گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۰)، ۶(۲): ۸۵-۹۴
مقاله پژوهشی
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85

اولین گزارش رخداد ویروس شکست رنگ گل شمعدانی (PFBV) از ایران و تعیین برخی ویژگی‌های مولکولی آن

شیدا بابایی[۱]، مریم کریمی[۲]، حسین بیات*[۲]

۱. مؤسسه آموزش عالی غیر انتفاعی مهرگان، محلات

۲. پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات

bayat_new@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱۶، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۶/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۶

چکیده

شمعدانی (*Pelargonium* spp.) از جایگاه مهمی در صنعت گل و گیاه جهان برخوردار بوده و یکی از محبوب‌ترین گیاهان برای استفاده داخل و خارج از خانه است. بیماری‌های ویروسی نقش مهمی در کاهش کمی و کیفی این گیاه زینتی دارند. در این بررسی ۷۲ نمونه مشکوک به آلودگی ویروسی با نشانه‌هایی مانند لکه‌های روشن حلقوی، سوخته و زرد روی برگ و شکستگی رنگ گلبرگ و همچنین گیاهان بدون نشانه از گلخانه‌های مختلف منطقه محلات و ورامین جمع‌آوری شدند. RNA نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج و در آزمون RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از آغازگرهای عمومی تیره *Tombusviridae*، یک قطعه DNA با اندازه ۵۰۰ جفت باز (bp) از ۲۱ نمونه تکثیر شد. با تعیین توالی قطعه یادشده در دو جدایه ویروس و مقایسه با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های GenBank، وابستگی جدایه‌های یادشده به گونه Pelargonium flower break virus (PFBV) یا ویروس شکست رنگ شمعدانی آشکار شد. دوباره آزمون RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی Ch1/Ch2 تکثیر کننده قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ bp از قسمت انتهای '3 ژنوم PFBV شامل ژن پروتئین پوششی (coat protein, CP) روی نمونه‌های مورد بررسی انجام گرفت که درستی نتایج مرحله قبل را تایید کرد. قطعه تکثیر شده سه جدایه برگزیده، از ژل استخراج و به‌طورمستقیم تعیین توالی شدند. واکاوی فیلوژنتیک براساس توالی آمینواسیدی ژن CP جدایه‌های برگزیده انجام شد و درختواره فیلوژنی با استفاده از روش neighbor joining رسم گردید. نتایج بررسی‌های تبارزایی نشان داد که جدایه های PFBV گزارش شده از کشورهای مختلف در دو گروه قرار می‌گیرند و سه جدایه PFBV ایران در یک زیر گروه و جدا از زیر گروه‌های کشورهای دیگر قرار گرفتند. این نخستین گزارش از وجود PFBV از ایران می باشد.

واژه‌های کلیدی: تیره Tombusviridae، شمعدانی، شناسایی، گیاهان زینتی، ویروس.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

مقدمه

شمعدانی[1]ها از جمله گیاهان پرطرفدار و محبوبی هستند که به عنوان گیاهان گلدانی، باغچه‌ای، سبدهای آویز و نیز مصارف دارویی کاربرد دارند. این گیاهان در تجارت بین‌المللی گیاهان باغچه‌ای رتبه دوم را دارا می‌باشند. گوناگونی این گیاهان در اندازه، رنگ برگ و گل، عادت رشد و نوع گلدهی سبب شده که برای بسیاری از طراحی‌های فضای سبز سازگار و مناسب باشند (Khandan Mirkouhi *et al*., 2014).

ارقام مختلف شمعدانی بیشتر از راه رویشی تکثیر می‌شوند و بنابراین اغلب توسط ویروس‌ها آلوده می‌شوند، که با رشد، گلدهی و در نتیجه وضعیت فیزیولوژیکی گیاه در تعامل‌اند. بنابراین با تکثیر گیاهان فوق با استفاده از روش کشت بافت کنترل واسنجه‌های محیطی در یک محفظه رشد آسان‌تر از گلخانه است و بارها و بارها گیاهان و ریزنمونه‌ها را در وضعیت فیزیولوژیک به‌طورکامل مشابهی خواهیم داشت (Dorion *et al*., 2010).

بیماری‌های ویروسی در شمعدانی بسیار مرسوم بوده و گیاهان ممکن است همزمان به چند ویروس آلوده باشند. نشانه‌های بیماری در گیاهان جوان شدت بیشتری داشته و بیشتر در فصل زمستان و آغاز بهار پدیدار می‌شوند. تا کنون افزون بر ۲۵ گونه ویروس از تیره‌های مختلف ویروسی از روی شمعدانی گزارش شده‌اند (Rosa & Moorman, 2018). Arabis mosaic virus (ArMV)، Tobacco ringspot virus (TRSV) و Tomato ringspot virus (ToRSV) از مهم‌ترین ویروس‌های شمعدانی در جنس *Nepovirus* هستند. این ویروس‌ها تا کنون از کشورهای ایالات متحده امریکا، چین، استرالیا و برخی کشورهای اروپایی گزارش شده‌اند (Rosa & Moorman, 2018). گزارش شده است که آلودگی گیاهان شمعدانی به این ویروس‌ها سبب کاهش قدرت گیاه چند ماه پس از آلودگی، کاهش اندازه برگ‌ها، کاهش عملکرد قلمه‌ها به مقدار ۱۳-۴۰٪، کاهش وزن تر قلمه‌ها به میزان ۳۳-۴۸٪ و کاهش تعداد قلمه‌ها در حدود ۲۰٪ شد. این ویروس‌ها همچنین باعث کاهش تعداد گلچه‌های گیاهان آلوده به میزان ۱۷-۴۰٪ شدند (Albouy *et al*., 1992).

بیماری‌های ناشی از ویروس‌های خانواده *Tombusviridae* در شمعدانی از اهمیت بیشتری برخوردارند. Tomato bushy stunt virus (TBSV)، Tobacco necrosis virus (TNV)، Morracan pepper virus (MPV)، Eggplant mottled crinkle virus (EMCV) و Pelargonium leaf curl virus (PLCV) از مهم‌ترین ویروس‌های شمعدانی در جنس *Tombusvirus* هستند که در کشورهای اروپایی، آمریکای شمالی و کشورهای حوضه مدیترانه شیوع دارند (Rosa & Moorman, 2018).

ویروس‌های جنس *Pelarspovirus* که بعنوان یک جنس جدید در خانواده *Tombusviridae* پیشنهاد شده است شامل Pelargonium chlorotic ring pattern virus (PCRPV)، Pelargonium line pattern virus (PLPV) و Pelargonium ringspot virus (PRSV) هستند (Scheets *et al*., 2015).

جنس *Alphacarmovirus* شامل گونه بسیار مهم Pelargonium flower break virus (PFBV) است. این ویروس دارای گسترش جهانی است و در بیشتر مناطق پرورش شمعدانی در اروپا به‌ویژه هلند از سالیان پیش حضور داشته است (Albouy *et al*., 1992; Bouwen & Maat, 1992). این ویروس افزون بر هلند، از سایر کشورهای اروپایی، اسراییل، کنیا و

۱- *Pelargonium* spp.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

چین نیز گزارش شده است (Rico *et al*., 2006 ; Wei *et al*., 2015; Franck & Loebenstein, 1992). نشانه‌های ویروس به صورت شکستگی رنگ گلبرگ در ارقام مختلف گونه *Pelargonium domesticatum* بروز پیدا می‌کند. اما بیشتر روی دو گونه *P. zonale* و *P. peltatum* بدون نشانه می‌باشد. با این حال در همین گونه‌ها هم ممکن است نشانه‌هایی مانند شکستگی رنگ گلبرگ، کوتولگی گیاه و لکه‌های زردی روی برگ‌ها بروز دهد (Rosa & Moorman, 2018). گزارش شده است که ویروس به روش مکانیکی و همچنین از راه آب آبیاری در سامانه‌های آبکشتی منتقل می‌شود (Stone & Holling, 1973; Kusiak *et al*., 1995; Albouy *et al*., 1992). ویروس قادر است به‌وسیله تریپس از راه حمل دانه‌های گرده آلوده به ویروس منتقل شود اما این انتقال به صورت مکانیکی صورت می‌گیرد نه زیستی (Kusiak *et al*., 1995). ویروس‌های MPV، EMCV و Cucumber mosaic virus (CMV) از ویروس‌هایی هستند که از ایران روی گیاه شمعدانی گزارش شده‌اند (Rasoulpour & Izadpanah, 2008; Rasoulpour & Izadpanah, 2011; Saidi & Safaeizadeh, 2011).

در این بررسی، برای نخستین بار در ایران، PFBV با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با ترانویسی وارونه (RT-PCR) [1] و با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفت و توالی ژن پروتیین پوششی [2] برخی جدایه‌های منتخب تعیین شدند.

مواد و روش ها

جمع آوری مواد گیاهی

در ابتدا بوته‌های گل شمعدانی با نشانه‌های مشکوک به آلودگی ویروسی از گلخانه‌های مختلف در سطح شهرستان‌های محلات و ورامین جمع‌آوری شدند و در گلخانه پژوهشی پژوهشکده گل و گیاهان زینتی با شرایط لازم و تغذیه و آبیاری مناسب نگهداری شدند. همچنین به صورت تصادفی تعدادی از گلدان‌های شمعدانی که بدون نشانه بودند نیز به منظور بررسی احتمال آلودگی به ویروس از گلخانه‌ها جمع آوری شدند. در جمع ۷۲ نمونه از گلخانه‌های مختلف جمع آوری شدند.

استخراج آر ان ا[3] کل

برای بررسی آلودگی‌های احتمالی ویروسی در نمونه‌های شمعدانی جمع‌آوری شده از گلخانه‌های محلات و ورامین اقدام به استخراج آر ان ا کل (Masoomi-Aladizgeh *et al*., 2016) از این نمونه‌ها شد. به صورت خلاصه ۰/۱۵ گرم بافت گیاهی مورد نظر با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد و به تیوپ های استریل ۲ میلی‌لیتری اضافه شد. یک میلی‌لیتر از بافر دست ساز استخراج به آن اضافه شد. آمیخته حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۶۰۰ ماکرولیتر محلول ایزوآمیل الکل /کلروفرم (۲۴/۱) به آن افزوده شد و پس از همگن سازی با تکاندن به مدت ۲۰ ثانیه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری RNase-DNase Free منتقل شد و پس از افزودن ایزوپروپانول سرد به مقدار هم حجم رونشین در همان شرایط پیشین سانتریفوژ شد. پس از حذف رونشین پلیت باقی مانده در ته تیوپ با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از حذف الکل و خشک شدن در دمای اتاق، ۳۰

۱- Reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) ۲- Coat protein ۳- RNA

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

میکرولیتر آب DEPC-treated به آن افزوده شد و پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق به فریزر ۲۰- منتقل شد. ارزیابی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Specgene, Jenway, UK) انجام شد.

آزمون RT-PCR

آزمون ترانویسی وارونه با استفاده از کیت 2X HyperscriptTM RT master mix (GeneAll, South Korea) و یا کیت Easy cDNA Synthesis Kit (شرکت پارس توس بیوتکنولوژی، ایران) انجام شد. در هر دو روش، مقدار ۱ µg از آر ان ا کل استخراج شده نمونه‌های گیاه شمعدانی به همراه ۰/۵ میکرومولار آغازگر تصادفی شش‌تایی و یا یکی از آغازگرهای پس‌سوی ذکر شده در جدول ۱ آمیخته شد و طبق دستورالعمل شرکت سازنده برای ساخت رشته دی ان ای مکمل (cDNA) استفاده شد. واکنش در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر(iCycler, Bio-Rad, USA) انجام شد. واکنش پی سی آر با استفاده از آمیخته آماده Red Master Mix (شرکت Amplicon، دانمارک) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر یاد شده انجام شد. به این منظور ۱/۵ میکرولیتر از cDNA تهیه شده در مرحله قبل به همراه ۱ میلی‌مولار از هر جفت آغازگر ذکر شده در جدول ۱ با هفت میکرولیتر از Master mix مخلوط شده و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر استریل به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد.

جفت آغازگرهای عمومی تیره *Tombusviridae* (Morozov *et al*., 1995) تکثیر کننده قطعه ۵۰۰ جفت بازی حاوی قمستی از ژن RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) و جفت آغازگرهای اختصاصی گونه PFBV (Rico & (Hernández, 2004) تکثیر کننده قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی انتهای '3 ژنوم ویروس مذکور در بردارنده توالی کامل ژن پروتیین پوششی ویروس برای این منظور مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). از RNA استخراج شده از گیاهان شمعدانی گواهی شده حاصل از کشت نوک مریستم به عنوان شاهد منفی در آزمون RT-PCR استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RT-PCR.

Table 1. Characters of used primers in RT-PCR tests.

تیره و گونه ویروس Virus species and family	اسم آغازگر Primer name	توالی Sequence	دمای اتصال (درجه سلسیوس) Annealing temp. (ºC)	منبع Reference
Tombusviridae	CarmoII F*/Carm VI R**	R:AARGTVGACCCGWVCCNMGNGTNATHCAACC F:GMMCTGCAGNACRCARTCRTCNCCRTTRTT	50	(Morozov *et al*., 1995)
PFBV	CH1/CH2	F:ATGGTGGTAATGGGGGGTTCTTGGGTTG R:TTCCCGGGGGGTTGTTTGTTTGTTAG	62	(Rico *et al*., 2004)

*F: (Forward) پیش سو **R: (Reveres) پس سو

تعیین توالی

محصول‌های پی سی آر به دست آمده با استفاده از آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ پس از برش از ژل آگارز یک درصد با استفاده از کیت GF-1 Gel DNA Recovery (سینا کلون، ایران) خالص سازی شدند. قطعه‌های خالص شده به‌طورمستقیم برای تعیین توالی به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی ایران فرستاده شدند.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

واکاوی توالی‌های به دست آمده

ترادف‌های به دست آمده با استفاده از برنامه BLAST با توالی‌های قابل دسترس در GenBank (جدول ۲) مقایسه شدند. مجموعه نرم افزاری DNASTAR 5 (DNAStar Inc., Madison, WI, USA) برای ترجمه ترادف‌های نوکلئوتیدی به توالی‌های آمینواسیدی همانند مورد استفاده قرار گرفت. انجام همردیف سازی چندگانه ترادف‌های نوکلیوتیدی و آمینواسیدی حاصل با سایر ترادف‌های موجود در GenBank با برنامه Clustal W انجام شد و درختواره فیلوژنتیکی مورد نظر با استفاده از روش neighbor joining با اعتبارسنجی bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار در نرم افزار MEGA X (Kumar *et al*., 2018) رسم شد.

جدول ۲- ویژگی‌های جدایه های PFBV استفاده شده برای واکاوی فیلوژنتیک.

Figure 2. Characteristics of PFBV isolates used in phylogenetic analysis.

کشور **Country**	میزبان **Host**	شماره دسترسی **Access number**	سال **Year**
Germany	*P. zonale*	DQ443020	2004
Germany	*P. zonale*	DQ443021	2004
Germany	*P. zonale*	DQ443022	2004
Germany	*P. zonale*	DQ443023	2004
Germany	*P. zonale*	DQ443024	1990
Germany	*P. zonale*	DQ443025	1990
Spain	*P. zonale*	DQ443011	2000
Spain	*P. zonale*	DQ443012	2000
Spain	*P. zonale*	DQ443014	2001
Spain	*P. zonale*	DQ443015	2001
Spain	*P. zonale*	DQ443016	2001
Spain	*P. zonale*	DQ443017	2001
Spain	*P. zonale*	DQ443018	2002
Spain	*P. zonale*	DQ443019	2002
Spain	*P. zonale*	DQ256073	2002
Spain	*P. zonale*	AJ514833	2000
Czech Republic	*P. zonale*	DQ443028	2002
Czech Republic	*P. zonale*	DQ443029	2002
China	*Pelargonium* spp.	KM884876	2015
China	*Pelargonium* spp.	KM884877	2015
China	*Pelargonium* spp.	KM884878	2015
Kenya	*P. zonale*	DQ443032	2004
Kenya	*P. zonale*	DQ443033	2004
Kenya	*P. zonale*	DQ443036	2004
Kenya	*P. zonale*	DQ443037	2004
Kenya	*P. zonale*	DQ443038	2004
Kenya	*P. zonale*	DQ443039	2004
The Netherlands	*P. zonale*	DQ443026	1990
The Netherlands	*P. zonale*	DQ443027	1990

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]

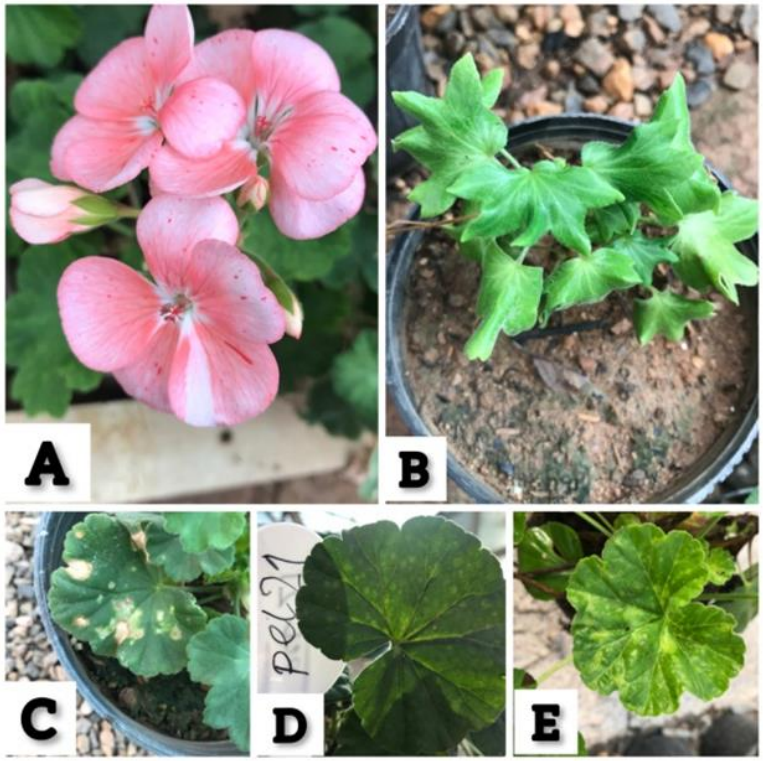
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

نتایج و بحث

بررسی مواد گیاهی

نشانه‌هایی مانند لکه‌های حلقوی سبزرد و بافت مرده، نقوش حلقوی، لکه‌های سبزرد بیضوی و لکه‌های حلقوی زرد روی سطح برگ، شکست رنگ در گلبرگ‌ها و وجود نقطه‌های رنگی در گیاهان شمعدانی جمع آوری شده از مناطق مختلف نمونه‌برداری مشاهده شد (شکل ۱). همچنین برخی از نمونه‌های دارای نشانه‌های مشخص ویروسی با هیچکدام از آغازگرهای مورد استفاده قطعه مورد انتظار را تشکیل ندادند. این موضوع نشان می‌دهد که ممکن است سایر ویروس‌ها از تیره‌ها یا جنس‌های دیگر ویروسی در منطقه محلات حضور داشته باشند که در مطالعه ما مورد بررسی قرار نگرفتند. از جمله ویروس‌هایی از تیره *Potyviridae* و جنس *Nepovirus* که از سایر مناطق ایران (Rasoulpour & Izadpanah, 2008; Rasoulpour & Izadpanah, 2011) و دنیا (Rosa & Moorman, 2018) روی شمعدانی گزارش شده‌اند.



شکل ۱ - نشانه های مشاهده شده روی گیاهان شمعدانی جمع آوری شده از گلخانه ها: ایجاد شکست رنگ و نقطه های رنگی روی گلبرگ‌های شمعدانی (A)، بد شکلی برگ های شمعدانی (B)، لکه های کلروز و رنگ پریده روی برگ های شمعدانی (C, D, E).

Figure 1. Symptoms observed on geranium plants collected from the greenhouse. Color breaking and color dots on geranium petals (A); leaf malformation (B); Chlorotic spots and leaf mottling (C, D, E).

آزمون RT-PCR با آغازگر عمومی تیره Tombusviridae

در ۲۱ نمونه از ۷۲ نمونه مورد بررسی در واکنش RT-PCR، قطعه مورد انتظار (۵۰۰ bp) با آغازگرهای عمومی مربوط به تیره *Tombusviridae* تکثیر شد (شکل ۲). افزون بر قطعه یادشده برخی از قطعه‌های غیر اختصاصی با اندازه‌های بزرگ‌تر هم

تکثیر شد که به نظر می‌رسد مرتبط با ماهیت آغازگرهای عمومی باشد (Morozov *et al*., 1995) (شکل ۲). استفاده از آغازگرهای عمومی تیره *Tombosvridae* روی گیاهان محک آلوده به ویروس‌های اعضای این تیره تایید شده بود (Morozov *et al*., 1995) اما استفاده از این آغازگرها برای تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از نمونه‌های آر ان ا شمعدانی برای اولین بار در این بررسی انجام گرفت.

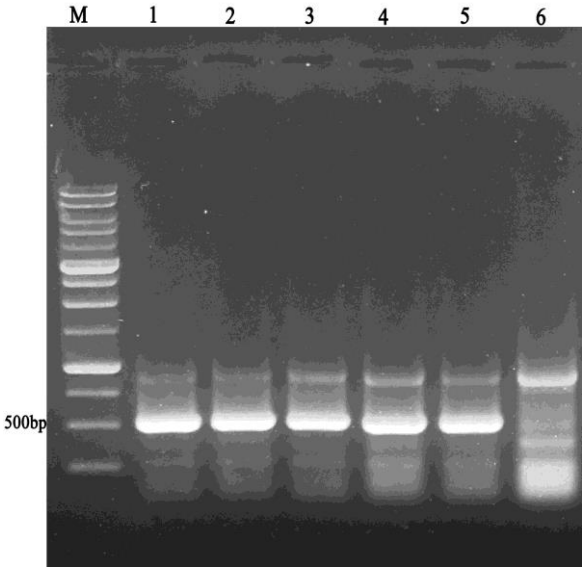
تعیین توالی قطعات تکثیر شده با آغازگرهای عمومی *Tombusviridae*

آنالیز BLASTn روی توالی به دست آمده از قطعه تکثیر شده bp ۵۰۰ با استفاده از جفت آغازگر عمومی *Tombusviridae* مربوط به دو جدایه شمعدانی (P6 و P19) نشان داد که قطعه مورد نظر مربوط به ژن RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) این دو جدایه می باشد که ۹۷-۹۵٪ شباهت در سطح نوکلئوتیدی با توالی‌های ناحیه مشابه جدایه‌های مختلف گونه Pelargonium flower break virus موجود در GenBank داشتند. به این ترتیب، وابستگی جدایه‌های یادشده به گونه PFBV مورد تایید قرار گرفت. این نخستین بار است که این ویروس از ایران گزارش می‌شود. پیش از این، برخی دیگر از ویروس‌های اعضای تیره *Tombusviridae* از روی شمعدانی گزارش شده بودند (Rasoulpour & Izadpanah, 2011). ویروس‌های اعضای تیره *Tombusviridae* از شایع‌ترین ویروس‌های شمعدانی محسوب می‌شوند (Alonso & burja, 2005; Rosa & Moorman, 2018) با این حال در ایران بررسی‌های اندکی در مورد آلودگی شمعدانی به این ویروس‌ها صورت گرفته است. این بررسی نشان داد که استفاده از آغازگرهای عمومی تیره *Tombusviridae* به خوبی قادر به ردیابی ویروس در این گیاه می‌باشد (شکل ۲). لذا استفاده از این آغازگرها برای ردیابی سایر اعضای این خانواده ویروسی در شمعدانی پیشنهاد می‌شود.

تکثیرانتهای '3 ویروس PFBV

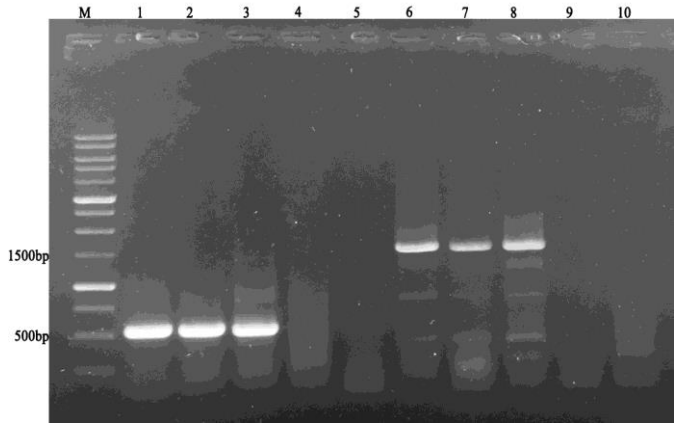
با توجه به نتایج حاصل از تعیین توالی دو جدایه شمعدانی و تایید حضور PFBV در نمونه‌های مورد بررسی، یک جفت آغازگر اختصاصی PFBV (CH2/CH1) تکثیر کننده انتهای '3 ژنوم ویروس مذکور در بردارنده ژن CP (Rico & Hernández, 2004) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR به دست آمده با این جفت آغازگر نشان داد که قطعه مورد انتظار bp ۱۵۰۰ در نمونه‌های شمعدانی که با آغازگرهای عمومی *Tombusviridae* باند مورد نظر را تشکیل داده بودند، تکثیر شد (شکل ۳). هر چند این جفت آغازگر هم در نمونه‌های شمعدانی منجر به تشکیل باندهای غیر اختصاصی شد (شکل ۳). بررسی‌های صورت گرفته با جفت آغازگر مذکور بر روی شمعدانی‌های مورد بررسی نشان داد که PFBV در برخی از نمونه‌های شمعدانی بدون نشانه نیز وجود دارد و در بیشتر موارد، نمونه‌های مثبت از بوته‌های بدون نشانه بودند (راهک های ۳-۱۴ شکل ۴). گسترش PFBV در برخی از ارقام شمعدانی بدون نشانه از پیش هم گزارش شده است (Bouwen & Maat, 1992). رخداد گسترده ویروس‌های مختلف در شمعدانی می‌تواند ناشی از آلودگی بدون نشانه ویروس و تکثیر رویشی گیاه باشد (Alonso & Burja, 2005).

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر عمومی (CarmoIIF/CarmVIR) تیره *Tombusviridae* روی ژل آگارز ۱٪. M: (GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas)، راهک‌های ۵-۱: به ترتیب جدایه های P19، P21، P108، P111 و P112 ، راهک ۶: شاهد منفی.

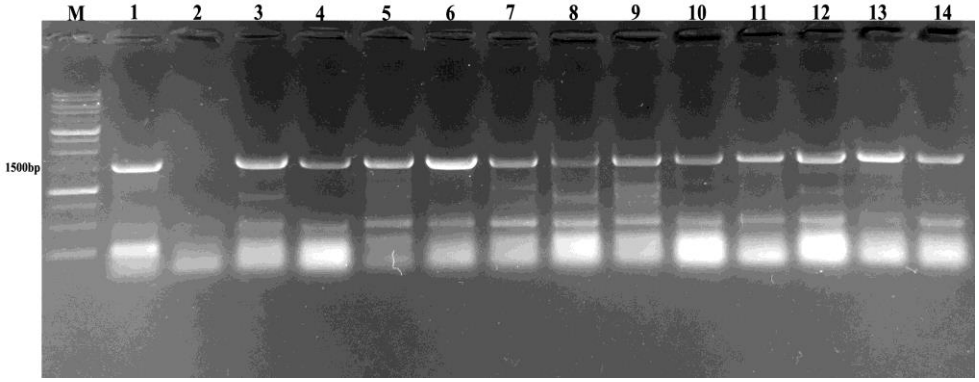
Figure 2. Electrophoretic patterns of RT-PCR products amplified by *Tombusviridae* degenerate primers (CarmoIIF/CarmVIR) in a 1% agarose gel. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); lanes 1-5: P19, P21, P108, P111 and P112 isolates, respectively; lane 6: negative control.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی *Tombusviridae* (CarmoIIF/CarmVIR) و اختصاصی PFBV (CH1/CH2) در جدایه های مشابه روی ژل آگارز ۱٪. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas)؛ راهک‌های ۱الی ۳: آغازگر عمومی *Tombusviridae* به ترتیب روی جدایه‌های P6، P19 وP105 راهک ۴:کنترل منفی؛ راهک۵: آب ؛ راهک‌های ۶ الی۸ : آغازگر اختصاصی PFBV به ترتیب روی جدایه‌های P6، P19 وP105 ؛ راهک ۹: کنترل منفی ؛ راهک۱۰: آب.

Figure 3. Electrophoretic patterns of RT-PCR products amplified by *Tombusviridae* degenerate primers (CarmoIIF/CarmVIR) and PFBV specific primers (CH1/CH2) in a 1% agarose gel. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); lanes 1-3 : Tombusviridae degenerate primers on P6, P19 and P105 respectively; lane 4: negative control; lane 5: water; lanes 6-8: PFBV specific primers on P6,P19 and P105, respectively; lane 9: negative control; lane10: water.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PFBV (CH1/CH2) روی ژل آگارز ۱٪ . M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas)؛راهک ۱: P6 ، راهک۲: شاهد منفی ،راهک های ۳ الی ۱۴: P101 الی P112 (گیاهان بدون نشانه).

Figure 4. Electrophoretic patterns of RT-PCR products amplified by PFBV specific primers (CH1/CH2) in a 1% agarose gel. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); lane 1: P6; lane 2: negative control; lanes 3-14: P101-P112 (symptomless plants).

نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر شده با آغازگر اختصاصی PFBV

نتایج تعیین توالی مستقیم خوانش دو طرفه قطعه bp ۱۵۰۰ تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی CH2/CH1 سه جدایه شمعدانی به نام‌های P6، P19 و P105 (بدون نشانه) و مقایسه با توالی‌های موجود در GenBank نشان داد که این جدایه‌ها به PFBV تعلق دارند. پس از ویرایش دستی توالی‌های به دست آمده و به دست آوردن توالی کامل ژن CP این سه جدایه ویروسی از روی توالی‌های یادشده، این توالی‌ها با شماره دسترسی‌های P6 = MT843891 ، P19 = MT843892 و P105 = MT843893 در پایگاه داده‌های GenBank ثبت شدند.

نتایج بررسی روی توالی نوکلیوتیدی ژن CP سه جدایه یادشده نشان داد که اندازه قطعه ژنی مذکور bp ۱۰۳۸ است که منجر به تشکیل یک پلی‌پپتید به طول ۳۴۶ آمینو اسید می‌شود. میزان شباهت توالی سه جدایه یادشده با هم در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۹۹/۳-۹۹/۹ و ۹۹/۷-۱۰۰ تعیین شد. این نتایج نشان داد که دو جدایه P19 و P105 شباهت بیشتری نسبت به یکدیگر دارند. بررسی توالی آمینواسیدی این سه جدایه در مقایسه با سایر جدایه های PFBV نشان داد که جدایه P6 در موقعیت آمینواسیدی ۲۵۲، جایگزینی آمینواسید آلانین به جای تریونین نسبت به دو جدایه دیگر ایران و سایر کشورها به جز جدایه‌های کشور جمهوری چک دارد. دو جدایه یادشده (P19 وP105) دارای دو منشا جغرافیایی متفاوت در ایران هستند. P19 از شمعدانی‌های گلخانه‌ای در محلات جمع‌آوری شد، در حالیکه P105 از شمعدانی بدون نشانه جمع‌آوری شده از استان تهران (ورامین) بود که در گلخانه پژوهشکده گل و گیاهان زینتی نگهداری می‌شد. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی این سه جدایه با جدایه‌های PFBV از سایر نقاط دنیا نشان داد که میزان مشابهت از ۹۶/۴ تا ۹۹/۴ متغیر است.

واکاوی فیلوژنی

درختواره فیلوژنتیکی به دست آمده بر اساس توالی آمینو اسیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های مختلف PFBV با استفاده از روش Neighbor Joining و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap نشان داد که این جدایه‌ها در دو گروه فیلوژنتیکی جداگانه قرار گرفتند

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

(شکل۵). جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در گروه یک در یک زیر گروه، جدا از جدایه‌های سایر کشور های مورد بررسی در واکاوی فیلوژنی قرار گرفتند (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی جدایه‌های یادشده نشان داد که اگر چه بیشتر جدایه‌ها با توجه به منشا جغرافیایی آنها با یکدیگر گروه بندی شدند اما برخی استثناها هم در این گروه بندی دیده شد. از جمله جدایه‌های کشور آلمان، که در هر دو گروه قرار گرفتند.

شکل ۵ : روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی PFBV (ستاره دار) بر اساس توالی آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی با سایر جدایه‌های ویروس. همردیف‌های توالی چندگانه به عنوان داده‌های ورودی برای ساخت درختواره فیلوژنتیک بر اساس روش Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار در نرم افزار MEGAX استفاده شد. شاخه‌هایی با کمتر از ۷۰٪ ارزش Bootstrap در درخت نهایی نشان داده نشده‌اند. توالی آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی Honeysuckle ringspot virus (HRSV) به عنوان outgroup مورد استفاده قرار گرفت.

Figure 5. Phylogenetic relationship of Iranian isolates of PFBV based on coat protein gene amino acid sequences with those of PFBV isolates which were available in GenBank. Multiple sequence alignments were used as input to construct phylogenetic tree based on neighbor-joining algorithm with 1000 bootstrap replicates using MEGA X software. Bootstrap values less than 70% are not shown in the final phylogenetic tree. Corresponding Honeysuckle ringspot virus (HRSV) sequence was used as outgroup.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

شمعدانی گیاهی است که بیشتر به صورت رویشی تکثیر می‌شود و با توجه به دیده‌نشدن نشانه آسیب ویروس‌ها در برخی از ارقام شمعدانی (Bouwen & Maat, 1992) و به دلیل ردوبدل شدن بین المللی قلمه‌های تکثیر شده امکان تبادل ویروس بین کشورهای مختلف بسیار امکان پذیر است. در مورد گروه ایرانی هم مشاهده شد که دو جدایه با منشا جغرافیایی متفاوت (P19 و P105) با هم یک گروه خواهری را تشکیل دادند. بررسی میزان گوناگونی ویروس در ایران نیاز به تعیین توالی جدایه‌های مختلف این ویروس از سایر مناطق کشت و پرورش شمعدانی دارد تا تصویر دقیق‌تری از میزان گوناگونی این ویروس و رابطه فیلوژنتیک آن به دست آید. بیشتر ارقام جدید شمعدانی در ایران وارداتی از کشورهای اروپایی هستند. بنابراین رابطه نزدیک جدایه‌های ایرانی با جدایه های اروپایی موردی قابل پیش بینی است.

نتیجه گیری کلی این بررسی نشان می‌دهد که PFBV در شهرستان محلات رخ‌داده و گسترش آن نیز به دلیل استفاده از بوته‌های مادری گواهی نشده برای قلمه‌گیری موضوعی دوری ناپذیر است. بررسی‌های این مطالعه نشان داد که این بیماری یک خطر جدی برای گلکاران منطقه و همچنین کشور محسوب می‌شود زیرا شهرستان محلات به عنوان یکی از قطب‌های اصلی تولید گل شمعدانی می‌باشد و به مکانی برای تأمین قلمه‌های رویشی شمعدانی به حساب می‌آید. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش پیشنهاد می‌شود از قلمه‌های عاری از ویروس و گواهی شده وارداتی و یا قلمه‌های سالم سازی شده داخلی برای کنترل بیماری ناشی از PFBV استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، در قالب پروژه مصوب به شماره ۹۶۱۵۴۲-۰۹۱۳۳-۲۶-۷ صورت گرفته است.

منابع

Albouy, J., Krczal, G., Lajoux, C. (1992). Influence of Pelargonium flower break virus (PFBV) and nepoviruses on Pelargonium production. In: VIII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Czech Republic, Prague, 55-62.

Alonso, M. Borja, M. (2005). High incidence of Pelargonium line pattern virus infecting asymptomatic Pelargonium spp. in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, *112*(2), 95-100.

Bouwen, I., Maat, D.Z. (1992). Pelargonium flower-break and Pelargonium line pattern viruses in the Netherlands; purification, antiserum preparation, serological identification, and detection in pelargonium by ELISA. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *98*(2), 141-156.

Dorion, N., Jouira, H.B., Gallard, A., Hassanein, A., Nassour, M., Grapin, A. (2010). Methods for In vitro Propagation of *Pelargonium* x *hortorum* and Others: From Meristems to Protoplasts. In: Jain, S. M., Ochatt, S. (Eds.), Protocols For In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Humana Press, pp. 197-211.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

Franck, A., Loebenstein, G. (1992). Virus and virus-like diseases of pelargonium in Israel. In: VIII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, Czech Republic, Prague, 31-40.

Khandan-Mirkohi, A., Kazemi, F., Babalar, M. Naderi, R. (2014). Effect of different levels of nitrogen in nutrient solution on the qualitative and quantitative traits of geranium (*Pelargonium hortorum* cv. Bulles eye). *Journal of Crop Improvement*, *16*(1), 157-168 (In Persian).

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547.

Kusiak, C., Deogratias, J., Moreau, J. (1995). Transmission of pelargonium flower break virus (PFBV) in irrigation systems and by thrips. *Plant Disease*, *79*(2), 163-166.

Masoomi-Aladizgeh, F., Jabbari, L., Khayam Nekouei, R., Aalami, A. (2016). A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protocol Exchange*, doi:10.1038/protex.2016.015

Morozov, S.Y., Ryabov, E.V., Leiser, R.M., Zavriev, S.K. (1995). Use of highly conserved motifs in plant virus RNA polymerases as the tags for specific detection of carmovirus-related RNA-dependent RNA polymerase genes. *Virology*, *207*(1), 312-315.

Rasoulpour, R., Izadpanah, K. (2011). Isolation and partial characterization of Pelargonium leaf curl virus, Moroccan pepper virus and Eggplant mottled crinkle virus from plant and soil in Iran. *Journal of Phytopathology*, *159*, 802-804.

Rasoulpour, R., Izadpanah, K. (2008). First report of Eggplant mottled crinkle virus in geranium in Iran. *Plant Pathology*, *57*(2), 397.

Rico, P., Hernández, C. (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of Pelargonium flower break virus. *Archives of Virology*, *149*(3), 641-651.

Rico, P., Ivars, P., Elena, S.F., Hernández, C. (2006). Insights into the selective pressures restricting Pelargonium flower break virus genome variability: evidence for host adaptation. *Journal of Virology*, *80*(16), 8124-8132.

Rosa, C., Moorman, G.W. (2018). Diseases of Geranium. In: McGovern, R.J., & Elmer, W.H. (Eds.). Handbook of Florists' Crops Diseases. Springer, pp 941-974.

Saidi, A., Safaeizadeh, M. (2011). First report of Cucumber mosaic virus infecting geraniums (*Pelargonium* spp.) in Iran. *Asian Journal of Plant Pathology*, *5*, 163-165.

Scheets, K., Jordan, R., White, K.A., Hernández, C. (2015). *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Archives of Virology*, *160*, 2385-2393.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

Stone, B.O.M., Hollings, M. (1973). Some properties of pelargonium flower break virus. *Annals of Applied Biology*, *75*(1), 15-23.

Wei, M.S., Li, G.F., Ma, J., Kong, J. (2015). First report of Pelargonium flower break virus infecting Pelargonium plants in China. *Plant Disease*, *99*(5), 735.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]

Flower and Ornamental Plants (2021), 6(2): 85-94
Research article
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85

First report of Pelargonium flower break virus (PFBV) in Iran and determining some of its molecular properties

Sheida Babaei[1], Maryam Karimi[2], Hossein Bayat[2*]

1. Mehregan Non-profit High Education Institute, Mahallat
2. Ornamental Plant Research Centre (OPRC), Horticulture Sciences Research Institute (HSRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat

Bayat_new@yahoo.com

Received: 2021/07/07, Revised: 2021/09/05, Accepted: 2021/09/07

Abstract

Geranium has an important place in the world flower and plant industry and is one of the most popular for indoor and outdoor use. Viral diseases play an important role in reducing the quantity and quality of this ornamental plant. In this study, 72 samples suspected of viral infection with symptoms such as bright ring spots, leaf necrosis and chlorosis, spots or color breaking on the petals, as well as asymptomatic plants were collected from various greenhouses in the Mahallat and Varamin and their suburbs. Total RNA was extracted and evaluated by RT-PCR using general primers of the family *Tombusviridae*. In 21 samples, a DNA fragment of 500 base pair (bp) in size was amplified using *Tombusviridae* primers. This DNA fragment from the two isolates were sequenced and compared with the sequences available in the Genbank database. The results indicated that both isolates belonged to Pelargonium flower break virus (PFBV). The RT-PCR test was performed again using a pair of specific primers (CH1/GH2) designed to amplify a 1500 bp DNA fragment from the 3' end of the PFBV virus genome containing the coat protein gene on the same samples, that confirmed the accuracy of the results of the previous step. The amplified DNA formed on the gel of three selected isolates was extracted from the gel and subjected to sequencing. Phylogenetic analysis was performed based on the amino acid sequence of CP gene and phylogenetic tree (genealogy) was drawn using neighbor joining method. The results of phylogenetic analysis showed that the reported PFBV isolates from different countries are in two groups and three PFBV isolates of Iran were placed separately in one subgroup from the subgroups of other countries. This is the first report of PFBV in Iran.

Keywords: Detection, Ornamental plants, Pelargonium, Tombusviridae family, Virus.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-12-19]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1400.6.2.3.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.85]