

ترادف نوکلئوتیدی و ویژگی‌های ساختاری دو واریانت جدید ویروئید کوتولگی رازک از مرکبات استان فارس*

سید علی اکبر باقریان**، کرامت‌اله ایزدپناه، علیرضا افشاری فر و سید علی اکبر بهجت‌نیا^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۲۷)

چکیده

ویروئید کوتولگی رازک (HSVd) در سال‌های اخیر به‌عنوان عامل همراه با بیماری‌های زرد و چوب‌پنبه‌ای شدن رگ‌برگ در درختان پرتقال و اشنگتن ناول و شقاقی شدن پوست لیموشیرین از مرکبات استان فارس و به‌عنوان عامل بیماری کاککسیای مرکبات از استان مازندران گزارش گردیده که نشان‌دهنده اهمیت این عامل بیماری‌زا در ایران است. در این مطالعه تعدادی نمونه بدون علائم مشخص از باغ‌های مرکبات استان فارس از نظر وجود ویروئید، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج آر آن ۱ و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانوسی معکوس، ژنوم کامل ۳ جدایه ویروئید موجود در نمونه‌ها تعیین ترادف شد و با ژنوم کامل دو جدایه از استان فارس و دو جدایه ویروئید کوتولگی رازک از استان مازندران که قبلاً تعیین ترادف شده بودند و برخی دیگر از جدایه‌های HSVd از سایر نقاط جهان مقایسه گردید. این مطالعه نشان داد که حداقل دو واریانت جدید ویروئید کوتولگی رازک در مرکبات استان فارس وجود دارد. از نظر فیلوژنتیکی، جدایه‌های HSVd از استان فارس برخلاف جدایه‌های استان مازندران، در گروه‌های مختلف جای گرفتند. جدایه 1 HSVd-cit از لیموشیرین از تمام جدایه‌های دیگر مورد مطالعه متفاوت بود و خود در یک گروه مستقل قرار گرفت. این امر بیانگر تنوع بیشتر جدایه‌های HSVd استان فارس در مقایسه با جدایه‌های استان مازندران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروئید، فیلوژنی، ویروئیدهای مرکبات، ویروئید کوتولگی رازک

مقدمه

تیره *Pospiviroidae* تعلق دارند و در ۴ جنس شامل *Cocaviroid*، *Hostuviroid*، *Apscaviroid*، *Pospiviroid* قرار می‌گیرند. تنها ویروئید جنس *Hostuviroid*، ویروئید کوتولگی رازک (HSPVd = *Hop stunt viroid*) است که ویروئید شماره II مرکبات (*Citrus viroid II*) نیز نامیده می‌شود (Elleuch et al. 2006).

ویروئیدها کوچک‌ترین بیمارگرهای گیاهی و متشکل از مولکول‌های آر آن ۱ تک لای حلقه‌ای، به‌طول ۲۴۶ تا ۴۰۱ نوکلئوتید، با ساختمان‌های ثانویه متعدد و فاقد پوشش پروتئینی هستند (Gora-Sochacka 2004; Tabler & Tsagris 2004). تاکنون چند ویروئید از مرکبات گزارش شده‌اند که همگی به

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sabagherian@gmail.com

۱. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استاد، دانشیار و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

علائم کاکسیا بازی می‌کند به طوری که تغییر در این موتیف می‌تواند باعث شدت و یا ضعف و حتی حذف قدرت تولید علائم کاکسیا گردد. ترادف این موتیف در انواع بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای واریانت‌های مرکبات و پروئید کوتولگی رازک متفاوت است (Serra et al. 2008).

در ایران HSVd به عنوان عامل کاکسیای مرکبات شمال، پیش از این معرفی شده است. همراهی واریانت‌های جدید این پروئید (HSVd-sb و HSVd-sycv) به ترتیب با بیماری‌های زرد و چوب‌پنبه‌ای شدن رگ‌برگ در درختان پرتقال واشنگتن ناول و شقاقی شدن پوست لیموشیرین در استان فارس نشان داده شده است (Alavi et al. 2006, Bagherian & Izadpanah 2009, unpublished). گزارش‌هایی نیز وجود دارد مبنی بر آن که درختان مرکبات به‌رغم آلودگی به پروئید کوتولگی رازک، بدون علائم بوده‌اند (Ito et al. 2002). در این مطالعه دو واریانت جدید پروئید کوتولگی رازک از مرکبات بدون علائم استان فارس جدا گردیده و با جدایه‌های دیگر این پروئید که از استان‌های مازندران و فارس گزارش شده‌اند، مقایسه شده‌اند.

روش بررسی

نمونه برداری

در تابستان سال ۱۳۸۷ از مناطق مختلف مرکبات کاری شهرستان‌های جهرم و داراب بازدید صورت گرفت و از ۷ درخت لیموترش از جهرم و ۳ درخت لیموشیرین از داراب نمونه برداری انجام شد. نمونه‌ها بدون علائم مشخص بودند. مقداری شاخه و برگ جوان از هر درخت جدا و پس از انجماد در ازت مایع، جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج آر ان ا از بافت گیاهی

استخراج آر ان ا از بافت گیاهی به روش یانگ و همکاران (Yang et al. 1992)، به صورتی که علوی و همکاران

و پروئید کوتولگی رازک (HSVd) دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و علاوه بر رازک و خیار، قادر به تکثیر در مرکبات، مو، هلو، آلو، گلابی، زرد آلو، بادام و انار می‌باشد (Shikata 1990, Astruc et al. 1996, Cañizares et al. 1999).

پروئید در مو، زرد آلو، بادام و انار بدون علائم است (Shikata 1990, Polivka et al. 1996, Astruc et al. 1996). در سایر موارد نیز بیماری‌هایی مانند رنگ پریدگی میوه خیار، کاکسیای مرکبات، زرد و چوب‌پنبه‌ای شدن رگ‌برگ مرکبات و خال دار شدن میوه آلو و هلو را به آلودگی به واریانت‌های مختلف HSVd نسبت داده‌اند (Sano et al. 1989, Diener et al. 1988, Semancik et al. 1988). تاکنون حدود ۴۵ واریانت از HSVd گزارش شده‌اند (Hadidi et al. 2003, Sano et al. 1989).

در گذشته بر اساس ترادف نوکلئوتیدی، واریانت‌های پروئید HSVd را به پنج گروه تقسیم کرده‌اند، سه گروه اصلی شامل تیپ آلو، تیپ رازک و تیپ مرکبات و دو گروه فرعی که تصور می‌شود از نوترکیبی بین اعضای سه گروه بالا به دست آمده‌اند. علاوه بر این مشخص شده که گروه تیپ رازک در نتیجه نوترکیبی بین اعضای تیپ‌های آلو و مرکبات به وجود آمده است (Kofalvi et al. 1997).

پروئیدها براساس ترادف ژنوم خود و باز جفتی، یک ساختار ثانویه قوی و حلقه‌ای را ایجاد می‌کنند. در تیره *Pospiviroidae* برای این ساختار پنج دامانه ساختمانی و عملکردی شامل: دامانه مرکزی حفاظت شده (central conserved region, CCR)، دامانه بیماری‌زایی (pathogenicity, P)، دامانه متغیر (variable, V)، دامانه انتهای سمت راست (terminal right, TR) و دامانه انتهای سمت چپ (terminal left, TL) پیشنهاد شده است (Keese & Symons 1985).

یک موتیف پنج تا شش نوکلئوتیدی در دامانه متغیر پروئید کوتولگی رازک جای گرفته است که آن را "موتیف بیان علائم کاکسیا" معرفی کرده‌اند. این موتیف نقش مهمی در ایجاد

همراه با یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها ($10\mu\text{M}$)، نیم میکرولیتر از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات (10mM)، یک میکرولیتر dithiothreitol (10mM)، 0.75 میکرولیتر MgCl_2 (50mM)، $2/5$ میکرولیتر بافر اختصاصی ($10\times$) $\text{Taq DNA polymerase}$ و 0.25 میکرولیتر آنزیم $\text{Taq DNA polymerase}$ ($5\text{U}/\mu\text{l}$) در واکنش 25 میکرولیتری زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفت. تمام مواد مورد استفاده در واکنش ترانویسی معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت فرمنتاس (Fermentas) و سیناژن (CinnaGen) تهیه شد.

چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز عبارت از یک برنامه یک چرخه‌ای شامل دمای 94°C به مدت 30 ثانیه و یک برنامه 35 چرخه‌ای شامل دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، 60°C به مدت 30 ثانیه و 72°C به مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط به مدت 5 دقیقه در 72°C نگه‌داری شد.

محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز 1% در بافر TBE ($10/8$ گرم تریس، $5/5$ گرم بوریک اسید و 0.73 گرم EDTA در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر، $\text{pH} 8.3$) مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، با دستگاه UV transilluminator باندهای نوکلئیک اسید مشاهده و به وسیله دستگاه gel documentation از ژل عکس‌برداری شد.

هم‌سازسازی (Cloning)

محصول PCR با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول خالص‌سازی شده واکنش PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas) در داخل ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T قرار داده شد. بدین منظور مخلوط پلاسمید و محصول PCR شامل 3 میکرولیتر ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T، 4 میکرولیتر محصول PCR، 3 میکرولیتر بافر اتصال $10\times$ برابر ($10\times$ Ligation buffer)، 3 میکرولیتر سوسپانسیون 50% (وزن به حجم) PEG 4000، یک

(Alavi et al. 2006) انجام داده‌اند با تغییرات اندکی صورت گرفت. کلیه مراحل استخراج آر ان ا در شرایط سترون انجام شد و تمامی محلول‌های مورد استفاده با آب سترون تیمار شده با DEPC تهیه شدند. پنج میکرولیتر از آر ان ا استخراج شده، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در حجم 25 میکرولیتری واکنش، مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش ترانویسی معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

این دو واکنش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک (Sano et al. 1988) شامل آغازگر معکوس ($5'-\text{CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT}-3'$) و آغازگر مستقیم ($5'-\text{GGCAACTCTTCTC AGAATCCAGC}-3'$) که قطعه‌ای در حدود 300 جفت نوکلئوتید را تکثیر می‌کنند، انجام شد. عمل ترانویسی معکوس در حجم 20 میکرولیتری شامل 4 میکرولیتر قالب آر ان ا استخراج شده ویروئید، آغازگر معکوس به غلظت 1 میکرومولار، یک میلی‌مولار از هریک از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات، 10 میلی‌مولار dithiothreitol ، $4/5$ میکرولیتر بافر اختصاصی ($5\times$) MMuLV و یک میکرولیتر آنزیم ($200\text{U}/\mu\text{l}$) $\text{MMuLV-Reverse transcriptase}$ انجام گرفت. برای این منظور ابتدا مخلوط آر ان ا و آغازگر معکوس به مدت 10 دقیقه در 70°C در دستگاه ترموسایکلر با دمای درپوش 105°C قرار داده شد تا آر ان ا واسرشته گردد و سپس به سرعت به مدت سه دقیقه داخل یخ آب قرار داده شد. پس از سانتی‌فوژ کردن به مدت چند ثانیه، بقیه مواد به میکروتیوب اضافه شد. مخلوط به آرامی دو تا سه بار پیچت شد و بعد از سانتی‌فوژ کردن به مدت چند ثانیه، در دستگاه ترموسایکلر با دمای 42°C به مدت دو ساعت قرار گرفت. سپس به مدت 10 دقیقه در 94°C قرار داده شد و بعد از اتمام این مرحله، سریعاً به مدت 3 دقیقه روی یخ سرد شد و 5 میکرولیتر آن

GenBank مقایسه شدند.

آنالیز ترادف‌های نوکلئوتیدی

مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی و محاسبه میزان اختلافات ژنتیکی بین جدایه‌های HSVd از ایران و سایر نقاط دنیا (جدول ۱) با استفاده از برنامه 9 Vector NTI (InforMax, Bethesda, MD) انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار DNAMAN (version 4.0.1.1) به انجام رسید. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) و بر اساس ۱۰۰۰۰ تکرار، رسم گردید.

مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی و رسم ساختار ثانویه جدایه‌های مورد بحث به ترتیب به وسیله نرم افزارهای BioEdit (version 5.0.9) و RNAstructure (version 4.6) انجام رسید.

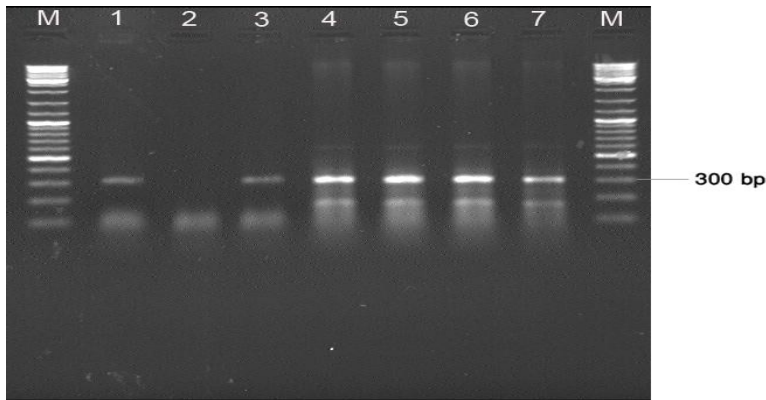
نتیجه

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانویسی معکوس (RT-PCR)
انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانویسی معکوس با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی و پروتئید کوتولگی رازک منجر به تکثیر قطعه‌ای به اندازه حدود ۳۰۰ جفت نوکلئوتید در نمونه‌های یکی از درختان لیموشیرین داراب (شکل ۱ راهک ۱) و دو درخت لیموترش جهرم (شکل ۱ راهک‌های ۴ تا ۷) شد. قطعات حاصل با موفقیت هم‌سانه‌سازی و از دو جهت تعیین ترادف شدند. این نتایج نشان داد که ترادف نوکلئوتیدی در محل آغازگرها در هم‌سانه‌های تعیین ترادف شده با آغازگرهای مورد استفاده یکسان است. با مقایسه ترادف حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLAST نزدیک بودن آنها با واریانت‌های مختلف و پروتئید کوتولگی رازک به اثبات رسید. در بقیه درختان مورد بررسی هیچ گونه باندی از و پروتئید کوتولگی رازک ردیابی نگردید.

میکرولیتر آنزیم T4 DNA ligase (۵ واحد در میکرولیتر) و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر سترون برای وارد کردن cDNA به پلاسمید ناقل به مدت یک شب در دمای ۲۲°C قرار داده شد. انتقال پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E. coli* با استفاده از کیت Ins T/A Clone PCR Product Cloning Kit (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید. پس از یک شب کشت در محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۲۰ µg/ml ماده IPTG و ۲۰ µg/ml ماده X-gal، کلنی‌های سفید که قاعداً باید حاوی پلاسمید نو ترکیب باشند، برداشته و هر کدام جداگانه در ۲-۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین کشت و به مدت یک شب در ۲۷°C در shaker incubator نگهداری شدند. برای استخراج دی‌ان‌ا پلاسمیدهای نو ترکیب از سلول‌های باکتری از روش جوشاندن (Holmes & Quigley 1981) استفاده شد. جهت تأیید قطعات وارد شده به پلاسمید مقدار یک میکرولیتر از دی‌ان‌ا پلاسمید نو ترکیب استخراج شده، به مخلوط واکنش PCR، طبق شرایط گفته شده، اضافه و پس از انجام PCR نتایج حاصله با الکتروفورز بررسی شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی

پس از تأیید صحت قطعه هم‌سانه‌سازی شده، باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب انتخاب و مجدداً کشت داده شد و پلاسمید آن با استفاده از High Pure Plasmid Isolation Kit (Fermentas) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و با روش هضم آنزیمی مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی موارد پس از غربال کردن به ازای هر محصول دو هم‌سانه حاوی قطعات مورد نظر به منظور تعیین ترادف با استفاده از جفت آغازگر و پروتئید کوتولگی رازک (Sano et al. 1988)، به شرکت Macrogen کشور کره جنوبی ارسال و از دو جهت تعیین ترادف شدند. ترادف‌های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف‌های موجود در



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیر شده در RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک. یک درخت لیموشیرین داراب (راهک ۳) و درختان لیموترش جهرم (راهک‌های ۴ تا ۷). هیچ بانندی در نمونه سالم (راهک ۲) مشاهده نشد. M= مارکر.

Fig. 1. Electrophoresis pattern of DNA fragments amplified by RT-PCR with a specific hop stunt viroid primer pair. 1,3 a sweet lime tree from Darab; 4-7 lime trees from Jahrom. No band was observed in healthy control sample (lane 2). M= marker.

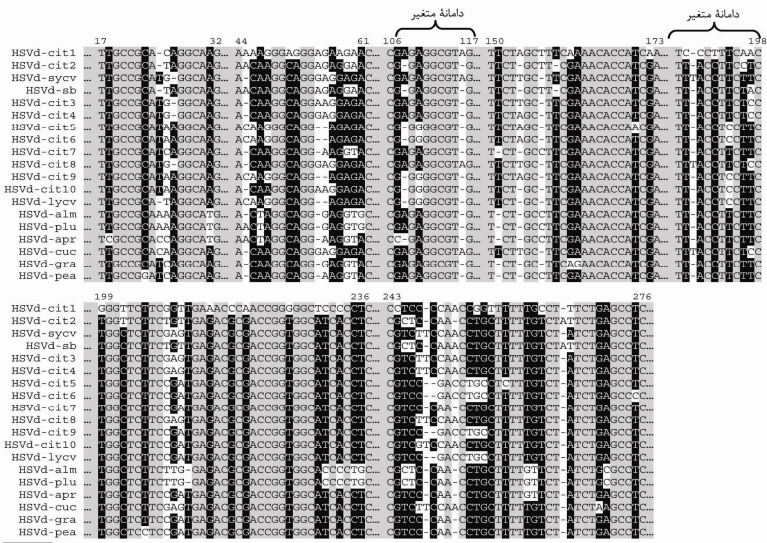
پایدارترین ساختار ثانویه ممکن برای دو جدایه مورد بحث به‌وسیله نرم افزار RNAstructure (version 4.6) رسم شد. این ساختارها مثل ساختار دیگر ویروئیدهای هم خانواده این جدایه‌ها، میله‌ای شکل و دارای ساختارهای حلقه‌ای کوچک فراوان می‌باشند. مقایسه ساختار ثانویه 1 HSVd-cit و HSVd-cit 2 وجود تفاوت در میزان پایداری و وجود تعداد شاخه‌های جانبی ساختار ثانویه آن دو را مشخص نمود (شکل ۳).

مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های مذکور با ۱۷ جدایه دیگر HSVd نشان داد که به‌جز 1 HSVd-cit، همواره شباهت بین جدایه‌ها بیش از ۹۰٪ می‌باشد (جدول ۳). جدایه 1 HSVd-cit کمترین شباهت (۸۷٪) را با HSVd-alm و HSVd-plu و بیشترین شباهت (۸۹٪) را با اکثر جدایه‌ها از جمله 8 HSVd-cit دارد در حالی که جدایه 2 HSVd-cit کمترین شباهت (۸۸٪) را با 1 HSVd-cit و بیشترین شباهت (۹۹٪) را با HSVd-sb دارد (جدول ۳).

دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد بررسی HSVd در پنج گروه جدا از هم قرار می‌گیرند. این در حالی است که دو جدایه گزارش شده از استان

آنالیز ترادف‌های نوکلئوتیدی و ساختار ثانویه آن‌ها اندازه قطعه تکثیر شده درخت لیموشیرین داراب ۳۰۲ نوکلئوتید و از ۲ درخت لیموترش جهرم ۲۹۸ نوکلئوتید تعیین شد. این قطعات به ترتیب در بانک ژن (مراکز اطلاعات GenBank, EMBL و DDBJ) با رس شماره‌های FJ626867 و FJ626868 تحت نام‌های HSVd-cit 1 و HSVd-cit 2 نهاده شدند. ساختار اولیه و مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی 1 HSVd-cit و 2 HSVd-cit با دیگر جدایه‌های HSVd (جدول ۱) در شکل ۲ و مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی و مقایسه تعداد و نوع نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده 1 HSVd-cit و 2 HSVd-cit در جدول ۲ نشان داده شده است.

1 HSVd-cit چهار نوکلئوتید بیشتر از 2 HSVd-cit دارد، بنابراین این بیشتر بودن وزن مولکولی 1 HSVd-cit نسبت به 2 HSVd-cit (جدول ۲) و کمتر بودن انرژی آزاد ساختار ثانویه 1 HSVd-cit (-118.9 Kcal) نسبت به 2 HSVd-cit (-120 Kcal) قابل توجیه است (شکل ۳). این جدایه‌ها غنی از G+C (جدول ۲) و ترکیب نوکلئوتیدی آنها، یک آر ان ا با ساختار ثانویه قوی و مقاوم به حرارت، که مشخصه ویروئیدها می‌باشد را برای آن پیشنهاد می‌کند.



شکل ۲. ساختار اولیه و مقایسه هم‌رديف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های مختلف ویروئید کوتولگی رازک از منابع مختلف. رس شمار هر جدایه قبلاً در جدول ۱ نشان داده شده است. نوکلئوتید: ترف حافظت شده، نوکلئوتید: ترادف یکسان، - عدم: وجود نوکلئوتید.

Fig. 2. Primary structures of HSVd variants from various sources. Sequences are aligned for maximum homology. Nucleotides: Conserved sequences; Nucleotides: Identical sequences; -: lack of nucleotide.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک مورد استفاده در این مطالعه

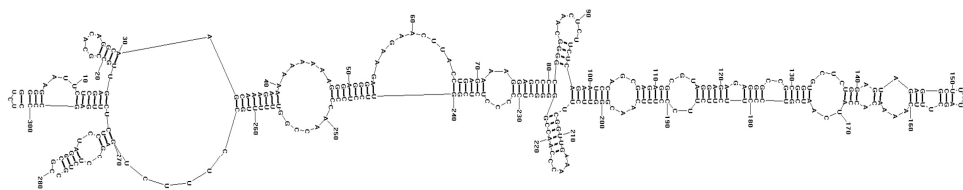
Table 1. Characteristics of HSVd isolates used in this study

Isolate جدایه	Accession no. رس شمار	Host میزبان	Origin منشاء	Number of nucleotides تعداد نوکلئوتید
sb	FJ465507	Sweet lime	Fars (Jahrom)	299
sycv	FJ465506	Sweet orange	Fars (Jahrom)	302
cit 1	FJ626867	Sweet lime	Fars (Darab)	302
cit 2	FJ626868	Lime	Fars (Jahrom)	298
cit 3	EF126046	Satsuma	Mazandaran	300
cit 4	EF186992	Satsuma	Mazandaran	300
cit 5	AF213494	Citrus sp.	Spain	297
cit 6	AF213495	Citrus sp.	Spain	297
cit 7	X00009	Citrus sp.	Japan	297
cit 8	AB054615	St. Michael orange-Wakayama	Japan	302
cit 9	AF213491	Citrus sp.	Spain	297
cit 10	AF131249	Citrus sp.	California	299
lycv	AJ490824	Lime	India	295
alm	AJ011813	Almond	Spain	296
apr	AJ297840	Prunus	Spain	297
cuc	X00524	Cucumber	Spain	303
gra	M35717	Grapevine	United States	296
pea	D13765	Peach	Japan	297
plu	D13764	Plum	Japan	297
CEVd (out group)	EF126047	Citrus sp.	Mazandaran	371

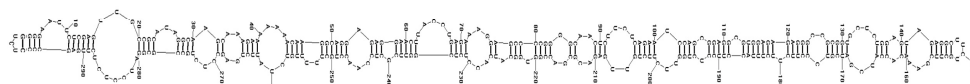
جدول ۲. مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی، تعداد و نوع نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده و تخمین وزن مولکولی آر ان ۱ HSVd-cit1 و HSVd-cit2 به وسیله نرم افزار BioEdit (version 5.0.9) (Hall, 1999).

Table 2. Comparison of nucleotide composition, number and type of nucleotides and molecular weights of HSVd-cit 1 and HSVd-cit 2 using BioEdit (version 5.0.9) program (Hall, 1999).

Viroid ویروئید	Number of nucleotides and proportion تعداد هر نوکلئوتید و سهم هر یک								Ratio نسبت		Ratio نسبت		Molecular Weight estimation تخمین وزن مولکولی	
	A		U		C		G		A+U	G+C	A/U	G/C	Single stranded	Double stranded
	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%	%	%	%	%	Daltons	Daltons
HSVd-cit1	67	22.19	67	22.19	89	29.47	79	26.16	44.37	55.63	1	0.89	97121	193326
HSVd-cit2	61	20.47	72	24.16	85	28.52	80	26.85	44.63	55.37	0.85	0.94	95606	190710



HSVd-cit 1 Free energy = -118.9 Kcal



HSVd-cit 2 Free energy = -120 Kcal

شکل ۳. مقایسه ساختار ثانویه HSVd-cit 1 (Free energy = -118.9 Kcal) و HSVd-cit 2 (Free energy = -120 Kcal).

Fig. 3. Comparison of secondary structures and minimum free energy of HSVd-cit 1 (Free energy = -118.9 Kcal) and HSVd-cit 2 (Free energy = -120 Kcal).

شده، مطابقت دارد.

جدایه‌های HSVd از استان فارس، متنوع‌تر از جدایه‌های گزارش شده از استان مازندران هستند. در مقایسه با جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه HSVd-cit 1 بیش از ۱۰٪ تفاوت نشان می‌دهد. هم‌چنین ساختار ثانویه این جدایه با تمامی جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه تفاوت دارد (همه ساختارها نشان داده نشده‌اند). موارد مذکور، ضرورت معرفی این جدایه به‌عنوان واریانتی کاملاً مشخص از دیگر واریانت‌های ویروئید کوتولگی رازک را نشان می‌دهد.

مازندران در کنار هم و در گروه دوم قرار می‌گیرند و واریانت‌های خیار (HSVd-cuc) و چوب‌پنبه‌ای شدن رگ‌برگ پرتقال (HSVd-sycv) از استان فارس هم با آنها هم‌گروه‌اند. از سوی دیگر دو جدایه دیگر استان فارس شامل HSVd-sb و HSVd-cit2 در گروه ۴ جای دارند و HSVd-cit 1 به‌تنهایی یک گروه (گروه ۵) را تشکیل می‌دهد (شکل ۴). این گروه‌بندی با گروه‌بندی قبلی واریانت‌های HSVd که توسط کفالوی و همکاران (Kofalvi et al. 1997) ارائه شده است در مواردی که از واریانت‌های یکسان در رسم دندروگرام استفاده

جدول ۳. درصد تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مورد استفاده HSVd در این مطالعه

Table 3. Percent sequence identity between selected HSVd isolates used in this study

	CEVd	HSVd-cit1	HSVd-cit2	HSVd-sb	HSVd-alm	HSVd-plu	HSVd-apr	HSVd-cit10	HSVd-cit5	HSVd-cit9	HSVd-cit6	HSVd-lycv	HSVd-cit3	HSVd-cit4	HSVd-cit8	HSVd-sycv	HSVd-cuc	HSVd-gra	HSVd-cit7	HSVd-pea
CEVd	100	46	46	46	45	45	46	46	46	46	46	46	46	46	47	47	46	45	45	45
HSVd-cit1		100	88	88	87	87	88	89	88	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89
HSVd-cit2			100	99	93	93	94	94	92	92	92	93	93	93	92	92	92	95	95	95
HSVd-sb				100	93	93	94	94	92	93	92	94	94	94	93	93	93	95	95	95
HSVd-alm					100	100	95	92	90	91	90	91	92	92	91	92	92	94	95	94
HSVd-plu						100	95	92	90	91	90	91	92	92	91	91	91	94	95	94
HSVd-apr							100	94	93	93	93	94	93	93	92	93	93	96	98	97
HSVd-cit10								100	96	96	96	96	97	97	96	96	96	96	96	96
HSVd-cit5									100	99	99	99	93	93	92	93	92	94	94	94
HSVd-cit9										100	100	99	94	94	93	93	93	95	95	94
HSVd-cit6											100	99	93	94	93	93	93	94	95	94
HSVd-lycv												100	93	93	93	93	93	95	95	94
HSVd-cit3													100	99	99	99	98	95	96	95
HSVd-cit4														100	99	99	98	95	96	95
HSVd-cit8															100	100	99	94	95	94
HSVd-sycv																100	99	95	95	95
HSVd-cuc																	100	94	95	94
HSVd-gra																		100	99	98
HSVd-cit7																			100	99
HSVd-pea																				100

دارد و طبق شکل شماره ۲، سه نوکلئوتید از ۴ نوکلئوتید متفاوت بین این دو واریانت در دامانه متغیر (variable domain) قرار گرفته و فقط یک نوکلئوتید (شماره ۱۹۷) مشخص شده به عنوان "موتیف بیان علائم کاکسیا" در این دو واریانت با یکدیگر متفاوت می‌باشند و احتمال دارد عدم توانایی ایجاد علائم شقاقی توسط HSVd-cit2 در لیموترش، به خاطر این تفاوت یک نوکلئوتیدی باشد.

با توجه به اهمیت روز افزون و پروتئیدهای مرکبات، انجام بررسی‌های مرتبط با این عوامل بیماری‌زا به‌ویژه در مرکبات جنوب کشور از طریق ساخت هم‌سانه‌های عفونت‌زای آنها و انجام آزمایش‌های بیماری‌زایی و مشاهده علائم، ضروری می‌باشد.

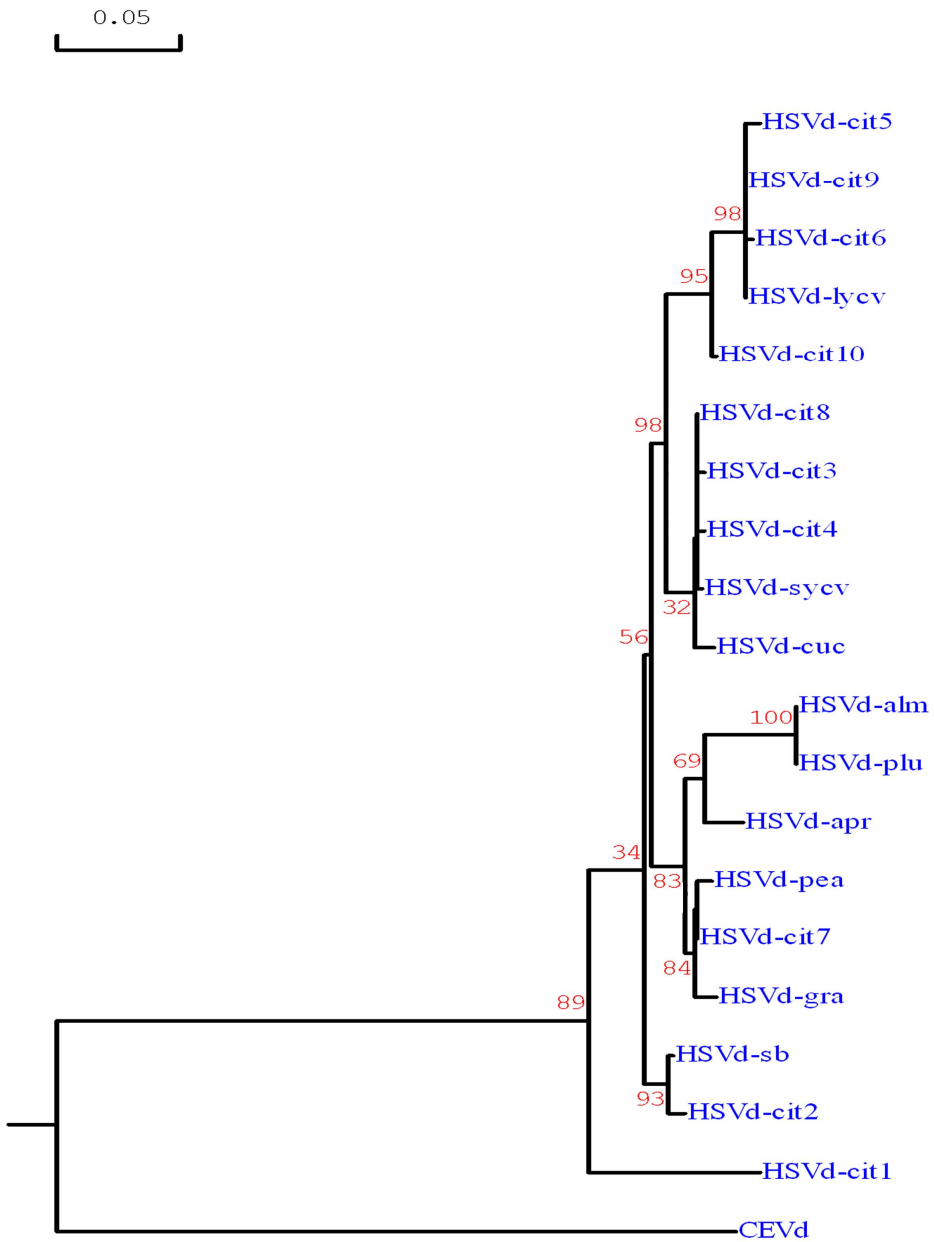
منابع

جهت ملاحظه به صفحات (9-10) متن انگلیسی مراجع شود.

هیچ علائم واضحی توسط HSVd-cit 1 در لیموشیرین و HSVd-cit 2 در لیموترش ایجاد نشده بود.

همان‌طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است یکی از واریانت‌های نزدیک به HSVd-cit 1 واریانت غیر کاکسیای HSVd (8 HSVd) می‌باشد. طبق شکل شماره ۲، بیشترین تفاوت موجود بین این دو جدایه در دامانه متغیر (variable domain) است و این در حالی است که فقط یک نوکلئوتید (شماره ۱۹۲) از ۶ نوکلئوتید (شماره‌های ۱۱۰، ۱۱۲، ۱۱۸، ۱۹۲، ۱۹۷ و ۲۰۰) دخیل در ظهور علائم کاکسیا در آنها با هم متفاوت است و ترکیب نوکلئوتیدی این ناحیه با تمام جدایه‌های مورد بررسی تفاوت فاحش دارد. احتمال آن وجود دارد که HSVd-cit 1 در این میزبان خاص (لیموشیرین) به خاطر تشابه با HSVd-cit 8 در "موتیف بیان علائم کاکسیا" قادر به ایجاد علائم کاکسیا نباشد. HSVd-cit 8 به عنوان یک واریانت غیر بیماری‌زا گزارش شده است (Ito et al. 2002).

از سوی دیگر، HSVd-cit 2 بیشترین شباهت را با HSVd-sb



شکل ۴. دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی ۱۹ جدایه HSVd (جدول ۱) با استفاده از روش neighbor-joining و براساس ۱۰۰۰۰ تکرار. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند.

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed from the alignment of nucleotide sequences of 19 HSVd isolates using the neighbor-joining method based on 10 000 replicates. The numbers indicate bootstrap percentage. See Table 1 for viroid accession numbers.