

ردیابی و تعیین خصوصیات مولکولی ژن پروتئین پوششی سه جدایه ایرانی ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*)

مهدی شیرازی^۱✉، محمدرضا صفرنژاد^۱، فرشاد رخشنده رو^۱ و حمیدرضا زمانی زاده^۱

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران؛ ۲- بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی،

موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۳؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳)

چکیده

ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*, PPV) یکی از خسارت‌زترین ویروس‌های درختان میوه هسته‌دار در دنیا می‌باشد. به منظور ردیابی و بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌های ایرانی PPV، طی سال‌های زراعی ۹۳-۹۱، تعداد ۱۳۰ نمونه برگ‌ی درختان هسته‌دار با علائم ویروسی از باغات درختان هسته‌دار استان‌های اردبیل، مازندران و تهران جمع‌آوری شدند. ردیابی ویروس با روش‌های DAS-ELISA، ایمونوبلات و همچنین RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی (CP) ویروس صورت پذیرفت. نتایج بدست آمده حاکی از وجود آلودگی در برخی از نمونه‌ها شامل ۳ نمونه از دشت مغان، ۲۴ نمونه از جویبار و ۲ نمونه از درکه بود. محصول RT-PCR بدست آمده از تکثیر ناحیه ژن CP ویروس به طول ۹۹۰ جفت باز مربوط به سه جدایه تعیین توالی گردیده و ترادف ناحیه کد کننده با سایر جدایه‌های موجود در NCBI مقایسه شدند. نتایج این آزمون نشان داد که دو جدایه 10s و 15s (از منطقه جویبار) دارای ۹۹/۳ و ۹۹/۴ درصد تشابه با سویه M (رس شمار EF626533.1) و جدایه M6 (از دشت مغان) دارای ۹۹/۴ درصد شباهت با سویه D ویروس (رس شمار HF585098.1) می‌باشند. این اولین گزارش از ردیابی مولکولی سویه‌های M و D ویروس آبله آلو بر مبنای توالی نوکلئوتیدی در مناطق ذکر شده می‌باشد. واژه‌های کلیدی: تعیین توالی، سویه‌های M و D، ویروس آبله آلو، RT-PCR، DAS-ELISA.

Detection and Molecular Characterization of Coat Protein Gene of Three Iranian *Plum pox virus* Isolates

M. SHIRAZI¹✉, M. R. SAFARNEJAD², F. RAKHSHANDEHROO¹ and H. R. ZAMANIZADEH¹

1- Department of Plant Pathology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Department of Plant viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Plum pox virus (PPV) is considered as one of the most devastating viruses of stone fruits in the world. During the growing seasons of the years 2012-2014, to detect and determine molecular characterization of Iranian isolates of PPV, sampling was done from stone fruit gardens in some parts in north and north western and central of Iran. A total number of 130 symptomatic *Prunus* leaf samples with virus like symptoms and symptomless weeds were collected from Ardebil, Mazandaran and Tehran. PPV detection was performed using DAS-ELISA, Dot Immuno Binding Assay and also RT-PCR with specific designed primers amplifying the gene encoding coat protein (CP). The results obtained from serological and molecular assays revealed presence of infection in 3 samples from Dasht-e Moghan, 24 samples from Jouybar and 2 samples from Darakeh. PCR amplicons belongs to the different regions were sequenced and compared with the corresponding worldwide strains available in NCBI. Comparisons showed the close similarity between the M6 isolate (from Dasht-e Moghan) and 15S and 10s isolates (from Jouybar) with the D (acc. nr. HF585098.1) (99.4%) and M (acc nr EF626533.1) (99.3% and 99.4%) strains of PPV, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report of molecular detection of M and D strains of PPV in the studied regions based on the nucleotide sequence.

Key words: DAS-ELISA, M and D strains, *Plum pox virus*, RT-PCR, Sequencing.

مقدمه

مختلف ویروس PPV از نظر دامنه میزبانی، شدت خسارت، نحوه انتقال و پراکنش جغرافیایی با یکدیگر تفاوت دارند (García *et al.*, 2014). از بین سویه‌های مختلف ویروس، سویه‌های D و M از اهمیت و گسترش بیشتری برخوردار بوده و از نظر خصوصیات اپیدمیولوژیکی و دامنه میزبانی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر دارند (García *et al.*, 2014). سویه D در مقایسه با M از قدرت مهاجم کمتری برخوردار بوده، دامنه میزبانی محدودتری داشته و از نظر انتقال با شته نیز از توانایی کمتری برخوردار است (Bousalem *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 1994; Quiot *et al.*, 1995; Myrta *et al.*, 1996 and 2001; Boscia *et al.*, 1997; Dallot *et al.*, 1998). سویه‌های M و D پراکنش گسترده‌ای در نواحی مختلف اروپا و آسیا دارند (Sochor *et al.*, 2012; Papayiannis *et al.*, 2007; Myrta *et al.*, 2001; Kernal and Dunez, 1979). دو سویه C و Rec از برخی کشورهای شرق و مرکز اروپا گزارش شده‌اند (Nemchinov and Hadidi, 1996; Glasa *et al.*, 2004; Nemchinov *et al.*, 1996). سویه Rec پس از سویه‌های D و M دارای بیشترین پراکنش در دنیا می‌باشد و حاصل نوترکیبی بین سویه‌های مذکور می‌باشد. این سویه عمدتاً باعث ایجاد آلودگی در زردآلو و آلو می‌شود و همانند سویه M دارای قابلیت بالا در انتقال با شته است (García *et al.*, 2014). همچنین سویه‌های EA از مصر (Wetzel *et al.*, 1991a; Myrta *et al.*, 1998) و از ترکیه (Sochor *et al.*, 2012) گزارش شده‌اند. در کشورهای منطقه وجود سویه M در سوریه (Ismaeil, 2006) گزارش گردیده است. همچنین گزارشات تأیید نشده‌ای از آلودگی باغات درختان هسته دار در کشورهای آذربایجان و گرجستان وجود دارد (OEPP/EPPO, 2004). شناسایی و تفکیک سویه‌ها با روش‌های سرولوژیکی با استفاده از آنتی بادی‌های تک همسانه‌ای (Cambra *et al.*, 2006) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی (Candresse *et al.*, 1995; Olmos *et al.*, 1997; William *et al.*, 2004) صورت می‌پذیرد. در ایران علیرغم گزارشات موجود

ویروس آبله آلو (PPV) عامل یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های ویروسی درختان میوه هسته‌دار (شارکا) در بسیاری از نقاط دنیا خصوصاً اروپای شرقی است. این ویروس از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* بوده و دارای ژنوم از نوع آر. ان. ای تک رشته مثبت به طول حدود ۱۰ کیلو باز می‌باشد که پلی‌پروتئین تولیدی از آن با فعالیت آنزیمی به چندین پروتئین ساختاری و کارکردی تبدیل می‌شود (García *et al.*, 2014). PPV توسط شته به روش ناپایا و پیوند منتقل می‌شود (Labonne *et al.*, 1995). بیماری مذکور اولین بار در اوایل قرن بیستم میلادی از بلغارستان (Atanasoff, 1932) گزارش گردید و در حال حاضر در بسیاری از نقاط دنیا از جمله اروپا و حوزه مدیترانه (Myrta *et al.*, 1998)، آمریکا (Stobbs *et al.*, 2005)، آسیا (Spiegel *et al.*, 2004; Navratil *et al.*, 2005) و آفریقا (Wetzel *et al.*, 1991) وجود دارد. علائم بیماری شامل ایجاد لکه‌ها و حلقه‌های کلروز و نقوش زرد روی برگ و میوه، رگبرگ زردی و بدشکلی برگ و میوه، ریزش میوه‌های نابالغ و زوال سریع و مرگ درختان آلوده در اثر حمله سایر ویروس‌ها می‌باشد (Nemeth, 1986). دامنه میزبانی ویروس شامل طیف وسیعی از درختان میوه هسته‌دار شامل زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلو (*P. domestica*)، هلو (*P. persicae*)، آلبالو (*P. cerasus*)، گیلاس (*P. avium*) و بادام (*P. dulcis*) می‌باشد (OEPP/EPPO, 2004). تاکنون نه سویه از ویروس آبله آلو شامل M, D (Kernal and Dunez, 1979)، C (Nemchinov and Hadidi, 1996; Wetzel *et al.*, 1991a; Myrta *et al.*, 1998)، EA (Nemchinov *et al.*, 1996)، Rec (Cervera *et al.*, 1993; Glasa *et al.*, 2004)، W (James and Varga, 2005) و T (Ulubas *et al.*, 2009) و CR (Chirkov *et al.*, 2013; Glasa *et al.*, 2013) گزارش شده است. در مقایسه با سایر پوتی ویروس‌ها، این ویروس دارای تعداد زیادی سویه است که این نشان دهنده تنوع بالا در این ویروس می‌باشد. سویه‌های

(egg albumin) ۲٪ در PBS با pH ۷/۴ انجام و همچنین برای ردیابی ویروس از سوبسترای Nitro blue tetrazolium (NBT) و Fermentas,) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Germany) استفاده شد.

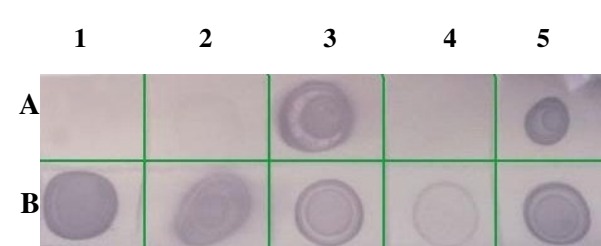
ردیابی مولکولی و تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی PPV:
استخراج آر. ان. ای. کل: ردیابی مولکولی ویروس با انجام روش RT-PCR بر روی تمامی نمونه‌هایی که از طریق آزمون‌های سرولوژیک مثبت تشخیص داده شده بودند صورت پذیرفت. برای این منظور ابتدا استخراج آر. ان. ای با روش لیتیم کلراید (Shi et al., 2001) انجام شد. در این روش ابتدا یک دهم گرم از بافت گیاهی در ازت مایع خرد و در ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج (شامل ۱۰۰mM Tris-HCl [pH=8.0], ۱۰۰mM Na₂EDTA [pH=8.0], ۱۰۰mM LiCl, ۵٪ SDS و ۲٪ متا بی سولفیت سدیم) حل شد و سپس ۶۰۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به هر نمونه اضافه و یک دقیقه در دمای اتاق بهم زده شدند. میانگریز با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام و فاز رانشین به لوله جدید منتقل گردید. سپس به هر نمونه به نسبت هم حجم فاز رویی کلرید لیتیم ۴ مولار اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت یک شب قرار گرفت. در ادامه میانگریز دوم با شرایط یاد شده در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت و فاز رانشین حذف گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل همراه با ۷۶۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد حاوی ۴۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار [pH=5.2] اضافه و پس از اختلاط به مدت دو ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. به دنبال آن میانگریز سوم مشابه دور قبل انجام شد. شستشوی رسوب آر. ان. ای. با اتانول ۷۰٪ انجام شد. پس از میانگریز چهارم به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و خشک شدن رسوب حاصل در دمای اتاق، رسوب در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تیمار شده با DEPC حل گردید و برای نگهداری به فریزر ۲۰-

مبنی بر وجود آلودگی در برخی از مناطق (Mohammadi et al., 2012; Jafarpour and Sabokkhiz, 2013; Moini and Izadpanah, 2006; Ghayeb Zamharir et al., 2000). در مورد حضور سویه‌های این ویروس در باغات درختان میوه هسته‌دار ایران و توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها، اطلاعات دقیقی در دست نمی‌باشد. تحقیق حاضر با هدف ردیابی PPV و نیز بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌ها در سه استان اردبیل، مازندران و تهران صورت پذیرفت. سطح کشت هسته‌داران در این سه استان به ترتیب برابر با ۸/۵، ۱۲/۵ و ۱۲ هزار هکتار بوده (Anonymous, 2013) و تعیین خصوصیات سویه‌های ویروسی PPV در این مناطق در تدوین برنامه‌های مدیریت این بیماری ضروری می‌باشد.

روش بررسی

نمونه برداری: طی سال‌های زراعی ۹۲-۹۱ و ۹۳-۹۲ نمونه‌برداری از باغات آلو، هلو، زردآلو و گیلاس با علایم کلروز، زردی، روشن شدن رگیرها و بدشکلی برگ (شکل ۱) و نیز علف‌های هرز هندوانه ابوجهل با علایم پیچیدگی برگ و گیاه سلمه فاقد علایم (جدول ۲) صورت پذیرفت. نمونه‌های بدست آمده شامل ۳۵ نمونه برگی از استان اردبیل (دشت مغان)، ۵۰ نمونه از استان مازندران (جویبار) و ۴۵ نمونه از استان تهران (شهریار و درکه) بود. ارزیابی آلودگی در نمونه‌ها با انجام آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی صورت پذیرفت.

آزمون‌های سرولوژیک: تشخیص آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA) به روش کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977) و همچنین ایمونوباتل نقطه‌ای (Dot Immuno Binding assay) (Banttari and Goodwin, 1985) با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای تجاری تهیه شده از شرکت Bioreba سوئیس با رقت ۱:۱۰۰۰ انجام شد. در آزمون ایمونوباتل نقطه‌ای بلوکه نمودن غشای نیتروسولوزی با محلول آلبومین تخم مرغ



شکل ۲- نتایج حاصل از آزمون ایمونوبلات نقطه‌ای در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف. لکه‌های بنفش رنگ بیانگر واکنش مثبت (نمونه آلوده) و بیرنگ بیانگر واکنش منفی. A1. کنترل منفی (عصاره گیلاس سالم)، A2,3. نمونه‌های هلوی دشت مغان، A4. بلانک (بافر استخراج)، A5. نمونه آلوده درکه، B1,2. نمونه‌های آلوده جویبار، B3,4. نمونه‌های هلوی جویبار، B5. کنترل مثبت (نمونه هلوی مثبت تشخیص داده شده با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در آزمایشات قبلی از جویبار).

Fig. 2. Results of Dot Immuno Binding Assay in collected samples from different regions. Violet indicates spots the positive reaction (infected sample) and the colorless ones show negative reaction. A1) Negative control (health sweet cherry), A2,3) peach samples from Dashte- Moghan, A4) Blank (extraction buffer), A5) plum sample from Darakeh, B1,2) plum samples from Jouybar, B3,4) peach samples from Jouybar, B5) Positive control (infected peach from Jouybar).

درجه سلسیوس منتقل گردید.



شکل ۱- علائم همراه با نمونه‌های آلوده به PPV. A. بدشکلی برگ هلو؛ B. لکه‌ها و نقاط زرد رنگ روی برگ آلو؛ C. رگبرگ زردی در هلو؛ D. زردی و موزاییک شدید روی برگ آلو؛ E. نمایی از درخت هلو آلوده

Fig. 1. Associated symptoms observed on plants infected with PPV: A. deformation of peach leaf; B. yellow spots on plum leaf; C. vein clearing of peach; D. yellowing and severe mosaic on plum leaf; E. an infected peach tree.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1- Sequences of the primers used in this study

ناحیه اتصال	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	قطعه مورد انتظار	نام آغازگر
Annealing region	Nucleotide sequence of primer	Expected size	Primer name
CP	5'-CAAAAGGTCGACAAGCTGACGAAAGAGAAGAC-3'	1020 bp	PPV-F
	5'-CAAAACCTCGAGTTACTCCCTCACAC-3'		PPV-R
	5'-ACCGAGACCACTACTCC-3'		P1
C terminal of CP	5'-CTTCAACAACGCCTGTGCGT-3'	198 bp	PM
	5'-CTTCAA CGA CAC CCG TAC GG-3'		PD

می‌باشد. این آغازگرها شامل ناحیه کد کننده پروتئین پوششی و همچنین نواحی اختصاصی آنزیم‌های برشی (*Sall/XhoI*) و چهار نوکلئوتید اضافی جهت تسهیل در همسانه سازی در ناقل بیانی پروکاریوتیک می‌باشد. همچنین آغازگرهای P1 و

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR): آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل آغازگرهای PPV-F و PPV-R جهت تکثیر ژن پروتئین پوششی (طراحی آغازگر به کمک نرم افزار کلون منیجر)

نهایی رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ژن پروتئین پوششی با چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشته سازی و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشته شدن، اتصال آغازگر و گسترش به ترتیب به مدت ۷۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۴۴ درجه سلسیوس و ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در آخر گسترش نهایی با یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و واکنش برای تفکیک سوبه‌ها با چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای واسرشته سازی و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته شدن، اتصال آغازگر و گسترش به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در آخر گسترش نهایی با یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler ep. Gradient, Eppendorf, Germany) انجام شد.

PM برای شناسایی سوبه M و نیز آغازگرهای P1 و PD برای ردیابی سوبه D (Olmos *et al.*, 1997) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). سنتز دی.ان.ای مکمل (cDNA) با استفاده از یک میکرولیتر آغازگرهای اختصاصی برگشتی (Reverse)، ۸ میکرولیتر آر.ان.ای. قالب، ۲۰ واحد بازدارنده فعالیت ریونوکلاز، ۴ میکرولیتر بافر واکنش با غلظت پنج برابر، ۲ میکرولیتر از dNTPs (10mM) ۲۰۰ واحد آنزیم رونویسی معکوس (M-MuLV) و آب مقطر تیمار شده با DEPC بر اساس دستورالعمل شرکت Fermentas آلمان صورت گرفت. تکثیر ژن پروتئین پوششی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشتی و استفاده از قالب دی.ان.ای مکمل انجام پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک واحد از آنزیم Taq DNA polymerase (CinnaGen, Iran) ۲ میکرولیتر از cDNA، ۲/۵ میکرولیتر از بافر واکنش با غلظت ده برابر، ۱ میکرولیتر از ۰/۵، MgCl₂ (50mM) میکرولیتر از dNTPs (10mM) و ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها بود و با آب دیونیزه به حجم

جدول ۲- نتایج حاصل از ردیابی PPV در نمونه‌های جمع‌آوری شده (درخت میوه هسته‌دار و علف‌هرز) با استفاده از آزمون‌های سرولوژیک و RT-PCR

Table 2. Results of PPV detection in collected samples (Stone fruit and weed) using serological and RT-PCR tests

تعداد کل نمونه آلوده (درصد) Total infected samples (%)	تعداد نمونه جمع‌آوری شده به تفکیک میزبان Number of collected samples based on host										منطقه Region
	علف هرز weed		گیلاس <i>Prunus avium</i>		زردآلو <i>Prunus armeniaca</i>		هلو <i>Prunus persicae</i>		آلو <i>Prunus domestica</i>		
	آلوده infected	جمع‌آوری شده collected	آلوده infected	جمع‌آوری شده collected	آلوده infected	جمع‌آوری شده collected	آلوده infected	جمع‌آوری شده collected	آلوده infected	جمع‌آوری شده Collected	
3 (8.6%)	-	4	-	-	1	6	2	14	-	11	دشت مغان Dasht-e Moghan
24 (48%)	2	6	-	-	-	-	7	18	15	26	جویبار Jouybar
-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	19	شهریار Shahriar
2 (9%)	-	-	-	13	-	-	-	-	2	9	درکه Darakeh
29 (16.4%)	2	10	-	13	1	6	9	36	17	65	جمع کل Total

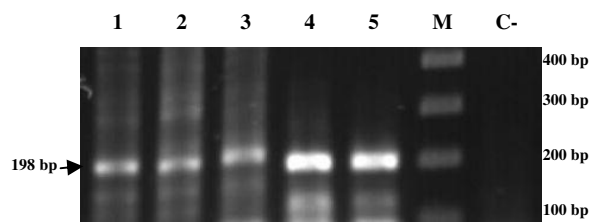
توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد آزمون توسط نرم افزار ClustalX همردیف و سپس توسط نرم افزار Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013)، درخت فیلوژنتیکی برای جدایه‌ها بر مبنی الگوی Neighbor joining و با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد.

نتیجه و بحث

نتایج آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی نشان داد که از مجموع ۱۳۰ نمونه مورد بررسی، وجود آلودگی در ۳ نمونه از دشت مغان (شامل دونمونه هلو و یک نمونه زرد آلو)، ۲۴ نمونه از شهرستان جویبار (شامل ۱۵ نمونه آلو، ۷ نمونه هلو، یک نمونه علف هرز سلمه و یک نمونه علف هرز هندوانه ابوجهل) و همچنین دو نمونه آلو از منطقه درکه استان تهران مورد تأیید قرار گرفت (شکل‌های ۱، ۲ و ۳، جدول ۲). در این تحقیق آزمون RT-PCR بر روی نمونه‌هایی که با روش سرولوژیک مثبت تشخیص داده شده بودند صورت پذیرفت. مقایسه نتایج بدست آمده از آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی نشان داد که در عمده موارد تطابق کامل بین این نتایج وجود دارد و صرفاً در مورد ۳ نمونه مورد آزمایش از مجموع ۲۴ نمونه مثبت منطقه جویبار (۲ نمونه آلو و یک نمونه هلو) وجود آلودگی با روش مولکولی مورد تأیید قرار نگرفت. علایم مشاهده شده در درختان آلوده شامل زردی، رگبرگ زردی و بدشکلی برگ بود (شکل ۱). نتایج این تحقیق مؤید گزارشات قبلی مبنی بر وجود ویروس آبله آلو در ایران می‌باشد (Mohammadi *et al.*, 2012; Jafarpour and Sabokkhiz, 2013; Moini and Izadpanah, 2000; Ghayeb Zamharir *et al.*, 2006). بررسی‌های صورت گرفته روی نمونه‌های تهیه شده از درختان هسته‌دار منطقه شهریار حاکی از عدم وجود آلودگی در این نمونه‌ها بود. همچنین در این بررسی هیچ یک از نمونه‌های گیلاس جمع‌آوری شده مثبت تشخیص داده نشدند. در این تحقیق وجود ویروس در نمونه‌های علف‌های هرز سلمه و هندوانه ابوجهل تهیه شده از باغات درختان هسته‌دار مورد تأیید قرار گرفت (جدول ۲).

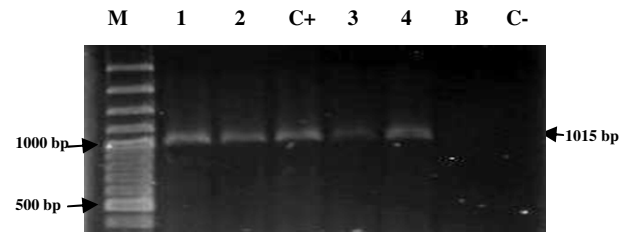
محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر TBE (شامل ۲/۷۲ g/L Tris-Base، ۱/۶ g/L Boric Acid، ۰/۹۳ g/L EDTA) با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی (Bio-Rad) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز و سپس توسط دستگاه Gel Document زیر نور UV مشاهده و عکس برداری شد.

همسانه سازی قطعه تکثیری: به منظور همسانه سازی در ناقل pTZ57R/T، پس از استخراج قطعه تکثیری خالص شده با استفاده از کیت استخراج دی. ان. ای. از ژل بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Fermentas, Germany) و تهیه واکنش اتصال شامل ۴ میکرولیتر بافر اتصال با غلظت ده برابر، ۴ میکرولیتر قطعه تکثیری خالص شده، ۵ واحد از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas, Germany)، یک میکرولیتر (۵۵ نانو گرم) ناقل همسانه سازی pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Fermentas, Germany) به همراه ۱۰ میکرولیتر آب دیونیزه عاری از نوکلئاز و نگهداری آن به مدت یک شب در دمای اتاق، ۵ میکرولیتر از این واکنش به ۴۵ میکرولیتر سلول‌های باکتری *E. coli* سویه DH5 α مستعد شده با CaCl₂ اضافه گردید و طی واکنش شوک حرارتی (Sambrook and Russell, 2001) پلاسمید نو ترکیب (pTZ57R/T-PPV-CP) به پیکره باکتری وارد گردید و در نهایت در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (50 μ g/ml) و IPTG (0.2 mM) و X-Gal (40 μ g/ml) کشت داده شد. استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Core Bio (Core-one plasmid mini prep kit, Korea) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. در ادامه سه همسانه بر اساس منطقه جغرافیایی و میزبان جهت تعیین توالی انتخاب و به شرکت‌های Bioscience انگلستان و Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده برای یافتن جدایه‌های مشابه موجود در NCBI (جدول ۳) توسط نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفتند. جهت مطالعه تبارزایی،



شکل ۴- قطعه دی.ان.ای تکثیر شده به طول 198 bp با آغازگرهای اختصاصی دو سویه M و D. M: 100 bp plus Ladder، 1، 2: نمونه‌های هلوی دشت مغان و 3: نمونه آلوی درکه با آغازگرهای PI/PD، 4، 5: به ترتیب نمونه‌های هلو و آلوی جویبار با آغازگرهای PI/PM، C-: کنترل منفی (نمونه سالم گیلاس منطقه درکه که در هیچ یک از آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی آلوده تشخیص داده نشد).

Fig. 4. Amplified fragment of 198 bp with specific primers of M and D strains: M) 100 bp plus Ladder (Fermentas), 1, 2) samples from Dasht-e Moghan and 3) sample from Darakeh with PI/PD specific primers, 4,5) samples from Jouybar with PI/PM specific primers, C-) Negative control (sweet cherry health sample from Darakeh).



شکل ۳- قطعه دی.ان.ای تکثیر شده مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی PPV به طول حدود ۱۰۱۵ جفت باز در نمونه‌های مورد بررسی. M: 100 bp plus Ladder، 1، 2، 4: نمونه‌های آلوی آلوده به PPV، C+: کنترل مثبت (نمونه هلوی آلوده از جویبار که با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی تأیید شده است)، 3: نمونه علف هرز سلمه آلوده به PPV، B: بلانک، C-: کنترل منفی (نمونه سالم گیلاس منطقه درکه که در هیچ یک از آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی آلوده تشخیص داده نشد).

Fig. 3- Amplified DNA fragment of around 1015 bp in collected samples: M) 100 bp plus Ladder (Fermentas), 1, 2, 4) plum samples infected with PPV, C+) Positive control (peach from Jouybar), 3) *Chenopodium* sp. Infected with PPV, B) Blank, C-) Negative control (sweet cherry from Darakeh).

جدول ۳- جدایه‌های انتخابی جهت تعیین ترادف به تفکیک میزبان، منطقه جغرافیایی و علائم همراه و نتایج تعیین توالی

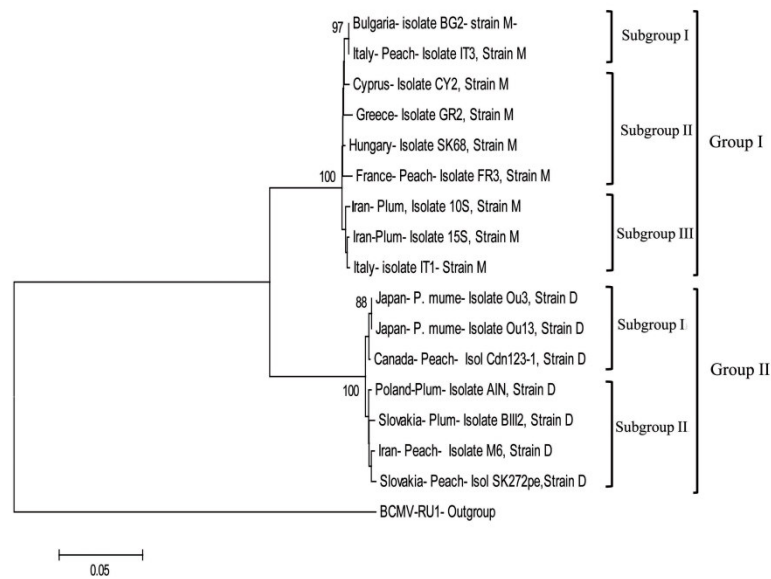
Table 3. Selected isolates for sequencing based on host, geographical region and associated symptoms with the result of sequencing

نام جدایه Isolate name	میزبان Host	منطقه Region	علائم همراه Associated symptoms	نام سویه Strain name	درصد شباهت Identity	نام جدایه‌های نزدیک در NCBI The closest isolates in NCBI	کد بانک ژن جدایه Accession number
M6	هلوی Peach	دشت مغان Dasht-e Moghan	بدشکلی برگ با زردی جزئی Leaf deformation with slight yellowing	D	99.4%	SK272pe	HF585098.1
						BIII/2	GU461890.1
						Ou13	AB576067.1
						Ou3	AB576059.1
						Cdn123-1	AY95326V.1
10S	هلوی Peach	جویبار Jouybar	لکه‌ها و نقاط زرد رنگ روی برگ Yellow spots on the leaf	M	99.3%	BG2	EF626533.1
						IT3	EF626556.1
						CY2	EF62655A.1
15S	آلو Plum	جویبار Jouybar	زردی برگ Leaf yellowing	M	99.4%	FR3	EF626541.1
						SK68	M92280.1
						GR2	EF626551.1

شباهت را با جدایه‌هایی از اسلواکی (Acc. No. HF585098.1) و لهستان (Acc. No. AF332871.1) نشان داد (۹۹/۴٪) در حالی که جدایه‌های 10S و 15S حداکثر شباهت را با جدایه‌ای از بلغارستان (Acc. No. EF626533.1) به ترتیب با ۹۹/۳ و ۹۹/۴ درصد نشان دادند. بررسی و مقایسه ترادف های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه های حاصله با یکدیگر و همچنین ۱۳ جدایه موجود در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که حداکثر شباهت بین جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه به میزان ۹۹/۶ درصد بین دو جدایه 10S و 15S و کمترین میزان شباهت ۸۵/۹ درصد بین جدایه‌های M6 و 10S می‌باشد. علی‌رغم مشابهت در نحوه گروه بندی‌ها و انشعابات درختان فیلوژنتیکی حاصل از آنالیزهای نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای به نظر می‌رسد فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های مورد بررسی بر مبنای توالی اسید آمینه‌ای بیشتر از توالی‌های نوکلئوتیدی می‌باشد.

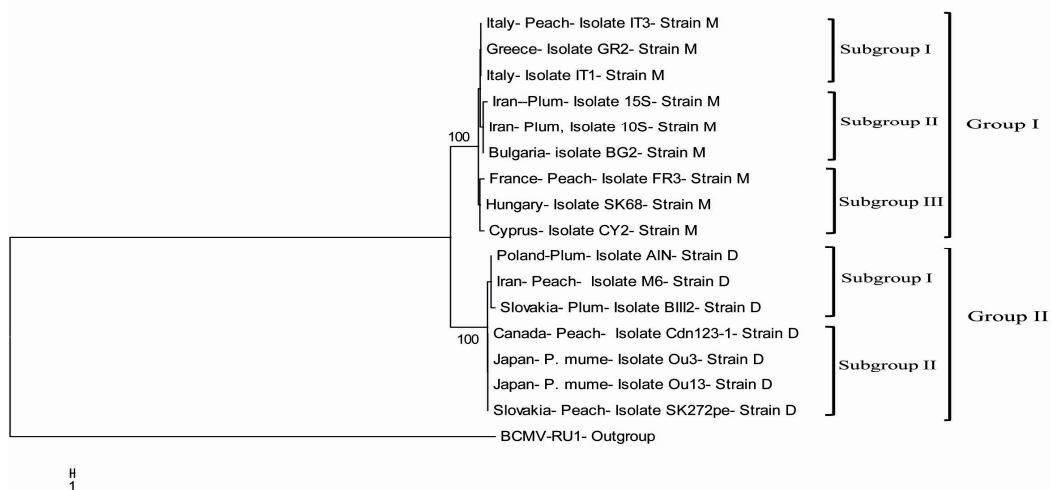
ردیابی سویه M ویروس در شهرستان جویبار بر اساس نتایج تعیین توالی با نتایج قبلی در این زمینه مطابقت دارد (Mohammadi et al., 2012). سویه D در مقایسه با سویه M از توانایی کمتری در انتقال با ناقل برخوردار بوده، قدرت مهاجم کمتری داشته و دامنه میزبانی محدودتری نیز دارد (Bousalem et al., 1994; Cambra et al., 1994; Quiot et al., 1995 and 2001; Myrta et al., 1996; Dallot et al., 1998; Boscia et al., 1997). به نظر می‌رسد این خصوصیات از عوامل مؤثر در نرخ پایین‌تر آلودگی در نمونه‌های تهیه شده از دشت مغان و تهران است، به نحوی که با توجه به نتایج بدست آمده از ردیابی سویه‌ها با آغازگرهای اختصاصی و نیز تعیین توالی به دلیل حضور سویه مهاجم تر M در منطقه جویبار درصد آلودگی بالاتر بوده و در دشت مغان و درکه به دلیل استقرار سویه D که از قدرت مهاجم و گسترش کمتری برخوردار است، درصد آلودگی پایین‌تر است.

نتایج ردیابی مولکولی PPV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی سویه‌های D و M، وجود سویه D در دو منطقه درکه و دشت مغان و حضور سویه M در نمونه‌های منطقه جویبار را مورد تایید قرار داد (شکل ۴). با توجه به نوع علائم و منطقه جغرافیایی سه جدایه PPV برای تعیین توالی انتخاب شدند (جدول ۳). برای این منظور محصول PCR با طول تقریبی ۱۰۱۵ جفت باز پس از انجام همسانه سازی برای تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه کد کننده پروتئین پوششی (۹۹۰ نوکلئوتید) و همچنین توالی آمینواسیدی (۳۳۰ اسید آمینه) پروتئین مربوطه، جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه اصلی قرار گرفتند. در هر دو حالت گروه اول به سه زیر گروه و گروه دوم به دو زیر گروه طبقه‌بندی شدند. جدایه‌های مربوط به سویه M در گروه اول و جدایه‌های مربوط به سویه D در گروه دوم قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از تعیین توالی نمونه‌های مورد بررسی تأیید کننده نتایج حاصله از تعیین سویه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PM، PD و PI بود (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). مقایسه توالی جدایه‌های مورد بررسی با جدایه‌های موجود در بانک ژن NCBI نشان داد جدایه‌های ایرانی متعلق به سویه M (10S و 15S) از منطقه جویبار در کنار جدایه‌هایی از سویه M متعلق به کشورهای بلغارستان، قبرس، اسلواکی، یونان، مجارستان، ایتالیا و فرانسه قرار دارند در حالی که جدایه منطقه دشت مغان (M6) متعلق به سویه D در کنار جدایه‌هایی از اسلواکی، لهستان، ژاپن و کانادا قرار می‌گیرد (جدول ۳). نتایج تحقیقات قبلی صورت گرفته نشان داده است که جدایه‌ای از استان خراسان رضوی بیشترین شباهت را با جدایه‌هایی متعلق به سویه D از ژاپن و آمریکا دارد (Jafarpour and Sabokkhiz, 2013). به نظر می‌رسد علی‌رغم وجود تنوع میزبانی، تنوع در شرایط جغرافیایی تفکیک کننده زیر گروه‌ها بوده است که این امر می‌تواند بیانگر تکامل مستقل جدایه‌های موسس در هر منطقه جغرافیایی باشد. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژن CP جدایه M6 حداکثر



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی نوکلئوتیدی منطقه کد کننده پروتئین پوششی از ژنوم PPV که در آن سه جدایه ایرانی در کنار ۱۳ جدایه PPV موجود در NCBI مورد بررسی قرار گرفته است. فاصله ژنتیکی ۰/۰۵، Cut off: 80%، ارزش‌های کمتر از ۸۰٪ از روی گره‌های ریشه حذف شدند. ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus* (AY863025) به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed using nucleotide sequence of coat protein coding region of the three Iranian isolates in comparison with thirteen related PPV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 0.05 and 80% respectively. Bootstrap values less than 80% are omitted. *Bean common mosaic virus* (Accession No. AY863025) is selected as an out-group species.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی اسید آمینه‌ای منطقه کد کننده پروتئین پوششی از ژنوم PPV که در آن سه جدایه ایرانی در کنار ۱۳ جدایه موجود در NCBI مورد بررسی قرار گرفته است. فاصله ژنتیکی ۱، Cut off: 80%، ارزش‌های کمتر از ۸۰٪ از روی گره‌های ریشه حذف شدند. ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 6. Phylogenetic tree constructed using amino acid sequence of coat protein coding region of three Iranian isolates in comparison with 13 PPV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 1 and 80%, respectively. Bootstrap values less than 80% are omitted. *Bean common mosaic virus* is selected as an out-group species.

References

- ANONYMOUS, 2013. Statistical annual report of Iranian agricultural crops.
- ATANASOFF, D. 1932. Plum pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia Faculty of Agriculture, No. 11: 49–69.
- BOSCIA, D., H. ZERAMDINI, M. CAMBRA, O. POTERE, M. T. GORRIS, A. MYRTA, B. DI TERLIZZI and V. SAVINO, 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *plum pox potyvirus*. European Journal of Plant Pathology, No. 103: 477–480.
- BOUSALEM, M., T. CANDRESSE, L. QUIOT-DOUINE and J. B. QUIOT, 1994. Comparison of three methods for assessing *plum pox virus* variability: further evidence for the existence of two major groups of isolates. Journal of Phytopathology, No. 142: 163–172.
- CAMBRA, M., M. ASENSIO, M. T. GORRIS, E. PEREZ, E. CAMARASA, J. A. GARSIA, J. J. MOYA, D. LOPEZ-ABELLA, C. VELA and A. SANZ, 1994. Detection of *plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, No. 24: 569–577.
- CAMBRA, M., D. BOSCIA, A. MYRTA, L. PALKOVICS, M. NAVRATIL, M. BARBA, M. T. GORRIS and N. CAPOTE, 2006. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, No. 36: 254–261.
- CANDRESSE, T., G. MACQUIRE, M. LANNEAU, M. BOUSALEM, L. QUIOT-DOUINE, J. B. QUIOT and J. DUNEZ, 1995. Analysis of *plum pox virus* variability and development of strain-specific PCR assays. Acta Horticulturae, No. 386: 357–369.
- CERVERA, M. T., J. L. RIECHMANN, M. T. MARTIN, and J. A. GARCIA, 1993. 3'-Terminal sequence of the *plum pox virus* PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. Journal of General Virology, No. 74: 329–334.
- CHIRKOV, S., P. IVANOV and A. SHEVELEVA, 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. Archives of Virology, No. 158(6): 1383–1387.
- هرچند این نتایج بر اساس بررسی تعداد محدودی نمونه بدست آمده است و جهت قضاوت دقیق‌تر نیاز به بررسی نمونه‌های بیشتری می‌باشد. وجود یک دوره نهفتگی چند ساله بدون علائم در ابتدای آلودگی (Wallis *et al.*, 2005) باعث می‌گردد که بررسی دقیق آزمایشگاهی نمونه‌های نهالستان‌ها و باغات مشکوک اجتناب ناپذیر گردد. حضور همزمان سویه‌های M و D در باغات درختان هسته‌دار کشور می‌تواند باعث فراهم آوردن شرایط برای شکل‌گیری سویه‌های نوترکیب این ویروس نظیر سویه Rec (Cervera *et al.*, 1993; Glasa *et al.*, 2004) گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، بررسی‌های تکمیلی در خصوص تعیین پراکنش ویروس در سراسر کشور، بررسی وقوع سایر سویه‌ها در باغات و همچنین بررسی مقاومت احتمالی ارقام رایج گونه‌های هسته‌دار در ایران نسبت به شارکا ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کارشناسان بخش ویروس‌های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و سازمان حفظ نباتات، مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر و قدردانی نمایند. این مقاله در چهار چوب حمایت مالی صورت گرفته توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور صورت پذیرفته است.

- CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, No. 34: 475-483.
- DALLOT, S., G. LABONNE, M. BOEGLIN, L. QUIOT-DOUINE, J. QUIOT and T. CANDRESSE, 1998. Peculiar *Plum pox potyvirus* D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulture*, No. 472: 355-366.
- GARCIA, J. A., M. GLASA, M. CAMBRA and T. CANDRESSE, 2014. *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular plant pathology* No. 15: 226-241.
- GHAYEB ZAMHARIR, M., N. SOKHANDAN BASHIR, and R. KHAKVAR, 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Iran. *EPPO/OEPP Bulletin*, No. 36(2): 210.
- GLASA, M., L. PALKOVICS, P. KOMINEK, G. LABONNE, S. PITTNEROVA, O. KUDELA, T. CANDRESSE, and Z. SUBR, 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, No. 85: 2671-2681.
- GLASA, M., Y. PRIKHODKO, L. PREDAJNA, A. NAGYOVA, Y. SHNEYDER, T. ZHIVAEVA, Z. SUBR, M. CAMBRA and T. CANDRESSE, 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, No. 103(9): 972-979.
- ISMAEIL, F. 2006. *Plum pox virus* (ppv) in syria. *EPPO Bulletin* No. 36: 216-216.
- JAFARPOUR, B. and M. A. SABOKKHIZ, 2013. Detection of *Plum pox virus* (PPV) in stone fruits in Khorasan Razavi province. *Journal of Plant Protection*, No. 27(1): 132-135. (in Persian)
- JAMES, D. and A. VARGA, 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Research*, No. 110: 143-150.
- KERNAL, C. and J. DUNEZ, 1979. Differentiation biologique et serologique des souches du virus de la sharka. *Annals de Phytopathologie*, No. 11: 541-555.
- LABONNE, G., M. YVON, J. B. QUIOT, L. AVINENT and G. LACER, 1995. Aphids as potential vectors of *plum pox virus*: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, No. 386: 207-218.
- MOHAMMADI, M., F. GOHARZAD and A. ZAGHI, 2012. Association of *Plum Pox Virus* Strain M with Plum Fruit Dropping in Mazandaran Province. *Applied Entomology and Phytopathology*, No. 80(1): 97-98. (in Persian with English summary)
- MOINI, A. A. and K. IZADPANA, 2000. Serological Identification of PNRSV and PPV in Dasht-e Moghan. In: *Proceeding of 14th Iranian Plant Protection Congress*. 338 PP. (in Persian with English summary)
- MYRTA, A., D. BOSCIA, O. POTERE, M. KOLBER, M. NEMETH, B. DI TERLIZZI, M. CAMBRA and V. SAVINO, 2001. Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*, No. 107: 845-848.
- MYRTA, A., B. DI TERLIZZI, D. BOSCIA, K. AGLAYAN, I. GAVRIEL, G. GHANEM, C. VARVERI and V. SAVINO, 1998. Detection and serotyping of *Mediterranean plum pox virus* isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies. *Acta Virologica*, No. 42: 251-254.
- MYRTA, A., B. DI TERLIZZI, M. DIGIARO and V. SAVINO, 1996. Viruses of stone fruits in Albania. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, No. 26: 141-146.
- MYRTA, A., O. POTERE, D. BOSCIA, T. CANDRESSE, M. CAMBRA and V. SAVINO, 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of *plum pox virus*. *Acta Virologica*, No. 42: 248-250.
- NAVRATIL, M., D. SAFAROVA, R. KARESOVA and K. PETRZIK, 2005. First Incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease*, No. 89: 338.
- NEMCHINOV, L. and A. HADIDI, 1996. Characterization of the sour cherry strain of *plum pox virus*. *Phytopathology*, No. 86: 575-580.
- NEMCHINOV, L., A. HADIDI, E. MAISS, M. CAMBRA, T. CANDRESSE and V. DAMSTEEGT, 1996. Sour cherry strain of *plum pox potyvirus* (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV

- strains. *Phytopathology*, No. 86: 1215–1221.
- NEMETH, M. 1986. *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Netherlands and Akademiai Kiado, Hungary, Martinus Nijhoff Publishers.
- OEPP/EPPO, 2004. Normes OEPP/EPPO Standards. Bulletin OEPP/EPPO, No. 34: 247–256.
- OLMOS, A., M. CAMBRA, M. A. DASI, T. CANDRESSE, O. ESTEBAN, M. T. GORRIS and M. ASENSIO, 1997. Simultaneous detection and typing of *plum pox potyvirus* (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, No. 68: 127–137.
- PAPAIYANNIS, L. C., A. B. KYRIAKOU and T. KAPARI-ISAIA, 2007. Typing of *Plum pox virus* (PPV) strains in Cyprus. *Australasian Plant Disease Notes*, No. 2: 29–30.
- QUIOT, J. B., G. LABONNE, M. BOEGLIN, C. ADAMOLLE, L.Y. RENAUD and T. CANDRESSE, 1995. Behaviour of two isolates of *plum pox virus* inoculated on peach and apricot trees: First results. *Acta Horticulturae*, No. 386:290-295.
- SAMBROOK, J. and D. W. RUSSELL, 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCHNEIDER, W. L., V. D. DAMSTEEGT, F. E. GILDOW, A. L. STONE, D. J. SHERMAN, L. E. LEVY, V. MAVRODIEVA, N. RICHWINE, R. WELLIVER and D. G. LUSTER, 2011. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of pennsylvania isolates of *plum pox virus*. *Phytopathology*, 101: 627–636.
- SHI, B. J., S. W. DING and R. H. SYMONS, 1997. Plasmid vector for cloning infectious cDNAs from plant RNA viruses – high infectivity of cDNA clones of tomato aspermy cucumovirus. *Journal of General Virology*, No. 78:1181–1185.
- SOCHOR, J., P. BABULA, V. ADAM, B. KRŠKA and R. KIZEK, 2012. *Sharka: The Past, The Present and The Future*. *Viruses*, 4:2853-2901.
- SPIEGEL, S., E. M. KOVALENKO, A. VARGA, and D. JAMES, 2004. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant Disease*, No. 88: 973-979.
- STOBBS, L. W., L. VAN DRIEL, K. WHYBOURNE, C. CARLSON, M. TULLOCH and J. VAN LIER, 2005. Distribution of *Plum pox virus* in residential sites, commercial nurseries, and native plant species in the Niagara region, Ontario, Canada. *Plant Disease*, No. 89: 822-827.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI and S. KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular biology and evolution*, No. 30(12): 2725–2729.
- ULUBAS SERCE, C., T. CANDRESSE, L. SVANELLA-DUMAS, L. KRIZBAI, M. GAZEL and K. CAGLAYAN, 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, No. 142: 121–126.
- WALLIS, C. M., S. J. FLEISCHER, D. LUSTER and F. E. GILDOW, 2005. Aphid (Hemiptera: Aphididae) Species Composition and Potential Aphid Vectors of *Plum Pox Virus* in Pennsylvania Peach Orchards. *Journal of Economic Entomology*, 98(5): 1441-1450.
- WETZEL, T., T. CANDRESSE, M. RAVELONANDRO, R. P. DELBOS, H. MAZYAD, A. E. ABOUL-ATA and J. DUNEZ, 1991. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of *plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*, No. 72: 1741-1746.
- WILLIAM, L., J. SCHNEIDER DIANA, L. SHERMAN ANDREW, D. STONE VERNON, V. DAMSTEEGT, and D. FREDERICK REID, 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, No. 120: 97–105.