

شناسایی و تعیین برخی خصوصیات مولکولی ویروئیدهای مو در استان فارس*

IDENTIFICATION AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GRAPEVINE VIROIDS IN FARS PROVINCE

محمد زکی عقل و کرامت اله ایزدپناه**

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۱۶)

چکیده

به منظور تعیین ویروئیدهای مو در فارس نمونه برداری از تاک‌های دارای علائم مختلف یا بدون علائم در چند نقطه انجام شد. از بافت برگ نمونه‌ها نوکلئیک اسید کل استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئیدهای گزارش شده مو، با روش RT-PCR بررسی شد. محصول پی سی آر پس از همسانه سازی تعیین ترادف شد. نتایج نشان داد که تاک‌های مورد بررسی به ویروئیدهای لکه زرد شماره ۱ مو (GYSVd1)، لکه زرد شماره ۲ مو (GYSVD2)، کوتولگی رازک (HSVd) و ویروئید استرالیایی مو (AGVd) آلوده هستند. بیشترین میزان آلودگی در نمونه‌ها مربوط به GYSVd1 و کمترین آن مربوط به AGVd بود. در هیچ موردی آلودگی به ویروئید اگزوکورتیس مرکبات دیده نشد. جدایه‌های GYSVd1 از لحاظ ترادف و ساختمان ثانویه ناحیه بیماری‌زایی مشابه اعضای تیپ دوم این ویروئید و همراه با علائم لکه زرد بودند. در آلودگی توأم این ویروئید با ویروس برگ بادبزی مو بر شدت علائم افزوده می‌شد. در ساختمان ثانویه جدایه‌های GYSVd2 و HSVd بیشترین تفاوت با سایر جدایه‌ها در نواحی بیماری‌زایی و انتهای سمت چپ مشاهده شد. ویروئید استرالیایی مو (AGVd) برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. جدایه ایرانی این ویروئید دارای خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی متفاوتی نسبت به سایر جدایه‌ها و بیشترین تفاوت آن مربوط به ساختمان ثانویه ناحیه بیماری‌زایی بود.

واژه‌های کلیدی: ویروئیدهای مو، ویروئید لکه زرد مو، ویروئید کوتولگی رازک، ویروئید استرالیایی مو، مو

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

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k_izadpanah@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

دارند (Hadidi et al. 2003).

بیماری لکه زرد مو در ۱۹۷۲ شناسایی شد (Taylor & Woodham 1972). علائم این بیماری به صورت لکه‌های زرد رنگ در اطراف رگبرگ‌ها است و در حالت شدید بیماری برگ‌ها سفید می‌شوند (Koltunow et al. 1989). علائم بیماری بسته به شرایط آب و هوایی، واریته گیاه و ژنوتیپ ویروئید متغیر است (Rigden & Rezaian 1993, Hadidi et al. 2003). عامل این بیماری ویروئیدهای GYSVd1 و GYSVd2 گزارش شده‌اند (Koltunow et al. 1989) با وجود این حضور این ویروئیدها در درختان مو همیشه همراه با علائم مزبور نیست (Rigden & Rezaian 1993, Hadidi et al. 2003). ویروئید GYSVd1 دارای ۳۷ درصد شباهت با ویروئید Apple scar skin viroid (ASSVd) است. این ویروئید دارای تنوع ژنتیکی زیادی است و بر اساس ساختمان ثانویه ناحیه بیماری زایی به سه تیپ تقسیم‌بندی می‌شود: در تیپ یک، جدایه‌های بدون علائم و در تیپ دوم جدایه‌های دارای توانایی تولید علائم قرار دارند. تیپ سوم از ایتالیا گزارش شده است و تفاوت زیادی از نظر علائم و ترادف با دو تیپ قبلی دارد (Rigden & Rezaian 1993, Szychowski et al. 1998). ویروئید GYSVd2 دارای ۷۳ درصد همولوژی با GYSVd1 است (Koltunow & Hadidi et al. 2003). Rezaian 1989) و در ناحیه انتهایی سمت چپ (TL) ۴۹ درصد با ویروئید *Tomato planta macho viroid* شباهت دارد. به همین دلیل احتمال می‌دهند که این ویروئید از نوترکیبی بین GYSVd1 با اعضای *Pospiviroid* به وجود آمده است (Hadidi et al. 2003).

ویروئیدها کوچک‌ترین بیمارگرهای گیاهی شناخته شده محسوب شده و از یک رشته آر ان ای تک لای حلقه‌ای تشکیل شده‌اند. این بیمارگرها فاقد چارچوب ژنی فعال هستند و توانایی سنتز پروتئین را ندارند و به رغم فقدان پروتئین پوششی، به علت دارا بودن ساختار پیچیده ثانویه، در مقابل عوامل مخرب نوکلئیک اسیدها مقاومت زیادی دارند (Hadidi et al. 2003). از لحاظ ساختمان ثانویه، محل همانندسازی و مسیر تکاملی، ویروئیدها به دو بالا خانواده *Pospiviroidae* و *Avsunviroidae* تقسیم می‌شوند (Gora-Sochacka 2004). در ساختمان ویروئیدهای خانواده *Pospiviroidae* پنج ناحیه انتهایی چپ (Terminal left)، بیماری‌زایی (Pathogenicity)، محافظت شده میانی (Central conserved)، متغیر (Variable) و انتهایی راست (Terminal right) از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند (Keese & Symons 1985).

تا کنون در مو پنج ویروئید *Grapevine yellow* ، *speckle viroid 1* (GYSVd1) ، *speckle viroid 2* (GYSVd2) ، *Hop stunt viroid* ، *speckle viroid 2* (GYSVd2) ، *HSVd* ، *Australian grapevine viroid* (AGVd) و *Citrus exocortis viroid* (CEVd) شناسایی شده‌اند. (Flores et al. 1985, Hadidi et al. 2003, Rezaian et al. 1988). بر خلاف سایر ویروئیدها، ویروئیدهای مو در این گیاه علائم چندانی ایجاد نمی‌کنند.

ویروئیدهای GYSVd1 ، GYSVd2 و AGVd به جنس *Apocaviroid* ، *HSVd* به جنس *Hostuviroid* و *CEVd* به جنس *Pospiviroid* تعلق دارند. *Apocaviroid* بزرگ‌ترین جنس در خانواده *Pospiviroidae* است و اغلب ویروئیدهای بیماری زای درختان در این جنس قرار

به سه گروه اصلی آلو (Plum)، رازک (Hop) و مرکبات (Citrus) تقسیم می‌شوند و جدایه‌های مو در گروه رازک قرار می‌گیرند. این جداسازی بیشتر نشان‌دهنده تغییرات در ژنوم برای سازگاری با میزبان است (Kofalvi et al. 1997 و Amari et al. 2001).

ویروئید اگزوکورتیس مرکبات دامنه میزبانی طبیعی و آزمایشگاهی وسیعی دارد هر چند در میزبان‌های طبیعی غیر مرکبات علائم چندانی ایجاد نمی‌کند و در مو فاقد علائم است. جدایه‌های CEVd بر اساس شدت علائم و ژنوتیپ به دو گروه تقسیم می‌شوند و جدایه مو این ویروئید در گروه دوم که علائم شدیدی ندارند قرار می‌گیرند. جدایه‌های مو CEVd دارای ۹۲-۸۹ درصد شباهت با جدایه‌های مرکبات هستند. هر چند این ویروئید گسترش جهانی دارد لیکن جداسازی آن از مو تنها از اسپانیا، استرالیا و کالیفرنیا گزارش شده است (Rezaian et al. 1988, Flores et al. 1985 Hadidi et al. 2003).
پیش از این اطلاعات مقدماتی در مورد ویروئید لکه زرد مو در ایران منتشر شده است (Zakiaghil & Izadpanah 2004, 2006). در تحقیق حاضر وجود پنج ویروئید در استان فارس مورد بررسی قرار گرفته و اطلاعاتی درباره فراوانی، ترادف نوکلئوتیدی و ساختمان فیزیکی آنها ارائه گردیده است.

روش بررسی

نمونه‌برداری

برای شناسایی و جداسازی ویروئیدها از تاکستان‌های شیراز و بوانات نمونه‌برداری گردید. در بعضی از نمونه‌ها علائم رگبرگ نواری دیده می‌شد ولی اغلب آنها فاقد علائم بودند.

بین ویروئیدهای GYSVd و ویروس برگ بادبزی مو (Grapevine fan leaf Virus, GFLV) رابطه سینرژستی وجود دارد و در درختانی که هم‌زمان به این بیمارگرها آلوده باشند علائم بیماری تشدید شده و به صورت رگبرگ نواری مشاهده می‌شود (Szychowski et al. 1995).

ویروئید استرالیائی مو دارای ترادف‌های محافظت شده در جنس *Apscaviroid* است لیکن برخلاف سایر اعضا به میزبان‌های علفی مانند خیار و گوجه فرنگی قابل انتقال است. اندازه AGVd ۳۶۹ نوکلئوتید است و احتمالاً از نوترکیبی بین سایر ویروئیدهای مو از جمله GYSVd1 و CEVd به وجود آمده است. میزان شباهت این ویروئید با CEVd و ASSVd به ترتیب ۶۹ و ۴۹ درصد است (Rezaian 1990, Rezaian et al. 1988, Hadidi et al. 2003).
در بین ویروئیدها، AGVd دارای بیشترین میزان باز جفتی در ساختمان ثانویه است. در این ویروئید بیشتر موتیف AAAGAAAA که در ناحیه بیماری‌زایی واقع شده، به صورت ساقه است و این را دلیل عدم توانایی ایجاد علائم در مو توسط این ویروئید دانسته‌اند (Rezaian 1990). میزان تنوع AGVd در مقایسه با سایر ویروئیدهای مو به مراتب کمتر است (Rezaian 1990, Jiang et al. 2009, Gora-sochacka 2004).

ویروئید کوتولگی رازک اولین ویروئید شناخته شده در مو است. این ویروئید در ۱۹۵۲ از گیاهان رازک با علائم کوتولگی جداسازی شد و علاوه بر رازک در مو، خیار، هسته‌داران و دانه داران بیماری‌زاست و ایجاد خسارت زیادی می‌کند. این ویروئید در مو علائم خاصی ایجاد نمی‌کند ولی علائم جدایه‌های مو (HSVd-g) در خیار مشابه با علائم سایر جدایه‌ها از دیگر میزبان‌هاست (Hadidi et al. 2003). جدایه‌های HSVd بر اساس میزبان

جداسازی نوکلئیک اسید

سانتریفوژ و رسوب به دست آمده بعد از شستشو با الکل ۷۰ درصد در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE2 حل گردید و در 65°C - نگهداری شد.

نوکلئیک اسید کل گیاه با استفاده از روش خالص‌سازی توصیف شده به وسیله (Wan Chow Wah & Symons 1997) از بافت مو جداسازی گردید. یک گرم از بافت برگ با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری (۹۵ میلی‌مولار بافر فسفات حاوی ۱۰٪ سوکروز، ۱۵٪ آلومین سرم گاو (BSA)، ۲٪ پلی وینیل پیرولیدون و ۵۳٪ اسکورییک اسید، pH ۷) مخلوط گردید. عصاره به دست آمده به مدت ۲ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm و سپس مایع رونشین به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده در ۲ میلی‌لیتر بافر TE1 (۵۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، pH ۸، حاوی ۱٪ SDS -۲۰٪ مرکاپتواتانول و ۶۵٪ سولفیت سدیم) به حال تعلیق در آورده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ به سوسپانسیون اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در 60°C و بعد یک دقیقه در یخ قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رونشین به لوله جدید منتقل و به آن ۴۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه نگه‌داری در 20°C در ۱۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رونشین به لوله جدید منتقل و به آن معادل ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار (pH ۵/۳) و ۰/۸ حجم ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در 65°C -، مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE2 (۱۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک و یک میلی‌مولار EDTA، pH ۷/۶) حل شد. برای حذف پلی ساکاریدها به محلول فوق تا غلظت نهایی ۲M نمک طعام و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و مجدداً در ۱۴۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه

بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

RT-PCR جهت شناسایی ویروئیدهای مو به صورت دو مرحله‌ای تنظیم گردید.

الف) ساخت cdNA

جهت ساخت cdNA از آنزیم MMuLV مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد.

ساخت cdNA از ژنوم ویروئید به روش "hot start" صورت پذیرفت. به این منظور در ابتدا ۱۰ میکرولیتر نوکلئیک اسید با ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس اختصاصی هر ویروئید مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در 70°C و سپس به مدت یک دقیقه در یخ قرار داده شد و سایر مواد لازم شامل ۵۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک، pH ۸/۳، ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۴ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱۰ میلی‌مولار دی تیو تریتول، یک میلی‌مولار dNTP (غلظت‌های نهایی) و ۲۰۰ واحد آنزیم MMuLV reverse transcriptase) به آماده اضافه و به مدت یک ساعت در 42°C نگهداری شد. غیر فعال کردن آنزیم با حرارت دادن آماده به مدت ۱۰ دقیقه در 70°C انجام پذیرفت.

ب) PCR

هماندسازی ژنوم ویروئیدها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) صورت پذیرفت. بهینه‌سازی شرایط PCR با استفاده از PCR optimization kit (Roche) صورت پذیرفت. جهت افزایش راندمان و

جدول ۱. فهرست آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی ویروئیدهای مو

Table 1. Primers used for amplification of grapevine viroids

ویروئید	آغازگر	ترادف (5'....3')	دمای اتصال	منبع
Viroid	Primer	Seq (5' 3')	(°C)	Ref.
GYSVd1	GV1(-)	GCG GGG GTT CCG GGG ATT GC	60	Staub <i>et.al</i> 1995
	GV2(+)	TAA GAG GTC TCC GGA TCT TCT TGC		Staub <i>et.al</i> 1995
	C4(-)	CGA CGA CGA GGC TCA CT	58	Wan Chow Wah & Symons 1997
	H4(+)	ACC CCC GCT AAG AAG TC		Wan Chow Wah & Symons 1997
GYSVd2	C3(-)	ACCGGCTTCGGAGATAGAAG	55	Designed locally
	H1(+)	TTGAGGCCCGGCGAAACGC		Wan Chow Wah & Symons 1997
HSVd	HSV+	GGC AAC TCT TCT CAG AAT CCA GC	59	Wan Chow Wah & Symons 1997
	HSV-	CCG GGG CTC CTT TCT CAG GTA AGT		Wan Chow Wah & Symons 1997
AGVd	C1(-)	CTCGACGACGAGTCGCCAGGTGAGTCTT	59	Wan Chow Wah & Symons 1997
	H1(+)	GTCGACGAAGGGTCCTCAGCAGAGCACC		Wan Chow Wah & Symons 1997
CEVd	C1(-)	CGAAAGGAAGGAGACGAGCTCCTG	55	Wan Chow Wah & Symons 1997
	H3(+)	TTCAGGGATCCCCGGGGAA		Wan Chow Wah & Symons 1997

علفی مانند خیار و گوجه فرنگی انجام شد (Rezaian *et al.* 1988). گیاهان مایه‌زنی شده به مدت چهار هفته در گلخانه نگهداری شدند و علائم آنها ثبت گردید. برای حصول اطمینان از آلودگی یا عدم آلودگی، گیاهان مایه‌زنی شده به روش پی سی آر مورد آزمایش قرار گرفتند.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

همسانه‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت Ins T/A clone TM PCR product cloning kit (Fermentas) انجام و دی ان ای همانندسازی شده از ژنوم ویروئیدها بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در ناقل pTZ57R/T وارد شد (Sambrook *et al.* 1989). ناقل نو ترکیب حاصل جهت تکثیر به باکتری *E. coli* سویه DH5α

حساسیت PCR بعضی از مواد مکمل مانند Dimethyl- sulphoxide (DMSO)، گلیسرول و پر سولفات آمونیوم نیز به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. پروفیل دمایی واکنش شامل یک دقیقه در ۹۵ °C برای واسرشته کردن ابتدایی، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای باز جفتی بمدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و بدنبال آن یک چرخه در ۷۲ °C به مدت هفت دقیقه بود.

مایه‌زنی مکانیکی و انتقال به میزبان‌های علفی

انتقال ویروئیدهای شناسائی شده به میزبان‌های علفی با مایه‌زنی مکانیکی یا تزریق نوکلئیک اسید در ساقه گیاهان

Symons 1997) از راندمان و حساسیت کمتری نسبت به جفت آغازگرهای Gv_1/Gv_2 (Staub *et al.* 1995) برخوردار است و در بعضی موارد علی‌رغم آلودگی گیاه جفت آغازگرهای C_4/H_4 قادر به شناسایی ویروئید در بافت گیاه نبود (شکل ۲). به همین دلیل در سایر مراحل از آغازگرهای Gv_1/Gv_2 جهت همانندسازی و شناسایی این ویروئید استفاده شد. ژنوم ویروئیدها غنی از بازهای گوانین و سیتوزین است. وجود مقادیر زیاد این دو باز و ساختارهای ثانویه متعدد باعث کاهش حساسیت پی سی آر شده و موفقیت آن را کاهش می‌دهد. در این موارد از مواد مکمل در واکنش استفاده می‌شود (Frackman *et al.* 1998 و Kitade *et al.* 2003). هم‌چنین (O'Connell 2002, Sambrook *et al.* 1989). هم‌چنین غلظت این بیمارگرها در بافت‌های گیاه کم است. اضافه کردن مواد مکمل به واکنش پی سی آر که باعث تشدید واکنش شده و ساختارهای ثانویه را کاهش می‌دهند ضمن افزایش حساسیت سیستم در شناسایی این عوامل به وسیله پی سی آر کمک می‌کند. در واکنش‌های هیبریداسیون برای شناسایی ویروئیدها نیز از موادی که ساختارهای ثانویه را کاهش می‌دهند استفاده شده است (Nakahara *et al.* 1998 و Sambrook *et al.* 1989). با توجه به این‌که در سمت چپ ساختمان ثانویه ناحیه Premelting region قرار دارد که غنی از آدنین و یوراسیل است و خواص ترمودینامیکی ویژه در این ناحیه و توجه به این نکته که در این ناحیه دمایی کمتری برای باز شدن ساختمان ثانویه لازم است بنابراین آغازگرهای Gv_1/Gv_2 که در این ناحیه متصل می‌شوند نسبت به آغازگرهای C_4/H_4 از حساسیت بیشتری برخوردار هستند.

انتقال داده شد و پس از خالص‌سازی پلاسمید (Holmes & Guigley 1981) تعیین ترادف شد. ترادف حاصل در سایت NCBI با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه و در برنامه Mega4 با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining نزدیکی آن با سایر سویه‌ها تعیین شد. ترسیم ساختار ثانویه ویروئید به وسیله برنامه RNA Draw V10.1 انجام شد.

آزمون Dot - blot

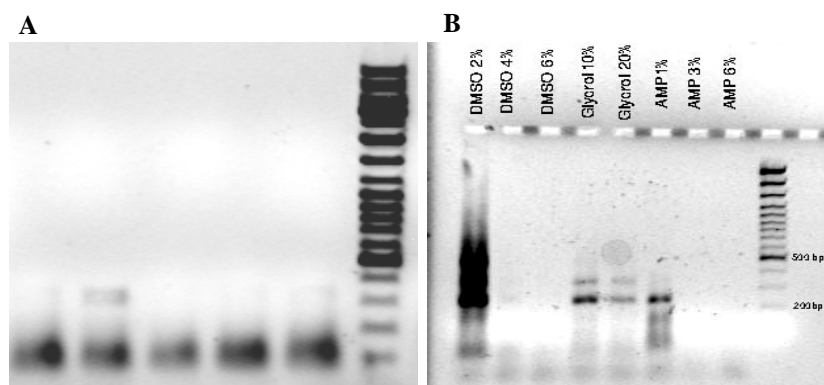
تعیین آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از شناسگر اختصاصی ویروئیدها انجام شد. تهیه شناسگر با استفاده از محصول حاصل از PCR به وسیله کیت DIG high prime DNA labeling (Roche) and detection starter kit I انجام شد. آزمون هیبریداسیون مطابق با روش توصیه شده به وسیله سازنده انجام گرفت. پانزده میکرو لیتر نوکلئیک اسید خالص شده از بافت مو به عنوان الگو در هیبریداسیون به کار برده شد.

نتیجه و بحث

بهینه‌سازی شرایط RT-PCR

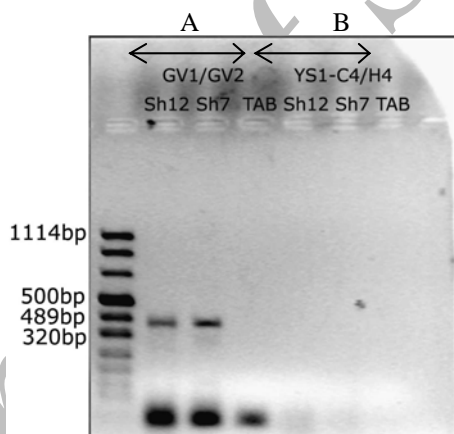
کاربرد کیت PCR optimization kit نشان داد بهترین شرایط PCR شامل ۲۰mM تریس - اسید کلریدریک و ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، pH ۸، حاوی ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم است. شدت واکنش PCR با اضافه کردن ۱۰٪ DMSO، ۱۰ درصد گلیسرول یا یک درصد پرسولفات آمونیوم تشدید گردید (شکل ۱).

در این تحقیق از دو آغازگر برای شناسایی ویروئید GYSVd1 استفاده شد. نتایج نشان داد که در شرایط مشابه جفت آغازگرهای C_4/H_4 (Wan Chow Wah &



شکل ۱. نقش الکتروفورزی محصول پی سی آر ویروئید GYSVd1 با جفت آغازگر C₄/H₄ بدون اضافه کردن مکمل (A) و با اضافه کردن مکمل های DMSO، گلیسرین یا پرسولفات آمونیوم (B). M: نشانگر دی ان ا

Fig. 1. Electrophoretic pattern of GYSVd1 using C₄/H₄ primer pair, without adjuvant (A) and after addition of DMSO, glycerol or ammonium persulfate (B). M: DNA marker



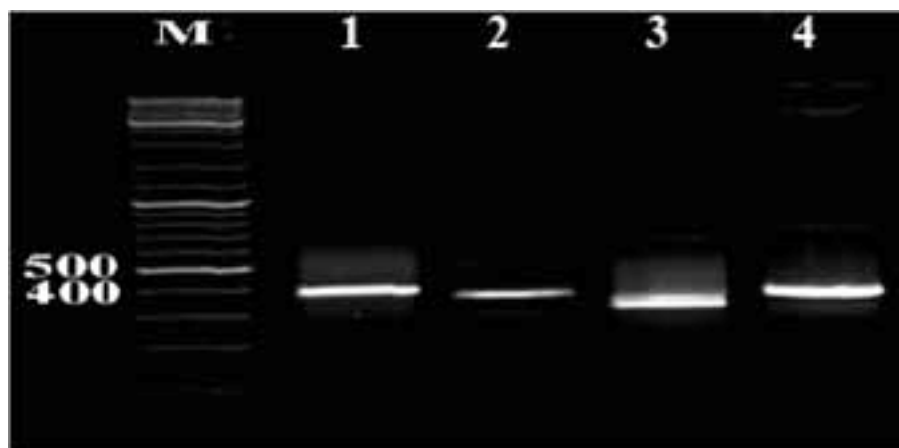
شکل ۲. تفاوت در نقش الکتروفورزی محصول پی سی آر ویروئید GYSVd1 با آغازگرهای GV1/GV2 (A) و C₄/H₄ (B)

Fig. 2. Difference in electrophoretic pattern of PCR products of GYSVd1 using GV1/GV2 (A) and C₄/H₄ (B) primer pairs.

ویروئید AGVd برای اولین بار در ایران تشخیص داده شد. در بین ۳۰ نمونه مو که مورد آزمایش قرار گرفتند بیشترین میزان آلودگی مربوط به ویروئیدهای عامل لکه زرد مو شماره ۱ و ۲ و کوتولگی رازک به ترتیب با ۷۱/۸۷، ۶۸/۷۵ و ۶۲/۵ و کمترین درصد آلودگی مربوط به ویروئید استرالیایی مو با ۱۸/۷۵ درصد بود. تنها دو نمونه از لحاظ تمام ویروئیدها منفی بودند. در هیچ یک از نمونه‌ها CEVd

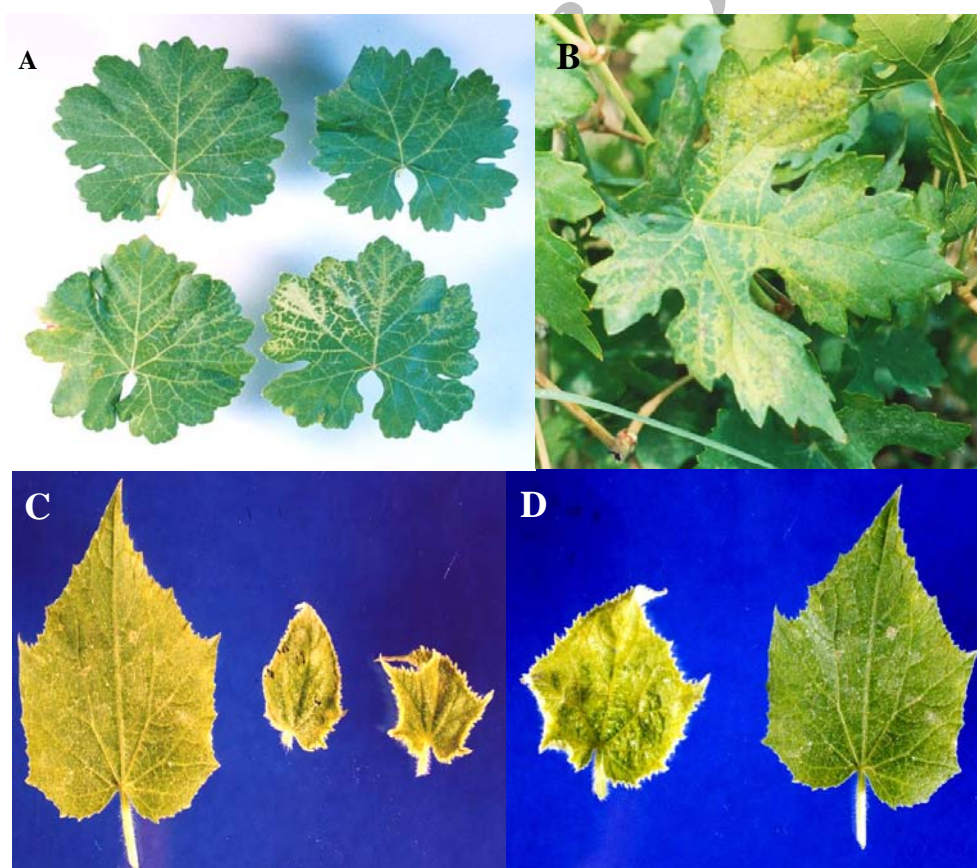
تعیین آلودگی نمونه‌ها و علائم

اکثر نمونه‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها به ویروئیدهای GYSVd1، GYSV2 و HSVd آلوده بودند. در تعدادی از نمونه‌ها نیز ویروئید AGVd شناسایی شد (شکل ۳ و جدول ۲). ویروئیدهای عامل لکه زرد مو و کوتولگی رازک پیش از این از تاکستان‌های ایران گزارش شده بودند (Zakiaghl & Izadpanah 2004, 2006) لیکن



شکل ۳. نقش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای چهار ویروئید مو از فارس. M: نشانگر، ۱: GYSVd1، ۲: GYSVd2، ۳: HSVd، ۴: AGVd.

Fig.3. Electrophoresis pattern of PCR products of four grapevine viroids in Fars. M: DNA marker, 1: GYSVd1, 2: GYSVd2, 3: HSVd, 4: AGVd.



شکل ۴. (A) علائم بیماری لکه زرد مو آلوده به GYSVds، (B) تشدید علائم در آلودگی توأم با ویروس برگ بادبزنی مو؛ (C) پیچیدگی و کوچک شدن برگ و (D) چروکیدگی برگ در خیار در اثر آلودگی به ویروئید کوتولگی رازک

Fig. 5. Yellow speckle symptoms (A), and severe symptoms in grapevine infected with both GYSVds and GFLV (B); leaf malformation (C) and rugosity (D) in HSVd-infected cucumber

جدول ۲. نتیجه آزمون‌های PCR و Dot Blot در شناسایی چهار ویروئید مو و ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) از تاک‌های بوانات (B) و شیراز (Sh)

Table 2. Results of RT-PCR and/or dot bolt hybridization tests in identification of four viroids and GFLV in grapevine samples from Bavanat (B) and Shiraz (Sh). All samples were negative for CEVd.

Sample	Location	Symptoms	GYSVd1	GYSVd2	HSVd	AGVd	GFLV
SH-2	Sh	Vein banding	+	+	+	+	-
SH-8	Sh	s.V.B	+	+	+	+	+
SH-5	Sh	s.V.B	+	+	+	-	+
SH-12	Sh	Vein banding	+	+	-	+	-
SH-7	Sh	s.V.B	+	+	-	-	+
SH-6	Sh	Vein banding	+	+	+	-	-
SH-3	Sh	Vein banding	-	-	-	-	-
SH-4	Sh	Vein banding	+	-	-	-	NT
SH-10	Sh	Vein banding	-	+	-	+	-
SH-11	Sh	Vein banding	+	+	+	-	-
SH-x2	Sh	Vein banding	+	-	-	-	NT
SH-x3	Sh	Vein banding	-	+	+	-	NT
Tab	Tabriz	s.V.B	+	+	-	+	+
M-1-7	B	s.V.B	+	-	+	-	+
M-1	B	Fan leaf	+	+	+	-	+
B-1	B	None	+	+	+	-	NT
B-3	B	None	+	+	+	-	-
B-4	B	None	+	-	+	-	+
B-5	B	None	-	+	+	-	+
B-6	B	None	-	+	+	-	+
B-7	B	None	+	+	-	-	NT
B-8	B	None	+	-	+	-	NT
B-9	B	None	-	-	-	-	+
B-10	B	None	+	+	-	-	+
B-12	B	None	-	-	+	-	+
B-13	B	None	+	+	+	-	-
akb1	Sh	None	+	+	+	+	+
akb2	Sh	None	+	+	+	-	+
akb3	Sh	None	+	+	+	-	+
akb4	Sh	None	+	+	+	-	-

+: positive
-: negative

NT: not tested
s.V.B.: severe vein banding

استرالیایی مو در خیار علائم کوتولگی ایجاد کرد و در گوجه فرنگی علاوه بر کوتولگی تولید بدشکلی برگ، کوچک ماندن برگچه‌ها و پیسک خفیف نمود. علائم سه تا چهار هفته پس از مایه‌زنی مشاهده شد. از این گیاهان باند ۳۰۰ bp و ۳۷۰bp مربوط به HSVd و AGVd حاصل شد. جدایه‌های گزارش شده AGVd در خیار تولید کوتولگی و در گوجه فرنگی ایجاد نکروز انتهائی می‌کنند (Rezaian *et al.* 1988) لیکن جدایه ایرانی این ویروئید علائم نکروز جوانه انتهائی را تولید نکرد و ایجاد علائم بدشکلی برگ و پیسک در گوجه فرنگی به وسیله این ویروئید تازگی دارد.

در هیچ مورد آلودگی به ویروئیدهای GYSVds در میزبان‌های علفی مشاهده نشد.

جدایه‌های GYSVd1 (DQ408542, FJ940920) دارای ۳۶۷-۳۶۸ نوکلئوتید بودند و ۹۳-۸۹ درصد با جدایه‌های بانک ژن مشابهت داشتند. بیشترین قرابت این جدایه‌ها با جدایه استرالیا بود (شکل ۵A). این جدایه‌ها از میزبان‌های دارای علائم بیماری لکه زرد مو جداسازی شدند و ترادف و ساختمان ثانویه ناحیه بیماری‌زایی آنها مشابه با اعضای تیپ دوم و سوم (Rigden & Rezaian 1993, Szychowski *et al.* 1998) این ویروئید بود (شکل ۵B). به رغم اختلاف کافی این جدایه‌ها برای ایجاد یک تیپ جدید، تعداد بیشتری جدایه برای این منظور می‌بایست تعیین ترادف شود. از لحاظ ترادف و ساختمان ثانویه لوپ سنجاق سری اول (HP I) این جدایه‌ها با واریانت IX (Polivka *et al.* 1996) شباهت داشتند (شکل ۵C). بیشترین تغییرات جدایه‌های ایرانی نسبت به جدایه تیپ در ناحیه بیماری‌زایی و انتهای سمت راست مشاهده شد (شکل ۶A).

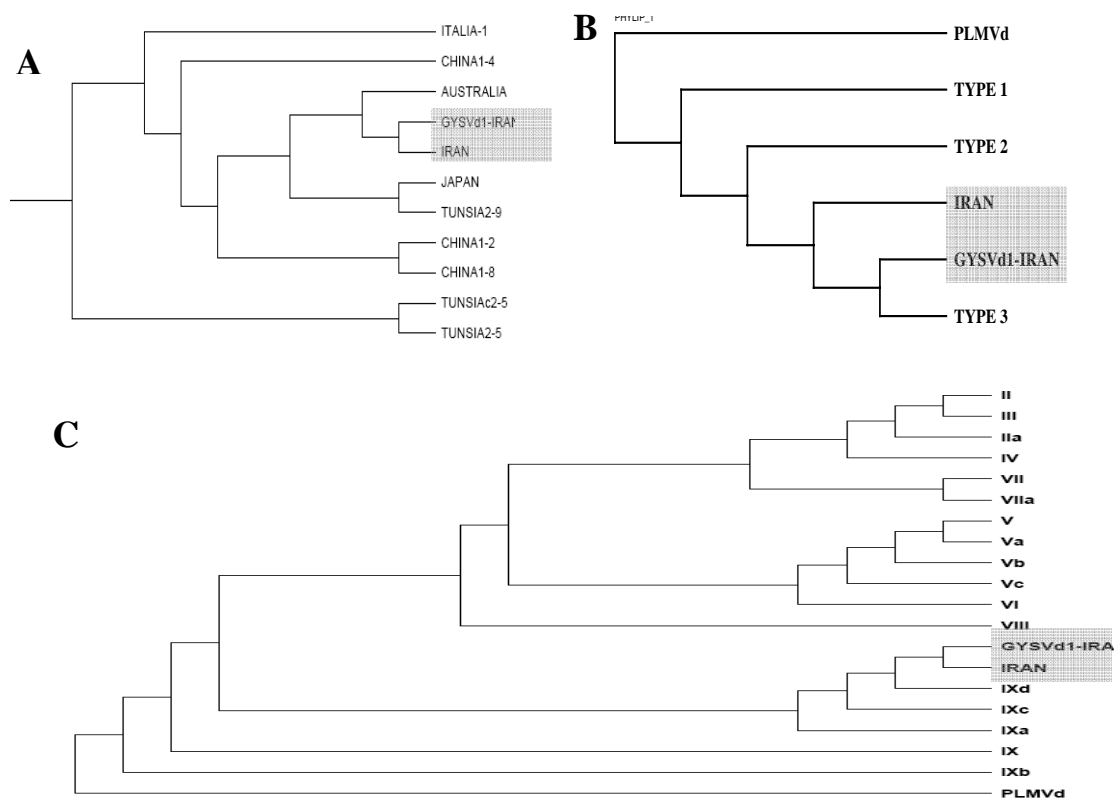
جدایه‌های ایرانی ویروئید GYSVd2 دارای ۳۶۲-۳۶۱

ردیابی نشد هر چند این ویروئید از مرکبات در جنوب کشور جداسازی شده است (Bagherian *et al.* 2009). از آنجا که نمونه‌برداری‌ها در مناطقی نسبتاً خنک و بدون کشت مرکبات انجام شده، عدم آلودگی آن در مو دور از انتظار نیست.

ویروئیدهای GYSVds و HSVd در بیشتر تاکستان‌های دنیا شیوع دارند و اغلب همراه با یکدیگر هستند (Flores *et al.* 1985 و Hadidi *et al.* 2003 و Rezaian *et al.* 1988). پیش از این AGVd علاوه بر استرالیا از کشورهای چین، تونس و ایالت متحده گزارش شده بود (Elleuch *et al.* 2002 & Al Rwahnih *et al.* 2009). احتمالاً این ویروئید نیز مانند سایر ویروئیدهای مو دارای گسترش جهانی است، لیکن به علت فقدان علائم خاص و غلظت پایین تاکنون تنها از چند کشور گزارش شده است.

در تاک‌های دارای علائم لکه زرد (شکل ۴A) حداقل یکی از ویروئیدهای GYSVds مشاهده گردید. در نمونه‌هایی که این ویروئیدها در آلودگی هم‌زمان با ویروس برگ بادبزی مو بودند شدت علائم افزایش یافته و به صورت رگبرگ نواری شدید مشاهده می‌شد (شکل ۴B) که احتمالاً به علت تأثیر متقابل این دو بیمارگر بر یکدیگر است (Szychowski *et al.* 1995). علائم بیماری در ماه‌های گرم سال مشخص تر بود و علائم اغلب در برگ‌های پایین تاک دیده می‌شد. در بعضی موارد گیاهان بدون علائم مشخصی آلوده به این ویروئیدها بودند. در تاک‌های آلوده به HSVd علائم خاصی ملاحظه نشد.

ویروئید کوتولگی رازک در خیارهای مایه زنی شده علائم کوتولگی، پیچیدگی شدید برگ‌ها و چروکیدگی برگ (Rugosity) ایجاد کرد (شکل ۴C,D). ویروئید



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی رابطه جدایه‌های ایرانی ویروئید لکه زرد با بعضی جدایه‌های بانک ژن (A)، رابطه آنها با تیپ‌های بیماری‌زای ویروئید GYSVd1 (B) و موقعیت جدایه‌های ایرانی از لحاظ لوپ سنجاق سری ۱ (C)

Fig. 5. Phylogenetic tree of Iranian and Genbank isolates of GYSVd1 (A), relationship of Iranian isolates of GYSVd1 with symptom inducing types of GYSVd1 (B), and dendrogram comparing Iranian isolates of GYSVd1 with 9 types of Hpi structure.

جدایه‌های بانک ژن بودند و بیشترین قرابت را با جدایه‌های مو در زیر گروه رازک این ویروئید داشتند (شکل ۷). در بین این جدایه‌ها حداقل پنج واریانت شناسایی شد و بیشترین تفاوت این واریانت‌ها با جدایه تیپ در ناحیه بیماری‌زایی بود. یکی از جدایه‌های ایرانی دارای ساختمانی متفاوت با سایر جدایه‌های گزارش شده در ناحیه بیماری‌زایی و انتهای چپ بود. در این جدایه ترادف سنجاق سری محافظت شده انتهایی (TCH) نسبت به سایر جدایه‌ها دارای تفاوت‌هایی بود و چندین نوکلئوتید در ساختار لوپ انتهایی وارد شده بود (شکل C, D).

نوکلئوتید طول بودند. این ویروئیدها در اغلب موارد در آلودگی توأم با ویروئید GYSVd1 وجود داشتند هرچند در تعدادی از نمونه‌ها به تنهایی نیز ردیابی شدند. دو جدایه ایرانی GYSVd2 که تعیین ترادف شدند (FJ940922 و FJ940921) از لحاظ وجود یا فقدان مولکول آدنین ۲۱۵ (A215) در انتهای راست با یکدیگر تفاوت داشتند و در سایر قسمت‌ها شبیه همدیگر بودند. بیشترین تفاوت این جدایه‌ها با استرین تیپ در دو ناحیه بیماری‌زایی و انتهای سمت چپ بود (شکل B).

جدایه‌های ایرانی HSVd (EU647233) به طول ۳۰۰-۲۹۵ نوکلئوتید دارای ۹۹-۹۰ درصد همولوژی با

A

```
G U CU U- UGU U - C GAA CC - C- CCU- AA AA- U- AGA - U - UC G-- GA - U C GA - CU -
CG U CUC ACC U-- C-- - A U
C GA CUUCUUG UG GGUUCC GG UU CAC UCG GG GC CG GGA GC AG GAAGA AGGGGC GGG GGAG GAG CC GUC UCGAC AG GGG GCA UCC GU GC GAGCUG
GU ACG CCAG CCUCGGG ACGC GCU UGGGC GGAAG GUC U
C CU GGAGAAU GC CCAAGG CC AA GUG AGC CC CG GC CCU CG UC UUUUCU UUUCCG CCC CCUU CUC GG CAG AGCUGA UC CCU CGU AGG CA CG CUCGGC
CA UGC GSUC GGAGUUC UGCG CGA AUCCG UCUUU CAG C
U - C- CC CC- U C - G-- C- C AA UGUU AG AAC UU AAA G - U UU GCG A- G C - AC C UU G
A- - C-- C-- CUU CUU A U U
```

B

```
G A CU U- UGU A C GAA C CGC- CU - GAAA A C AGA -- U - UC G-- GAA- U CCGAA C C G
CG -- CU C - - CAC- CGC - C
C GAUC UUUUC UG GGUUCC GGUU CAC UCG GGC UC GGAC GC AGA AGA GAAGGG CC GGG GAA GAG CC GUC UCGAC GGGG GCAUU GAG UGG CU GCGU
UC CGG CC UC G ACCG CCGAG UAGAA AAGSUC U
C CUGG AAAAG GU CCAAGG CUAA GUG AGC CCG AG CUUG CG UCU UUU UUUUCC GG CCC CUU CUC GG CAG AGCUG CCUC CGUAG CUC GUC GG CGCA
AG GCC GG AG U UGCG GCUC AUUUU UUUACG C
U - C- CC CCC G - GCC - CAAC UU U AGUC C A AG- GC - C UU GCG AUUCG - AAUC- U C G
A- CG C- A U CGAA U-- C G
```

C

```
U AAUU UUG---- AUCA A-- AA AAAA -- GA U UU U AA A--- - G- AACUCU - --- AU-- CG C
- C -- -- C- U - A-
C GGGG CUCGAG CCGC GGCA GC AGA ACA AGGCAGG GG AC ACC GAGA GG GCC CCGG GC UCUC-A GA CCAG AGAGG
GUGGAGA GA GGG CG CG GUG UC GGA GUAG G
CCCC GAGUUC GGCG CCGU CG UCU UGU UUCGUCC CC UG UGG CUCU CC CGG GGCC CG AGAG-U CU GGUC UCUUC
CAUUUCU CU CCC GC GC CAC AG CUU CGUC G
U ---- UCUCUA ---- CUC AG AUC- UU AA C CU - -- ACUA U AG C----- G AGC UCUC U- -
U U U UA UAC AA - C UC
```

D

```
UA A- G - UCC G AA UCUUC - A CC G U CCC AAC-- U- U AA A--- - G- AACUCU - --- AU-- CG C
- C -- -- C- U - A-
C G U CGG A GAUU GC C U CAGA U A CAAA AGC GU U ACC GAGA GG GCC CCGU GC UCUC A GA CCAG AGAGG GUGGAGA
GA GGG CG CG GUG UC GGA GUAG G
C C G GUU U CUAG CG G G GUCU A U GUUUU UCG CA G UGG CUCU CC CGG GGCC CG AGAG U CU GGUC UCUUC CAUUUCU
CU CCC GC GC CAC AG CUU CGUC G
UC CC A C CUC G CC UCUC A - UC - - UC- ACCCU CU - -- ACUA U AG C----- - AGC UCUC U- -
U U U UA UAC AA - C UC
```

E

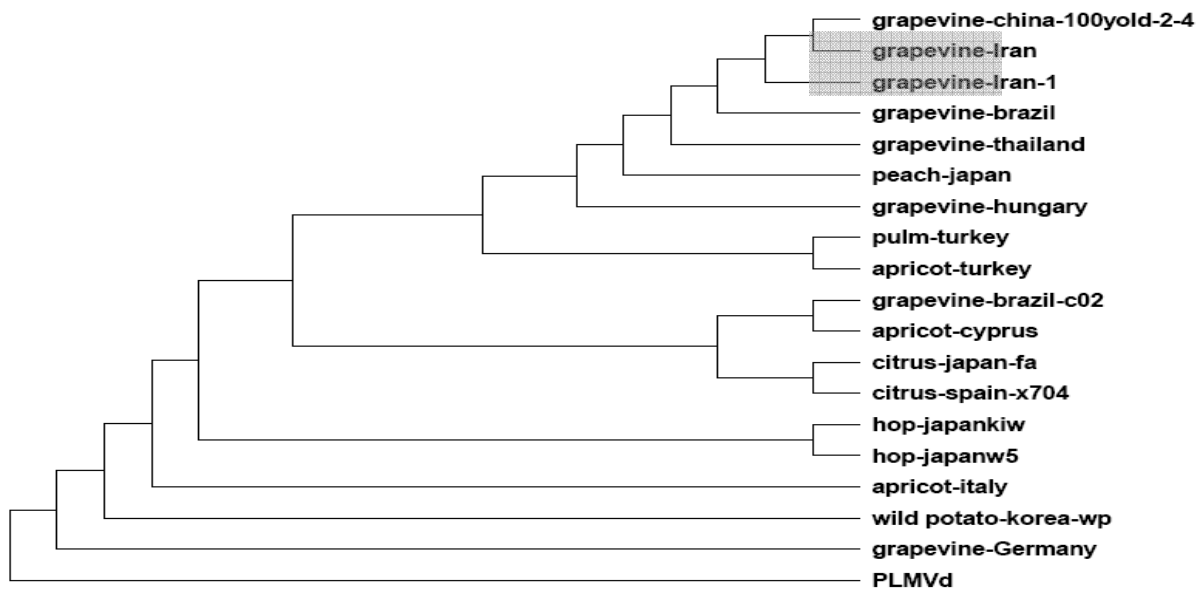
```
G A- C U- UGU U C CGAA- C GAA UA AAAA - GUAA CAC -- C- CGU GAA- U U AG A-- G
AGG U AA C C CA- GACU- U
U GGC CCAA UAG GGUUCC GG UA ACAC GG CGC GC GGAAGA GAUAAGA AAGCUGG GACU CU GGCGA UCGU UCGAC GGG CC CAGC AGC CC GCAGG
CGCUA GCAGG CG UAGGGGU CU GCGGAG GAAGAAC C
- CCG GGUU GUC CCAAGG CC AU GGUG CC GCG CG CCUUUUU CUUUUUU UUGUACC CUGG GA CUGCU GGCG AGCUG CCC GG GUCG UCG GG CGUCC
GCGGU CGUUC GU GUCCCUA GG UGUCUC CUUUUUU C
C GA U CC U-- C U CUGGC - GG- UC AUC- C AACC C-- CC CA --- AUUCG U - A- AAG A
AAA - GC U A ACGA ACUUU G
```

شکل ۶. ساختمان ثانویه پیش‌بینی شده برای جدایه‌های ایرانی ویروئیدهای مو (A) GYSVd1، (B) GYSVd2، (C) HSVd، (D) HSVd7 و (E) AGVd

Fig. 6. Predicted secondary structure of Iranian isolates of grapevine viroids GYSVd1 (A), GYSVd2 (B), HSVd (C), HSVd7 (D) and AGVd (E)

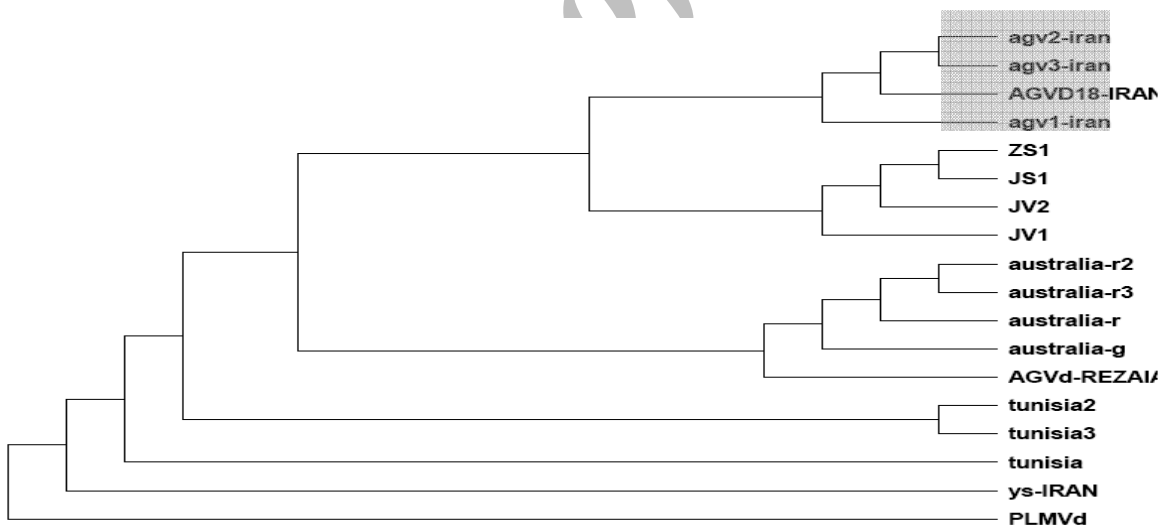
مطالعه بیماری‌زایی آن است. اندازه جدایه‌های AGVd ۳۷۱-۳۷۰ نوکلئوتید بود. جدایه ایرانی AGVd-Ir (FJ940923) ۹۸-۹۰ درصد با ترادف‌های ویروئید استرالیایی مو در بانک ژن مشابه بود و بیشترین قرابت را با جدایه‌های چین دارا بود (شکل ۸). جدایه ایرانی (۳۷۱ نوکلئوتیدی) ویروئید استرالیایی مو دارای دو نوکلئوتید بیشتر نسبت به سایر جدایه‌های این ویروئید بود و این تغییر باعث ایجاد یک لوپ اضافه در

موتیف TCH در جنس *Hostuoviroid* محافظت شده است. تغییر در این موتیف ممکن است باعث از دست رفتن عفونت‌زایی یا تغییر در شدت و نوع علائم شود. در موارد مشابه در جنس *Pospiviroid* تغییر در خواص ترمودینامیکی انتهای سمت چپ باعث ناپایداری ویروئید یا افزایش شدت بیماری شده است (Gora-Sochacka 2004). Owens *et al.* 1995, 1996. برای بررسی تأثیر این تغییرات نیاز به تولید همسانه عفونت‌زای این جدایه و



شکل ۷. دندروگرام رابطه دو جدایه ایرانی با سایر جدایه‌های گزارش شده ویروئید کوتولگی رازک

Fig. 7. Dendrogram showing relationship of two Iranian isolates of HSVd-g with other isolates of HSVd



شکل ۸. دندروگرام رابطه چهار جدایه ایرانی AGVd با سایر جدایه‌های گزارش شده این ویروئید

Fig. 8. Dendrogram showing relationship of the Iranian isolates of AGVd with other Genbank isolates of this viroid.

کاهش باز جفتی در ناحیه بیماری‌زایی جدایه ایرانی AGVd ممکن است باعث تغییر در شدت علائم و یا بیماری‌زایی ویروئید شود. همان‌گونه که پیشتر ذکر شد علائم این جدایه به خصوص در گوجه فرنگی متمایز از

ساختمان ثانویه در ناحیه بیماری‌زایی این ویروئید شده است. این جدایه‌ها در ناحیه بیماری‌زایی بیشترین تفاوت را نسبت به سایر جدایه‌ها دارا بودند و در دیگر مناطق اغلب مشابه با استرین تیپ بودند (شکل ۶E).

منابع

- سایر جدایه‌های گزارش شده بود (Rezaian 1990). برای تعیین تأثیر این تغییر، همسانه عفونت‌زای ویروئید باید تهیه شود و با استفاده از ژنتیک معکوس و حذف بازهای اضافه تأثیر آنها در زیست‌شناسی ویروئید مشخص شود.
- جهت ملاحظه به صفحات (69-71) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID