیح شد. پس از یک ساعت برگ‌های مایه‌زنی شده با جریان ملایم آب شسته شدند. در تیمار شاهد برگ‌های سلمک با بافر عصاره‌گیری و پودر کاربوراندیم مایه‌زنی شدند.

استخراج آر آن ای کل و آر تی - پی سی آر

استخراج آر آن ای کل از نمونه‌ها مطابق روش بوم و همکاران (4) انجام شد. مقدار 150 میلی‌گرم از بافت برگ در 1 میلی‌لیتر بافر استخراج (4M Guanidine Hydrochloride, 0.2 M Na Acetate pH 5, 25mM EDTA, 2.5% PVP-40) درون هاون استریل عصاره‌گیری و 5 میکرولیتر مرکاپتواتانول اضافه شد. عصاره به میکروتیوب منتقل و به مدت 2 دقیقه در سرعت 6800 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. 500 میکرولیتر از فاز رویی به میکروتیوب جدید حاوی 60 میکرولیتر سارکوسیل 20 درصد منتقل شده و پس از مخلوط کردن، به مدت 20 دقیقه در 65 درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت 5 دقیقه با سرعت 13000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. 350 میکرولیتر از رانشین به میکروتیوب حاوی 20 میکرولیتر سیلیکا انتقال داده شد و بعد از همگن‌سازی، 315 میکرولیتر اتانول مطلق به مخلوط اضافه شد. لوله‌ها به مدت 30 ثانیه در سرعت 6500 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب با 600 میکرولیتر بافر Wash I (4M Guanidine Hydrochloride, 0.2 M Na Acetate pH 5, 25mM EDTA) شستشو و سپس به مدت 30 ثانیه در سرعت 6500 دور در دقیقه رسوبدهی مجدد شد. در مرحله بعد رسوب در 500 میکرولیتر بافر Wash II (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl and absolute ethanol) خوب حل

می‌باشد. هر یک از این روش‌ها مزایا و معایبی دارند و دقت تشخیص هر کدام از آن‌ها متفاوت است (21).

برای شناسایی ویروس‌های مو اغلب از آزمون الیزا استفاده می‌شود اما به دلیل غلظت پایین ویروس برگ بادبزنی مو در گیاهان آلوده طی ماه‌های گرم سال (به ویژه در تابستان) الیزا حساسیت کافی برای شناسایی ویروس را ندارد (15). همچنین به دلیل عدم پراکنش یکسان ویروس در بخش‌های مختلف گیاه، ردیابی این ویروس با مشکل مواجه می‌شود (10). از این رو، روش‌های مبتنی بر ژنوم برای شناسایی و ردیابی این ویروس به کار گرفته می‌شود. ردیابی ویروس از طریق آر تی - پی سی آر نیز به دلیل وجود مواد بازدارنده بخصوص در گیاهان خشبی، از جمله ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها که موجب تخریب اسید نوکلئیک شده و از عمل آنزیم پلیمرز ممانعت بعمل می‌آورند، گاه با اشکال مواجه است. (7) هر چند روش‌های متعددی برای استخراج موفق و با کیفیت بالای آر آن ای از مو بهینه‌سازی شده است (7، 8 و 20).

استان خراسان رضوی با دارا بودن 22824/7 هکتار تاکستان، بیشترین سطح زیر کشت مو در کشور را دارا می‌باشد و سالانه 381053/7 تن محصول تولید می‌کند. علی‌رغم سطح زیر کشت وسیع مو در استان اطلاعاتی از پراکنش بیماری برگ بادبزنی مو در تاکستان‌های استان در دسترس نیست، لذا انجام آزمایش‌هایی جهت شناسایی و تعیین پراکنش این ویروس با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر به دلیل تنوع ژنتیکی زیادی که در ایزوله‌های ایرانی ویروس وجود دارد (3) ردیابی ویروس با آغازگرهای موجود با مشکلاتی همراه است به نحوی که در بسیاری از موارد علی‌رغم وجود علائم در تاکستان‌ها و ردیابی آلودگی به‌وسیله تست‌های سرولوژیکی ردیابی در آزمون RT-PCR میسر نمی‌باشد. در تحقیق حاضر کوشش می‌شود تا آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی موثر ویروس از نمونه‌های آلوده نیز طراحی و بهینه‌سازی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بهار و تابستان سال‌های 91 و 92 از تاکستان‌های استان خراسان رضوی در شهرستان‌های سبزوار، نیشابور، کاشمر و بردسکن به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آزمایش در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک

ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک به روش Indirect-ELISA با استفاده از آنتی بادی تهیه شده بر علیه جدایه ایرانی

پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه و 30 چرخه شامل 95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه در مرحله واسرشت سازی، 56 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 80 ثانیه و در نهایت یک سیکل 72 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید.

محصول PCR در ژل آگارز 1 درصد حاوی 2 میکرولیتر از Green viwer الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داگ عکسبرداری شد. محصول PCR با PCR purification kit خالص سازی شده و جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن ارسال شد.

تعیین روابط فیلوژنتیکی جدایه‌ها با یکدیگر و سایر توالی‌های گزارش شده از ایران و ترادف‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA 5 به روش Neighbour joining و 1000 تکرار در آزمون Bootstrap انجام شد.

نتایج و بحث

دامنه پراکنش ویروس برگ بادبزی مو

از 280 نمونه جمع‌آوری شده از تاکستان‌های خراسان رضوی، 187 نمونه در آزمون الیزا آلوده به GFLV شناخته شدند. فراوانی این ویروس در نمونه‌های شهرستان کاشمر بیشتر از سایر مناطق بود (جدول 2).

در نمونه‌های آلوده علائمی از جمله بدشکلی برگ‌ها، موزائیک، کوتاهی میانگره‌ها، زیگزاگ شدن شاخه‌ها و دوقلو شدن جوانه‌ها مشاهده شد. (شکل 1) هر چند در اغلب نمونه‌ها علائم خاصی مشاهده نشد (25).

شده و مجدداً رسوبدهی انجام شد. این مرحله بار دیگر تکرار گردید. سپس لوله‌ها به مدت 2 دقیقه در 60 درجه سانتی گراد خشک شده و رسوب در 70 میکرولیتر بافر TE حل شده و برای 1 دقیقه در 65 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله ی آخر میکروتیوب به مدت 5 دقیقه با سرعت 13000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی حاوی اسید نوکلئیک به میکروتیوب جدید انتقال داده شد.

برای سنتز رشته مکمل (cDNA) 3 میکرولیتر از آر. ان. ای. کل استخراج شده با 2 میکرولیتر آغازگر عمومی Oligo d(T) و 9/5 میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای 60 درجه به مدت 10 دقیقه قرار داده شد. سپس 2 میکرولیتر مخلوط (50 میلی‌مولار) dNTPs، 4 میکرولیتر بافر 5x واکنش و 0/5 میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت 60 دقیقه در دمای 47 درجه ترموسایکلر قرار گرفت (6 و 17).

به منظور طراحی آغازگر مناسب برای ردیابی جدایه‌های ایرانی ویروس ترادف ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس و جدایه‌های مرجع بانک ژن در برنامه Vector NTI v 10.0 هم‌ردیف سازی شده و از نواحی محافظت شده موجود در بین تمامی جدایه‌ها برای طراحی آغازگر به‌وسیله نرم افزار استفاده شد و در نهایت آغازگرهای DetR و DetF که از پارامترهای مناسبی برخوردار بودند جهت آزمون PCR انتخاب شدند (جدول 1).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قسمتی از ژن پروتئین پوششی انجام شد. حجم نهایی واکنش 20 میکرولیتر شامل 3 میکرولیتر از cDNA، 1 میکرولیتر از هر آغازگر، 2 میکرولیتر 10× PCR buffer، 1/2 میکرولیتر (50 میلی‌مولار) MgCl₂، 0/4 میکرولیتر مخلوط dNTPs و 0/2 میکرولیتر (5 واحد در میکرو لیتر) Taq DNA Polymerase بود.

جدول 1- آغازگرهای استفاده شده در شناسایی GFLV

Table 1- Primers used for amplification of GFLV

| نام پرایمر primer name | طول Length | توالی Sequence | محل اتصال در ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو Position in GFLV coat protein gene |
|---------------------------|---------------|------------------------------|--|
| DetF | 19 | 5'-CGGCAGACTGGCAAGCTGT-3' | 437-456 |
| DetR | 22 | 5'-GGTCCAGTTTAATTGCCATCCA-3' | 1460-1438 |

جدول 2- نتایج آزمون الیزا در شناسایی ویروس برگ بادبزی مو از تاکستان‌های استان خراسان رضوی

Table 2- Results of ELISA in identification of grapevine fanleaf virus in vineyards of Khorasan razavi

| منطقه Location | تعداد نمونه No. Samples | تعداد نمونه آلوده No. infected samples | درصد الودگی % infection |
|-------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| Kashmar | 103 | 93 | 90 |
| Sabzevar | 73 | 46 | 63 |
| Neyshabour | 46 | 15 | 32 |
| Bardaskan | 58 | 33 | 56 |



شکل 1- علائم ویروس برگ بادبزنی مو در تاک‌های آلوده
Figure 1- Symptoms of GFLV in infected vines

پروتئین پوششی ویروس در آزمون آر تی - پی سی آر و تأیید صحت قطعه همانندسازی شده پس از تعیین توالی تأیید کننده آلودگی تاک‌ها به ویروس برگ بادبزنی مو می‌باشد.

نتایج تعیین ترادف و مقایسه توالی‌های به دست آمده با بانک ژن نشان داد که قطعه همانندسازی شده در واکنش RT-PCR قسمتی از ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو است. قطعات همانندسازی شده دارای 90-92 درصد شباهت با ایزوله‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی بود و 88-97 شباهت در سطح آمینو اسیدی بودند.

جدایه‌های تعیین ترادف شده در این تحقیق همراه با جدایه‌های گزارش شده از کاشمر در یک گروه قرار گرفتند. همانند سایر جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو این جدایه‌ها نیز در آنالیز فیلوژنی جدا از سایر جدایه‌های دنیا طبقه‌بندی شدند (شکل 3). نکته جالب آن است که به لحاظ فیلوژنی جدایه‌های گزارش شده از شمال غرب ایران قرابت بیشتری با جدایه‌های جهانی داشته در حالی که جدایه‌های شرق کشور از لحاظ تکاملی مسیری متفاوت را طی کرده و ارتباط دورتری با جدایه‌های جهانی و هم‌چنین جدایه‌های شمال غرب کشور دارند. هم‌چنین مشخص شد که جدائی جغرافیائی در تکامل و فیلوژنی دارای اثر مثبت می‌باشد.

نتایج به دست آمده نشان دهنده پراکنش وسیع ویروس برگ بادبزنی مو در تاکستان‌های عمده خراسان رضوی می‌باشد. با توجه به این که منشا این ویروس از ایران است (11 و 24) این امر چندان دور از ذهن نیست و در گزارش‌های دیگری از غرب و جنوب ایران (2، 21 و 25) نیز به این امر اشاره شده است. علائم مشاهده شده در تاکستان‌ها مشابه با علائم گزارش شده در منابع است (3) و تنوع در علائم موجود در تاکستان‌ها ممکن است ناشی از تنوع ژنتیکی و وجود

در 32 درصد (91/280) از نمونه‌ها اگر چه علائمی از قبیل بدشکلی برگ‌ها، موزائیک، کوتاهی میانگره‌ها، زیگزاگ شدن شاخه‌ها و دوقلو شدن جوانه‌ها مشاهده شد لیکن در آزمون الیزا آلودگی آن‌ها محرز نشد، هر چند در تعدادی از این نمونه‌ها آلودگی به GFLV به وسیله RT-PCR تأیید شد این موضوع ممکن است در اثر خصوصیات سرولوژیکی متفاوت در جدایه‌های ویروس برگ بادبزنی مو و یا شرایط محیطی نامناسب که موجب کاهش غلظت ویروس می شود باشد. چنین مشاهداتی نشان می‌دهد که صرفاً اتکا به علائم ظاهری برای اطمینان از سلامت قلمه‌ها و گیاهان کافی نیست و ضرورتاً باید از تکنیک‌های تشخیصی با دقت بالا هم‌چون RT-PCR برای تأیید سلامت گیاهان تکثیری بهره گرفته شود.

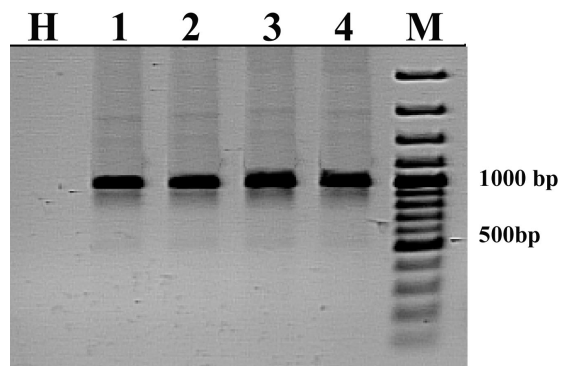
مایه‌زنی جدایه‌های انتخابی منجر به بروز علائمی شامل شفاف شدن رگبرگ‌ها، لکه‌های کلروتیک زرد و بد شکلی برگ‌ها بر روی گیاه *Chenopodium quinoa* پانزده روز پس از مایه‌زنی گردید. در آزمون الیزا گیاهان سلمک مایه‌زنی شده نیز آلوده به ویروس برگ بادبزنی شناسایی شد.

از بین 187 نمونه آلوده در آزمون الیزا 40 نمونه به صورت تصادفی انتخاب و در آزمون PCR بررسی شدند.

آزمون آر تی - پی سی آر

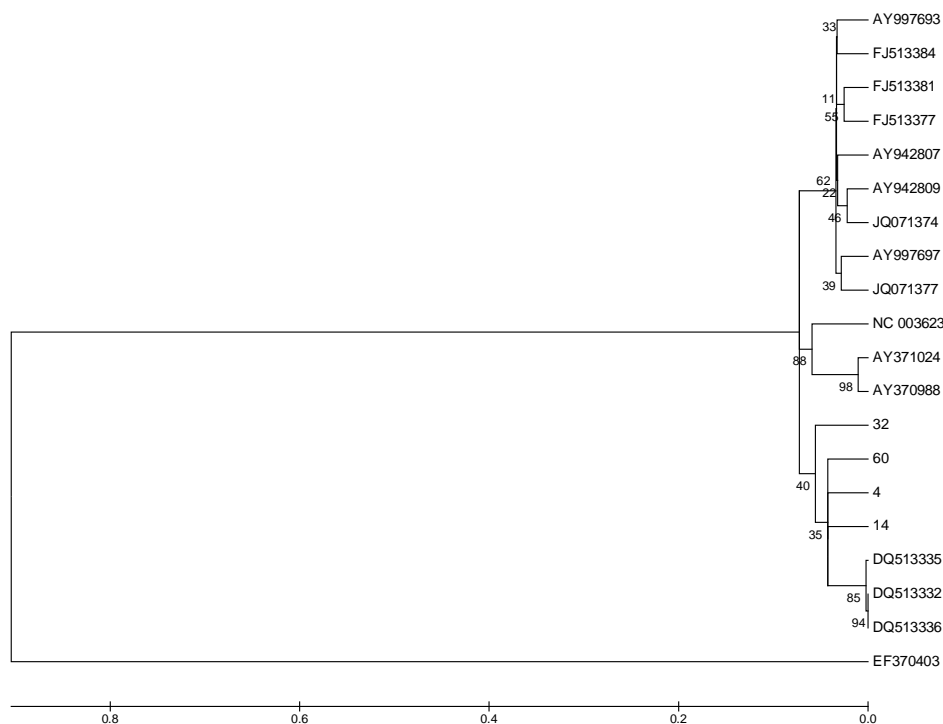
در واکنش آر تی - پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی قطعه‌ای به طول 1000 جفت باز در نمونه‌های آلوده به GFLV تکثیر شد (شکل 2)، در حالی که در نمونه گیاه سالم هیچ‌گونه بانندی مشاهده نشد. از نمونه‌های مرغ و علف هفت بند که در آزمون الیزا آلوده ارزیابی شده بودند نیز قطعه‌ای با وزن مولکولی مشابه به وسیله RT-PCR همانندسازی شد. همانندسازی قسمتی از

سویه‌های مختلف ویروس (23 و 25) یا ناشی از تغییرات ژنتیکی میزبان می‌باشد (16).



شکل 2- نتیجه RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس برگ بادبزنی مو (DetR / DetF). خط 1-4: نمونه های جمع آوری شده از نواحی مختلف استان خراسان رضوی. M: DNA Ladder، H: نمونه منفی.

Figure 2- Results of RT-PCR using GFLV specific primers (DetF/DetR). Lane 1-4 GFLV infected samples of Khorasan Razavi vineyards, M: DNA ladder, H: healthy plant



شکل 3- دندروگرام رابطه جدایه های ایرانی GFLV با بعضی از جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از ترادف ژن پروتئین پوششی. ترسیم دندروگرام در نرم افزار MEGA 5 به روش Neighbour joining (bootstrap × 1000) انجام شده است.

Figure3- Dendrogram illustrating the phylogenetic relationships between the Iranian isolates of GFLV and other GFLV sequences deposited in the GenBank. The tree was drawn using MEGA 5 using Neighbor-joining method with 1000 replicates of bootstrap test.

با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد این ویروس و بروز مشکلاتی در زمینه علائم شناسایی آن به وسیلهٔ آزمون RT-PCR که ناشی از عدم

هماندسازی قطعه ی 1000 جفت بازی و فقدان آن در گیاه سالم دلالت بر اختصاصی بودن آغازگر طراحی شده در این تحقیق داشت.

قلمه‌های عاری از ویروس در احداث تاکستان‌های جدید، می‌تواند به عنوان راهی در جهت کاهش خسارت مد نظر قرار گیرد. بدیهی است که وجود یک روش مطمئن در شناسایی ویروس لازمه دست یابی به این مهم است. از طرفی دیگر نشان داده شده است که کارایی آرتی - پی سی آر نسبت به الیزا در ردیابی ویروس برگ بادبزنی مو بیشتر است. بنابراین با معرفی آغازگرهای اختصاصی دقت روش آرتی - پی سی آر را می‌توان افزایش داد.

اتصال آغازگر به رشته الگو می‌باشد آغازگر فوق با توجه به مترادف جدایه‌های ایرانی موجود در بانک ژن و سایر ایزوله‌های GFLV طراحی شده است و این آغازگر می‌تواند مسائل مربوط به شناسایی جدایه‌های مختلف این ویروس را مرتفع سازد. جدایه‌های تعیین مترادف شده دارای تنوع ژنتیکی 90-92 درصد بود که این امر قبلاً در مورد جدایه‌های غرب کشور نیز گزارش شده است و تأیید کننده منشأ ویروس نیز می‌باشد.
با توجه به گسترش وسیع ویروس در تاکستان‌ها، استفاده از

منابع

- 1- Anonymous. 2012. Statistics reports of ministry of Jihad-Agriculture.
- 2- Bashir S.N. and Hajizadeh M. 2007. Survey for grapevine fanleaf virus in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates, Australasian Plant Pathology, 36: 46-52.
- 3- Bashir S.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.
- 4- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., Van der Noorda J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 28:495-503.
- 5- Esmenjaud D. and Adab P. 1994. Detection of a region of the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus* by RT-PCR in the nematode vector *Xiphinema index*, Plant Disease, 78: 1087-1090.
- 6- Fattouch S., Acheche H., Mhirsi S., Mellouli L., Bejar S., Marrakchi M. and Marzouki N. 2005. RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants, Journal of Virological Methods 127:126-132.
- 7- Gambino G., Perrone I. and Gribaudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants, Phytochemical Analysis 19: 520-525.
- 8- Hajizadeh M., Sokhandan-bashir N., Niknam A. and Nikkiah Sh. 2007. Optimization of Nucleic Acid Extraction and RT-PCR for Detection of *Grapevine fanleaf virus* Isolates from Vineyards in North-West of Iran. Journal of Agricultural Science, 16:145-156.
- 9- Hampton R., Ball E. and De Boer S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. Aps PRESS, 388 pages. Convert. R. and Martin, R., Indirect ELISA. Pp: 179-197.
- 10- Hewitt W.B., Raski D.J. and Goheen A.C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. Phytopathology, 48:586-595.
- 11- Hewitt W.B., Martelli G.P., Dias H.F. and Taylor R.H. 1970. *Grapevine fanleaf virus*. C. M. I/ A.A. B. Descriptions of Plant Viruses. No. 28.
- 12- Hinkle R.P. 1995. Fanleaf, the unmentionable virus. Wines and vines, 76:24-27.
- 13- Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y.P., Daubert S.D., and Rowhani A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for *grapevine fanleaf virus*, Plant Disease, 87: 1179-1182.
- 14- MacKenzie D.J., Mclean M.A., Mukerji S. and Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction, Plant Disease, 81: 222-226.
- 15- Martelli G.P. 1993. Graft-transmissible disease of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. (Ed) G. P. Martelli, (p. 263) FAO. Roma.
- 16- Naraghi-Arani P., Daubert S. and Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus, Journal of General Virology, 82, 1791-1795.
- 17- Noorinejad Zarqani Sh., Shamsbakhsh M., Sokhandan bashir N. and Pajoohandeh, M. 2012. Identification and detection of Iranian osplates of Grapevine fanleaf virus using green-grafting and RT-PCR. Plant Pathology, 48: 381-391.
- 18- Parvizi R. 1989. Occurrence of grapevine fanleaf disease in vineyards of Ourmia. In: Proceedings of the 9th Plant Protection Congress of Iran, 9-14 Sep., Mashhad, Iran. p. 164.
- 19- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M. and Fucks L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Grapevine fanleaf nepovirus*, Journal of General Virology, 72: 2357-2365.
- 20- Rowhani A., Chay C., Golino D.A. and Falk W. 1993. Development of a Polymerase chain reaction technique for the detection of *grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue, Phytopathology, 83:749-753.
- 21- Salami A.R., Ebadi A., Kuhi-habibi M. and Zamani Z. 2011. Study of *Grapevine fanleaf virus* Distribution in Iran Using Test Plants, DAS-ELISA and IC-RT-PCR, Iranian Journal of Plant Protection Science, 42:11-18.

- 22- Vuittenz A. 1970. Fanleaf of grapevine. In: N. W. Frazier (ed.). Virus disease of small fruits and grapevine. University of California, Berkeley, pp. 217-228.
- 23- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S. and Fuchs M. 2004. Population structure and genetic diversity within *Grapevine fanleaf virus* isolates from a naturally infected vineyard: Evidence for mixed infection and recombination, *Journal of general virology*, 85: 2435-2445.
- 24- Ward C.W. 1993. Progress towards a higher taxonomy of viruses, *Research in Virology*, 114:419-453.
- 25- Zaki-Aghl M. and Izadpanah K. 2003. Serological and molecular identification of *grapevine fanleaf virus* in Iran, *Iranian Journal of Plant Pathology*, 39, 161-171.