

## ردیابی، تحلیل تبارزایی و آنالیز ژنتیک جمعیت و بروس ساقه شیاری سیب بر اساس ژن پروتئین پوششی

مهسا محمدلو<sup>۱</sup>، داود کولیوند<sup>۱</sup>✉، محمد حاجی‌زاده<sup>۲</sup>

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.  
✉ Koolivand@znu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰

بازنگری: ۱۴۰۰/۲/۲۶

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۶

### چکیده

ویروس ساقه شیاری سیب (*Apple stem grooving virus* (ASGV)) یکی از ویروس‌های مهم درختان سیب است. در تحقیق حاضر به منظور ردیابی این ویروس، ۸۷ نمونه مشکوک از برگ و پوست درختان سیب دارای علائم و فاقد علائم از مناطق غربی و جنوب غربی استان زنجان و شرق استان کردستان نمونه برداری انجام شد. پس از استخراج آران‌ای کل از ۵۰ نمونه از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ساخت دی‌ان‌ای کامل با استفاده از آغازگر معکوس طراحی شده منطبق بر ژن کامل پروتئین پوششی انجام شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، قطعه‌ای به طول ۷۲۸ جفت باز مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب در ۱۲ نمونه از باغات مختلف از منطقه زنجان و بیجار استان کردستان تکثیر شد. ۹ محصول پی‌سی‌آر برای تعیین توالی انتخاب شد، از ۹ محصول پی‌سی‌آر انتخاب شده چهار نمونه به صورت همسانه‌سازی شده در پلاسמיד pTG19 و پنج محصول پی‌سی‌آر بصورت مستقیم توالی‌یابی شدند. نتایج تعیین توالی و مقایسه با پایگاه داده‌های بانک ژن نشان داد قطعات تکثیر یافته در پی‌سی‌آر مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب است. آنالیز تبارزایی جدایه‌های تعیین توالی شده و توالی‌های به دست آمده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و روش Neighbor Joining (NJ) و مدل Jukes Cantor نشان داد که جدایه‌های ایرانی تازه ردیابی شده با جدایه‌هایی از ایران، هند، کره جنوبی و چین در یک خوشه قرار می‌گیرند. نتایج بررسی جهش‌ها نشان داد dN/dS جدایه‌های ایرانی نسبت به سایر جدایه‌ها کمتر است و بیشترین تبادل ژنی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های کره جنوبی و چین است. این اولین گزارش از این ویروس در منطقه زنجان است.

کلمات کلیدی: آنالیز تبارزایی، زنجان، کردستان، کاپیلوویروس

## Detection, phylogenetic and population genetic analysis of *Apple stem grooving virus* based on coat protein gene

Mahsa Mohammadlou<sup>1</sup>, Davoud Koolivand<sup>1</sup>✉, Mohammad Hajizadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. <sup>2</sup>Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. ✉Koolivand@znu.ac.ir

Received: 15 April 2021

Revised: 16 May 2021

Accepted: 11 September 2021

### Abstract

*Apple stem grooving virus* (ASGV) is one of the important viruses infecting apple trees. In this research, 87 symptomatic and symptomless leaf and bark samples were collected from the apple orchards in west and south west of Zanjan and east of Kurdistan provinces to detect ASGV. After total RNA extraction from 50 out of 87 samples, cDNAs were synthesized by reverse primer and PCR optimized using a pair of specific primer corresponding to complete coat protein gene. A DNA segment with 728 bp length corresponding to complete coat protein gene was amplified from twelve samples by RT-PCR. Nine PCR-products including four samples cloned into pTG19 and five samples without cloning were sequenced. The sequencing and blast results revealed that the fragments belong to coat protein gene of *Apple stem grooving virus*. Phylogenetic analysis of new Iranian isolates and those retrieved from GenBank by MEGA 7 and Neighbor-Joining methods in Jukes-Cantor model showed that the new Iranian isolates were placed in a sub-clade with reported Iranian, Indian, South Korean and Chinese isolates. The result revealed that the least dN/dS ratio belonging to Iranian isolates and the most gene flow was calculated between isolates from Iran, China and South Korean. This is the first report of *Apple stem grooving virus* from the Zanjan region.

**Keywords:** Kurdistan, Phylogenetic Analysis, Expression, *Cappilovirus*, Zanjan

### How to cite:

Mohammadlou M, Koolivand D, Hajizadeh M, 2022. Detection, phylogenetic and population genetic analysis of *Apple stem grooving virus* based on coat protein gene. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (2): 67–78.

## مقدمه

می‌کند و غالباً علائم خفیفی روی میزبان ایجاد می‌کنند ( Shim et al. 2004). از زمان تشخیص اولیه، دامنه میزبانی شناخته شده طبیعی ویروس ساقه شیاری سیب گسترش یافته و شامل زردآلوی ژاپنی، گلابی ژاپنی، گیلاس، مرکبات، گلابی اروپایی، کیوی، انگور فرنگی و زنبق چینی است (Shim et al. 2004). عمده میزبان‌های این ویروس شامل گونه‌هایی در خانواده‌های سوسنیان (Liliaceae)، کیویان (Actinidiaceae)، سداییان (Rutaceae) و گل‌سرخیان (Rosaceae) هستند. اغلب ارقام تجاری سیب و گلابی بدون علائم هستند مگر اینکه به یک پایه حساس پیوند زده شوند (Welsh & Uyemoto 1980). در صورت وجود علائم می‌توان به موارد مختلفی از جمله تورم پوست میوه، لکه برگی کلروتیک (James 2008; Sutton et al. 2014)، ظهور خطوط قهوه‌ای در قسمت بالای پیوند و در برگ به صورت کلروز، حفره و یا لکه‌های حلقه‌ای و ایجاد شیاری در ساقه اشاره کرد. شیاری موجود می‌تواند به صورت طولانی همراه با تورم باشد (Welsh & Uyemoto 1980). از آنجایی که این ویروس بافت چوبی را مورد حمله قرار می‌دهد، در ابتدای آلودگی میوه‌ها ریز و رشد درخت متوقف شده و بعد از چند سال درخت آلوده خشک می‌شود. خوشه بندی این شیاریها ممکن است منجر به ایجاد نواحی فرورفته و یا سطحی روی ساقه شود که بدون جدا کردن پوست هم قابل شناسایی است. شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد در برخی موارد علائم به صورت سیستمیک هستند (Welsh & Uyemoto 1980). علائمی از قبیل Top-working و نکروز سلول‌های غربالی آوند آبکش، نکروز در آوندهای چوبی در ژاپن و برزیل دیده شده است (James et al. 2008). خسارت این ویروس در برخی از ارقام سیب و گلابی ممکن است به حدود ۵۰ درصد برسد ( Shim et al. 2004).

آنالیز تبارزایی این ویروس بر اساس مناطق مختلف ژنومی از جمله پروتئین پوششی بر اساس توالی اسید نوکلئیکی و آمینو اسیدی در مناطق مختلف نشان داده است که جدایه‌های ردیابی شده از میزبان‌های مختلف در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند و دارای تشابه نوکلئوتیدی زیادی هستند ( James et al. 1997; Shim et al. 2004; Magome et al. 2008). عدم ارتباط گروه‌بندی جغرافیایی و میزبانی در جدایه‌های ردیابی شده این ویروس از میزبان‌های مختلفی مانند سیب، گلابی و مرکبات در بررسی‌های انجام شده در ردیابی این ویروس از ژاپن گزارش شده است ( Yoshikawa et al. 1993; Magome et al. 1999). RT-PCR بر اساس مناطق مختلف ژنومی این ویروس از

سیب با توجه به ارزش غذایی بالا و صادراتی آن یکی از محصولات مهم باغی در ایران به شمار می‌رود. مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی که درختان سیب را آلوده می‌کنند عبارتند از ویروس موزاییک سیب *Apple mosaic virus*، ویروس لکه سبزرده برگ سیب *Apple chlorotic leaf spot virus*، ویروس ساقه آبله‌ای سیب *Apple stem pitting virus* و ویروس ساقه شیاری سیب *ASGV Apple stem grooving virus* متعلق به جنس *Capillovirus* و خانواده *Betaflexiviridae* است ( Cieślínska et al. 2007). پیکره‌های این ویروس رشته‌ای خمیده است و طول رشته‌ها ۴۷۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر و عرض آنها ۱۳-۱۲ نانومتر است. ژنوم ویروس آرانی تک رشته‌ای (ssRNA) با قطبیت مثبت است که در انتهای ۳' داری انتهای Poly A است ( King et al. 2011). در این ویروس سه چارچوب ژنی از ۵' به ۳' وجود دارد و طول ژنوم آن به اندازه ۶۴۹۵ تا ۶۴۹۷ نوکلئوتید است. چارچوب ژنی شماره ۱ (ORF1) یک پروتئین چند بخشی که اندازه آن ۲۴۱ کیلودالتون است را رمز می‌کند. این پروتئین چندبخشی حاوی موتیف‌های متیل ترانسفراز، هلیکاز و RNA dependent RNA polymerase است که در تکثیر ویروس نقش دارد. چارچوب ژنی دوم (ORF2) که بخش زیادی از آن بصورت همپوشان با چارچوب ژنی اول است، پروتئین حرکتی به اندازه ۳۶ کیلو دالتون را از طریق استراتژی آرانی زیرژنومی رمز می‌کند. چارچوب ژنی سوم (ORF3) به اندازه حدود ۲۷ کیلودالتون در ادامه انتهای کربوکسیلی چارچوب ژنی اول قرار گرفته است که پروتئین پوششی ویروس را احتمالاً از طریق آرانی زیرژنومی تولید می‌کند (Shim et al. 2004). این ویروس دارای ناقل ناشناخته است و انتقال و انتشار در این خانواده ویروسی عمدتاً از طریق پیوند و نشاهای آلوده صورت می‌گیرد (Adams et al. 2004; Chen et al. 2011). روش‌های مختلفی مانند روش‌های سرولوژیکی و مولکولی مانند (RT-PCR) Reverse transcription polymerase chain reaction برای ردیابی و شناسایی این ویروس استفاده شده است که به نظر می‌رسد با توجه به نتایج، ردیابی با استفاده از RT-PCR بر اساس ژن پروتئین پوششی یک روش قابل اعتمادتر است ( Menzel et al. 2003).

ویروس ساقه شیاری سیب اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط Lister et al. (1965) توصیف شد. دامنه میزبانی ویروس‌های این خانواده وسیع است و معمولاً روی میزبان‌های چوبی سیب و همچنین گونه‌های مختلفی از جنس *Citrus sp.* ایجاد بیماری

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

برای تهیه منبع ویروسی، نمونه‌برداری از برخی باغات سیب که علائم توصیف شده ویروس ساقه شیباری سیب (dpvweb.net) را دارا بودند انجام شد. نمونه‌برداری از برگ‌های تازه دارای علائم شامل موزائیک خفیف تا شدید و تغییر شکل برگ و برخی برگ‌های فاقد علائم و پوست جوان درختان دارای علائم از درختان مناطق غربی و جنوب غربی استان زنجان (زنجان، ایچرود، ابهر، خرمدره و ماهنشان) و برخی از مناطق شرقی استان کردستان (شهرستان بیجار) انجام شد (جدول ۱). در مجموع ۷۸ نمونه برگ (۷۰ نمونه برگ دارای علائم و ۸ نمونه برگ بدون علائم) از شاخه‌های دارای علائم و ۹ نمونه از پوست درختان دارای علائم جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌برداری در اواخر بهار و اوایل تابستان و یا اواخر تابستان و اوایل پاییز جمع‌آوری شدند. اطلاعات مربوط به تعداد نمونه‌ها و مناطق نمونه‌برداری و نوع نمونه (برگ یا پوست) در جدول ۱ مشخص شده است.

نمونه‌های مختلف برگ، میوه، گل و پوست درخت توسط محققین انجام شده است (James. 2008; Shim *et al.* 2004; Menzel *et al.* 2003; Halistones *et al.* 2000). ارزیابی آلودگی کولتیوارهای مختلف درختان سیب به ویروس‌های مهم سیب از جمله ویروس ساقه شیباری سیب در منطقه کمال‌شهر استان البرز با الیزا و RT-PCR نشان داد که آلودگی به ASGV در حدود ۱۹ درصد نمونه‌ها محرز شد (Keshavarz & Hajinajar, 2021).

با توجه به اهمیت خسارت بیماری‌های ویروسی در درختان دانه‌دار، شناسایی ویروس‌ها و بررسی تبارزایی آنها از اهمیت بسزایی برخوردار است. اولین مرحله در ارائه یک برنامه مدیریتی صحیح بیماری‌های گیاهی به‌ویژه ویروس‌های آلوده کننده، ردیابی به موقع ویروس در باغات است. در تحقیق حاضر پس از بررسی علائم مربوط به ویروس ساقه شیباری سیب وجود این ویروس با استفاده از آغازگر اختصاصی مبتنی بر ژن پروتئین پوششی این ویروس انجام شد. همچنین آنالیز تبارزایی جدایه‌های مختلف ردیابی شده به منظور گروه‌بندی جدایه‌ها صورت گرفت.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به محل نمونه‌برداری و نتایج ردیابی از مناطق مختلف.

Table 1. Information of collected samples and the result of detection in different regions.

Sequenced	RT-PCR*	Bark	RT-PCR	Leaf Sample	Region
3	4	3	12	23	Zanjan
1	1	-	5	8	Ijrood
-	-	-	3	5	Abhar
-	-	-	2	4	Khoramdareh
2	3	4	10	14	Mahneshan
2	3	2	11	15	Zanjanrood
1	1	-	7	10	Bijar
9	12	9	50	78	Total

آران‌ای برای ادامه کار استفاده شد. به همین منظور، استخراج آران‌ای از حدود ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگ و پوست درخت هر کدام به‌صورت جداگانه، مطابق با دستورالعمل کیت RiboEXTM (کره جنوبی، GeneAll) انجام شد. پس از تعیین کیفیت آران‌ای استخراج شده، برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از آغازگر معکوس و کیت ساخت cDNA (Synthesis Kit Easy™) (cDNA) ساخت شرکت پارس توس ایران در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ویروس ساقه شیباری سیب در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix ساخت شرکت Amliqon، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای

ردیابی ویروس و تکثیر ژن پروتئین پوششی

به منظور ردیابی ویروس ساقه شیباری سیب با استفاده از روش RT-PCR یک جفت آغازگر (جدول ۲) برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی ویروس ساقه شیباری سیب و براساس توالی نوکلئوتیدی جدایه مرجع این ویروس (NC\_001749) با استفاده از نرم افزار Primer Premier 6 (PREMIER Biosoft International) طراحی شد. در طراحی این جفت آغازگر توالی محل اثر آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI* نیز اضافه شد. سپس، بر اساس تنوع علائم، مناطق مختلف و زمان نمونه‌برداری (با توجه به طول زمان نمونه‌برداری) و کیفیت آران‌ای-های استخراج شده از مجموع ۸۷ نمونه از ۵۰ نمونه استخراج

سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۶ °C و بسط ۶۰ ثانیه در ۷۲ °C برای ۳۵ چرخه و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام گردید.

مستقیم و معکوس اختصاصی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه حرارتی پی‌سی‌آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C برای ۲ دقیقه، واسرشت-

جدول ۲. توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس منطبق بر ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب.

Table 2. Sequences of the forward and reverse primers based on ASGV coat protein gene.

Primer name	Sequence of Primers*	Size
ASGV-CPF	5'-TGGGATCCATGAGTTTGGAAAGACG-3'	
ASGV-CPR	5'-CGAATTCCAACCCTCCAGTTCCA-3'	728bp

(Korea) به منظور تعیین توالی همسانه‌های pTG19-ASGV-C از کلون‌های مثبت انجام شد. تعیین توالی همسانه‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی پلاسمید pTG19 توسط شرکت پیشگام انجام شد. علاوه بر تعیین توالی چهار نمونه همسانه‌سازی شده، پنج محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده توسط آغازگر اختصاصی نیز به صورت مستقیم تعیین توالی شدند.

#### آنالیز تبارزایی جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب

پس از تعیین توالی، نتایج توالی‌های نوکلئوتیدی (۹ نمونه مجزا) از همسانه‌ها با اطلاعات و توالی‌های موجود در ژن بانک توسط برنامه BLASTn (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی چارچوب ژنی پروتئین پوششی جدایه‌های تازه ردیابی شده و برخی از جدایه‌های موجود در ژن بانک (جدول ۳) توسط نرم‌افزار MEGA 7 و روش ClustalW انجام شد (Kumar et al. 2015). محاسبه ماتریس فاصله بر اساس مدل Jukes Cantor انجام شد. بعد از هم‌ردیف‌های چندگانه و بررسی و ویرایش آنها، هم‌ردیف شده‌ها (الاینمنت) برای ادامه آنالیزها مورد استفاده قرار گرفتند. تحلیل تبارزایی جدایه‌ها براساس توالی نوکلئوتیدی با استفاده از روش Neighbor-Joining و مدل Tamura-3-parameter توسط نرم‌افزار MEGA 7 با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ انجام گرفت (Kumar et al. 2015). ویروس ای گیلان (Cherry virus A) به عنوان عضو گروه خارجی برای رسم درخت استفاده شد. کلیه شاخه‌ها با ارزش بوت‌استرپ پایین‌تر از ۵۰ درصد از درخت حذف شدند، و نهایتاً درخت تبارزایی جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب بازسازی شد.

همسانه‌سازی قطعات تکثیر شده درون پلاسمید pTG19 محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده مربوط به چهار نمونه که از مناطق مختلف جغرافیایی (زنجان، ایجرود، ماهنشان و بیجار هر کدام یک نمونه) بودند در پلاسمید pTG19 همسانه سازی شد. به این منظور از حامل pTG19 ساخت شرکت Vivantis Malaysia استفاده شد. برای همسانه‌سازی از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد. واکنش اتصال به مدت یک ساعت در انکوباتور در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و سپس به مدت یک شب (۱۰ تا ۱۲ ساعت) در دمای ۱۶ درجه سلسیوس انجام شد. سپس، سه میکرولیتر از محصول این واکنش درون سلول‌های مستعد تهیه شده از باکتری *Escherichia coli* DH5α که به روش Chung et al. (1989)، تهیه شده بودند انتقال و باکتری‌ها روی محیط جامد LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 µg/ml) کشت داده شدند. با استفاده از کلنی‌های رشد کرده، پی‌سی‌آر کلونی به منظور تایید همسانه سازی موفق انجام شد. کلنی‌های باکتری حاوی حامل نوترکیب درون محیط کشت مایع LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 µg/ml) به صورت شبانه کشت شد. استخراج پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت مایع با استفاده از روش لیز قلیایی انجام شد و حضور قطعه در پلاسمید با استفاده از پی‌سی‌آر توسط آغازگرهای اختصاصی ویروس در پلاسمید بررسی شد بطوریکه از پلاسمید استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد. علاوه بر این به منظور تایید درج قطعه در پلاسمید، پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از آنزیم BamHI در واکنش برش قرار گرفتند. پس از تایید پلاسمیدهای حاوی قطعه مورد نظر، استخراج پلاسمید توسط کیت Gene All® Exprep TM Plasmid (GeneAll, South mini, 50p مطابق دستورالعمل شرکت سازنده) انجام شد.

جدول ۳. مشخصات جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب لحاظ شده در آنالیز تبارزایی.

**Table 3.** Characteristics of ASGV isolates included in the phylogenetic analysis.

Isolate	Host	Country	Accession number
MRJ5	Apple	India	MN912566
SPASG	Apple	India	MT678109
-	Apple	India	FM204881
Red Chief	Apple	India	KJ617056
Ki-1	<i>Actinidia deliciosa</i>	India	HG796196
Ki-3	<i>Actinidia deliciosa</i>	India	HG796198
AP-RD1	Apple	India	LN901439
WR-32	Wild Rose	India	LN559087
BAU2	<i>Bauhinia variegata</i>	India	LN559075
HPHF15	Apple	India	LN901436
Ap-GS2	Apple	India	LN901437
AGJP-22	Pear	Japan	HM352772
Hanzhong2	Actinidia	China	MH457057
fx	Apple	China	JX885569
HZ76	<i>Prunus mume</i>	China	KY680265
YT-4-4	Apple	China	KF735124
HN-14	<i>Rosa chinensis</i>	China	KU254601
Pd-21	Pear	China	GQ330294
GJ	<i>Polygonatum kingianum</i>	China	MK592613
-	Apple	South Korea	AF465354
GW4	Apple	South Korea	KR606309
Ys4	Apple	South Korea	KR606311
CS6	Apple	South Korea	KR606316
YS8	Apple	South Korea	KR606313
CS9	Apple	South Korea	KR606319
17	Apple	South Korea	KR606322
CW6	Apple	South Korea	KR606323
P67	Pear	South Korea	JN792492
SJ2018	<i>Pyrus pyrifolia</i>	South Korea	LC487910
CA2018	<i>Pyrus pyrifolia</i>	South Korea	LC487911
GW-JS	<i>Cnidium officinale</i>	South Korea	LC506127
Kp1	Pear	South Korea	MG682506
CO-kr1	<i>Cnidium officinale</i>	South Korea	MW889884
NYJ2018	<i>Pyrus pyrifolia</i>	South Korea	LC487914
-	-	South Korea	AF465354
ASGV_CP:BR:11	Apple	Brazil	MH378808
ASGV_CP:BR:6	Apple	Brazil	MH378810
ASGV_CP:BR:5	Apple	Brazil	MH378809
UV01	Apple	Brazil	AF438409
KS3	Apple	Iran	MK354030
kz	<i>Prunus armeniaca</i>	Iran	MK354031
D3	Apple	Iran	MK354032
NG	<i>Pyrus communis</i>	Iran	MK354033
SS	Apple	Iran	MK354034
SS4	Apple	Iran	MK354035
X4	Apple	Iran	MK354036

برای تعیین پارامترهای جمعیت و تنوع ژنتیکی از برنامه DnaSP (Rozas et al. 2017)، برای ارزیابی اختلاف‌های ژنتیکی تخمین تعداد هاپلوتیپ‌ها (H)، تنوع هاپلوتیپ (Hd)، تعداد محل‌های چند شکلی (S)، تعداد کل جهش‌ها (η)، میانگین تعداد اختلاف‌های نوکلوتیدی (k)، میانگین تنوع نوکلوتیدی دو به دو (μ)، تعداد کل جهش‌های مترادف (SS)، تعداد کل جهش‌های نا مترادف (NS) و نسبت جهش‌های نامترادف به جهش‌های مترادف (ω) ارزیابی شد. برای محاسبه آماره تنوع جمعیت معیارهای مختلفی شامل \*KS، \*KST، \*Snn و FST

رسم الگوریتم نوترکیبی با نرم‌افزار RDP4 برای بررسی نوترکیبی احتمالی بین جدایه‌های ردیابی شده با سایر جدایه‌های موجود در ژن بانک براساس جدول (۳)، از برنامه RDP V4.95 استفاده شد. وقایع و نقاط نوترکیب با استفاده از برنامه RDP4 و مدل‌های مختلفی مانند GENECONV، Chimaera، MaxChi، BOOTSCAN، RDP و SISCAN با تنظیمات پایه‌ای برنامه انجام شد (Simon-Loriere & Holmes 2011; Martin et al. 2015). تعیین پارامترهای جمعیت و تنوع ژنتیکی

بین زیرشاخه‌های درخت تبارزایی و جمعیت‌ها در مناطق مختلف با استفاده از نرم افزار DnaSP انجام شد.

## نتایج و بحث

### نتایج مشاهدات میدانی، علائم

نتایج نشان داد که در برخی از نمونه‌ها (دو نمونه مربوط به زنجان و دو نمونه ماهنشان) علائم بدشکلی و شانکر در تنه درخت قابل مشاهده بود که نتایج RT-PCR تایید کننده حضور ویروس در برگ‌ها بود. علائم متفاوتی در باغ‌های بازدید شده قابل مشاهده بود (شکل ۱) که در ۱۲ نمونه از تعداد ۵۰ نمونه استخراج آران‌ای شده ویروس ساقه شیاری سیب ردیابی شد که ۹ نمونه از ۱۲ نمونه تعیین توالی شدند (جدول ۱). علائم مشخص و واضحی در تنه درختان قابل مشاهده نبود در حالیکه در موارد معدودی در تنه درختانی که ویروس ساقه شیاری سیب ردیابی شد ترشح صمغ از تنه و شاخه قابل مشاهده بود که چنین علائمی در برخی از جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب توسط Shim *et al.* (2004) گزارش شده است. از مجموع نمونه‌های مثبت جمع‌آوری شده هشت نمونه مربوط به مناطق مختلف استان زنجان (سه نمونه شهر زنجان، دو نمونه ایجرود، یک نمونه ابهر و دو نمونه ماهنشان) و یک نمونه مربوط به استان کردستان (شهرستان بیجار) بود (جدول ۱).

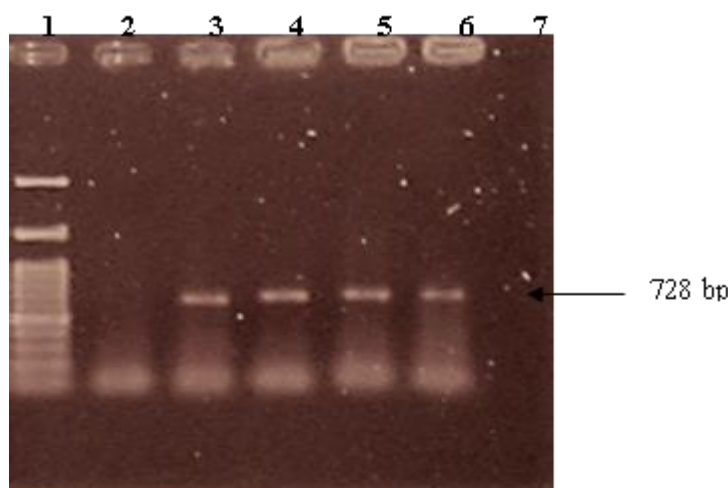
### نتایج ردیابی با آر تی-پی سی آر

نتایج استخراج آران‌ای از ۵۰ نمونه مشکوک و آزمون RT-PCR با جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده برای این ویروس آلودگی به ویروس ساقه شیاری سیب را در ۱۲ نمونه از آنها استخراج شده نشان داد که ۹ نمونه از ۱۲ نمونه تعیین توالی شدند (شکل ۲). جزئیات مربوط به مناطق نمونه برداری و نتایج مربوط به نمونه‌های مثبت از شهرهای مختلف آورده شده است (جدول ۱). انتخاب جدایه‌ها به منظور تعیین توالی و استفاده برای آنالیزهای تبارزایی بر اساس تنوع در مناطق نمونه برداری شده، تنوع در علائم مشاهده شده شامل موزائیک خفیف و شدید و زمان نمونه برداری در اوایل تابستان و اواخر تابستان بوده است. بر همین اساس از بین ۱۲ محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده از مناطق مختلف استان زنجان ۹ نمونه برای تعیین توالی انتخاب شد (جدول ۳). نتایج الکتروفورز محصولات پی‌سی‌آر در ژل آگارز حاکی از تکثیر قطعه‌ای در حدود ۷۲۸ جفت باز مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب بود در حالیکه در نمونه گیاهی سالم این باند تکثیر و مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱. علائم موزائیک، بدشکلی و پیچیدگی برگ در برگ‌های سیب آلوده به ویروس ساقه شیاری سیب.

**Figure 1.** Mosaic, leaf curling and leaf deformation symptoms in ASGV infected samples.



شکل ۲. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر با جفت آغازگرهای اختصاصی ASGV-CPF و ASGV-CPR. ۱. چاهک ۱. مارکر ۱۰۰ bp، چاهک‌های ۲ الی ۶. محصولات پی‌سی‌آر تکثیر یافته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ASGV، چاهک ۲. نمونه فاقد باند اختصاصی تکثیر شده، چاهک ۷. کنترل منفی (نمونه سالم).

**Figure 2.** Electrophoresis of PCR product amplified by specific primers ASGV-CPF, ASGV-CPR. **1.** Ladder 100 bp, Lane **2-6.** PCR-products amplified by ASGV CP specific primers, Lane **2.** Negative samples not-infected Lane **7.** Healthy plant (Negative control).

اطمینان‌ترین روش برای شناسایی این ویروس است که سایر محققین نیز با مقایسه این روش با سایر روش‌های موجود این نتایج را تایید کرده‌اند (Menzel *et al.* 2003; Foissac *et al.* 2005) البته با توجه به تنوع در برخی از جدایه‌ها روش‌های تکمیلی مانند پی‌سی‌آر آشیانه‌ای نیز مورد نیاز است (James 2008).

#### نتایج همسانه‌سازی در پلاسمید *pTG19*

نتایج همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی در پلاسمید حاکی از رشد کلونی‌های سفید در محیط کشت LB حاوی آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین بود. نتایج بررسی کلونی‌های موجود رشد کرده در تشتک با استفاده از کلونی پی‌سی‌آر نشان داد که یک قطعه دی‌ان‌ای با اندازه ۷۲۸ جفت باز تکثیر شد (شکل ۳) که این امر نشان دهنده قرار گرفتن قطعه مورد نظر در پلاسمید بود. علاوه بر این نتایج برش آنزیمی پلاسمیدهای استخراج توسط آنزیم *BamHI* حاکی از قرار گرفتن قطعه در پلاسمید بود. پس از برش سازه *pTGASGVCP* توسط آنزیم *BamHI*، دو قطعه به اندازه‌های ۲۹۰۰ جفت باز مربوط به حامل پلاسمیدی و ۷۲۸ جفت باز مربوط به ژن پروتئین پوششی ASGV مشاهده گردید. علاوه بر این، نتایج تعیین توالی نیز تایید کننده همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی درون پلاسمید بود.

#### نتایج آنالیز تبارزائی

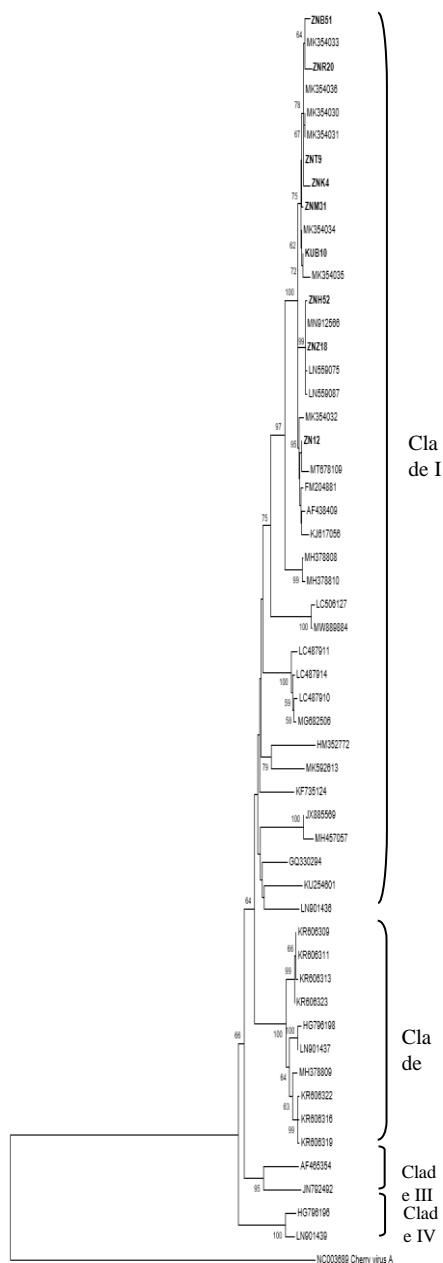
نتایج بلاست توالی‌های به دست آمده و مقایسه آن با توالی‌های موجود در ژن بانک نشان داد که محصولات پی‌سی‌آر تکثیر شده متعلق به ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب است. نتایج بلاست حاکی از شباهت بالای ۹۰ درصدی

نمونه‌هایی که از باغات مختلف سیب جمع‌آوری شده بودند آلودگی ویروسی در مراحل بعدی با روش‌های مولکولی در آنها اثبات شد که دارای علائم متفاوتی بودند، و در هر منطقه بعضی از این علائم غالب بودن که احتمالاً نشان‌دهنده غالب بودن یک واریانت خاص از ویروس ساقه شیاری سیب در آن منطقه است که در این تحقیق بررسی نشد. به عنوان مثال غالب نمونه‌هایی که در زنجان و ماهنشان مشاهده شدند علاوه بر علائم در برگ-ها علائمی در ساقه و تنه درختان نیز قابل مشاهده بود که احتمالاً با علائم ناشی از ویروس ساقه شیاری سیب در ارتباط باشند اما در تحقیق حاضر بررسی پوست برخی از درختان دارای علائم نشان داد که قطعه اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی تکثیر نشد. علائم موزاییک خفیف و تغییر شکل برگ از رایج‌ترین علائم مشاهده شده در مزارع بودند که در منابع نیز از علائم نام برده شده است. علائم در برخی موارد با علائم ناشی از بیماری‌های باکتریایی و قارچی همراه بود که ممکن است باعث تشدید علائم بیماری شود. با توجه به وجود علائم موزاییک و کلروز در برگ نمونه‌های جمع‌آوری شده احتمال وجود آلودگی مخلوط با سایر ویروس‌های رایج سیب از جمله ویروس ساقه آبله‌ای سیب نیز وجود دارد که در تحقیق حاضر این آلودگی مخلوط بررسی نشد اما نتایج محققین نشان داده است (Ito *et al.* 2002; Menzel *et al.* 2002; Menzel *et al.* 2003; Foissac *et al.* 2005) که وجود آلودگی مخلوط با ویروس‌های رایج سیب بر تولید علائم و بروز علائم اثر گذار است.

در این بررسی از روش RT-PCR برای ردیابی ویروس ساقه شیاری سیب استفاده شد. استفاده از RT-PCR منطبق بر ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب رایج‌ترین و قابل

نسبت به سایر زیرشاخه‌ها است که شامل جدایه‌هایی از ایران، هند، کره جنوبی، چین، برزیل و یک جدایه از ژاپن هستند. اغلب این جدایه‌ها از درختان دانه‌دار مانند سیب و گلابی گزارش شده‌اند با این حال سایر ویروس گزارش شده از سایر میزبان‌ها نیز در این زیر شاخه وجود دارد. Clade I شامل زیر شاخه‌های متفاوتی است که با درجه اطمینان بالایی از همدیگر تفکیک شده‌اند.

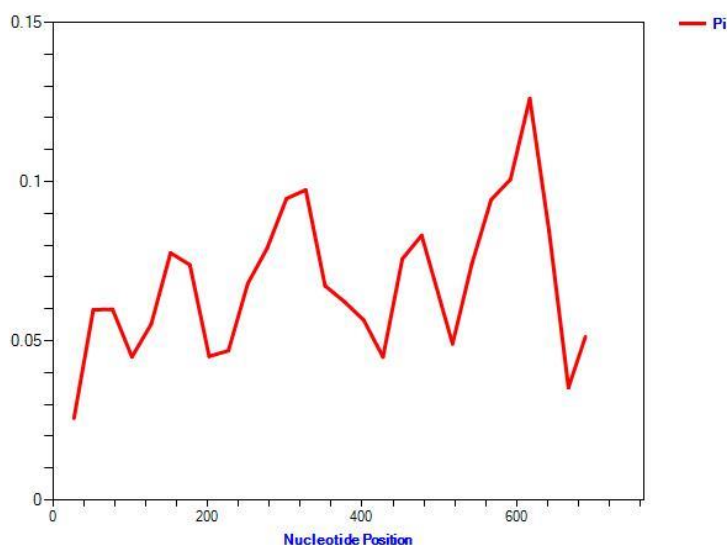
توالی‌های به دست آمده با توالی‌های ژن پروتئین پوششی ASGV بود. نتایج تجزیه تحلیل تبارزایی با استفاده از توالی‌های به دست آمده و ۴۴ جدایه ثبت شده در ژن بانک نشان داد که جدایه‌های تازه ردیابی شده همراه با جدایه‌هایی که قبلاً از ایران گزارش شده‌اند و جدایه‌هایی از هند در یک شاخه قرار می‌گیرند (شکل ۳). با توجه به درخت تبارزایی، جدایه‌ها در چهار گروه اصلی قرار گرفتند شامل Clade I، Clade II، Clade III و Clade IV هستند. Clade I شامل تعداد جدایه‌های بیشتری



شکل ۳. تحلیل تبارزایی جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی، براساس روش Neighbor-Joining که با استفاده از نرم افزار Mega 7 رسم شده است. درجه اطمینان بیش از ۵۰ درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه‌های ایرانی ردیابی شده در تحقیق بصورت پر رنگ مشخص شده‌اند.

**Figure 3.** Phylogenetic analysis of *Apple stem grooving virus* isolates based on nucleic acid sequencing of coat protein gene and Neighbor-Joining method using MEGA7 software. Bootstrap values more than 50 were showed on the branches and new Iranian isolates are shown in bold.





شکل ۴. نتایج بررسی تنوع نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی در جمعیت‌های ویروس ساقه شیاری سیب.  $P_i$  نشان دهنده تنوع نوکلئوتیدی است.

**Fig 4.** The result of polymorphism trend along the coat protein genes in ASGV populations,  $P_i$  stands for nucleotide diversity.

بر اساس نتایج بررسی احتمال نوترکیبی با برنامه RDP4 شواهدی دال بر وقوع نوترکیبی در منطقه ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی به دست نیامد. در بین توالی‌های مورد بررسی تنها یک جدایه با رس شماره MH457057 از کشور چین با سه روش Chimaera، MaxChi و BOOTSCAN با  $P$  value کمتر ۰/۰۵ نوترکیبی نشان دادند.

#### نتایج تنوع ژنتیکی و چند شکلی

نتایج تنوع ژنتیکی و چند شکلی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس ساقه شیاری سیب در جدول ۴ قابل مشاهده است. بیشترین مقادیر در هر کدام از پارامترها به صورت پررنگ نمایش داده شده است. بیشترین نسبت جهش‌ها غیرهمنام به جهش‌های همنام مربوط به جدایه‌های چینی هستند. این نسبت در جدایه‌های ایرانی ۰/۰۵۴ است. همچنین بیشترین تنوع نوکلئوتیدی نیز مربوط به جدایه‌ها از چین هستند و کمترین تنوع نوکلئوتیدی نیز مربوط به جدایه‌های ایرانی هستند. علاوه بر این کمترین و بیشترین  $\pi$  نیز به ترتیب مربوطه به جدایه‌های ایرانی و چینی هستند. در آنالیز مولفه‌های جمعیت تعداد هاپلوتایپ‌ها (H)، تنوع هاپلوتایپ (Hd)، تعداد محل‌های چند شکلی (S)، تعداد کل جهش‌ها ( $\eta$ )، میانگین تعداد اختلاف‌های نوکلئوتیدی (k)، میانگین تنوع نوکلئوتیدی دو به دو ( $\mu$ )، تعداد کل جهش‌های همنام (SS)، تعداد کل جهش‌های غیر همنام (NS) و نسبت جهش‌های غیر

نتایج قرار گرفتن جدایه‌ها در این زیرشاخه‌ها حاکی است که ارتباط بین مناطق جغرافیایی و میزبان وجود ندارد، هر چند که همه جدایه‌های جدید ایرانی و سایر جدایه‌هایی گزارش شده از ایران در زیرشاخه‌های متفاوت Clade I قرار گرفتند. Clade II شامل عمده جدایه‌هایی از کره جنوبی است هر چند که جدایه‌هایی از چین، هند و برزیل نیز در این شاخه قرار دارند. دو Clade III و IV نیز فراوانی کمتری نسبت به سایر شاخه‌ها دارند بطوریکه Clade III شامل دو جدایه از کره جنوبی و Clade IV نیز دو جدایه از هند را شامل می‌شوند. با توجه به نتایج به دست آمده از شباهت ژنتیکی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های استفاده شده در زیرهم چینی بین ۸۸ تا حدود ۱۰۰ درصد بود که بیشترین شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه‌های ایرانی و در حدود ۹۹ تا ۹۹/۹۵ درصد بود. استفاده از آغازگرهای منطبق بر ژن پروتئین پوششی ASGV، امکان تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی را فراهم می‌کند. جدایه‌های ردیابی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ASGV پس از تعیین توالی و آنالیز تبارزایی با توجه به درخت تبارزایی در خوشه‌ای همراه با جدایه‌هایی از ایران، هند و چین قرار گرفتند. همانطور که نتایج تبارزایی نشان داد جدایه‌ها از مناطق مختلف و میزبان‌های مختلف در شاخه‌های متفاوت قرار گرفتند که حاکی از عدم ارتباط جغرافیایی و میزبانی در جدایه‌های ASGV منطبق بر ژن پروتئین پوششی ویروس است (Jame 2008; Menzel et al. 2002).

هم‌نام به جهش‌های هم‌نام ( $\omega$ ) ارزیابی شد که نتایج در جدول (۴) قابل مشاهده است. در گروه بندی جدایه‌ها بر اساس مناطق جغرافیایی، در جدایه‌های ایرانی نسبت  $dN/ds$  کوچکتر از یک (۰/۰۵۴) است.

جدول ۴. داده‌های مربوط به پارامترهای جمعیتی در جمعیت‌های مختلف ویروس ساقه شیاری سیب مبتنی بر ژن پروتئین پوششی.

**Table 4.** Data on population parameters of different ASGV populations based on the coat protein gene.

Country	N	H	Hd	S	$\eta$	K	$\pi$	SS	NS	dS	dN	$\omega$
South Korea	15	15	1.000	138	153	46.610	0.06697	153.81	539.19	0.24248	0.01670	0.068
Iran	17	11	0.941	68	69	11.088	0.01553	161.48	549.52	0.05819	0.00315	0.054
China	6	6	1.000	116	130	53.800	0.07556	159.14	548.86	0.26712	0.02053	0.076
Brazil	4	4	1.000	78	79	41.167	0.05766	161.33	549.67	0.21673	0.01150	0.053
India	11	11	1.000	140	152	51.000	0.07143	160.42	550.58	0.27419	0.01293	0.047

جدول ۵. تخمین افتراق ژنتیکی برای جمعیت‌های مختلف بر اساس ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب.

**Table 5.** Genetic differentiation estimates for geographical populations of ASGV CP.

Population	$^aK_S^*$	$^aK_{ST}^*$	$K_S^*, K_{ST}^* p$ value	$^aZ^*$	$P$ value	Snn	$P$ value	$^bF_{ST}$
Iran (n=17)/Brazil(n=4)	2.03867	0.14288	0.0000 ***	4.13203	0.0000 ***	0.8857	0.0000 ***	0.232
Iran (n=17)/ South Korea(n=15)	2.62602	0.21338	0.0000 ***	4.75779	0.0000 ***	0.9687	0.0000 ***	0.499
Iran (n=17)/ China(n=6)	2.29550	0.19999	0.0000 ***	4.24765	0.0000 ***	0.9130	0.0010 **	0.449
Iran (n=17)/ India(n=11)	2.50369	0.10051	0.0000 ***	4.68772	0.0010 **	0.7261	0.0170 *	0.189
India (n=11)/Brazil(n=4)	3.53222	0.01600	0.1680 ns	3.61655	0.1460 ns	0.7333	0.1760 ns	0.021
India (n=11)/ South Korea(n=15)	3.52206	0.06488	0.0010 **	4.58839	0.0060 **	1.0000	0.0000 ***	0.167
India (n=11)/ China(n=15)	3.67781	0.05524	0.0090 **	3.72934	0.0120 *	0.8235	0.0220 *	0.175
South Korea (n=15)/Brazil(n=4)	3.48526	0.04959	0.0070 **	4.08257	0.1090 ns	0.9473	0.0030 **	0.193
South Korea (n=15)/China(n=11)	3.59220	0.04416	0.0120 *	4.24011	0.0330 *	0.8571	0.0060 **	0.131
China (n=11)/Brazil(n=4)	3.73008	0.01456	0.3060 ns	2.79702	0.3260 ns	0.7500	0.0930 ns	0.106

کمترین تنوع نوکلئوتیدی مربوط به جدایه‌های ایرانی بودند که این امر احتمالاً به دلیل وسعت کم جغرافیایی منطقه مورد مطالعه و همچنین میزبان‌های یکسان هستند. زیرا همه جدایه‌های جدید و قدیم ایرانی از یک میزبان مشترک جداسازی شده‌اند درحالی‌که جدایه‌های هندی و چینی و کره جنوبی از میزبان‌های مختلف گزارش شده‌اند. علاوه بر این نسبت کمتر از یک جهش‌های غیرهمنام به همنام نشان‌دهنده انتخاب طبیعی منفی بین جدایه‌های ایرانی است که این امر سبب تنوع کمتر بین جدایه‌ها نیز شده است. انتخاب منفی در بین جمعیت ایران حاکی از تثبیت تنوع در بین جدایه‌های ایرانی

نتایج آنالیز مربوط به جریان ژنی بین جمعیت‌های مختلف و تفاوت ژنتیکی در جدول ۵ قابل مشاهده است. بیشترین جریان ژنی بین جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های کره جنوبی و چین است. کمترین جریان ژنی بین جدایه‌هایی از هند و برزیل بودند (جدول ۵). نتایج بررسی محل تنوع نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی نشان داد که تنوع نوکلئوتیدی در کل ژن پروتئین پوششی پراکنده است و می‌توان گفت بیشترین تنوع نوکلئوتیدی در قسمت انتهای ۳' ژن پروتئین پوششی است (شکل ۴).

های مولکولی حاکی از ردیابی جدایه‌های مختلف این ویروس از مناطق استان زنجان و شهرستان بیجار استان کردستان بود. تنوع کم نوکلئوتیدی بین جدایه‌های ایرانی احتمالاً به دلیل وسعت کم منطقه مورد مطالعه و عدم تنوع میزبانی است.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از معانت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان تقدیر و تشکر می‌گردد

است و این امر احتمالاً به دلیل وسعت کم و حدود منطقه نمونه‌برداری است. به همین دلیل توصیه بر این است برای بررسی جامع‌تر مولفه‌های جمعیتی از منطقه وسیع‌تری بررسی انجام شود.

باغات سیب و دانه‌دار به عنوان یکی از محصولات مهم و استراتژیک باغی در مناطق مختلف ایران از جمله مناطق غربی هستند که پتانسیل بالایی برای صادرات دارد با این وجود بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های ویروسی یکی از عوامل محدود کننده این محصولات هستند. در تحقیق حاضر بررسی-

protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* 160: 29-37.

Hailstones DL, Bryant KL, Broadbent P, Zhou C, 2000. Detection of Citrus tatter leaf virus with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Australasian Plant Pathology* 29: 240-248.

Hull R, 2013. Plant virology, *Academic press*.

James D. 2008. *Apple stem grooving virus. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses, Horticultural Crops. Texas* 2: 37-53.

Keshavarz T, Hajinajar H, 2021. Evaluation of apple cultivars to four pome fruit viruses in Iranian National Collection of Kamalshahr Horticulture Research Station, Karaj. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54: 918-932.

King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, 2011. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, USA. 1327 pp.

Kumari S, Makkouk K, Katul L, Vetten H, 2001. Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of Faba bean necrotic yellows virus. *Journal of Phytopathology* 149: 543-550.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Lima JAA, Nascimento AKQ, Radaelli P, Purcifull DE, 2012. Serology applied to plant virology. *Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka, Croatia: InTech* 1: 71-94.

Ling K-S, Zhu H-Y, Jiang Z-Y, Gonsalves D, 2000. Effective application of DAS-ELISA for detection of grapevine leafroll associated closterovirus-3 using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein.

### References

Adams M, Antoniw J, Bar-Joseph M, Brunt A, Candresse T, *et al.*, 2004. Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-1060.

Amiri Sadeghan A, Shams-Bakhsh M, Yakhchali B, 2013. Expression of Citrus tristeza virus coat protein gene in *Escherichia coli*. *Journal of Crop Protection* 2: 387-393.

Barbieri MR, Carvalho MGd, Zambolim EM, Zerbini FM, 2004. Expression in *Escherichia coli* of the capsid protein of *Watermelon mosaic virus* and production of specific antiserum. *Fitopatologia Brasileira* 29: 215-219.

Chen J, Xiong J, Yang J, Mao Z, Chen X, 2011. Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae. *Archives of Virology* 156: 523-528.

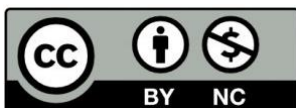
Chung C, Niemela SL, Miller RH, 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 2172-2175.

Cieślińska M, Borisova A, Komorowska B, 2007. Some molecular properties of several isolates of Apple chlorotic leaf spot virus from Bulgaria. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 125-131.

Fajardo TV, Barros DR, Nickel O, Kuhn GB, Zerbini FM, 2007. Expression of Grapevine leafroll-associated virus 3 coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. *Fitopatologia Brasileira* 32: 496-500.

Gulati-Sakhuja A, Sears JL, Nunez A, Liu H-Y, 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat

- European Journal of Plant Pathology* 106: 301–309.
- Lister RM, Bancroft JB, Nadakavukaren MJ, 1965. Some sap-transmissible viruses from apple. *Phytopathology* 55: 859–870.
- Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Miyakawa T, 1997. Molecular variability of the genomes of Capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* 87: 389–396.
- Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, 1999. Single-strand conformation polymorphism analysis of apple stem grooving capillovirus sequence variants. *Phytopathology* 89: 136–140.
- Menzel W, Jelkmann W, Maiss E, 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81–92.
- Menzel W, Zahn V, Maiss E, 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *Journal of Virological Methods* 110: 153–157.
- Mutasa-Gottgens E, Chwarszczynska D, Halsey K, Asher M, 2000. Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite *Polymyxa-a* targeted recombinant DNA approach. *Plant Pathology* 49: 276–287.
- Nickel O, Targon ML, Fajardo TV, Machado MA, Trivilin AP, 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29: 558–562.
- Rana T, Chandel V, Hallan V, Zaidi AA, 2011. Expression of recombinant *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein in heterologous system: production and use in immunodiagnosis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 138–141.
- Rozas J, 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. In: Posada D 204 (editor), *Bioinformatics for DNA sequence analysis; methods in molecular biology series*. Humana 205 Press, NJ, USA, pp. 337–355.
- Shim H, Min Y, Hong S, Kwon M, Kim D, *et al.*, 2004. Nucleotide sequences of a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecules & Cells* 18: 192–199.
- Sutton TB, Aldwinckle HS, Agnello AM, Walgenbach JF, 2014. Compendium of apple and pear diseases and pests, *American Phytopathological Society*.
- Tatineni S, Sarath G, Seifers D, French R, 2013. Immunodetection of *Triticum mosaic virus* by DAS-and DAC-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in *Escherichia coli*: potential for high-throughput diagnostic methods. *Journal of Virological Methods* 189: 196–203.
- Welsh M, Uyemoto J, 1980. Differentiation of syndromes caused in apple by graft-transmissible, xylem-affecting agents. *Phytopathology* 70: 349–352.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)