ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۲۰-۱۱

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های آلوده کننده گل محمدی در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان

Detection and distribution of the important viruses infecting Damask rose in floricultures of Isfahan, Markazi and Kerman provinces

فائزه السادات ابطحی[۱]، مسعود شمس‌بخش*[۱]، مجید مهدیه[۲]، ناصر صفایی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استادیار، دانشگاه اراک

Abtahi FS[1], Shams-Bakhsh M*[1], Mahdiyeh M[2], Safaie N[1]

1. PhD Student, Associate Professors, Tarbiat Modares University
2. Assistant professor, Arak University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۹- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)، ویروس موزائیک سیب (*Apple mosaic virus*, ApMV) و ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus*, ArMV) از مهمترین ویروس‌های گل رز در دنیا به شمار می‌آیند. هدف از انجام این پژوهش ردیابی و تعیین پراکنش این ویروس‌ها در گلستان‌های گل محمدی واقع در استان‌های اصفهان، کرمان و مرکزی بود. به این منظور، ۷۴۹ نمونه برگی طی دو سال زراعی ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ و بصورت تصادفی از این گلستان‌ها جمع‌آوری شدند. آلودگی این نمونه‌ها به PNRSV، ArMV و ApMV با استفاده از آزمون سرولوژیکی به روش الیزای مستقیم (Double Antibody Sandwich-ELISA, DAS-ELISA) و با استفاده از پادتن‌های اختصاصی برای هر کدام از سه ویروس، بررسی شد. نتایج نشان داد که در سال زراعی ۱۳۹۱، ۴/۴۱ درصد از نمونه‌ها به ArMV، ۲/۲۰ درصد از نمونه‌ها به ApMV و ۶/۳ درصد از نمونه‌ها به PNRSV و در سال زراعی ۱۳۹۲، ۲/۳۱ درصد از نمونه‌ها به ArMV، ۵/۳۲ درصد از نمونه‌ها به ApMV و ۴/۱۶ درصد از نمونه‌ها به PNRSV آلوده بودند. با توجه به این که پراکنش PNRSV نسبت به دو ویروس دیگر بیشتر بود، تعیین توالی ژن رمزکننده پروتئین پوششی PNRSV برای بررسی بیشتر جدایه‌های این ویروس انجام، درخت فیلوژنتیکی ترسیم و ماتریس درصد تشابه و ردیابی وقایع نوترکیبی انجام شدند. بر اساس درخت فیلوژنتیکی، جدایه‌های ایرانی در گروه PV96 قرار گرفتند. این اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی PNRSV در ایران و اولین گزارش از وقوع آلودگی گلستان‌های گل محمدی استان‌های مرکزی و اصفهان به PNRSV، ApMV و ArMV می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین پوششی
تعیین توالی
ApMV
ArMV
PNRSV

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

مقدمه

گل محمدی (*Rosa damascene* Miller) از مهمترین گیاهان معطر می‌باشد که از روغن و اسانس آن برای تولید دارو، عطر، اسانس و برخی دیگر از فرآورده‌های معطر استفاده می‌شود (Demirozer et al. 2009). این گیاه در بسیاری از مناطق دنیا از جمله ترکیه، بلغارستان، مراکش، ایران، مصر، فرانسه، چین و هندوستان کشت می‌شود (Weiss 1996). استان‌های اصفهان و کرمان از مهمترین استان‌های تولید کننده گل محمدی به لحاظ وسعت سطح زیر کشت هستند (Nikbakht and Kafi 2010). تنش‌های مختلف از جمله بیماری‌های ویروسی رز در کاهش کیفیت و کمیت محصول اهمیت ویژه‌ای دارند و چندین ویروس مختلف می‌توانند گونه‌های جنس *Rosa* را آلوده کنند که از این میان سه ویروس موزائیک سیب (*Apple mosaic virus*, ApMV)، ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus*, ArMV) و لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) از مهمترین و خسارت‌زاترین این ویروس‌ها به شمار می‌آیند (Sertkaya 2009).

ویروس موزائیک آرابیس (ArMV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* با دامنه میزبانی وسیع می‌باشد. پیکره ویروس ایزومتریک بوده و ژنوم آن از دو قطعه RNA تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است (Loudes et al. 1995). این ویروس در طبیعت توسط *Xiphinema diversicaudatum* و *X. americanum* و نیز بوسیله بذر، دانه گرده و پیوند منتقل می‌شود. ویروس موزائیک آرابیس در ایران از رزکاری‌های مناطق مختلف تهران (Rakhshandehroo et al. 2006) و گوجه فرنگی و انگور (Massumi et al. 2009; Doustsedigh et al. 2012) گزارش شده است.

هر دو ویروس PNRSV و ApMV متعلق به جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* می‌باشد. این ویروس‌ها ایزومتریک بوده و ژنوم آنها از سه قطعه RNA تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است (Oliver et al. 2009). انتقال ApMV با پیوند و نیز اندام-های تکثیری گیاه انجام می‌شود. این ویروس دامنه متفاوتی از علایم مانند پیسک[1]، موزائیک[2]، سبزردی[3] و لکه حلقوی بافت مرده[4] را در گیاهان میزبان ایجاد می‌کند. در ایران نخستین بار ApMV از ارقام سیب گلاب شفیع آبادی و کهنز در مشهد، کرج و شهریار گزارش شد (Manouchehri 1968). سپس این ویروس به همراه ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) از ارقام سیب فوجی و گلدن دلیشز در مزرعه تحقیقاتی کمال آباد کرج گزارش شده است (Mizani and Hajnajari 2013). ویروس PNRSV نیز از طریق تماس مکانیکی، اندام‌های تکثیری آلوده، پیوند و در بسیاری از گونه‌های هسته‌دارن با دانه گرده و بذر منتقل می‌شود. همچنین انتقال این ویروس توسط کنه و نماتد نیز گزارش شده است (Moury et al. 2000). علایم آلودگی به PNRSV در گیاه رز شامل خطوط و حلقه‌های سبزردی و نقش برگ بلوطی[5] می‌باشد. در ایران نخستین بار PNRSV از استان اردبیل و دشت مغان گزارش شد (Moini and Izadpanah 2000). پس از آن این ویروس از رزهای زینتی در استان تهران (Rakhshandehroo et al. 2006)، باغ‌های هسته داران استان گلستان (Fallah and Nasrollanejad 2009) و گیاه پیچک صحرایی استان های تهران، البرز و مازندران (Sabaghian et al. 2013) گزارش شده است. همچنین پراکنش این ویروس در باغ‌های هسته داران استان‌های فارس و گلستان بررسی شده است و آلودگی نمونه‌ها با استفاده از روش RT-PCR تایید شد (Rahmanian et al. 2013). نژادهای PNRSV بر اساس تفاوت‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و همچنین تفاوت در توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و حرکتی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. جدایه‌های مختلفی از PNRSV که تاکنون از نظر مولکولی تعیین خصوصیت شده در سه گروه فیلوژنتیکی با نام‌های PE5-III، PV96-II و PV32-I قرار می‌گیرند (Guo et al. 1995; Hammond and Crosslin 1995; Sanchez-Navarro and Pallas 1997). تجزیه جدایه‌ها نشان داده که بین دامنه میزبانی، منشا جغرافیایی و توالی نوکلئوتیدی یا اسید آمینه ارتباط خاصی وجود ندارد. تجزیه توالی ژن پروتئین پوششی نشان داده که این

[1] Mottling
[2] Mosaic
[3] Chlorosis
[4] Necrotic ring spot
[5] Oak leaf pattern

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

پروتئین فوق‌العاده حفاظت شده است (Aparicio et al. 1999; Vaškova et al. 2000; Moury et al. 2001; Glasa et al. 2002; Hammond 2003; Salem et al. 2004).
ردیابی و تعیین پراکنش عوامل ویروسی در میزبان‌های مختلف پیش نیاز تدوین استراتژی مناسب برای کنترل خسارت ناشی از این عوامل است. همچنین با توجه به گزارش PNRSV از نقاط مختلف ایران، (Moini and Izadpanah 2000; Rakhasandehroo et al. 2006; Rahmanian et al. 2013; Sabaghian et al. 2013) کنترل این ویروس ضروری می‌باشد. یکی از مهمترین راه‌های کنترل ویروس‌های گیاهی استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. پیش از آن که مقاومت نسبی ارقام و یا گیاه تراریخت برای کنترل ویروس بررسی شود، بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو هدف پژوهش حاضر بررسی پراکنش سه ویروس ApMV، ArMV و PNRSV و تعیین ترادف قسمت‌هایی از توالی ژنوم جدایه‌های ویروس غالب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه برداری

طی فصول بهار تا پاییز سال‌های ۹۱ و ۹۲ بازدیدهایی از گلستان‌های گل محمدی شهرستان‌های قمصر، نیاسر و مشهد، اردهال از استان اصفهان، نراق و جاسب از استان مرکزی و شهرستان بردسیر از استان کرمان انجام گرفت. در مجموع ۷۴۹ نمونه به صورت تصادفی و با حرکت در قطر گلستان‌ها جمع آوری شدند. تعداد ۱۱۵ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۱۵۳ نمونه در سال ۱۳۹۲ از استان مرکزی، تعداد ۱۴۴ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۲۱۲ نمونه در سال ۱۳۹۲ از استان اصفهان و تعداد ۵۸ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۶۷ نمونه در سال ۱۳۹۲از استان کرمان جمع‌آوری شد (جدول‌های ۱ و ۲).

آزمون سرولوژیکی

بررسی آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به ویروس‌های موزائیک سیب، موزائیک آرابیس و لکه حلقوی بافت مرده هسته داران با استفاده از پاتن‌های اختصاصی تهیه شده از شرکت DSMZ (برانشوایک- آلمان) و به روش ساندویچ دو طرفه[1] الیزا (DAS-ELISA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

[1] Double antibody sandwich

عصاره هر نمونه به طور تصادفی در دو چاهک به عنوان تکرار بارگذاری شد. میزان تغییر رنگ ایجاد شده در ماده زمینه ۴-پارا نیتروفنیل فسفات (شرکت مرک، آلمان) در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا خوان (ELISA –reader مدل Beckman AD340 ساخت آمریکا) هر پانزده دقیقه تا یک ساعت و نیم پس از افزودن ماده زمینه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از فرمول $R= x + 3\ SD$ که در آن x میانگین جذب نمونه منفی و SD انحراف معیار چاهک‌ها و R سطح آستانه آلودگی می‌باشد، محاسبات انجام شد.

استخراج RNA کل

با توجه به نتایج بدست آمده از الیزا و پراکنش بیشتر PNRSV نسبت به دو ویروس دیگر، از گیاهان آلوده به این ویروس RNA کل به روش توصیف شده Chang et al. (1993) با اندکی تغییرات انجام شد. به این منظور یک گرم بافت برگ تازه درون نایلون‌های مخصوص عصاره گیری قرار داده شد و به هر نمونه مقدار سه میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل تریس-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار pH = ۸، کلرید سدیم ۱/۴ مولار، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، دو درصد CTAB، سولفیت سدیم یک درصد و دو درصد PVP-40) اضافه و بصورت یکنواخت عصاره‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل به میکروتیوب منتقل و به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به میزان ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط آماده کلروفرم و ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به یک) اضافه و مخلوط شد. در مرحله بعد، به مدت ۱۵ دقیقه در g ×۱۴۰۰۰ و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد میانگریز شد. فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل و یکبار دیگر به میزان هم حجم فاز رویی از مخلوط آماده کلروفرم و ایزوآمیل الکل اضافه و مخلوط شد. میانگریزش به مدت ۱۵ دقیقه در g ×۱۴۰۰۰ و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شده و به میزان برابر کلرید لیتیم چهار میلی‌مولار به مخلوط اضافه و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عمل میانگریز به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. رسوب بدست آمده در ۲۰۰ میکرولیتر بافری متشکل از تریس HCl ۱۰ میلی‌مولار pH= ۸ یک میلی‌مولار EDTA و دو درصد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

جدول۱- نتایج آزمون الیزا برای تعیین میزان پراکندگی ویروس‌های PNRSV، ArMV و ApMV در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان در سال ۱۳۹۱.

استان	شهر	تعداد نمونه مورد بررسی	PNRSV		ArMV		ApMV	
			تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
	قمصر	۵۰	۶	٪۱۲	۵	٪۱۰	۳	٪۶
اصفهان	نیاسر	۵۲	۴	٪۷/۷	۱	٪۱/۹۲	۱	٪۱/۹۲
	مشهد اردهال	۴۲	۳	٪۷/۱۴	۳	٪۷/۱۴	۰	۰
مرکزی	نراق	۵۵	۷	٪۱۴	۳	٪۵/۴۵	۱	٪۱/۸۱
	جاسب	۶۰	۰	۰	۲	٪۳/۳۳	۲	٪۳/۳۳
کرمان	بردسیر	۵۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	کل	۳۱۷	۲۰	٪۶/۳	۱۴	٪۴/۴۱	۷	٪۲/۲۰

جدول۲- نتایج آزمون الیزا برای تعیین میزان پراکندگی ویروس‌های PNRSV، ArMV و ApMV در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان در سال ۱۳۹۲.

استان	شهر	تعداد نمونه مورد بررسی	PNRSV		ArMV		ApMV	
			تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
	قمصر	۷۱	۶	٪۸/۴	۴	٪۵/۶۳	۸	٪۱۱/۲۶
اصفهان	نیاسر	۶۷	۳	٪۴/۴۷	۲	٪۲/۹۸	۳	٪۴/۴۷
	مشهد اردهال	۷۴	۴	٪۵/۴	۰	۰	۴	٪۵/۴۰
مرکزی	نراق	۷۶	۵	٪۶/۵۷	۳	٪۳/۹۴	۵	٪۲/۶۳
	جاسب	۷۷	۰	۰	۱	٪۱/۲۹	۳	٪۱/۲۹
کرمان	بردسیر	۶۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	کل	۴۳۲	۱۸	٪۴/۱۶	۱۰	٪۲/۳۱	۲۳	٪۵/۳۲

SDS به حالت سوسپانسیون در آورده شده و پس از آن RNA کل با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم پنج میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس میانگریزش به مدت ۱۵ دقیقه در $g \times ۱۴۰۰۰$ و در دمای چهار درجه سانتی-گراد انجام شد. پس از آن رسوب بدست آمده با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. در نهایت رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (شرکت مرک، آلمان) به حالت سوسپانسیون در آمده و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش نسخه برداری معکوس

برای ردیابی PNRSV، از آغازگرهای رفت Ilar1 با توالی '3-5'-TTCTAGCAGGTCTTCATCGA و برگشت Ilar2 با توالی '3-5'-CCACCGAGAGGTTGGCA (Candresse et al. 1997) برای تکثیر قسمتی از منطقه ژنی مسئول بیان پروتئین پوششی ویروس به اندازه ۲۰۶ نوکلئوتید در فاصله نوکلئوتیدهای ۱۵۶۸ تا ۱۷۷۲ بر اساس ژنوم جدایه PE5 (Hammond and Crosslin 1995) و برای تکثیر کامل ژن پروتئین پوششی PNRSV به طول ۶۷۵ نوکلئوتید از آغازگر رفت MG1 با توالی '3-5'-ACTCTAGATCTCAAGCAGGTC و آغازگر برگشت MG2 با توالی '3-5'-ATGGTTTGCCGAATTTGCAAT (Glasa et al. 2002) استفاده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

جدول ۳- مشخصات جدایه‌های PNSRV منتشر شده در GenBank که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

جدایه	کشور	میزبان	شماره دسترسی بانک ژن	گروه فیلوژنتیکی
6-54	چک	آلو	AF170160	PV96-II
30-4	آمریکا	هلو	U57046	PV32-I
AlmCl.car1	شیلی	بادام	EF565247	PV96-II
AlmIt-cor1	ایتالیا	بادام	AJ133204	PV96-II
AlmIt-pre1	ایتالیا	بادام	AJ133202	PV96-II
AprIt-caf1	ایتالیا	زرد آلو	AJ133199	PV96-II
AprIt-try1	ایتالیا	زرد آلو	AJ133201	PV32-I
CH30	آمریکا	آلبالو	AF034994	PE5-III
CH38	آمریکا	آلبالو	AF034991	PV32-I
CH57	آمریکا	آلبالو	AF034993	PV32-I
CH9	آمریکا	آلبالو	AF034992	PV32-I
Ch71	آمریکا	آلبالو	AF03445	PE5-III
Chr1	کانادا	آلبالو	JQ005030	PV96-II
ChrIt.bla1	ایتالیا	آلبالو	AJ133210	PV96-II
ChrIt-lam1	ایتالیا	آلبالو	AJ133203	PV96-II
ChrIt-mrs1	ایتالیا	آلبالو	AJ133209	PV96-II
E260	هند	گل رز	AJ619958	PV32-I
I-9	لهستان	زرد آلو	DQ983493	PV96-II
Nahnuta	چک	آلو	AF170169	PV96-II
NctSp-mur1	اسپانیا	شلیل	AJ133208	PV96-II
Pch1	کانادا	هلو	JQ005047	PV96-II
PchIt-may1	ایتالیا	هلو	AJ133205	PV96-II
PchIt-mry1	ایتالیا	هلو	AJ133207	PE5-III
PchTu-unk1	تونس	هلو	AJ133206	PV32-I
PE-5	آمریکا	هلو	L38823	PE5-III
PlmAl-unk1	آلبانی	آلو	AJ133211	PV32-I
PlmIt-clf1	ایتالیا	آلو	AJ133212	PV96-II
PNRSV-AL1	استرالیا	بادام	EU368735	PV96-II
PNRSV-Ch41	چین	آلبالو	FJ610341	PV96-II
PNRSV-Mk	مجارستان	گیلاس	EU368738	PV96-II
PNRSV-RP84	لهستان	گل رز	DQ003584	PV32-I
PS 14-22	چک	آلبالو	AF170159	PV32-I
PS12-16	چک	آلبالو	AF170158	PV32-I
PS7-12	چک	آلبالو	AF170162	PV96-II
PV-32	امریکا	سیب	Y07568	PV32-I
PV-96	آلمان	محلب	S78312	PV96-II
RM-2.India.Rose	هند	گل رز	AY948440	PV32-I
RosIr1-Mas1	ایران-مشهد اردهال	گل محمدی	KJ599816	-
RosIr2-Nis1	ایران-نیاسر	گل محمدی	KJ599817	-
RosIr3-Ghs1	ایران- قمصر	گل محمدی	KJ599818	-
RosIr4-Nag1	ایران-نراق	گل محمدی	KJ599819	-
RSIn-95	هند	گل رز	AJ969095	PV32-I
S-Ch95	چین	آلبالو	EU869295	PV32-I
UH1	چک	آلو	AF170163	PV96-II
Valticka	چک	هلو	AF170171	PV96-II
Yunnan	چین	گل رز	AY684271	PV32-I

واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. ابتدا ۱۵ میکروگرم RNA به همراه ۲۰ پیکومول آغازگر برگشت به لوله‌های PCR انتقال یافته و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر تیمار شدند. سپس مخلوطی از دو میکرولیتر بافر واکنش با پنج برابر غلظت، یک میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs)، ۲۰ واحد آنزیم بازدارنده ریبونوکلئاز (Ribonuclease inhibitor)، ۵۰ واحد آنزیم M-MuLV RT و آب تیمار شده با DEPC به هر تیوب اضافه شد، به طوری که حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر شد. واکنش ساخت cDNA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و در آخر ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، همسانه‌سازی و تعیین توالی DNA

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس به عنوان الگو، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، دو میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، دو میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ده برابر (شامل ۵۰۰ mM از KCl و Tris-HCl (اسیدیته ۸/۴))، ۱/۵ میلی‌مولار از dNTPs و ۱/۲۵ واحد آنزیم تک پلیمراز (*Taq* Polymerase) (پرومگا، آمریکا) و در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در این مرحله شامل یک چرخه واسرشت-سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۳۳ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه و سرانجام یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و برای تعیین توالی ابتدا محصول به دست آمده از روی ژل با استفاده از کیت Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (پرومگا، آمریکا) جدا و قطعات استخراج شده برای الحاق به حامل پلاسمیدی pGEM-Teasy طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و پس از آن با

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

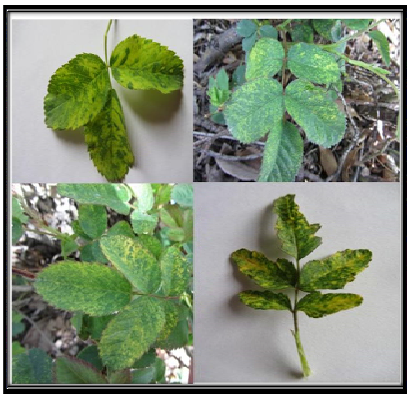
استفاده از شوک الکتریکی (اپندورف، آلمان) به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* 1022 ترانسفورم شدند. برای استخراج پلاسمید از کیت Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification system (پرومگا، آمریکا) استفاده شد. پس از آن به منظور هضم حامل‌های نوترکیب برای بررسی قطعات DNA الحاقی به حامل چهار میکرولیتر از حامل نوترکیب با آنزیم‌های برشی *Not*I و *Eco*RI به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد و در نهایت نمونه‌ها روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. تعدادی از همسانه‌های حاوی قطعات مورد انتظار انتخاب و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت آلمانی MWG Biotech ارسال شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی

توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده بـه وسـیله نـرم‌افـزار Vector NTI advance 11.5 (اینویترون، امریکا) همگذاری[1] شدند. سپس توالی جدایه‌های تعیین توالی شده در این پژوهش بـا تـوالی‌هـای ثبت شده در GenBank با اسـتفاده از CLASTAL W موجـود در نرم‌افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013) همردیف‌سازی[2] شدند. سپس درصد تشابه تـوالی‌هـا توسـط نـرم افـزار BioEdit (Hall 1999) محاسبه شد. برای بررسی روابط فیلوژنتیکی و تعیین فشار انتخابی موجود بر روی پـروتئین پوششـی PNSRV از نـرم‌افـزار MEGA6 استفاده شد. وقایع نوترکیبی احتمالی از طریق نرم‌افـزار RDP v.4 (Martin et al. 2010) بررسی شدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمون الیزای انجام شده بر روی ۳۱۷ نمونه جمع‌آوری شده از استان‌های مرکزی، اصفهان و کرمان در سال زراعی ۱۳۹۱ نشان داد که ۱۴ نمونه (۴/۴۱ درصد) به ArMV، هفت نمونه (۲/۲۱ درصد) به ApMV و ۲۰ نمونه (۶/۳ درصد) به PNRSV آلوده بودند (جدول۱). در سال زراعی ۱۳۹۲ از ۴۳۲ نمونه بررسی شده، ده نمونه (۲/۳۱ درصد) به ArMV، ۲۳ نمونه (۵/۳۲ درصد) به ApMV و ۱۸ نمونه (۴/۱۶ درصد) به PNRSV آلوده بودند (جدول۲). در گیاهان گل محمدی آلودگی به PNRSV علایمی



شکل ۱- علایم موازییک و بد شکلی ایجاد شده در برگ‌های بوته گل محمدی در اثر ابتلا به ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته داران.

شامل موزائیک، کلروز بین رگبرگی و بد شکلی مشاهده شد (شکل ۱).

نتایج الیزاهای نشان داد که در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ گلستان‌های گل محمدی در قمصر نسبت به سایر مناطق مطالعه شده دارای آلودگی بیشتری به هر سه ویروس ApMV، ArMV و PNRSV بودند. رویشگاه‌های گل محمدی در شهرستان قمصر از قدیمی‌ترین و سنتی‌ترین مناطق پرورش این محصول در کشور محسوب می‌شوند، به علاوه این مراکز در مجاورت باغ‌های میوه هسته‌داران و دانه‌داران واقع شده‌اند (Nikbakht and Kafi 2010). از اینرو شیوع بالاتر ویروس‌های مورد مطالعه نسبت به سایر مناطق استان اصفهان و استان‌های مرکزی و کرمان مورد انتظار بوده و به نظر می‌رسد ویروس از این مناطق به سایر گلستان‌ها انتقال یافته باشد. بی‌شک مطالعات بیشتر برای تعیین منشا آلودگی اولیه ضروری است.

نتایج نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه بردسیر کرمان به ویروس‌های مورد مطالعه آلوده نبودند، با این وجود بررسی بیشتر و دقیق‌تر منطقه برای آلودگی به سایر ویروس‌ها ضروری می‌باشد. در صورت اثبات عدم آلودگی به ویروس، اعمال قرنطینه استانی برای جلوگیری از ورود ویروس‌ها پیشنهاد می‌شود. بردسیر کرمان یکی از قطب‌های تجاری پرورش گل محمدی در کشور به شمار می‌رود (Nikbakht and Kafi 2010) و پرورش دهندگان گل در این منطقه از روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای برای احداث گلستان‌های جدید استفاده می‌کنند که می تواند دلیلی برای عدم وقوع آلودگی ویروس در این منطقه باشد.

[1] Assembly
[2] Alignment

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

جدول ۴- ماتریس درصد برابری دوبه دو بین نوکلئوتیدهای (پایین شکل) و آمینواسیدهای (بالای شکل) ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران ایران و نماینده سه تیپ گروه PV32، PV96 و PE5.

nt \ aa	RosIr1	RosIr2	RosIr3	RosIr4	PE-5	PV-96	PV-32	ApMV-Shiel
RosIr1	ID	100	99.1	99.5	90.1	98.6	95	50
RosIr2	100	ID	99.1	99.5	90.1	98.6	95	50
RosIr3	99.2	99.2	ID	98.6	90.1	98.6	95	50
RosIr4	99.5	99.5	99.4	ID	89.7	98.2	94.6	49.5
PE-5	88.1	88.1	88.1	88.1	ID	91	90.1	52.2
PV-96	98.6	98.6	98.8	98.8	88.4	ID	95.5	50.4
PV-32	95.2	95.2	95.2	95.2	89.3	95.5	ID	49.5
ApMV	56.1	56.1	56	56	56.5	56.4	57.6	ID

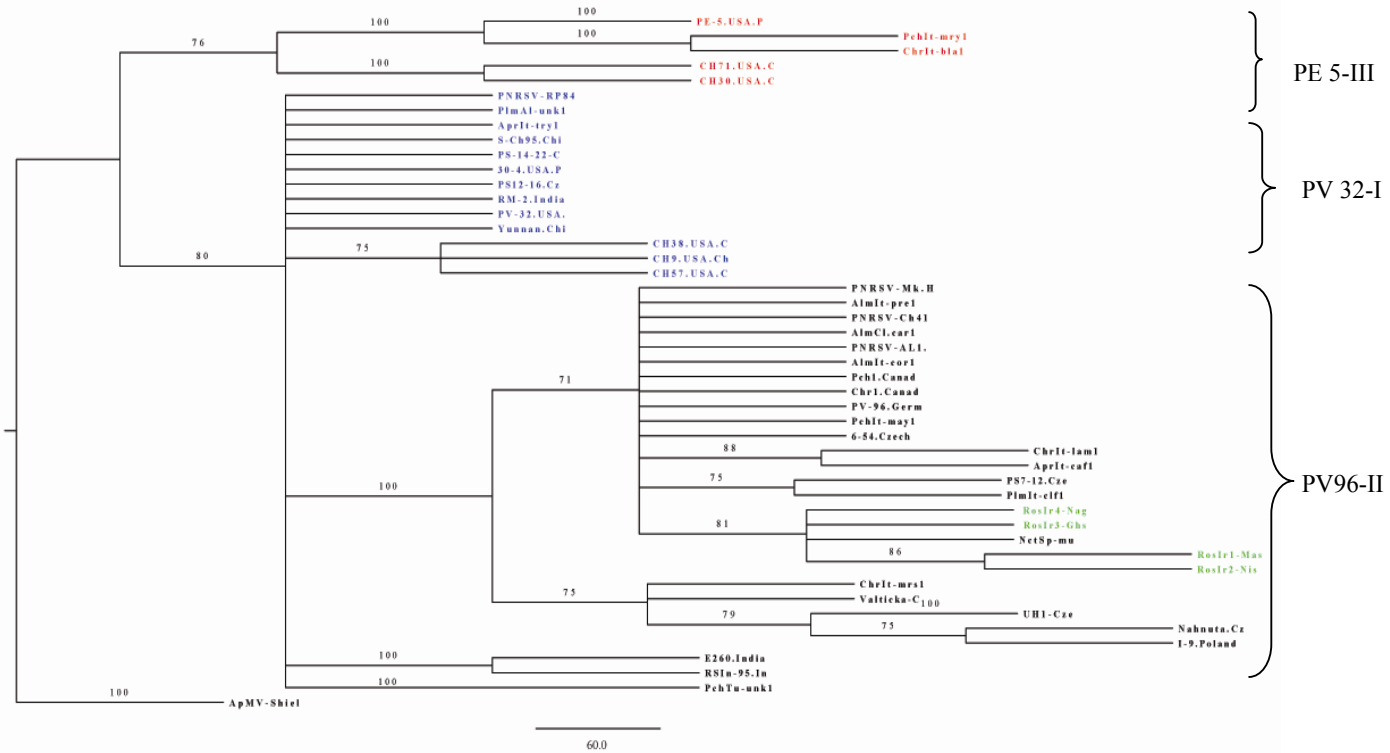
از اینرو گلستان‌ها بردسیر می‌تواند خزانه مناسبی در تکثیر و تولید قلمه گل محمدی باشد. مطالعات قبلی در مورد درصد آلودگی و تعیین شایع‌ترین ویروس‌های رزکاری‌های نشان داد که ArMV و PNRSV به ترتیب با ۲۳/۱ درصد و ۱۸/۸ درصد آلودگی با اهمیت‌ترین ویروس‌های رز در استان تهران (Rakhshandehroo et al. 2006) و در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی ArMV به ترتیب ۳۰/۳ درصد و ۳۰/۲ درصد (Doustsedigh et al. 2012) گزارش شده است، در حالی‌که در پژوهش حاضر بیشترین درصد آلودگی به این ویروس‌ها کمتر از هفت درصد بود. روش نمونه‌برداری (جمع‌آوری نمونه‌های دارای علایم یا نمونه‌برداری تصادفی)، تنوع گیاهان مورد مطالعه، حضور و جمعیت حشرات گرده افشان با توجه به شرایط آب و هوایی و تراکم بالای باغ‌های دانه‌داران و وجود تاکستان‌های متعدد را می‌توان از علل تفاوت در نتایج پژوهش‌های یاد شده با مطالعه حاضر تلقی کرد. یافته‌های این پژوهش با نتایج Sertkaya (2009) که حضور سه ویروس موزائیک سیب، ویروس موزائیک آرابیس و ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار را در طی دو سال بررسی کرد مطابقت دارد.

نتایج ردیابی مولکولی و تعیین توالی پروتئین پوششی PNRSV قطعه ۲۰۶ جفت بازی مورد انتظار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ilarviruses (Ilar1 و Ilar2) و نیز قطعه ۶۷۵ جفت بازی برای تکثیر پروتئین پوششی PNRSV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MG1 و MG2 در واکنش RT-PCR تکثیر شد (شکل۲). توالی چهار جدایه از PNRSVهای جمع‌آوری شده در این پژوهش، پس از تعیین توالی در پایگاه اطلاعاتی GenBank با رس شمارهای KJ599816 تا KJ599819 ثبت شد.

تجزیه و تحلیل توالی‌های ویروسی و ترسیم ماتریس برابری چهار جدایه تعیین توالی شده در این پژوهش در سطح اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه به ترتیب ۱۰۰-۹۹/۴ و ۱۰۰-۹۸/۶ درصد تشابه داشتند. تشابه در سطح نوکلئوتید در منطقه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی در جدایه‌های ایران با سه تیپ گروه (Phylogroup) معرفی شده توسط Aparicio et al. (1999) که شامل PV32 (رس شمار Y07568 ، Sanchez-Navarro and Pallas 1997)، PV96 (رس شمار S78312، Guo et al. 1995) و PE5 (رس شمار L38823، Hammond and Crosslin 1995) می‌باشند به ترتیب ۹۵/۲، ۹۸/۸ و ۸۸/۱ درصد و در سطح اسیدآمینه به ترتیب ۹۴/۶، ۹۸/۶ و ۸۹/۷ درصد بود (جدول ۴). بنابراین بیشترین شباهت در هر دو سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با گروه PV96 مشاهده شد.

تشابه توالی در سطح نوکلئوتید بین جدایه‌های ایران و جدایه‌های PV96 و PV32 بیش از ۹۰ درصد بود. ارتباط بین توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایران و سه مدل تیپ گروه نشان داد که هر چهار جدایه ایرانی در گروه PV96 طبقه-بندی شدند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی در طول نوکلئوتیدهای ژن رمز کننده پروتئین پوششی جدایه‌های موجود در GenBank و جدایه‌های ایران، با روش Minimum-evolution بر اساس مدل Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984) و درصد حمایتی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار. درخت با ApMV –Shiel (رس شمار U15608) ریشه دهی شده است. گروه بندی جدایه‌ها براساس رنگ نشان داده شده است: قرمز برای PE5-III؛ آبی برای PV32-I و مشکی برای PV96-II . جدایه‌های ایران داخل کادر و با رنگ سبز از سایر جدایه‌ها متمایز شده اند.

ردیابی وقایع نوترکیبی با استفاده از بسته نرم‌افزاری ردیابی وقایع نوترکیبی RDP v.4 (Martin et al. 2010) و با روش‌های RDP، GENECONV، BootScan، MaxChi، Chimaera، SiScan و 3Seq با رعایت پارامترهای پیش فرض موجود در نرم‌افزار، در مقایسه ناحیه مورد نظر پروتئین پوششی هم در مقایسه جدایه‌های PNRSV با هم هیچ گونه شواهد اولیه نوترکیبی را نشان نداد؛ این نتایج نشان داد که نوترکیبی در ناحیه بررسی شده پروتئین پوششی این ویروس رخ نداده است.

درخت فیلوژنتیکی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس ناحیه پروتئین پوششی، با روش Minimum evaluation (Rzhetsky and Nei 1992) بر اساس مدل Tajima – Nei (1984) در جدایه‌های حاصل از تعیین توالی و جدایه‌های ثبت شده در GenBank با نرم افزار MEGA6 نشان داد که جدایه‌های ایران در گروه PV96 قرار می‌گیرند (شکل۳). نام‌گذاری این گروه‌ها براساس اولین مطالعات انجام گرفته روی توالی نوکلئوتیدی PNRSV در دنیا می‌باشد (Aparicio et al. 1999, Vaskova et al. 2000, Hammond 2003). این مطالعات نشان دادند که پاتوتیپ‌های شناخته شده PNRSV به طور کلی در سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند؛ گروه I (PV32) شامل جدایه‌هایی می‌باشد که سبب بروز علایم شدیدی می‌شوند در حالی که جدایه‌های گروه II (PV96) علایم ملایمی در میزبان‌های خود ایجاد می‌کنند. جدایه‌های گروه III (PE5) سبب بروز هر دو نوع علایم شدید و ملایم می‌شوند. یک ساختار سنجاق سری (Stem-Loop) که شامل یک تکرار شش نوکلئوتیدی (دو اسید آمینه) در طول توالی ژن پروتئین پوششی در موقعیت نوکلئوتید ۱۲۲۶ (بر اساس ژنوم جدایه PV32)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

می‌باشد را به عنوان ویژگی جدایه‌های گروه I معرفی کردند (Aparicio et al. 1999) و پیشنهاد شده که نوآرایی درون مولکولی[1] ناشی از رونویسی ناپیوسته آنزیم RNA پلیمراز سبب شکل گیری آن شده است. همچنین آنها با شناسایی یک ناحیه ترجمه نشدنی در انتهای ′۵ مولکول RNA چهار، اعضاء گروه PE5 را از دو گروه دیگر متمایز کردند.

برآورد آماره‌های Tajimas′s D و نسبت dN/dS (dN: ۰/۰۱۸ و dS: ۰/۱۷۳) با نرم‌افزار MEGA6 نشان داد که نسبت dN/dS در پروتئین پوششی PNRSV کمتر از یک بود (۰/۱۱) که موید فشار انتخاب منفی بر روی این ناحیه است. به عبارت دیگر بیشتر جهش‌های انجام شده منجر به تغییر اسیدآمینه نشده‌اند و با توجه به نقش‌های پروتئین پوششی این نتایج قابل پیش بینی بود. نتایج آزمون Tajima's D نیز منفی برآورد شد (۲/۱۳-) که انتخاب منفی در این ناحیه را تایید می‌کند که با نتایج محققان دیگر (Fiore et al. 2008; Oliver et al. 2009; Boulila et al. 2013) همخوانی دارد.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران در بوته‌های گل محمدی موجود در برخی گلستان‌های واقع در شهرستان‌های قمصر، نیاسر، مشهد اردهال و نراق در مرکز کشور پراکنده شده است و به دلیل حضور شرایط مناسب در گلستان‌های مرکز کشور، ویروس از درصد پراکندگی متوسطی برخوردار بودند که این امر موجب افزایش میزان آلودگی گلستان‌ها از سالی به سال دیگر شده است. تجزیه توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نشان داد که جدایه‌های PNRSV آلوده کننده گل محمدی در گروه PV96، که دربرگیرنده نژادهای غیر مهاجم می‌باشد، قرار می گیرد. از طرفی تنوع ژنتیکی نسبتا کم در جدایه های PNRSV می‌تواند ناشی از گسترش سریع و وسیع این ویروس در یک منطقه باشد.

[1] Intermolecular rearrangement

منابع

Aparicio F, Myrta A, Di Terlizzi B, Palls V (1999) Molecular variability among isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different *Prunus* spp. Virology 89: 991-999.

Boulila M, Ben-Tiba S, Jilani S (2013) Molecular adaptation within the coat protein-encoding gene of Tunisian almond isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. Journal of Genetics 92: 11-24.

Candresse T, Kofalvi SA, Lanneau M, Dunez J (1997) A PCR-ELISA procedure for the simultaneous detection and identification of Prunus necrotic ringspot (PNRSV) and Apple mosaic (ApMV) ilarviruses. Acta Horticulturae 472: 219-225.

Chang S, Puryear L, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116.

Demirozer O, Kaydan MB, Karaca I, Ben-Dov Y (2009) First records of armored scale insect (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) from oil-rose, Rosa damascene, in Turkey. Hellenic Plant Protection Journal 2: 33-35.

Doustsedigh H, Rakhshandehroo F, Shams-bakhsh M (2012) Distribution of *Arabis mosaic virus* on grapevine in West and eastern Azarbaijan province. Plant Protection (Science Journal of Agriculture) 34: 59-74.

Fallah T, Nasrollanejad S (2009) Detection and distribution of PNRSV on stone fruits in Golestan provinces. Journal of Plant Production 16: 88-98.

Fiore N, Fajardo TVM, Podan S, Herranz MC, Aparicio F, Montealegre J, Elena SF, Pallás V, Sánchez-Navarro J (2008) Genetic diversity of the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. Archive of Virology153: 909-919.

Glasa M, Betinova M, Kùdela O, Šubr Z (2002) Biological and molecular characterisation of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates and possible approaches to their phylogenetic typing. Annals of Applied Biology 140: 279-283.

Guo D, Maiss E, Günter A, Casper R (1995) Prunus necrotic ringspot ilarvirus: nucleotide sequence of RNA3 and relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. Journal of General Virology 76: 1073-1079.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids 41:95-98

Hammond RW (2003) Phylogeny of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from the Ilarvirus ring test and identification of group-specific features. Archives of Virology 148: 1195-1210.

Hammond RW, Crosslin JM (1995) The complete nucleotide sequence of RNA3 of peach isolate of *Prunus necrotic ringspot virus*. Virology 208: 349-353.

Loudes AM, Ritzenthaler C, Pinck M, Serghini MA, Pinck L (1995) The 119 KDA and 124 Kda polyproteins of Arabis mosaic Nepovirus (isolates) are encoded by two distinct RNA-2 species. Journal of General Virology 76: 899-906.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]

Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26: 2462-2463.

Massumi H, Shaabanian M, Hosseini Pour A, 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.

Manouchehri A (1968). Plant viral diseases. Tehran University Press 1189:194.

Mizani A, Hajnajari H (2013) Detection of ApMV and ToRSV in apple trees and inhibitive effect of seed rootsocks against viral infections. International Journal of Agronomy and Plant Production 4: 3109-3114.

Moini A, Izadpanah K (2000) Serological identification of *Prunus necrotic ringspot virus* and PPV in Dasht-e-Moghan. In: Proceedings of 14th Plant protection congress of Iran. Iran, Isfahan 338 (In Farsi).

Moury B, Cardin L, Onesto JP, Candresse T, Poupet A (2001) Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in Rose and its variability in Rose and *Prunus* spp. Phytopathology 91: 84-91.

Nikbakht A, Kafi M (2010) The Rosa damascene of Iran. Iranian Academic Center for Education Culture and Research, IUT branch press, Isfahan, Iran (In Farsi).

Oliver JE, Freer J, Andersen RL, Cox KD, Robinson TL, Fuchs M (2009) Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates within a cherry orchard in New York. Plant Disease 93: 599-606.

Rahmanian P, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H (2013) Detection and distribution of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) on stone fruits in some gardens located in Fars and Golestan provinces. Iranian Journal of Plant Protection Science 44: 129-139.

Rakhshandehroo F, Pourrahim R, Zamanizadeh H, Rezaee S, Mohammadi M (2005) Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. Journal of Phytopathology 153: 480-484.

Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H, Modarresi A, Hajmansour, SH (2006) Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. Plant Disease 90: 975-976.

Rzhetsky A, Nei M (1992) A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. Molecular Biology and Evolution 9:945-967.

Sabaghian S, Rakhshanderoo F, Rezaee S (2013) First report of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting binweed in Iran. Journal of Plant Pathology 95:659-668.

Salem N, Mansour A, Al-Musa A, Al-Nsour A, Hammond R (2004) Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. Journal of Plant Pathology 86:85-90.

Sanchez-Navarro JA, Pallas V (1997) Evolutionary relationships in the Ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic rinspot virus RNA3. Archive of Virology 142: 749-763.

Sertkaya G (2009) An investigation on Rose mosaic disease of Rose in Hatay-Turkey. In proceeding of 21st International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Germany, Neustadt Julius Kühn Institute 309-313.

Tajima F, Nei M (1984) Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution 1: 269-285.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipskiA, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Vaškova D, Petrzik K, Karešova R (2000) Variability and molecular typing of the woody-tree infecting *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*. Archives of Virology 145: 699-709.

Weiss EA (1996) Essential oil crops. CABI Pub 608p.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.2.8]