مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ۹۰-۷۹

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

تنوع ژن $2A^{HP}$ ویروس برگ بادبزنی مو در سطح امینو اسیدی بیشتر از سطح نوکلئوتیدی آن است

Grapevine fanleaf virus $2A^{HP}$ gene shows more diversity at amino acid level rather than nucleotide level

مرضیه انتشاری [۱]، شاهین نوری نژاد زرقانی [۲*] و سید محسن نساج حسینی [۳]

Marziyeh Enteshari[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2] and Sayed Mohsen Nassaj Hosseini[3]

۱ - دانش آموخته گروه حشره شناسی و بیماریهای گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲ - استادیار گروه حشره شناسی و بیماریشناسی گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

۳ - استادیار جهاد دانشگاهی واحد استان گیلان، رشت

[1] M.Sc., Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

[2] Assistant Professor of Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

[3] Assistant Professor of ACECR, Gillan Branch, Rasht.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: sh_nourinejhad@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۱- تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۲)

چکیده

ویروس برگ باد بزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) در تاکستان‌های مناطق مختلف دنیا شیوع دارد. علایم ایجاد شده توسط این ویروس اغلب در سه سندرم برگ بادبزنی، موزاییک زرد و رگ نواری تقسیم بندی شده‌اند که علت تفاوت در ایجاد علایم به تنوع ژنتیکی جدایه‌ها نسبت داده شده‌است. از این‌رو در این تحقیق تنوع ژنتیکی GFLV $2A^{HP}$ بویژه در جدایه‌های همراه با علایم زردی بررسی شد. نمونه‌ها از تاکستان‌های بناب، روستای شیرامین، حسین آباد قزوین و تبریز جمع آوری و ژن $2A^{HP}$ در ۱۱ جدایه تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین ترادف شد. این ژن در سطح نوکلوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۲۷-۰/۸ و ۳۵-۰/۸ درصد تنوع داشت که نشانگر تنوع بیشتر در سطح آمینواسیدی نسبت به اسیدهای نوکلئیک است. نتایج آزمون نوترکیبی بر وجود نقطه داغ برای نوترکیبی را تایید نمود. فشار انتخابی این ژن در تمامی بخش‌های آن یکسان نبوده به طوری که انتهای آمینی $2A^{HP}$ متناظر با نوکلئوتیدهای ٥٦٤-٤٠٨ بیشتر از ۱ بود. وجود جهش‌های نقطه‌ای که منجر به تغییر امینواسیدها شده‌اند به همراه نوترکیبی می‌توانند تنوع بیشتر اسیدآمینه‌ها در مقایسه با نوکلئوتیدها را در این ناحیه ژنی توجیه کنند.

واژه‌های کلیدی

مو،
ویروس برگ بادبزنی،
تبارزائی،
ژن $2A^{HP}$،
تعیین توالی

مقدمه

بیش از ٦٠ گونه ویروسی مختلف از تاکستان‌های سراسر دنیا شناسایی و گزارش شده‌اند که از میان آنها *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) عامل بیماری برگ بادبزنی مو یکی از مضرترین و قدیمی‌ترین ویروس‌های انگور شناخته شده است (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017). این ویروس از جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* است و ژنوم آن از دو مولکول RNA که انتهای '٥ و '٣ آنها به ترتیب متصل به VPg (virus protein genome-linked) و پلی‌آدنین است. هر کدام از RNAهای ژنومی یک پلی پروتئین رمز می‌کند. پلی پروتئین P2 که از RNA2 رمز می‌شود به سه پروتئین کوچکتر $2A^{HP}$، $2B^{MP}$ (پروتئین حرکتی) و $2C^{CP}$ (پروتئین پوششی) شکسته می‌شود (Andret-Link *et al.*, 2004). گاهی این ویروس موجب تغییرشکل شاخه‌ها، کوتاه شدن و زیگزاگی شدن میانگره‌ها، نامتقارن شدن برگ‌ها و دندانه‌دار شدن حاشیه آن‌ها (سندروم برگ بادبزنی) و همچنین علایم موزاییک و سبز روشن شدن رگبرگ‌ها (سندروم رگبرگ نواری) است (Martelli and Savino, 1990).

در ایران اطلاعات در مورد این ویروس محدود به ردیابی آن، تعیین توالی ژن‌های پروتئین پوششی (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2007, Sokhandan-Bashir *et al.*, 2011, Sokhandan-Bashir and Melcher, 2012, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013) و حرکتی (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2007, Sokhandan-Bashir *et al.*, 2012, Sokhandan-Bashir and Melcher, 2012, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2015) است و گزارش RNA2 آن در چهار جدایه و اطلاعاتی در مورد طول کامل ژن $2A^{HP}$ به آنها مربوط می‌شود (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013).

انتهای آمینی پروتئین $2A^{HP}$ از لحاظ اندازه در نپوویروس‌ها متفاوت است (Loudes *et al.*, 1995) این پروتئین در *Tomato black ring virus* (TBRV) و *Hungarian Grapevine chrome mosaic nepovirus* (HGCMV) به ترتیب ٤٠ و ٥٠ کیلو دالتون وزن دارد، در حالیکه در GFLV و *Arabis mosaic virus* (ArMV) اندازه این پروتئین تقریبا مشابه و در حدود ٢٨ کیلودالتون است. ناحیه مرکزی پروتئین $2A^{HP}$ در بین جدایه‌های ArMV و GFLV حفاظت شده است، درحالیکه ناحیه آمینی در هر دو ویروس تنوع زیادی دارد (Mekuria *et al.*, 2009, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2014).

نشان داده شده است که تفاوت در ایجاد علایم به تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بستگی دارد (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2012). همچنین شواهد مشابهی از ویروس موزاییک آرابیس (*Arabis mosaic virus*)، نزدیک‌ترین گونه به GFLV، گزارش شده است که مقایسه بخش‌های مختلف ژنوم نشان داد بیشترین تنوع در ArMV در ژن $2A^{HP}$ است. در مقایسات دوبدوی این ناحیه از ژنوم ویروس در ٤ جدایه مورد بررسی نشان داده شد که این ژن در جدایه‌های همراه با رگ‌نواری جدا شده از استان‌های آذربایجان‌شرقی و قزوین تفاوتی وجود ندارد ولی در دو جدایه ارومیه و شیرامین که همراه با علایم زردی بودند، تنوع دیده شد (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013). از این‌رو در این تحقیق تنوع ژنتیکی GFLV $2A^{HP}$ بویژه در جدایه‌های همراه با علایم زردی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مشکوک به آلودگی به GFLV در اواسط بهار و اوایل تابستان بیشتر براساس علایم زردی و نیز سایر علایم شامل سندرم رگ نواری و برگ بادبزنی (Martelli and Savino, 1990) از تاکستان‌های شیرامین، حومه تبریز، بناب، ملکان و شهرستان تاکستان جمع‌آوری گردید. برای ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک جمع‌آوری شده، از DAS-ELISA و با استفاده از کیت‌های شرکت DSMZ آلمان یا Agritest ایتالیا و بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. برای انجام RT-PCR ابتدا RNAی کل گیاه به روش چهارم روحانی و همکاران (١٩٩٥) استخراج گردید. ساخت cDNA با استفاده از کیت Trancriptase RevertAid Reverse (Thermofischer, Germany) و مطابق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. PCR با استفاده از آنزیم *Taq* polymerse شرکت سینا کلون (ایران) انجام شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ١ نشان داده شده-

اند. آغازگرهای G2-3370-s/3NC برای تایید نتایج الیزا و ردیابی GFLV به روش RT-PCR بکار برده شدند. برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer3 استفاده شد. بسته به ترکیب آغازگری مورد استفاده، قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل استخراج و در یکی از حامل‌های pTG19-T (Vivantis, Malaysia) یا pTZR57 (Thermofischer, Germany) همسانه‌سازی شد. پلاسمیدهای نوترکیب پس از انتخاب برای تعیین توالی به شرکت Macrogene (کره جنوبی) ارسال شدند. برای بررسی نتایج تعیین توالی از نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) استفاده شد. برای رسم درخت تبارزائی از نرم‌افزار Phylogeny Inference Package (Phylip) version 3.65 استفاده شد. رس شماره جدایه‌های مورد استفاده در در درخت تبارزایی آورده شده است. جدایه ArMV-NW با شماره NC006056 به عنوان عضو برون گروه در آنالیزها بکار برده شد. نرم‌افزار DnaSP برای محاسبه فشار انتخابی و محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت استفاده شد.

نتایج و بحث

ردیابی ویروس

با استفاده از آزمون DAS-ELISA ویروس برگ بادبزنی مو، در ۲۶ نمونه از ۳۰ نمونه‌ی مشکوک جمع‌آوری شده ردیابی شد. نتایج حاصل از این آزمون حاکی از آلودگی برخی از تاکستان‌های بناب، روستای شیرامین، تاکستان و تبریز به GFLV بود. لازم به ذکر است که نتیجه الیزا بر روی برخی از نمونه‌های مشکوک به رگ‌نواری و برگ بادبزنی منفی بود. این علایم می‌توانند توسط سایر ویروس‌ها نیز ایجاد شوند (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2006).

نتایج RT-PCR

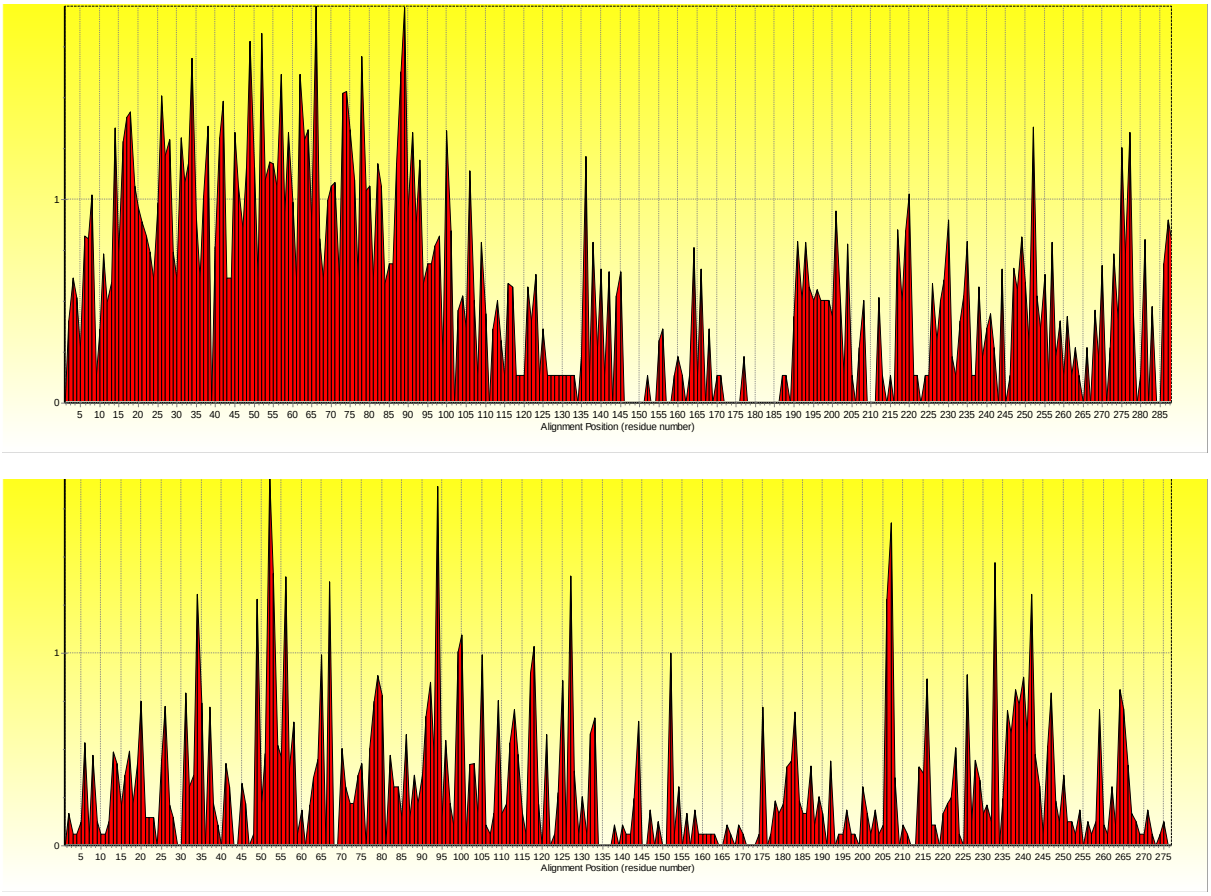
قطعه مورد انتظار، بخشی از RNA2 متناظر با نوکلوتئیدهای ۳۷۰۴–۳۳۶۵ و ۲۵۳۹ تا دنباله آدنوزینی طی RT-PCR و به ترتیب با استفاده از آغازگرهای G2-3370-s/3NC و GFLV-CP2-s/Oligo $d(T)_{25}$ (جدول ۱) که برای تشخیص GFLV و تایید نتایج الیزا انجام شد، توانستند آنرا تکثیر کنند و داده‌های الیزا را تایید نمایند. از میان آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش (جدول ۱)، 5’NC/G2A-992-as، G2-631-s/G2-1179-as، 5’NC/G2-1390-as و 5’NC/G2A-as نتوانستند ژن $2A^{HP}$ را بطور کامل یا بخش از آنرا را سنتز کنند. جایگاه دقیق و اندازه قطعه تکثیری مورد انتظار در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Tabel 1. Sequence of primers used in this study.

Primer name نام آغازگر	Sequence 5’ to 3’ توالی آغازگر از انتهای ′۵ تا ′۳	Position on RNA2 موقعیت در RNA2	Reference منبع
G2-1179-as	TYCTRGCYTGCTCRAAHGTCA	1179-1200	This study
G2A-992-as	CATCYGCACARCACACAGA	992-1009	This study
M4	GTDATCCACTTYTCATACTG	2172-2153	Wetzel *et al*., 2002
G-1390-as	GGCCTTGCTCAATCATGTCT	1238-1219	This study
G2-3370-s	GCTCTCCAAAGGTTAGAGGG	3365-3384	Nourinejhad Zarghani *et al*., 2013
G2-1570-as	GCTCTCGCTAGCCCATTTCC	1587-1568	Nourinejhad Zarghani *et al*., 2012
3NC	GTTCGGTGATATGGAGAGCG	3704-3685	Wetzel *et al*., 2002
5'NC	CCAAGAGTTTRRGAAACTCA	51-71	Wetzel *et al*., 2002
G2A-as	TYCTRGCYTGCTCRAAHGTCA	1013-977	This study
G2-631-s	CGGGCCAYTGTGGAAAGRCT	631-650	This study
GFLV-CP2-s	CACGTTGGTATTTGATCCAG	2539-2558	Nourinejhad Zarghani *et al*., 2013
Oligo $d(T)_{25}$	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Poly A	Nourinejhad Zarghani *et al*., 2013

هم‌چنین جفت آغازگرهای 5’NC/G2-1179-as و 5’NC/G2-1570-as ژن $2A^{HP}$ را به همراه بخش ترجمه نشونده انتهای '۵ و بخشی از ژن پروتئین حرکتی را تنها در برخی جدایه‌ها و همراه با قطعات غیر اختصاصی تکثیر نمودند. اما جفت آغازگر M4 و 5'NC توانست ترجمه نشونده انتهای '۵ تا ابتدای پروتئین پوششی را که حاوی ناحیه $2A^{HP}$ بطور کامل بود را در تمام جدایه‌های مورد بررسی تکثیر نماید. از آنجا که از این آغازگرها برای جدایه‌های مناطق دیگر نیز استفاده شده بود، بنظر می‌رسد آغازگرهای مناسبی برای تکثیر بخشی از ژنوم GFLV حاوی $2A^{HP}$ هستند. در نهایت قطعات بدست آمده از واکنش RT-PCR در جدایه‌های Shir Amin-01، Shir Amin-152، Shir Amin-10، Shir Amin-06، Shir Amin-12، Tabriz-1، Malekan، Bonab-2 و Takestan-2 همسانه سازی و تعیین توالی شدند.



شکل ۱- نمودار پراکنش و میزان تنوع ژنتیکی $GFLV\ 2A^{HP}$ در سطح نوکلئوتیدی (بالا) و آمینو اسیدها (پایین). محور طولی نشان دهنده موقعیت نوکلئوتیدها یا آمینو اسیدها پس از زیر همچینی، و نمودار عرضی نشان دهنده تعداد تغییرات در آن جایگاه است.

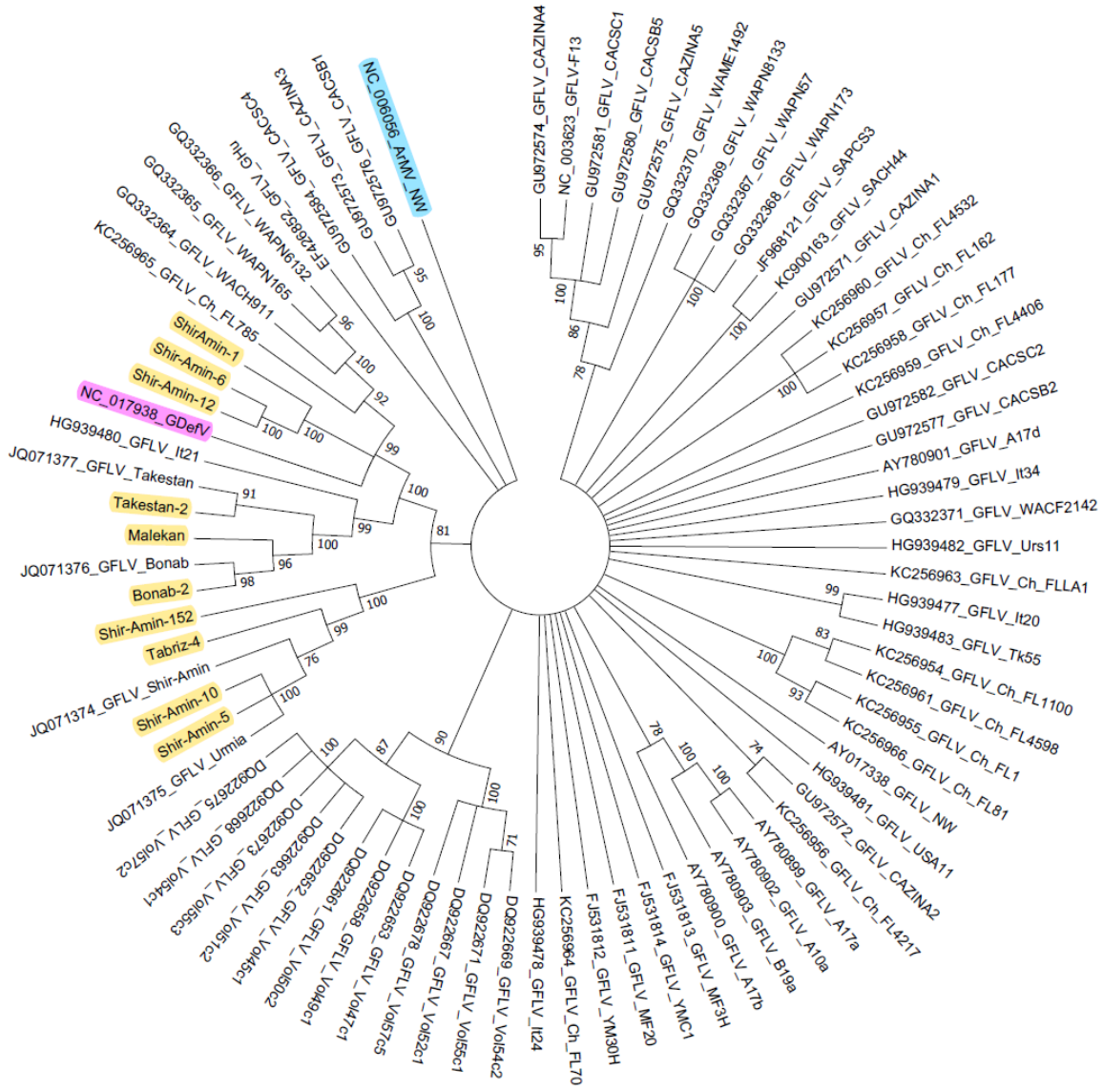
Figure 1. Distribution of nucleotide (upper) or amino acid (lower) differences in the GFLV $2A^{HP}$ isolates after alignment. The longitudinal axis denotes position of the nucleotide (upper graph) or amino acids (lower graph) and latitude axis denotes the percentage of the differences at a position.

نتایج تعیین توالی و آنالیز داده‌ها

اندازه ژن $2A^{HP}$ در جدایه‌های تعیین توالی شده در این مطالعه ۷۷٤ تا ۷۹۸ نوکلئوتید بود. با توجه به گزارش‌های قبلی اندازه‌ی ژن $2A^{HP}$ در جدایه‌ی A17d، ۷٦۵ نوکلئوتید (Vigne *et al.*, 2004)، در جدایه‌های CACSB2 و WACF2142 ۷٦۸ نوکلئوتید (Oliver *et al.*, 2010) و در سایر جدایه‌های از قبل تعیین توالی شده از سایر مناطق دنیا ۷۷۱ یا ۷۷٤ (Serghini *et al.*, 1990, Wetzel *et al.*, 2002, Vigne *et al.*, 2005, Pompe-Novak *et al.*, 2007, Vigne *et al.*, 2008, Mekuria *et al.*, 2009, Oliver

(*et al.*, 2010). نوکلئوتید بود. اندازه‌ی ژن $2A^{HP}$ در جدایه‌های Bonab-2 و Malekan (تعیین توالی شده در این پژوهش) مشابه جدایه های از قبل تعیین توالی شده از ایران با علایم رگ‌نواری یعنی جدایه‌های Bonab و Takestan (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013) ۷۹۸ نوکلئوتید بود که تا کنون طولانی‌ترین ژن $2A^{HP}$ تعیین توالی شده در بین جدایه‌های GFLV به شمار می‌آیند. با بررسی زیرهمچینی توالی نوکلئوتیدی این ژن در جدایه‌های مختلف مشخص شد رخدادهای حذف و اضافه و نوترکیبی در ناحیه‌ی ژن $2A^{HP}$ باعث تفاوت در اندازه‌ی این ژن از ۷٦۵ نوکلئوتید در جدایه‌ی A17d تا ۷۹۸ نوکلئوتید در جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق بناب و شیرامین شده است. این تغییرات در اندازه‌ی طول RNA2 در محدوده‌ی تعیین شده برای زیرگروه A نپوویروس‌ها است (Fauquet *et al.*, 2005). نتایج مشابهی در مورد ژن ArMV $2A^{HP}$، نیز گزارش شده است (Wetzel *et al.*, 2002). ژن $2A^{HP}$ در ArMV هم از لحاظ اندازه و هم تنوع به چهار گروه تقسیم می‌شوند؛ به طوری که این ژن در جدایه‌های ArMV از ٦۹۹، ۷۷٤، ۷۷۷ و یا ۸٤۰ نوکلئوتید تشکیل شده است. علت تفاوت در اندازه‌ی این ژن در ArMV نیز مربوط به رخدادهای حذف و اضافه در این ژن گزارش شده است. تاکنون هیچ نقش بیولوژیکی برای این تفاوت ارایه نشده است (Wetzel *et al.*, 2002). این تنوع می‌تواند ناشی از خطای آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRP) حین همانندسازی و بویژه نوترکیبی (Duffy *et al.*, 2008; Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2014) باشد. با ترسیم نمودار پراکنش جهش‌های رخ داده در ناحیه $2A^{HP}$ (شکل ۱) مشخص شد بیشترین پراکنش این جهش‌ها در ناحیه انتهای آمینی و پس از آن انتهای کربوکسیلی است و بخش مرکزی این ژن نسبت به سایر قسمت‌های این ناحیه دچار جهش کمتری شده است. در مقایسات دوبدوی توالی‌های $2A^{HP}$ مابین جدایه‌های GFLV در سطح نوکلئوتیدی، تشابه بین جدایه ها ۹۹/۲–۷۳ درصد و در سطح آمینواسیدها ۹۹/۲–٦۵ درصد بود. بعبارت دیگر تنوع این ناحیه از ژنوم GFLV در سطح اسیدهای آمینه بیشتر از تنوع آن در سطح نوکلئوتیدی بود.

بررسی‌های فیلوژنتیکی: در درخت ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن $2A^{HP}$ (شکل ۲)، جدایه‌های GFLV شامل جدایه‌های تعیین توالی شده در این مطالعه و جدایه‌هایی که توالی آن‌ها در بانک اطلاعات موجود است (در کل ۸۹ جدایه) بر اساس درخت فیلوژنتیکی در ۱۳ گروه قرار گرفتند و تعدادی از جدایه‌ها شامل NW از آلمان، Ch-FL4406 و Ch-FC70 از شیلی، GHu از مجارستان، WAME1492، WACF2142، CACSC2، CAZINA5، GFLV-USA11، CACSB2 وCAZINA1 از آمریکا، GFLV-Urs11 از روسیه و GFLV-It24 از ایتالیا در هیچ گروهی قرار نگرفتند (شکل ۲). گروه‌بندی‌ها نشانگر عدم انطباق منشاء جغرافیایی و گروه‌بندی فیلوژنتیکی هستند، بنابراین نمی‌توان با درخت‌های بدست آمده منشاء جغرافیایی جدایه‌ها را تعیین نمود. جدایه مرجع (GFLV-F13 از کشور فرانسه) همراه با سه جدایه از آمریکا در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌های آمریکایی گزارش شده و مورد استفاده در آنالیزها در سه گروه قرار گرفتند و تعداد ۱۳ جدایه بدون گروه‌بندی باقی ماند، در حالیکه (Oliver *et al.*, 2010) این جدایه‌ها را در ٦ گروه تقسیم‌بندی کرده بودند و تعدادی از جدایه‌ها در هیچ گروهی قرار نگرفته بودند. جدایه‌های NW، GHu، WACF2142، CACSC2، CACSB2 وCAZINA1 در این مطالعه در هیچ گروهی قرار نگرفته‌اند که با نتایج الیور و همکاران (Olivier *et al.*, 2010) مطابقت داشت. جدایه‌های اسلواکی نیز در دو گروه بزرگ قرار گرفتند که با داده‌های ارایه شده در تحقیق دیگر (Melcher *et al.*, 2008, Elbeaino *et al.*, 2014) مطابقت داشت. جدایه‌های شیلی در دو گروه قرار گرفتند و جدایه‌های Ch-FL4406 و Ch-FL70 در گروهی قرار نگرفت. جدایه ترکیه با یکی از جدایه‌های ایتالیایی (It20) و دیگر جدایه‌ی It21 با جدایه‌های ایرانی در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌های ایرانی به دو گروه تقسیم شدند: نخست جدایه‌های عامل رگ‌نواری شامل Bonab، Takestan، Tabriz-1 و Malekan به همراه جدایه ایتالیایی و نیز سه جدایه از شیرامین که از گیاهی با دو علایم رگ نواری و موزاییک زرد جدا شده بودند؛ دوم جدایه‌های Shir Amin، Urmia و نیز چهار جدایه دیگر از شیرامین با علایم زردی در یک گروه دیگر قرار گرفتند. جدایه‌های شیرامین (هشت جدایه) همه با علایم زردی در دو گروه قرار گرفتند و این امر نشان دهنده تنوع زیاد این جدایه‌ها در این منطقه است.

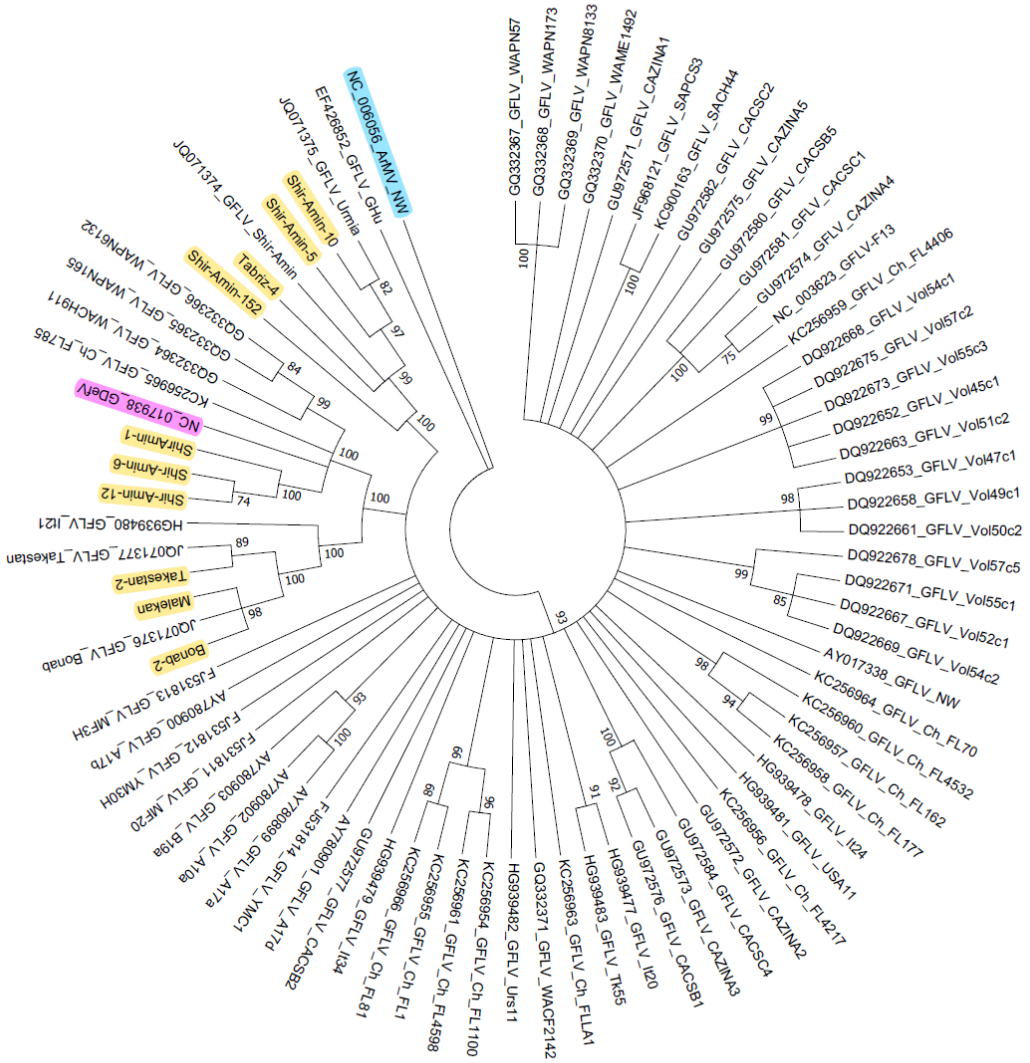


شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی نوکلئوتیدی ژن $2A^{HP}$ جدایه‌های GFLV به روش نزدیکترین همسایه. شاخه‌هایی با بوت استرپ بیشتر از ۷۰٪ نمایش داده شده‌اند. جدایه ArMV-NW به عنوان عضو برون گروه با رنگ آبی، *Grapevine deformation virus* (GDefV) با رنگ بنفش و جدایه‌های ایرانی تعیین توالی شده در این پژوهش به رنگ زرد نشان داده شده‌اند.

Figure 2. Neighbor-joining tree based on the nucleotide sequence of GFLV $2A^{HP}$ gene. Branches with supports less than 70% were collapsed. ArMV-NW as outgroup isolate was shown in blue, *Grapevine deformation virus* (GDefV) in purple and Iranian isolates of GFLV sequenced in this study in yellow.

این روستا از قدیمی‌ترین روستاهای تولید انگور است که به لحاظ موقعیت توسط موانع طبیعی یعنی تپه‌ها و کوه‌ها محاط شده است و قدیمی‌ترین باغات را دارد. حتی قلمه‌های باغ‌های تازه تاسیس از باغ‌های قدیمی گرفته می‌شود، بنابراین اگر قلمه‌ها از گیاهان آلوده اخذ شده باشند، که به نظر چنین است (براساس مصاحبه‌های انجام شده با کشاورزان) قدمت درختان انگور یا پایه‌ها شاید به بیش از ۲۵۰ سال برسد. RNA2 جدایه Shir-Amin (شماره JQ071374) به طور کامل تعیین توالی شده و معلوم شده است که این جدایه‌ها دارای کوتاه‌ترین RNA2 در بین جدایه‌های GFLV هستند. از آن‌جا که انتهای ترجمه نشونده سایر بخش‌های RNAی جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق به طور کامل بررسی نشده‌اند، نمی‌توان گفت که جدایه‌های مورد

مطالعه در این تحقیق نیز دارای کوتاه‌ترین RNA2 هستند. یکی از محققان پیشنهاد کرده که بین جدایه‌های ایتالیایی و ایرانی با علایم مشخص یک رابطه فیلوژنتیکی برقرار است و موتیف‌های مشترکی را برای این جدایه‌ها معرفی کرده است (Elbeaino *et al.*, 2014). در درخت ترسیم شده جدایه‌های ایجاد کننده رگ‌نواری و موزاییک زرد از هم تفکیک شدند. اما از آنجا که جدایه‌های Shir Amin-01، Shir Amin-06 و Shir Amin-12 که از گیاهانی با علایم مشکوک به هردو سندروم جدا شده‌اند نیز نزدیک به جدایه‌های رگ‌نواری گروه‌بندی شده‌اند، نمی‌توان نظریه ارایه شده را رد یا قبول کرد، چرا که علایم ایجاد شده در گیاهانی که این جدایه‌ها جمع‌آوری شده‌اند، می‌تواند ناشی از آلودگی مخلوط باشد. الگوی گروه‌بندی مشاهده شده در درخت مبنی بر توالی آمینواسیدی ژن $2A^{HP}$ (شکل ۳) مشابه گروه‌بندی بر اساس توالی نوکلئوتیدی بود.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی اسیدهای آمینه ژن $2A^{HP}$ به روش نزدیکترین همسایه. شاخه‌هایی با بوت استرپ بیشتر از ۷۰٪ نمایش داده شده‌اند. جدایه‌ی ArMV-NW به عنوان عضو برون گروه با رنگ آبی، *Grapevine deformation virus* (GDefV) با رنگ بنفش و جدایه‌های ایرانی تعیین توالی شده در این پژوهش به رنگ زرد نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Neighbor-joining tree based on the amino acid sequence of GFLV $2A^{HP}$ gene. Branches with supports less than 70% were collapsed. ArMV-NW as outgroup isolate was shown in blue, *Grapevine deformation virus* (GDefV) in purple and Iranian isolates of GFLV sequenced in this study in yellow.

جدول ۲- تخمین شاخص‌های جمعیتی براساس ناحیه $2A^{HP}$.

Table 2. Estimating genetic parameters based on the $2A^{HP}$.

N	S	Pi(a)	Pi(s)	Pi(a)/Pi(s)	Pi	Θ_W
۹	۲٦۸	۰/۱٦۱۸۸	۰/۲٦٥۲٤	۰/٦۱۰	۰/۱۹۸٥۱ ±(۰/۰۲۱۹۱)	۰/۱۳۰۹٥ ± (۰/۰٥٤٦۹)

N: تعداد نمونه، S: تعداد سایت‌های افتراقی، Pi(a): نسبت جهش‌هایی که منجر به تغییر در توالی آمینواسیدها شده‌اند، Pi(s): نسبت جهش‌هایی که منجر به تغییر در توالی آمینواسیدها نشده‌اند، Θ_W و Pi: تنوع نوکلئوتیدی.

N: number of samples, S: Segregating sites, Pi(a): the average number of asynonymous substitutions, Pi(s): the average number of asynonymous substitutions, Θ_W and Pi: nucleotide diversity.

جدایه‌های GHu، CACSC1، CACSC2، CACSB2،CACSB3،CAZINA1، WAME1492، WACF2142، CAZINA5، CAZINA2 و En-03 همگی از آمریکا، Urs11 (ایران)، Ch-FL70 و Ch-FL4217 (هر دو از شیلی) و NW (آلمان) بدون گروه قرار گرفتند. الگوی گروه‌بندی جدایه‌های آمریکایی، اسلواکی، ایتالیایی نیز کم و بیش مشابه درخت مبنی بر اساس توالی نوکلئوتیدی بود. در کل جدایه‌های GFLV در ١٤ گروه تقسیم بندی شدند که جدایه‌های ایرانی در این درخت همانند گروه‌بندی ارایه شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی گروه‌بندی شدند.

با توجه به گروه‌بندی‌های گزارش شده بر اساس ژن‌های $2C^{CP}$، $2B^{MP}$ و $2A^{HP}$، طول کامل ORF2 و RNA2 (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013) و گروه‌بندی حاصل از ژن $2A^{HP}$ در این تحقیق و نیز با دقت در توالی ژن $2A^{HP}$ در سطح اسیدهای آمینه و نوکلئوتید و مقایسات دو به دوی انجام شده، می‌توان نتیجه گرفت که ژن $2A^{HP}$ دارای بیشترین تنوع در میان جدایه‌های مورد مطالعه GFLV و ArMV بوده است و بدلیل نوترکیبی‌های متعدد رخ داده در این ناحیه (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, 2014) برای آنالیزهای فیلوژنتیکی ناحیه مناسبی نیست، اما با توجه به تنوع بالای آن می‌توان از آن برای گروه‌بندی در سطح زیرگونه در صورت نیاز استفاده کرد. از سوی دیگر با توجه به انطباق آنالیزهای نوترکیبی با منطقه $2A^{HP}$ نمی‌توان با قاطعیت به گونه‌ی ویروس پی برد، چرا که نشان داده شده است که جدایه-ArMV Butterbure و نیز GDefV در بین جدایه‌های GFLV گروه‌بندی می‌شوند (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2014) بنابراین استفاده از این ژن برای شناسایی گونه ویروس توصیه نمی‌شود.

نتایج تعیین شاخص‌های جمعیتی براساس ژن $2A^{HP}$

شاخص‌های ژنتیکی تخمین زده شده بر اساس ژن‌های $2A^{HP}$ در جدول ۲ آورده شده‌اند. بر اساس تحلیل‌ها Θ_W (۰/۰۳۷۹٤± ۰/۱۲۹۸۹) و Pi (۰/۰۰۹۸۹ ± ۰/۱٤۱۳۹) برای ژن $2A^{HP}$ بود که در مقایسه این اعداد با گزارش‌های ارایه شده برای نواحی مختلف (Wetzel *et al.*, 2002, Pompe-Novak *et al.*, 2007, Mekuria *et al.*, 2009, Oliver *et al.*, 2010, Sokhandan-Bashir and Melcher, 2012, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2014) دارای بیشترین تنوع در مقایسه با Θ_W تخمین زده شده برای ژن‌های $2B^{MP}$ و $2C^{CP}$ است. نسبت‌های محاسبه شده‌ی Pi(a)/Pi(s) برای ژن $2A^{HP}$ کمتر از یک بود که نشان از وجود فشار انتخابی منفی (purifying selection) است. اما این نسبت‌ها در تمامی بخش‌های این ژن یکسان نبود بطوریکه این مقدار برای انتهای آمینی $2A^{HP}$ متناظر با نوکلئوتیدهای ٥٦٤-٤۰۸ بیشتر از ۱ بود.

نتایج بررسی فشارهای تکاملی بر اسید آمینه های ژن $2A^{HP}$ نشان داد که بیشترین انتخاب منفی در کدون ۷۸ وجود دارد و نیمه اول ژن مذکور بیشتر تحت انتخاب منفی و نیمه دوم بیشتر تحت انتخاب مثبت است. با توجه به این نتایج و نیز نتایج بررسی تنوع ژنتیکی در دو منطقه ژنی، می‌توان گفت انتهای مرکزی و کربوکسیل پروتئین $2A^{HP}$ که تنوع کمتری دارد و تحت انتخاب منفی است، نقش مهمتری در مقایسه با بخش‌های دیگر این پروتئین دارد و تغییر در آن می تواند منجر به از بین رفتن جهش یافته مربوطه شود.

جمع بندی: طی این پژوهش، آغازگرهایی برای ناحیه $2A^{HP}$ طراحی و کارایی آنها مورد بررسی قرار گرفت و سعی شد بخشی از ژنوم ویروس که بیشترین تنوع را دارد تکثیر شود. در گزارش-

های قبلی نیز برخی جدایه‌های آذربایجان‌شرقی با الیزا ردیابی نشدند (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2011) ولی با RT-PCR ردیابی شدند. جفت آغازگر 5'NC/M4 به خوبی جدایه‌های ایرانی را ردیابی کردند و برای ردیابی جدایه‌هایی از GFLV در مناطقی که هنوز هیچ اطلاعاتی در مورد آن وجود ندارد، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد اما از سوی دیگر برای ردیابی همزمان چند ویروس طی آزمون‌هایی نظیر real-time PCR و multiplex PCR بهتر است از آغازگرهای طراحی شده برای بخش‌های دیگر ژنوم GFLV که توانایی ردیابی همه جدایه‌ها را دارند و اندازه قطعه مورد انتظار کوچکتری را تکثیر می کنند، استفاده شوند (Mackay, 2007). آغازگرهای GFLV-3370/3NC و GFLV-CP2-s/Oligo $d(T)_{25}$ (که برای جدایه‌های ایرانی این ویروس معرفی شده‌اند (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013)، در ردیابی ابتدایی جدایه‌ها نیز موفق عمل نمودند (اطلاعات نشان داده نشده‌اند).

طی مقایسه‌ی بخش‌های مختلف RNA2 در بین جدایه‌های GFLV و ArMV، مشخص شد ژن $2A^{HP}$ بیشترین تنوع را دارد (Wetzel *et al.*, 2002, Imura *et al.*, 2008, Mekuria *et al.*, 2009, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013; 2014). از سوی دیگر در بیشتر موارد به ویژه در جدایه‌های ایرانی، تنوع ژنتیکی ژن $2A^{HP}$ در سطح اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی نشان داد که در این جدایه‌ها تنوع ژن $2A^{HP}$ در سطح اسیدهای آمینه بیشتر از نوکلئوتیدهاست. یکی از مهم‌ترین منابع تغییر در ویروس‌هایی با ژنوم RNA، پلیمراز ویروس است که فاقد توان تصحیح است (Holland *et al.*, 1992). از آنجا که بیشتر اسیدهای آمینه بیش از یک کدون دارند، ممکن است بسته به محل جهش تغییر در توالی نوکلئوتیدی منجر به تغییر در توالی اسید آمینه‌ای نشود. بطور معمول اگر جهشی در سومین نوکلئوتید کدون اسیدآمینه رخ دهد می‌تواند منجر به تغییر اسید آمینه نشود، ولی اگر تغییر در اولین نوکلئوتید کدون صورت گیرد، منجر به تغییر در اسید آمینه شود (Nei and Kumar, 2000). به همین دلیل اغلب تنوع در سطح اسیدهای آمینه کمتر از میزان تنوع همان ژن در سطح نوکلئوتیدی است. همچنین نرخ تنوع در ویروس‌هایی با ژنوم RNA در حدود $۱۰^{-۴}$–$۱۰^{-۵}$ جهش به ازای یک نوکلئوتید (García-Arenal *et al.*, 2001) که میزان تنوع در ژن $2A^{HP}$ بیشتر از این محدوده است. از طرفی میزان تنوع ناشی از رویدادهای نوترکیبی در مقایسه با جهش‌های ایجادی توسط RdRp ویروس بیشتر بوده و نوترکیبی مهمترین عامل در ایجاد تنوع ژنتیکی در ویروس‌ها به شمار می‌آید (García-Arenal *et al.*, 2001). برخلاف گزارش‌های قبلی که تنها نشان از انتقال بخش‌هایی از RNA2 ویروس ArMV به GFLV بود (Oliver *et al.*, 2010)، داده‌های این پژوهش نشان داد که ژن $2A^{HP}$ حداقل در یک جدایه ArMV-Butterbur نوترکیب بوده و منشاء آن GFLV است. نشان داده شده است که در همسانه‌های نوترکیب تهیه شده برای جدایه‌ی ArMV-NW، در صورت جایگزینی انتهای آمینی یا ژن کامل GFLV $2A^{HP}$ اختلالی در تکثیر ویروس نوترکیب ایجاد نمی‌شود، هر چند تنوع در ژن $2A^{HP}$ می‌تواند در میزان همانندسازی RNA2 ویروس نقش داشته باشد (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2014). در مطالعات مختلف تنوع در ژن $2A^{HP}$ مرتبط با ایجاد علایم مختلف در یک میزبان (مو) یا میزبان‌های مختلف (گیاهان آزمایشگاهی مثل تکثیری و لکه موضعی) فرض شده است (Pompe-Novak *et al.*, 2007, Imura *et al.*, 2008, Mekuria *et al.*, 2009, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, Elbeaino *et al.*, 2014, Martin *et al.*, 2018)، چرا که در جدایه‌هایی که با یک سندروم مرتبط بودند موتیف‌هایی نیز شناسایی شده‌اند (VxxQAQSR, CxSGxSAxxAExxARxxKxxSLERV, PxxQxxTECxITPGGIxxExxTxxTTxTSRvv, QxxxxPxVxxxxxxxMxRxxxxP). اما نقش این موتیف‌ها در ایجاد علایم هنوز به اثبات نرسیده است (Elbeaino *et al.*, 2014).

مقایسات توالی‌های در دسترس GFLV نشان داد که $2A^{HP}$ به لحاظ ژنتیکی به همان اندازه $2B^{MP}$ یا $2C^{CP}$ محافظت شده نیست و به لحاظ اندازه و توالی دارای تنوع (حداکثر ۳۵ درصد) است (Pompe-Novak *et al.*, 2007, Vigne *et al.*, 2008). در برخی مقالات این تنوع در ژن $2A^{HP}$ مرتبط با تنوع علایم جدایه‌های این ویروس گزارش شده است (Naraghi-Arani *et al.*, 2001). در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده که ۵۰ آمینواسید انتهای کربوکسیلی پروتئین $2A^{HP}$ در بروز علائم نکروتیک نقش دارد و شاید یک تعیین کننده بیماریزایی و محرک حساسیت فوق العاده است (Martin *et al.*, 2018) و ممکن است عامل تنوع در علائم باشد. از سوی دیگر نوترکیبی که یک رخداد متداول در

ویروس‌های گیاهی است در GFLV هم دیده شده است. این بخش از ژنوم به نظر نقطه داغ برای رخدادهای نوترکیبی است و تاکنون کمترین میزان نوترکیبی برای GFLV CP گزارش شده است (Pompe-Novak *et al.*, 2007, Imura *et al.*, 2008, Mekuria *et al.*, 2009, Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013, 2014, Elbeaino *et al.*, 2014, Martin *et al.*, 2018). با توجه به اینکه تعداد زیادی توالی از GFLV در بانک اطلاعاتی GenBank وجود دارد، اما اطلاعات در مورد ژن $2A^{HP}$ و اینکه از چه گروه علایم دیده شده است، موجود نیست. بنابراین ایجاد ارتباط بین علایم و داده‌ها بسیار دشوار بوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه است.

منابع

Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. and Fuchs, M. 2004. *Grapevine fanleaf virus*: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*: 183-195.

Digiaro, M., Elbeaino, T. and Martelli, G. 2017. *Grapevine fanleaf virus* and other old world nepoviruses. Grapevine viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. pp. 47-82. Springer.

Duffy, S., Shackelton, L. A. and Holmes, E. C. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, **9**: 267-276.

Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G. P. and Digiaro, M. 2014. Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic'and 'infectious malformation'syndromes in Grapevine. *Archives of Virology*, **159**: 2757-2764.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press.

Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. and Ritzenthaler, C. 1999. Protein 2A of *Grapevine fanleaf nepovirus* is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, **264**: 25-36.

García-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, **39**: 157-186.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucleic acids symposium series. pp. 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

Holland, J. J. D., De La Torre, J. and Steinhauer, D. 1992. RNA Virus Populations as Quasispecies. Genetic diversity of RNA viruses. pp. 1-20. Springer.

Imura, Y., Oka, H., Kimata, K., Nasu, M., Nakahama, K. and Maeda, T. 2008. Comparisons of complete RNA-2 sequences, pathological and serological features among three Japanese isolates of Arabis mosaic virus. *Virus Genes*, **37**: 333-341.

Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y., Daubert, S. and Rowhani, A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, **87**: 1179-1182.

Loudes, A. M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M. A. and Pinck, L. 1995. The 119 kda and 124 kda polyproteins of Arabis mosaic nepovirus (isolate s) are encoded by two distinct RNA2 species. *Journal of General Virology*, **76**: 899-906.

Mackay, I. M. 2007. *Real-time pcr in microbiology: From diagnosis to characterization*, Horizon Scientific Press.

Martelli, G. and Savino, V. 1990. Fanleaf degeneration. *Compendium of Grape Diseases*: 48-49.

Martin, I. R., Vigne, E., Berthold, F., Komar, V., Lemaire, O., Fuchs, M. and Schmitt-Keichinger, C. 2018. The 50 distal amino acids of the $2A^{HP}$ homing protein of *Grapevine fanleaf virus* elicit a hypersensitive reaction on nicotiana occidentalis. *Molecular Plant Pathology*, **19**: 731-743.

Mekuria, T. A., Gutha, L. R., Martin, R. R. and Naidu, R .A. 2009. Genome diversity and intra- and interspecies recombination events in

Grapevine fanleaf virus. *Phytopathology*, **99**: 1394-1402.

Melcher, U., Muthukumar, V., Wiley, G. B., Min, B. E., Palmer, M. W., Verchot-Lubicz, J., Ali, A., Nelson, R. S., Roe, B .A. and Thapa, V. 2008. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from Ambrosia psilostachya. *Journal of Virological methods*, **152**: 49-55.

Naraghi-Arani, P., Daubert, S. and Rowhani, A. 2001. Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of General Virology*, **82**: 1791-5.

Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford university press.

Nourinejhad Zarghani, S., Dupuis-Maguiraga, L., Bassler, A. and Wetzel, T. 2014. Mapping of the exchangeable and dispensable domains of the RNA2-encoded $2A^{HP}$ protein of *Arabis mosaic nepovirus*. *Virology*, **458**: 106-113.

Nourinejhad Zarghani, S., Karimi, M., Zarghani, A. N. and Hosseinzadeh, M. R. 2015. Genetic diversity of and selection pressure on Grapevine fanleaf virus movement protein in Iranian isolates. *Plant Protection*, **38**.

Nourinejhad Zarghani, S., Shams- Bakhsh, M., Sokhandan-Bashir, N. and Wetzel, T. 2013. Molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of *Grapevine fanleaf virus. Journal of Phytopathology*, **161**: 419-425.

Oliver, J., Vigne, E. and Fuchs, M. 2010. Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* populations. *Virus Research*, **152**: 30-40.

Pompe-Novak, M., Gutiérrez-Aguirre, I., Vojvoda, J., Blas, M., Tomažič, I., Vigne, E., Fuchs, M., Ravnikar, M. and Petrovič, N. 2007. Genetic variability within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*. *European Journal of Plant Pathology*, **117**: 307-312.

Schmitt-Keichinger, C., Hemmer, C., Berthold, F. and Ritzenthaler, C. 2017. Molecular, cellular, and structural biology of *Grapevine fanleaf virus*. Grapevine viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. pp. 83-107. Springer.

Serghini, M., 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.

Sokhandan-Bashir, N., Hooshmand, A. and Delpasand-Khabazi, A. 2012. Molecular characterization of phylogenetically distinct isolates of Grapevine fanleaf virus from Iran based on $2A^{HP}$ gene. *Indian Journal of Virology*, **23**: 50-56.

Sokhandan-Bashir, N., Koolivand, D. and Behjatnia, S. a. A. 2015. Preparation of polyclonal antibodies to *Grapevine fanleaf virus* coat protein expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **14**: 173-180.

Sokhandan-Bashir, N. and Melcher, U. 2012. Population genetic analysis of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Virology*, **157**: 1919-1929.

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.

Sokhandan-Bashir, N., Zarghani, S. N. and Hejazi, M. S. 2007. Diversity of *Grapevine fanleaf virus* isolates from Iran. *Virus Research*, **128**: 144-148.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. and Fuchs, M. 2004. Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, **85**: 2435-2445.

Vigne, E., Demangeat, G., Komar, V. and Fuchs, M. 2005. Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Virology*, **150**: 2241-2255.

Vigne, E., Marmonier, A. and Fuchs, M. 2008. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus*. *Archives of Virology*, **153**: 1771-1776.

Wetzel, T., Fuchs, M., Bobko, M. and Krczal, G. 2002. Size and sequence variability of the *Arabis mosaic virus* protein 2A. *Archives of Virology*, **147**: 1643-1653.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

Grapevine fanleaf virus $2A^{HP}$ gene shows more diversity at amino acid level rather than nucleotide level

Marziyeh Enteshari[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2*] and Sayed Mohsen Nassaj Hosseini[3]

[1] M.Sc, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran
[2] Assistant Professor of Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran
[3]Assistant Professor of ACECR, Gillan Branch, Rasht.

*Corresponding author: sh_nourinejhad@ut.ac.ir

Abstract

Grapevine fanleaf virus (GFLV) has been reported from vineyards worldwide. The virus causes different symptoms categorized as three distinct syndromes including fan leaf degeneration, yellow mosaic, and vein banding. These variations in the symptoms can be addressed by analysis of genetic diversity of the virus. The aim of the present study was to estimate genetic diversity of the corresponding $2A^{HP}$ gene in GFLV isolates especially the ones that are associated with the yellow mosaic syndrome. Accordingly, the Grapevine samples were collected from vineyards in Bonab, Shir-Amin, Hossein-Abad, and Tabriz in East Azarbaijan Province of Iran. After amplification of GFLV $2A^{HP}$ gene from the infected samples via RT-PCR, the products were cloned and sequenced. The sequenced GFLV $2A^{HP}$ gene from 11 different isolates showed 0.8-27% and 0.8-35 % diversity at nucleotide and amino acid levels, respectively, denoting a higher diversity of $2A^{HP}$ amino acid sequence than its nucleotide sequence. Likewise, presence of a hot spot for recombination events on $2A^{HP}$ region was explored by the use of recombination analysis. Moreover, it was found that the selection pressure on $2A^{HP}$ region is not uniformly distributed so that the ratio (dn/ds) for the N-terminus proximity, between the nucleotides 408-564, was more than one. Therefore, synonymous point mutations as well as recombination events might be reason for this evidence.

Keywords: Grapevine, GFLV, sequencing, phylogeny, nepoviruses, $2A^{HP}$