

شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها (*Prunus necrotic ring spot virus*) در درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار استان کردستان

مهدی آذریار^۱، محمد حاجی‌زاده^{۲*}، عبدالباسط عزیزی^۲ و مسعود نادرپور^۳

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۳. استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

به‌منظور شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی عامل لکه حلقوی بافت مرده درختان هسته دار، شمار ۱۴۹ نمونه برگ از درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار استان کردستان طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۶ جمع‌آوری و با آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی PNRSV-F3/PNRSV-R3 آزمون RT-PCR شدند. نتیجه‌ها RT-PCR نشان دادند که ۲۰/۸ درصد از نمونه‌ها آلوده به PNRSV بودند. سیزده جدایه بر پایه نوع میزبان و منطقه جغرافیایی گزینش و پس از تکثیر و پیوست بخشی از ژن پروتئین پوششی آن‌ها به پلاسمید pTG-19 و همسانه‌سازی در باکتری *E. coli* تعیین توالی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده در سطح نوکلئوتیدی به‌طور میانگین $98/9 \pm 0/002$ درصد با یکدیگر و $94/9 \pm 0/006$ درصد با دیگر جدایه‌های موجود در بانک ژن همانندی نوکلئوتیدی نشان دادند. در واکاوی تبارزایی بر پایه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های PNRSV در سه گروه تبارزایی PV96، PV32، PE5 و قرار گرفتند که سیزده جدایه این پژوهش به همراه بیشتر جدایه‌های ایرانی در گروه تبارزایی PV96 قرار گرفتند. بیشترین همانندی نوکلئوتیدی میان جدایه‌های هلو از کامیاران (KH10)، زردآلو از سنندج (SZ93) و هلو از دهگلان (D7) با جدایه شلیل از ایران (KX353935) با ۹۸ درصد و کمترین همانندی نوکلئوتیدی میان جدایه زردآلو از سنندج (SZ26) با جدایه آلو از لهستان (DQ983499) با ۸۳/۶ درصد همانندی دیده شد. نسبت‌های کم جانشینی مترادف به غیر مترادف (d_N/d_S) در ژن پروتئین پوششی این ویروس روشن‌گر این نکته است که گزینش منفی نقش بزرگی را در تکامل این ژن بازی کرده است و بررسی نوترکیبی با نرم‌افزار RDP v.4.63 نیز نشان داد که در جدایه‌های موردبررسی در این پژوهش نوترکیبی در این بخش از ژنوم رخ نداده است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین پوششی، گزینش منفی، نوترکیبی، واکاوی تبارزایی.

Phylogenetic analysis of *Prunus necrotic ring spot virus* in pome and stone fruit trees in Kurdistan province

Mahdi Azaryar¹, Mohammad Hajizadeh², Abdolbaset Azizi² and Masoud Naderpour³

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Research Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

(Received: Apr. 29, 2018 - Accepted: Mar. 6, 2019)

ABSTRACT

In order to study molecular identification and genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), 149 leaf samples from 37 orchards of pome and stone fruit trees of Kurdistan province were collected and tested by RT-PCR using a PNRSV-F3/PNRSV-R3 specific primer pair. Results showed that 20.8% of the samples were infected by PNRSV. In the next stage of the study, 13 isolates were selected based on the host and geographic region and their amplified fragments were ligated into the pTG19-T plasmid, transformed to *E. coli* DH5 α , and sequenced. Phylogenetic analysis showed that PNRSV isolates formed three clades PV96, PV32, and PE5, and all new-sequences from Kurdistan (in this research) were categorized in PV96 phylogenetic clade, which is close to other Iranian isolates. The new isolates shared 99 ± 0.002 identities together and $94/9 \pm 0.005$ with other previously PNRSV reported isolates at the nucleotide level. Pairwise comparisons of sequences showed that isolates peach from Kamyaran (KH10), pear from Sanandaj (SZ93), and peach from Dehgolan (D7) had the highest nucleotide similarity (98%) with Iranian isolate nectarine (KX353935) whereas isolate pear from Sanandaj (SZ26) had the lowest nucleotide identity with isolate plum from Poland (DQ983499). The low d_N/d_S ratio in all populations of the virus showed that negative selection plays important role in PNRSV-CP evolution and recombination. There is no recombination event in this domain of PNRSV genome of these isolates.

Keywords: Coat protein, negative selection, recombination, phylogenetic analysis.

* Corresponding author E-mail: m.hajizadeh@uok.ac.ir

مقدمه

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها (*Prunus* necrotic ringspot virus, PNRSV King et al., 2011) متعلق به جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* است (*Prunus* King et al., 2011). این ویروس به‌وسیله بذر، دانه گرده و تکثیر رویشی ترابرده می‌شود و تاکنون ناقل زیستی برای آن شناخته نشده است (Vaskova et al., 2000). PNRSV دارای پیکره چندوجهی است و ژنوم آن دربرگیرنده سه بخش RNA تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت و یک بخش زیرژنومی است (Pallas et al., 2013). RNA1 و RNA2 به ترتیب پروتئین‌های P1 و P2 را کد می‌کنند که در تکثیر ویروس نقش دارند و بخش ۵' از RNA سه پروتئین حرکتی و بخش ۳' به شیوه زیر ژنومی پروتئین پوششی را کد می‌کند (Aparicio et al., 2010; Bujarski et al., 2012). ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها نخستین بار از آمریکا در سال ۱۹۴۱ از درختان هلو گزارش شده است (Cochran & Hutchins, 1941). پژوهش‌های دیگر نشان داد که این ویروس گسترش جهانی داشته و از لحاظ اقتصادی در هسته‌دارها خسارت‌زا است (Mink, 1992). ویروس یادشده از استان اردبیل و دشت مغان (Moini & Izadpanah, 2000)، استان تهران و شمال کشور (Rakhshandehroo et al., 2006)، استان‌های فارس و گلستان (Rahmanian et al., 2013) و برخی بخش‌های غرب و شمال غرب (Sokhandan-Bashir et al., 2017) از میزبان‌های گوناگون گزارش شده است.

دامنه میزبانی ویروس لکه‌حلقوی بافت مرده هسته‌دارها دربرگیرنده بیش از ده خانواده است که خانواده‌های *Amarantaceae*، *Apiaceae*، *Cucurbitaceae*، *Chenopodiaceae*، *Cannabinaceae*، *Compositae*، *Leguminosae*، *Malvaceae*، *Rosaceae*، *Solanaceae* و *Scrophulariaceae* به این ویروس حساس هستند (Fallah et al., 2009). این ویروس از عامل‌های ایجادکننده نشانه‌های لکه غربالی در درختان میوه هسته‌دار است و باعث کاهش کمی و کیفی میوه‌ها می‌شود که در برخی باغ‌ها میزان زیان تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Vaskova et al., 2000).

نشانه‌های ویروس لکه‌حلقوی بافت مرده هسته‌دارها به رقم میزبان و جدایی ویروسی بستگی دارد که در جدایه‌های با توان بیماری‌زایی بالا نشانه‌های لکه‌حلقوی بیشتر روی برگ‌ها، جوانه‌ها و همچنین شاخه‌ها پدیدار شده که سپس تبدیل به بافت‌مردگی می‌شوند و درنهایت از پهنک برگ جدا شده، برگ‌ها سوراخ و به حالت غربالی در می‌آیند (Moury et al., 2001; Fiore et al., 2008). در برخی رقم‌های درختان امکان آلودگی نهان وجود دارد (Uyemoto & Scott, 1992).

جدایه‌های این ویروس بر پایه ژن پروتئین پوششی در سه گروه تبارزایی جدا قرار می‌گیرند (Zindovic et al., 1999; Aparicio et al., 2015). جدایه‌های گروه تبارزایی PV32 در میزبان‌های اصلی گیلاس و هلو بیماری موزاییک و روی گیاه آزمون سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) بدشکلی و بافت‌مردگی انتهایی برگ ایجاد می‌کنند. جدایه‌های گروه تبارزایی PV96 نیز دارای نشانه‌های خفیف‌تر در برابر گروه پیشین هستند و روی میزبان‌های اصلی دربرگیرنده گیلاس و هلو نشانه‌ها پیسک خفیف یا بدون نشانه و روی گیاه آزمون سلمه‌تره پیسک خفیف ایجاد می‌کنند. جدایه‌های گروه تبارزایی PE5 دارای نشانه‌های متغیری روی میزبان‌های اصلی و علفی هستند. این جدایه‌ها روی میزبان‌های اصلی پیسک و روگوز ایجاد می‌کنند و روی سلمه‌تره پیسک همراه با لکه‌های نکروز و خالدار ایجاد می‌کنند. جدایه‌های گروه تبارزایی PV32 دارای توان تهاجمی بیشتری در برابر دو گروه دیگر هستند (Fajardo et al., 2015; Apricio et al., 1999).

کارآمدترین روش برای مدیریت این بیماری، از میان بردن درختان آلوده در باغ‌ها، عدم به‌کارگیری از پیوندک آلوده هنگام پیوندزنی و به‌کارگیری نهال‌های گواهی‌شده است بنابراین، شناسایی این ویروس برای مهار بیماری ضروری است. بررسی تنوع ژنتیکی ویروس در میزبان‌های گوناگون باعث برگزیدن راهبرد مناسبی برای مهار عامل‌های ویروسی و کامیابی اقدامات مهاری می‌شود. بیشتر پژوهش‌های انجام‌گرفته در ایران روی این ویروس بر پایه ردیابی با

آغازگر معکوس که توانایی تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی PNRSV به اندازه ۵۵۳ جفت باز را داشتند، استفاده شد. این آغازگرها بر پایه منطقه‌های حفاظت‌شده جدایه‌های گوناگون طراحی شدند. واکنش PCR در حجم پایانی ۱۲/۵ میکرولیتر دربردارنده ۶/۲۵ میکرولیتر از مخلوط PCR (GeneAll, South Korea)، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ده پیکومول در میکرولیتر، ۴/۷۵ میکرولیتر آب سترون دیونیزه و یک میکرولیتر cDNA انجام شد. همچنین در نمونه شاهد منفی به جای cDNA از آب استفاده شد. شرایط زمانی و دمایی PCR به صورت ۹۴ درجه سلسیوس برای زمانی برابر دو دقیقه برای آغاز و سپس ۳۲ چرخه دربرگیرنده ۹۴ درجه سلسیوس برای زمانی برابر ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه سلسیوس برای زمانی برابر ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس برای زمانی برابر یک دقیقه و درنهایت ۷۲ درجه سلسیوس برای زمانی برابر هفت دقیقه بود. برای دیدن و جداسازی قطعه‌های تکثیرشده از الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۱/۲ درصد استفاده شد.

همسانه‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی

برای همسانه‌سازی قطعه‌های DNA برآمده از PCR، از حامل PCR cloning vector pTG19-T، شرکت Vivantis (Selangor, Malaysia) برابر دستورکار شرکت سازنده استفاده شد. همسانه‌سازی در باکتری *Escherichia coli* سویه DH5a انجام شد. استخراج پلاسمید با به‌کارگیری کیت استخراج پلاسمید شرکت Plasmid (Gene All Biotechnology, Seoul, Korea) TM SV Exprep، برابر دستورکار شرکت سازنده انجام شد. پلاسمیدها با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر آماده و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌یابی با روش خودکار سنگر به وسیله آغازگر مستقیم T7 promoter انجام شد.

ترسیم درخت تبارزایی

داده‌های نوکلئوتیدی به دست آمده نخست در نرم‌افزار BioEdit وارد و نخست توالی آغازگرها در آن جستجو

روش‌های سرم‌شناسی (Moini & Izadpanah, 2000; Rakhshanderoo *et al.*, 2006; Fallah & Rahmanian *et al.*, 2009) و مولکولی (Nasrollanejad, 2009 *al.*, 2013; Abtahi *et al.*, 2015; Sakhandan-Bashir *et al.*, 2017) بوده و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی این ویروس جداشده از گل محمدی (Abtahi *et al.*, 2015) و درختان هسته‌دار (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2017) انجام شده است. از آنجاکه در سالیان پسین نشانه‌های گمان‌مند به PNRSV در باغ‌های درختان هسته‌دار و دانه‌دار استان کردستان دیده شد، از این روی انگیزه این پژوهش شناسایی این ویروس در این استان بود که توالی‌های جدیدی به دست آمد و با هم سنجی با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن، تبارزایی و تنوع ژنتیکی آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، استخراج RNA و RT-PCR

نمونه‌برداری از ۳۷ باغ درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار استان کردستان طی ماه‌های تیر، مرداد و شهریور سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۶ از میزبان‌های گوناگون دربرگیرنده آلبالو، آلو، زردآلو، سیب، شلیل، گلابی و هلو انجام شد. در باغ‌های با گونه‌های گیاهی گوناگون، از همه گونه‌ها نمونه‌برداری شد. در سال ۱۳۹۶، نمونه‌برداری از درختان بدون نشانه نیز انجام شد. در میزبان‌های دارای نشانه‌ها گمان‌مند به PNRSV از برگ‌های دارای نشانه‌ها و در میزبان‌های بدون نشانه‌ها به صورت تصادفی از برگ‌های یک شاخه درخت نمونه‌برداری انجام شد. استخراج RNA از بافت برگ نمونه‌ها با روش سیلیکا (Foissac *et al.*, 2000) انجام شد. برای ساخت DNA مکمل (cDNA) از آغازگرهای شش نوکلئوتیدی تصادفی در واکنشی با حجم پایانی ده میکرولیتر به وسیله کیت ساخت cDNA تولید شرکت GeneAll (کره جنوبی) برابر دستورکار شرکت سازنده آن استفاده شد. در این پژوهش از آغازگرهای PNRSV-F3

(5'GCCGAATTTGCAATCATACCC 3')
به‌عنوان آغازگر مستقیم و PNRSV-R3 (5'ACTTCGGTCTTGAATTTCGAT3') به‌عنوان

نرم‌افزار DnaSP v.5.10.05 (Librado & Rozas, 2009) برآورد شد. توالی‌هایی از یک ژن که حتی در یک نوکلئوتید باهم اختلاف داشته و منحصر به فرد باشند، به‌عنوان یک هاپلو تیپ جدا در نظر گرفته شدند (Gao *et al.*, 2017). برای برآورد شدت فشار گزینش وارد به ژن (d_N-d_S) روی هر کدون از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد. برای شناسایی کدون‌های تحت اثر فشار گزینش طبیعی، نخست توالی کدون‌های اسید آمینه‌ای در نرم‌افزار MEGA6 هم ردیف‌سازی شدند و سپس سه روش گوناگون الگوریتم Maximum-likelihood دربرگیرنده Single Fixed likelihood ancestor counting (SLAC) effects likelihood (FEL) و Internal fixed effects likelihood (IFEL) در نرم‌افزار Datamonkey (Delpont *et al.*, 2010) استفاده شد. بررسی امکان رخداد نوترکیبی در این بخش از ژنوم میان جدایه‌ها با نرم‌افزار RDP v. 4.63 (Martin *et al.*, 2015) بررسی شد. هفت روش RDP، GENECONV، SISCAN، Chimaera، MaxChi، و BOOTSCAN برابر تنظیمات نرم‌افزار برای شناسایی جدایه‌های نوترکیب استفاده شدند و جدایه‌هایی که نوترکیبی آن‌ها دست‌کم با سه روش تشخیص داده شد به‌عنوان نوترکیب شناخته شدند.

و پس از زدایش توالی‌های مربوط به پلاسמיד، توالی به‌دست‌آمده به‌وسیله الگوریتم ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) در نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف شدند. سپس درخت تبارزایی توالی‌های هم‌ردیف شده با به‌کارگیری دو روش Neighbor joining (NJ) و Maximum likelihood (ML) (Tajima & Nei, 1984) و الگوی Tajima-Nei با ۱۰۰۰ تکرار در نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شد.

برآورد سنج‌های ژنتیکی ژن پروتئین پوششی

برآورد سنج‌های مربوط به تنوع ژنتیکی ویروس با به‌کارگیری نرم‌افزار DnaSP V.5.10.05 انجام شد. برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی، فشار گزینش جدایه‌های تعیین توالی شده در این پژوهش به همراه دیگر جدایه‌های توالی‌یابی شده از ایران به‌عنوان زیر جمعیت ایرانی ویروس PNRSV با دیگر زیر جمعیت‌های این ویروس از شیلی، چین، ایتالیا، لهستان و آمریکا هم سنجی شدند (جدول ۱).

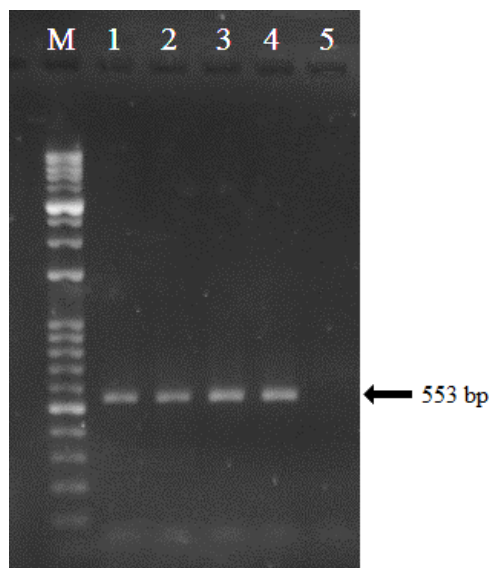
در این هم‌سنجی سنج‌های ژنتیکی مانند شمار هاپلو تیپ (H)، تنوع هاپلو تیپ (Hd)، شمار جایگاه‌های افتراقی (S)، شمار کل جهش‌ها (η)، تنوع نوکلئوتیدی (π)، نسبت جانیشینی مترادف (d_S)، نسبت جانیشینی غیر مترادف (d_N) و فشار گزینش (d_N/d_S) با به‌کارگیری

جدول ۱. رس‌شمارها و دیگر ویژگی‌های جدایه‌های ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Accession numbers and origins of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates/strains analyzed in this study

Source	Number	Accession Number	Isolate/Strain	Host
Chile	6	EF565251, EF565260, EF565247, EF565250, EF565259, EF565253	ChrCl.roy1, PlmCl.mrb1, PlmCl.mrb1, ChrCl.swe1, PchCl.sum1, PchCl.sum1	Cherry, Plum, Almond, Cherry, Peach, Nectarine
China	10	HQ833193, HQ833195, KF135204, KF135195, KF135200, FJ610344, FJ610342, KT444703, EU869295, AY684271	Chr-m, Nec-e, AprSX3, FchrYT5, PchHN2, -, -, ChrYL, -, Yunnan	Cherry, Nectarine, Apricot, Cherry, Peach, Rose, Rose, Sweet-cherry, Sweet-cherry, Rose
Iran	۶	KJ599816, KX353935, KX353932, KX353930, KJ573395, MF767268, AJ133204, AJ133203, AJ133201,	RosIr1-Mas1, SHN-40, SHN-6, ZKN-52, Iranian, 82K	Rose, Nectarine, Nectarine, Nectarine, Almond, Apple
Italy	7	AJ133210, AJ133207, EU368737, EU368736	AlmIt.cor1, ChrIt.lam1, AprIt.try1, ChrIt.bla1, PchIt.mry1, PNRSV-PL38, PNRSV-AL17	Almond, Cherry, Apricot, Cherry, Peach, Cherry, Cherry
Poland	4	DQ983495, DQ003584, DQ983499, DQ983498	Bl, I-23, Emp, 143	Cherry, Rose, Plum, Cherry
USA	4	AF013286, AF034990, FJ231736, FJ231738	Prune, CH39, ChrT133, ChrT224	Plum, Sweet cherry, Cherry, Plum

-: unknown



شکل ۱. نتیجه‌های الکتروفورز RT-PCR با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی. M: مارکر DNA ۱۰۰ bp (جین آل، کره جنوبی) و چاهک‌های ۱-۵ به ترتیب شاهد مثبت، KH10، SAI53، SZ93 و شاهد منفی

Figure 1. Electrophoretic patterns of PCR products on 1.2% agarose gel using specific primers of *Prunus necrotic ring spot virus*. Lane M) 100 bp molecular marker (GeneAll, South Korea), Lane 1-5) Positive control, KH10, SAI53, SZ93, and negative control, respectively.

نتایج و بحث

مشاهده‌های مزرعه‌ای و نتیجه‌های RT-PCR

قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی PNRSV به طول کم‌وبیش ۵۵۳ جفت باز در ۳۱ نمونه (۲۰/۸ درصد از نمونه‌ها) به دست آمد درحالی‌که هیچ قطعه‌ای از شاهد منفی (نمونه سالم و آب) تکثیر نگردید (شکل ۱). این ویروس در سال ۱۳۹۴ در ۲۲/۳۸ درصد نمونه‌ها و در سال ۱۳۹۶ در ۱۹/۵۱ درصد از نمونه‌ها ردیابی شد.

درمجموع در سال‌های موردبررسی، در میان منطقه‌های گوناگون استان کردستان، کامیاران با ۲۵/۹۲ درصد آلودگی در میان نمونه‌ها جزو آلوده‌ترین منطقه‌های نمونه‌برداری شده بود. با این‌وجود، PNRSV از شهرستان‌های سقز و قروه ردیابی نشد که می‌تواند در ارتباط با شمار کم نمونه مورد مطالعه از این منطقه‌ها باشد. در میان میزبان‌ها در استان کردستان، هلو با ۱۵ نمونه آلوده در میان ۳۸ نمونه مورد مطالعه (۳۹/۴۷ درصد) بیشترین میزان آلودگی و سیب با یک نمونه آلوده در میان ۳۸ نمونه مورد مطالعه (۳/۰۳ درصد) کمترین میزان آلودگی را نشان دادند درحالی‌که این ویروس از میزبان گلابی ردیابی نشد (جدول ۲).

جدول ۲. زمان، منطقه‌ها و میزبان‌های نمونه‌برداری از استان کردستان و نتیجه‌های RT-PCR برای ردیابی PNRSV

Table 2. Time, geographic, and host species origin of collected samples concerning the results of incidence and detection of *Prunus necrotic ringspot virus* detection from Kurdistan province

Sampling time	Location	Number of gardens	Total samples	Number of infected samples	Number of infected / Number of collected samples							
					Peach	Cherry	Apricot	Sour cherry	Nectarine	Plum	Apple	Pear
1394	Sanandaj	6	30	11	5.8	1.4	4.8	1.1	0.1	0.1	0.7	-
	Marivan	2	4	1	0.1	0.1	-	-	1.1	0.1	-	-
	Saqquez	3	10	0	0.1	0.3	-	-	-	0.1	0.5	-
	Baneh	2	6	1	1.2	-	-	0.1	0.1	-	0.2	-
	Kamyaran	3	12	1	1.6	-	0.1	0.1	0.1	-	0.3	-
	Dehgolan	2	5	1	0.1	1.1	0.1	-	-	0.1	0.1	-
	Total	18	67	15	7.19	2.9	4.10	1.3	1.4	0.4	0.18	-
1396	Sanandaj	7	39	5	4.9	0.4	0.4	0.3	1.2	0.7	0.9	0.1
	Marivan	3	7	1	0.3	1.2	0.1	-	-	0.1	-	-
	Saqquez	1	3	0	0.1	-	0.2	-	-	-	-	-
	Baneh	2	9	1	0.1	-	-	-	0.2	0.2	1.2	0.2
	Kamyaran	3	15	6	2.3	0.2	2.4	-	1.1	1.2	0.2	0.1
	Dehgolan	3	9	3	2.3	0.1	0.1	-	-	1.2	0.2	-
	Total	19	82	16	8.20	1.9	2.12	0.3	2.5	2.14	1.15	0.4
1394 + 1396	Sanandaj	13	69	16	9.17	1.8	4.12	1.4	1.3	0.8	0.16	0.1
	Marivan	5	11	2	0.4	1.3	0.1	-	1.1	0.2	-	-
	Saqquez	4	13	0	0.2	0.3	0.2	-	-	0.1	0.5	-
	Baneh	4	15	2	1.3	-	-	0.1	0.3	0.2	1.4	0.2
	Kamyaran	6	27	7	3.9	0.2	2.5	0.1	1.2	1.2	0.5	0.1
	Dehgolan	5	14	4	2.4	1.2	0.2	-	-	1.3	0.3	-
	Total	37	149	31	15.39	3.18	6.22	1.6	3.9	2.18	1.33	0.4

pGT19-T و میزبان *E. coli* تعیین توالی شدند. ترادف‌های به‌دست‌آمده پس از زدایش توالی نوکلئوتیدی مربوط به پلاسمید در دو سوی توالی ویروسی موردنظر که در جایگاه ۸ تا ۵۶۰ ژن پروتئین پوششی این ویروس است، در پایگاه اطلاعاتی داده‌های نوکلئوتیدی (NCBI) به ثبت رسیدند.

جدایه‌های توالی‌یابی شده در این پژوهش در سطح نوکلئوتیدی با یکدیگر به‌طور میانگین $98/9 \pm 0/002$ درصد و با دیگر جدایه‌های ایرانی $97/3 \pm 0/004$ درصد همانندی داشتند. همچنین، میزان همانندی جدایه‌های این پژوهش با جدایه‌های موجود در بانک ژن به‌طور میانگین $94/4 \pm 0/006$ درصد بود. سه جدایه D7، KH10 و SZ93 و دو جدایه DG1 و D4 دارای همانندی نوکلئوتیدی ۱۰۰ درصد بودند و به‌عنوان یک هاپلوتیپ در نظر گرفته شدند.

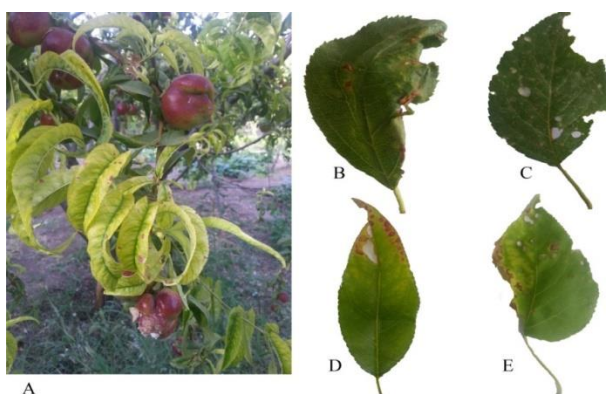
دگرگونی‌ها در طول توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در جدایه‌های این پژوهش روند همانندی را با دیگر جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد (شکل ۳). بیشترین میزان دگرگونی‌های نوکلئوتیدی در یک‌سوم نخستین ژن پروتئین پوششی این ویروس دیده شد؛ بنابراین طراحی آغازگر از این بخش برای ردیابی همه جدایه‌های این ویروس کارآمد نیست.

نمونه‌های آلوده دارای طیف گسترده‌ای از نشانه‌ها همانند زردی، موزاییک، لکه‌غریالی، پیچیدگی برگ و بدشکلی میوه بودند (شکل ۲) که این نشانه‌ها با نشانه‌های توصیف‌شده برای PNRSV هم‌خوانی داشت (Mink, 1992). نشانه‌ها و شدت آن‌ها به فراخور میزبان، سویه ویروسی و شرایط محیطی گوناگون است (Boulila *et al.*, 2013). عدم ردیابی ویروس لکه‌حلقوی درختان هسته‌دار از همه نمونه‌های دارای نشانه‌ها شاید به دلیل آلودگی نمونه‌ها به دست ویروس یا ویروس‌های دیگر باشد که در این پژوهش بررسی نشد.

در نمونه‌برداری‌های انجام‌گرفته از میزبان‌های بدون نشانه، از یک نمونه گیلان و یک نمونه زردآلو PNRSV ردیابی شد؛ بنابراین تهیه پیوندک از درختان سالم بدون آزمون مولکولی این درختان ممکن است منجر به آغاز آلودگی در باغ جدید گردد.

تجزیه و تحلیل توالی ژن پروتئین پوششی

سیزده جدایه Sal53، SZ93، SZ26، BH11، KH10، DG1، B5، M، K6، S2، M4، D4 و D7 (جدول ۳)، بر پایه منطقه جغرافیایی، میزبان و نوع نشانه‌های ایجادکننده گزینش و پس از تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی و همسانه‌سازی در پلاسمید



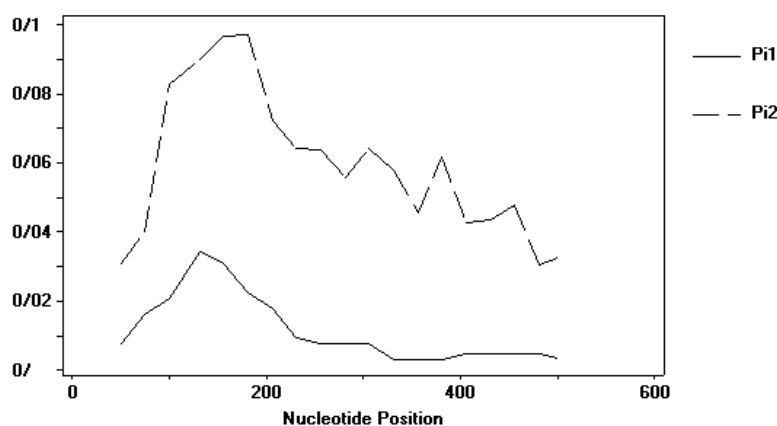
شکل ۲. نشانه‌های PNRSV روی برگ درختان هسته‌دار و دانه‌دار در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از منطقه‌های گوناگون استان کردستان که آلودگی آن‌ها با روش RT-PCR آشکار شد. A) شلیل (جدایه K8) جمع‌آوری‌شده از کامیاران، B) سیب (جدایه B5) جمع‌آوری‌شده از بانه، C) آلو (جدایه K2) جمع‌آوری‌شده از کامیاران، D) هلو (جدایه S3) جمع‌آوری‌شده از سنندج و E) نشانه‌های روی برگ زردآلو (جدایه K6) جمع‌آوری‌شده از کامیاران

Figure 2. Symptoms of PNRSV on pome and stone fruit samples collected from several locations of Kurdistan province. A) Nectarine (isolate K8) collected from Kamyaran, B) Apple (isolate B5) collected from Baneh, C) Plum (isolate K2) collected from Kamyaran, D) Peach (isolate S3) collected from Sanandaj, and E) Apricot (isolate K6) collected from Kamyaran

جدول ۳. میزبان، محل نمونه برداری، نشانه‌ها و شماره دسترسی در ژن بانک جدایه‌های تعیین توالی شده در این پژوهش

Sample	Host	Location	Symptoms ^a	Accession Nos.
Sal53	<i>Prunus cerasus</i>	Sanandaj	LD, Y, NS	MF574153
KH10	<i>Prunus persica</i>	Kamyaran	CS, LD	MF574154
SZ93	<i>Prunus armeniaca</i>	Sanandaj	M	MF574155
BH11	<i>Prunus persica</i>	Baneh	M, LD	MF767265
SZ26	<i>Prunus armeniaca</i>	Sanandaj	SL	MF767267
DG1	<i>Prunus avium</i>	Dehgolan	SH, M	MF767266
B5	<i>Malus domestica</i>	Baneh	NS, LD	MG788250
M	<i>Prunus persica</i>	Dehgolan	CS, M	MG788256
K6	<i>Prunus armeniaca</i>	Kamyaran	SH, CS, NS	MG788253
S2	<i>Prunus persica</i>	Sanandaj	CS	MG788255
M4	<i>Prunus avium</i>	Marivan	SL	MG788254
D7	<i>Prunus persica</i>	Dehgolan	CS, NS	MG788252
D4	<i>Prunus domestica</i>	Dehgolan	NS	MG788251

a) LD: leaf deformation, Y: yellowing, NS: necrotic spots, CS: chlorotic spots, M: mosaic, SL: symptomless, SH: shot holes.



شکل ۳. میانگین دگرگونی‌های نوکلئوتیدی در ۵۵۳ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها در جدایه‌های موجود (Pi1) و جدایه‌های این پژوهش (Pi2)

Figure 3. Trend of nucleotide diversity along the 553 nucleotides of coat protein gene in the *Prunus necrotic ringspot virus* strains/isolates in previously reported isolates (Pi1) and our isolates (Pi2)

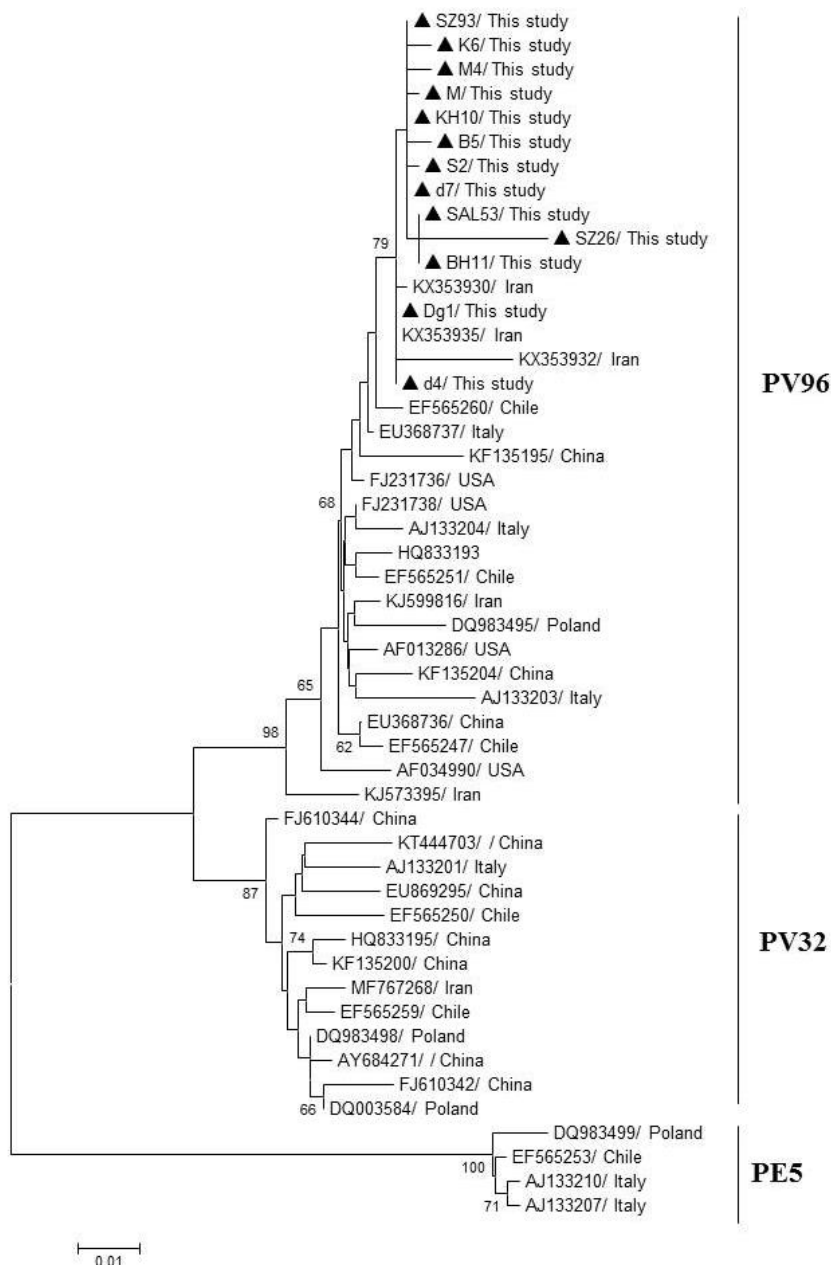
جدایه از ایتالیا و گروه تبارزایی PE5 دربرگیرنده چهار جدایه، دو جدایه از ایتالیا و یک جدایه از شیلی و یک جدایه از لهستان بودند. در پژوهشی که در استان گلستان روی جدایه‌های این ویروس انجام شد، همگی جدایه‌ها در گروه تبارزایی PV32 (Rahmanian *et al.*, 2013) بودند اما در پژوهش دیگر، جدایه‌های PNRSV از گل محمدی در گروه تبارزایی PV96 قرار گرفتند (Abtahi *et al.*, 2015). همچنین، در درخت ترسیم‌شده برابر با پژوهش‌های پیشین (Aparicio *et al.*, 1999; Fiore *et al.*, 2008) همبستگی میان نوع میزبان، منشأ جغرافیایی با گروه‌بندی تبارزایی به دست نیامد هرچند ارتباط معنی‌داری میان بیماری‌زایی جدایه‌های این ویروس و گروه‌های

تجزیه و تحلیل تبارزایی

جدایه‌های ویروس لکه حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار بر پایه ۵۵۳ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی با هر دو روش NJ و ML در سه گروه تبارزایی PV96، PV32 و PE5 قرار گرفتند (شکل ۴) که با پژوهش‌های پیشین (Aparicio & Pallas, 2002; Aparicio, 1999; Fiore *et al.*, 2008) همخوانی داشت. گروه تبارزایی PV96 دربرگیرنده ۱۳ جدایه این پژوهش، پنج جدایه از ایران، چهار جدایه از ایتالیا، چهار جدایه از آمریکا، سه جدایه از چین، سه جدایه از شیلی و یک جدایه از لهستان، گروه تبارزایی PV32 دربرگیرنده یک جدایه از ایران، هفت جدایه از چین، دو جدایه از شیلی، دو جدایه از لهستان و یک

برآمده از میزبان (host-associated selection) باشد (Garcia-Arenal *et al.*, 2003). قرار گرفتن جدایه‌های ایرانی در دو گروه جدا (شکل ۴) نشان داد که این ویروس در ایران مسیر تکاملی جدایی را طی نکرده است.

تبارزایی وجود داشت (Hammond & Crosslin, 1998؛ Cui *et al.*, 2012). نبود ارتباط میان نوع میزبان و گروه‌بندی تبارزایی در این ویروس بر پایه CP، می‌تواند برآمده از نبود گزینش واریانت‌های ویژه به‌وسیله میزبان و یا به‌اصطلاح نبود فشار گزینش



شکل ۴. درخت تبارزایی ترسیم‌شده به روش Neighbor-joining از هم‌ردیف سازی ۵۵۳ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ۵۰ جدایه PVNSRV اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار برای برآورد روابط تبارزایی به کار رفته است. اندازه‌های بوت استرپ کمتر از ۶۰ روی گره‌ها نشان داده نشده‌اند. جدایه‌های ردیابی شده در این پژوهش با نشان مثلث سیاه‌رنگ کنار آن.

ویژگی‌های جدایه‌ها در جدول ۱ آمده‌اند.

Figure 4. Phylogenetic relationships of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates reconstructed based on 553 bp of CP gene sequence data using the Neighbor-joining method. Bootstrap values over 60% are given at the nodes. Isolates of this study are shown by black triangles. Identities of isolates are given in Table 1.

در میان گروه‌های تبارزایی، بیشترین همانندی نوکلئوتیدی در گروه تبارزایی PE5 با ۹۹/۱ درصد و سپس گروه تبارزایی PV96 با ۹۸/۲ درصد و گروه تبارزایی PV32 با ۹۸ درصد مشاهده شد. بیشترین فاصله ژنتیکی میان گروه‌های تبارزایی PV96 و PE5 با ۰/۱۳۳ به دست آمد و بیشترین نزدیکی میان دو گروه تبارزایی PV32 و PV96 با ۰/۰۵۶ برآورد شد. همچنین فاصله ژنتیکی میان گروه تبارزایی PV32 و PE5، ۰/۱۲۱ بود.

نتیجه‌های برآمده از برآورد سنج‌های ژنتیکی ویژگی‌ها مولکولی ژن پروتئین پوششی PNRSV به‌وسیله چندین سنج ژنتیکی برآورد شد (جدول ۴). جدایه‌های این پژوهش دارای شمار ۱۰ هاپلوتیپ، میزان تنوع نوکلئوتیدی $\pi=0/0103$ ، شمار جایگاه‌های افتراقی $S=34$ ، شمار جهش‌ها $I=35$ ، نسبت جانیشینی نوکلئوتیدهای نامترادف به جانیشینی مترادف $d_N/d_S=0/4857$ بودند که روشن‌گر نقش کارآمد گزینش منفی در تکامل این ژن بوده است. برای دریافتن بیشتر از هم‌سنجی جمعیت ایرانی این ویروس با دیگر جمعیت‌های این ویروس در جهان، جدایه‌های این پژوهش و شش جدایه از پیش تعیین توالی شده از دیگر استان‌ها (جدول ۱) تحت عنوان جمعیت ایرانی تجزیه و تحلیل شدند. بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi=0/078$) و بیشترین شمار جایگاه‌های افتراقی ($S=95$) در جدایه‌های ایتالیا و کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi=0/013$) با کمترین شمار جایگاه‌های افتراقی ($S=14$) برای جدایه‌های آمریکا به دست آمد. کمترین میزان تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های این ویروس برای جمعیت آمریکا ($\pi=0/014$) و سپس جمعیت ایران ($\pi=0/025$) به دست آمد. تنوع کم این ژن در جمعیت ایرانی PNRSV شاید برآمده از پیشینه کم این ویروس در ایران باشد. فشار گزینشی همانندی از سوی گونه‌های گوناگون میزبان به این ویروس وارد شده است و در نتیجه باعث ایجاد جمعیت‌های مشتق از میزبان نشده است همچنان که درباره ویروس‌های دیگر نیز این حالت دیده شده است (Veis *et al.*,)

قرارگیری جدایه‌هایی از یک کشور در گروه‌های تبارزایی گوناگون (شکل ۱)، وجود تنوع کم ژنتیکی در درون گروه‌ها، وجود تنوع ژنتیکی فراوان در میان گروه‌ها و برآورد شناسه افتراق جمعیت (F_{ST}) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) به نظر می‌رسد که مهاجرت ژنی (جدایه‌ها) در اثر جابجایی مواد تکثیری آلوده به‌وفور رخ داده است. همچنین نسبت‌های کم جانیشینی مترادف به غیر مترادف (d_N/d_S) در همه جمعیت‌ها (جدول ۴) روشن‌گر این نکته است که گزینش منفی نقش بسیار را در تکامل این ژن ویروس بازی کرده است. با توجه به فرضیه $d_S=d_N$ ، فشار گزینش در گروه‌ها حالت خنثی نداشته است و این نشان‌دهنده نقش کارآمد گزینش منفی در تنوع و تکامل این ژن از ویروس بوده است. نتیجه‌های نشان دادند که بیشترین فشار گزینش ($d_N/d_S=0/258$) در جمعیت ایرانی و آمریکایی و کمترین فشار گزینش ($d_N/d_S=0/198$) در زیر جمعیت شیلی وجود داشت. بیشترین مقدار $d_N/d_S=0/4857$ برای جدایه‌های این پژوهش به دست آمد و دلیل این امر ممکن است در پیوند با بی‌شماری میزبان‌های مورد بررسی در این پژوهش باشد که جدایه‌های ویروس از آن‌ها جدا شده‌اند.

هرچند نوترکیبی نقش فراوانی را در دگرگونی‌های ژنتیکی و تکامل ویروس‌ها بازی می‌کند (Gao *et al.*, 2016)، اما این بخش از ژنوم ویروس PNRSV بدون نوترکیبی بود. نوترکیبی در این ژن در پنج جدایه از تونس و یک جدایه از لهستان گزارش شده است (Boulila, 2009)، ولی این جدایه‌ها در این پژوهش مورد به‌کار نرفتند. چرایی پایین بودن نرخ نوترکیبی در این ویروس شاید در پیوند با نبود ناقل زیستی باشد.

میزان شدت گزینش (d_N-d_S) بر روی کدون‌های در پیوند با این بخش از ژن پروتئین پوششی در نرم‌افزار MEGA6 برآورد و نتیجه‌ها نشان دادند که میزان شدت گزینش در طول این ژن یکسان نبوده است (شکل ۵).

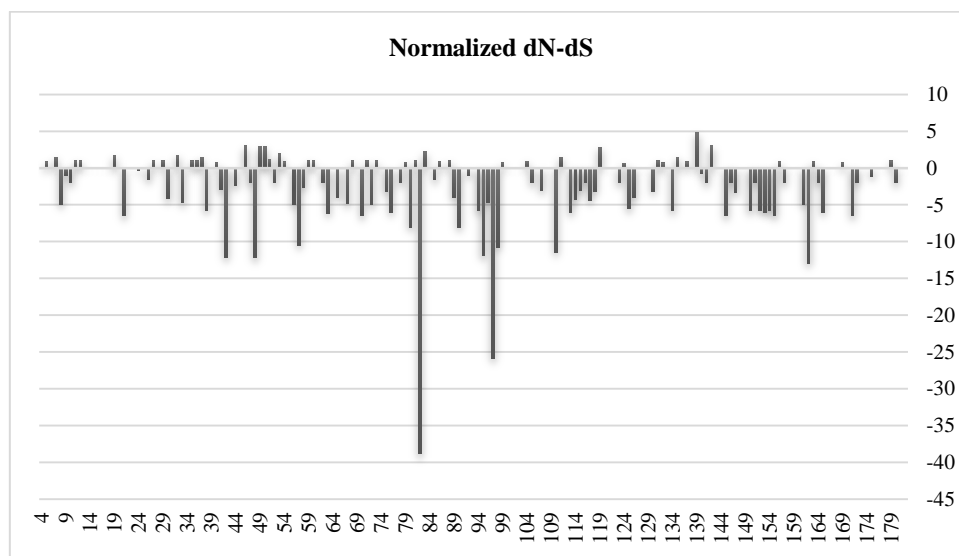
جدول ۴. نتیجه‌های برآورد سنج‌های جمعیتی بر پایه بخشی از ژن پروتئین پوششی PNRSV

Table 4. Genetic characterization of <i>Prunus necrotic ring spot virus</i> coat protein from different populations									
Geographic region	N	H ^a	Hd ^b	S ^c	η^d	π	d _N	d _S	d _N /d _S
This study	13	10	0.949	34	35	0.0103	0.0085	0.0175	0.4857
Chile	6	6	1.000	91	98	0.0695	0.0350	0.1793	0.1979
Chin	10	10	1.000	61	63	0.0380	0.0198	0.0960	0.2062
Iran	19	14	0.959	79	83	0.0199	0.0123	0.0486	0.2530
Italy	7	7	1.000	95	103	0.0785	0.0468	0.1827	0.2561
Poland	4	3	0.833	80	82	0.0765	0.0427	0.1860	0.2295
USA	4	4	1.000	14	14	0.0133	0.0080	0.0310	0.2580
Total	50	45	0.994	171	203	0.0498	0.0274	0.1457	0.1880

N: شمار نمونه، H: شمار چندشکلی (پلی‌مرفیسم)، Hd: تنوع هاپلوپیدی، S: شمار جایگاه‌های افتراقی، η : شمار کل جهش‌ها، π : تنوع ژنتیکی، dN: تنوع

جهش‌هایی که منجر به تغییر اسیدآمیننه نشده‌اند، dS: تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسیدآمیننه شده‌اند.

N: number of isolate; H: number of haplotypes/isolates; Hd: haplotype diversity; S: number of polymorphic (Segregating) sites; η (Eta): total number of mutations; π : nucleotide diversity; dS: synonymous nucleotide diversity; dN: non-synonymous nucleotide diversity.



شکل ۵. شدت فشار گزینش بر ژن پروتئین پوششی (d_N-d_S) در طول کدون‌های ژن پروتئین پوششی

Figure 5. Selection pressure intensity (d_N-d_S) along the codons of the coat protein gene

داده‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش به دریافت ساختار مولکولی جمعیت‌های این ویروس در راستای به‌کارگیری راهبردهای مشتق از بیمارگر به‌منظور رویارویی با این ویروس یاری خواهد کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، با روش مولکولی RT-PCR ویروس لکه‌حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار از میزبان‌های هسته‌دار و دانه‌دار استان کردستان ردیابی شد و همچنین داده‌هایی در پیوند با ژنتیک جمعیت این ویروس به‌دست آمد. داده‌های به‌دست‌آمده در برآورد سنج‌های جمعیتی این ویروس نشان داد که گزینش منفی نقش فراوانی را در تکامل ژن پروتئین پوششی این ویروس بازی کرده است.

همچنین نوع فشار وارد بر هر کدون با به‌کارگیری نرم‌افزار HyPhy موجود در Datamonkey با روش‌های SLAC، FEL و IFEL در سطح معنی‌داری ۰/۱ انجام شد. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است بیشتر کدون‌ها تحت فشار گزینش منفی بودند. در سطح معنی‌دار ۰/۱، با به‌کارگیری الگوریتم FEL کدون‌های ۵۱ و ۱۴۱ و با الگوریتم IFEL و کدون‌های ۵۱ و ۱۱۸ با فشار گزینش مثبت در سطح معنی‌دار ۰/۱ به‌دست آمد درحالی‌که با الگوریتم SALC هیچ کدونی تحت فشار گزینش مثبت یافت نشد. همچنین کدون‌های ۷۸، ۸۲، ۸۴، ۹۲، ۹۹، ۱۰۰، ۱۱۲، ۱۱۵، ۱۶۴ و ۱۶۷ با هر سه الگوریتم FEL، IFEL و SALC و در سطح معنی‌دار ۰/۱ تحت فشار گزینش منفی شناسایی شدند.

REFERENCES

1. Abtahi, F. S., Shams-Bakhsh, M., Mahdiyeh, M. & Safaie, N. (2015). Detection and distribution of the important viruses infecting Damask rose in floricultures of Isfahan, Markazi and Kerman provinces. *Modern Genetics Journal*, 1, 11-20.
2. Aparicio, F. & Pallás, V. (2002). The molecular variability analysis of the RNA 3 of fifteen isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* sheds light on the minimal requirements for the synthesis of its subgenomic RNA. *Virus Genes*, 25(1), 75-84.
3. Aparicio, F., Myrta, A., Di Terlizzi, B. & Pallas, V. (1999). Molecular variability among isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different *Prunus* spp. *Phytopathology*, 89, 991-999.
4. Aparicio, F., Pallás, V. & Sánchez-Navarro, J. (2010). Implication of the C terminus of the *Prunus necrotic ringspot virus* movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *Journal of General Virology*, 91(7), 1865-1870.
5. Boulila, M. (2009). Molecular Evidence for Recombination in *Prunus Necrotic Ringspot Virus*. *Plant Molecular Biology Report*, 27, 189-198.
6. 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(1), 11-24.
7. Bujarski, J., Figlerowicz, M., Gallitelli, D., Roossinck, M. J. & Scott, S. W. (2012). Family *Bromoviridae*. In: *Virus Taxonomy*. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp, 965-976.
8. Cochran, L. C. & Hutchins, L. M. (1941). A severe ring-spot virus on peach. *Phytopathology*, 31, 860.
9. Cui, H. G., Liu, H. Z., Chen, J., Zhou J. F., Qu, L. N., Su, J. M., Wang, G. P. & Hong, N. (2012). Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting stone fruit trees grown at seven regions in China and differentiation of three phylogroups by multiplex RT-PCR. *Crop protection*, 74, 30-36.
10. Delport, W., Poon, A. F., Frost, S. D. W. & Pond, K. S. L. (2010). Datamonkey: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, 26(19), 2455-2457.
11. Fajardo, T. V. M., Nascimento, M. B., Eiras, M., Nickel, O. & Pio-Ribeiro, G. (2015). Molecular characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolated from rose in Brazil. *Ciência Rural*, 45(12), 2197-220
12. Fallah, T. & Nasrollanejad, S. (2009). Detection and distribution of PNRSV on stone fruits in Golestan provinces. *Journal of Plant Production*, 16, 88-98. (in Farsi)
13. Fiore N., Fajardo T. V., Prodan, S., Herranz, M. C., Aparicio, F., Montealegre, J. & Sánchez-Navarro, J. (2008). Genetic diversity of the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Archives of Virology*, 153(5), 909-919.
14. Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M. J. & Candresse, T. (2000). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulture*, 357, 52-59.
15. Gao, F., Lin, W., Shen, J. & Liao, F. (2016). Genetic diversity and molecular evolution of arabis mosaic virus based on the CP gene sequence. *Archives of Virology*, 161, 1047-1051.
16. Gao, R., Xu, Y., Candresse, T., He, Z., Li, S., Ma, Y. & Lu, M. (2017). Further insight into genetic variation and haplotype diversity of *Cherry virus A* from China. *PLOS ONE*, 12(10), e0186273.
17. Garcí'a-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6, 225-232.
18. Garcí'a-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 157-186.
19. Hammond, R. W. & Crosslin, J. M. (1998). Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. *Journal of General Virology*, 79, 1815-1823.
20. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B. (2011). "Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Academic Press, London, UK. 1327 pp.89.
21. Librado, P. & Rozas, J. (2009). Dnasp V5: A software for Comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
22. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes, *Virus Evolution*, 1(1), vev003, doi: 10.1093/ve/vev003.
23. Mink, G. I. (1992). *Prunus necrotic ringspot virus*, Pp 335-356. In: J. Kumer, H. S. Chaube, U. S. Singh, and A. N. Mukhadpadhyay (Eds). *Plant Diseases of International Importance*. Vol. III. Prentice Hall, New York.
24. Moini, A. & Izadpanah, K. (2000). Serological identification of *Prunus necrotic ring spot virus* and PPV in Dasht-e-Moghan. In: *Proceedings of the 14th Plant Protection Congress of Iran*, 5-8 September, Isfahan, Iran, p. 338.

25. Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. P., 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.
26. Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, c. M., Sanchez-Navarro, A. J. & Scott, W. S. (2013). The molecular biology of Ilarviruses. *Advances in Virus Research*, 87, 139-181.
27. 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. (in Farsi)
28. Rakhshandehroo, F., Zamani Zadeh, H. R., Modarresi, A. & Hajmansoor, S. (2006). Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on rose in Iran. *Plant Disease*, 90, 975.
29. Sokhandan-Bashir, N., Kashiha, Z., Koolivand, D. & Eini, O. (2017). Detection and phylogenetic analysis of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates from stone fruits in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 717- 723.
30. Tajima, F. & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1, 269-285.
31. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
32. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-80.
33. Vaskova, D., Pertzik, K., Spak, J. & Karesova, R. (2000). Variability and molecular typing of the woody tree infecting *Prunus necrotic ringspot virus*. *Archive of Virology*, 145(4), 699-709.
34. Vives, M. C., Rubio, L., Galipienso, L., Navarro, L., Moreno, P. & Guerri, J. (2002). Low genetic variation between isolates of *Citrus leaf blotch virus* from different host species and of different geographical origins. *Journal of General Virology*, 83(10), 2587-2591.
35. Uyemoto, J. K. & Scott, S. (1992). Important diseases of prunus caused by viruses and other graft transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*, 76, 5-11.
36. Zindović, J., Autonell, C. R. & Ratti, C. (2015). Molecular characterization of the coat protein gene of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting peach in Montenegro. *European Journal of Plant Pathology*, 143(4), 881-891.