

آزمون نتاج جدایه ایرانی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات در دو پایه حساس و متحمل

مرضیه قباخلو^۱، اکبر دیزجی^{۲*}، احد یامچی^۳ و حشمت‌الله رحیمیان^۴

۱. ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۴. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱)

چکیده

ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus exocortis viroid* (CEVd)، عامل یکی از بیماری‌های مهم اقتصادی به نام اگزوکورتیس مرکبات است. در این پژوهش، چندشکلی توالی نوکلئوتیدی و ساختار جمعیت CEVd در دو میزبان متحمل و حساس (به ترتیب، نارنج (*Citrus aurantium* L.) و سیترونج (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. sinensis* (L.)) بررسی شد. رونوشت تمام طول برآمده از جدایه ایرانی CEVd-S1 در شرایط درون شیشه‌ای جهت آلوده‌سازی مکانیکی نهال‌ها استفاده شد. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های CEVd با به‌کارگیری چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای (SSCP) و توالی‌یابی نوکلئوتیدی تعیین شد. بررسی ژنوم ویروئید همسانه‌سازی شده در این دو میزبان، تأثیر گونه میزبان بر تغییرهای ژنتیکی جمعیت برآمده از یک جدایه CEVd را آشکار کرد. نتیجه‌های این پژوهش نشان دادند که ساختار جمعیتی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات در دو میزبان حساس و متحمل متفاوت و در میزبان متحمل متنوع‌تر از میزبان حساس است. بررسی ساختار ثانویه ترمودینامیکی واریانت‌ها نشان داد که تغییرهای شناسایی شده در ژنوم ویروئید در این پژوهش تأثیر چشمگیری در ساختار کلی میله‌ای شکل ویروئید نداشته است.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای، ساختار ژنتیکی جمعیت، واریانت، ویروئید اگزوکورتیس مرکبات.

Progeny analysis of Iranian *Citrus exocortis viroid* isolate in two sensitive and tolerant rootstocksMarzie Ghobakhloo¹, Akbar Dizajji^{2*}, Ahad Yamchi³ and Heshmat Rahimian⁴

1, 2. Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4. Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Jul. 15, 2018 - Accepted: Nov. 22, 2018)

ABSTRACT

Citrus exocortis viroid (CEVd) is the causal agent of exocortis disease, the economically important viroid disease of citrus. In this research, sequence polymorphism and population structure of CEVd were investigated in CEVd tolerant and sensitive hosts (sour orange (*Citrus aurantium* L.) and citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *C. sinensis* (L.)), respectively) seedlings. Full-length *in vitro* transcript of single sequence CEVd-S1 isolate was used for mechanical inoculation. The genetic diversity of CEVd populations was estimated in two citrus hosts by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing. The analysis of cloned DNAs recovered from infected hosts by this isolate demonstrated that host species was effective on the variability within a single CEVd isolate. The amount and composition of the genetic diversity were different among the two hosts, and was higher in the tolerant host compared with the sensitive one. Furthermore, the analysis of thermodynamic secondary structures illustrated that nucleotide changes identified in this study did not induce major modifications in the viroid rod-like secondary structure.

Keywords: *Citrus exocortis viroid*, Population structure, SSCP, Variant.

* Corresponding author E-mail: adizajji@ut.ac.ir

مقدمه

ویروئیدها به عنوان کوچکترین عوامل بیمارگر گیاهی، تنها متشکل از یک مولکول RNA حلقوی تک‌لا (۲۴۶-۴۰۱ نوکلئوتید) با ساختارهای ثانویه پیچیده هستند. ویروئیدها بدون چارچوب ژنی و پوشش پروتئینی بوده و به صورت کاملاً آزاد از ویروس‌های گیاهی دیگر همانندسازی می‌کنند (Di-Serio et al., 2017). اعضای تیره *Pospiviroidae* با گونه تپ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) دارای ساختاری میله‌ای شکل بدون انشعاب هستند و پنج دامانه کارکردی/ساختاری در آن تعریف می‌شود که شامل دامانه‌های حفاظت‌شده مرکزی، بیماری‌زایی، متغیر، انتهایی سمت چپ و انتهایی سمت راست است و محل همانندسازی و تجمع این ویروئیدها درون هسته سلول گیاهی است (Di-Serio et al., 2017). بیماری اگزوکورتیس مرکبات نخستین بار در سال ۱۹۴۸ در کالیفرنیا به عنوان رخداد پوسته‌پوسته شدن تنه درختان مرکبات دارای پایه نارنج سه برگ *Poncirus trifoliata* (L.) Raf (Fawcett & Klotz, 1948) زیان اقتصادی این بیماری شامل کاهش چشم‌گیر ارتفاع درختان و در نتیجه کاهش باردهی است (Hadidi et al., 2017). ویروئید اگزوکورتیس مرکبات *Citrus exocortis viroid* (CEVd)، عامل بیماری اگزوکورتیس مرکبات، متعلق به جنس *Pospiviroid* از تیره *Pospiviroidae* است. بر پایه پدیدار شدن نشانه‌های این ویروئید در میزبان تکثیر گیوه‌فرنگی، جدایه‌های این ویروئید در دو کلاس A (پرازار) و کلاس B (کم آزار) تقسیم شدند که وجه تمایز مولکولی این دو کلاس در دست‌کم ۲۶ نوکلئوتید واقع در موتیف P_L (از دامانه بیماری‌زایی) و P_R (از دامانه متغیر) است (Visvader & Symons, 1985). به‌طور کلی می‌توان گفت CEVd در نارنج سه برگ و دو رگ‌های آن مانند سیترنج (Troyer and Carrizo citranges) شکاف عمودی پوست تنه و کوتولگی را بروز می‌دهد، در حالی که نارنج (*Citrus aurantium* L.) در هنگام آلودگی بدون نشانه‌های بارز است (Hadidi et al., 2003). نارنج، نارنج سه برگ و دو رگ‌های آن در جهان و ایران بیشتر از دیگر

مرکبات به‌عنوان پایه استفاده می‌شوند (Murica et al., 2011; Bani-Hashemian et al., 2013). در سال ۱۹۸۹ برای نخستین بار گسترش بیماری اگزوکورتیس مرکبات در استان مازندران بر پایه نشانه‌های برجسته این بیماری در پایه‌های حساس و جابه‌جایی آن با پیوندک آلوده گزارش شد (Habashi, 1988) و در سال‌های اخیر نیز ترادف‌های بی‌شماری از جدایه‌های ایرانی این ویروئید در بانک‌های اطلاعاتی ذخیره شده‌اند.

جمعیت ویروئیدها و بیشتر ویروس‌هایی دارای ژنوم RNA، آمیخته‌ای از هاپلوتایپ‌های نزدیک به هم است که فراوانی آن‌ها در جمعیت از تعادل ناشی از جهش، انتخاب طبیعی و ریزش ژنتیکی به دست می‌آید. این ناهمگونی جمعیت ویروئیدها دستاورد نرخ تکثیر بالا، جمعیت بزرگ و نبود فعالیت ویرایشگر آنزیم RNA پلی‌مراز بوده که باعث تغییرپذیری فراوان آن‌ها می‌شود (Gandia et al., 2000). الگوی فرگشتی ویروئیدها با مدل شبه‌گونه (Quasi-species) سازگاری دارد (Roossinck, 2008). آشکار است که عامل‌های بی‌شماری مانند تنش‌های حرارتی و تغییر میزبان در تنوع ژنتیکی ویروئیدها دخالت دارند. بررسی ساختار ژنتیکی و تنوع جمعیتی در دریافت سازوکارهای فرگشتی در جمعیت‌های ویروس‌ها و ویروئیدها دارای اهمیت است (Garcia-Arenal et al., 2003). تاکنون پژوهش‌های فراوانی در ارتباط با نرخ تنوع درون جمعیت ویروئیدها و تأثیر میزبان بر آن انجام شده است. آشکار شده که ده سال پس از آلودگی نارنج و پونسیروس با یک منبع یکسان CEVd، میزان تنوع‌پذیری ویروئید در میزبان نارنج بیشتر از پونسیروس بوده است (Bernad et al., 2009). در پژوهش دیگری و به دنبال مایه‌زنی کشت پروتوپلاستی، گیاهچه و نهال مرکبات با همسانه عفونت‌زای CEVd، بیش‌ترین نرخ تنوع در کشت پروتوپلاستی و کمترین نرخ در نهال‌ها دیده شد (Hajeri et al., 2011). البته تغییر میزبان نیز به‌عنوان یک تنگنا (Bottlenecks) می‌تواند منجر به تغییر در جمعیت ناهمگن ویروئید و نشانه‌های ایجادشده شود (Gandia et al., 2007).

میزبان حساس، Troyer citrange) عاری از هرگونه ویروس و ویروئید جهت مایه‌زنی انتخاب شدند. مایه‌زنی گیاهان دو هفته پس از جابه‌جایی آن‌ها از خزانه به گلخانه صورت گرفت. نخست سطوح موردنظر در ساقه با اتانول ۷۰ درصد سترون و سپس با آب مقطر آبشویی شد. با فروبردن تیغ اسکالپل سترون در مخلوط RNA (با غلظت پنج میکروگرم) و ایجاد زخم‌هایی اوریب در پوست ساقه مایه‌زنی انجام شد (Garnsey & Jones, 1967). در هر میزبان، سه تکرار جهت مایه‌زنی با RNA و نیز سه تکرار جهت مایه‌زنی با آب دیونیزه (شاهد) در نظر گرفته شد. محل زخم‌ها با نوار پارافیلیم پوشانده شد و نهال‌ها تا پایان این پژوهش در گلخانه نگهداری شدند. سه هفته پس از مایه‌زنی، نمونه‌هایی از بافت پوست ساقه نهال‌ها برداشته شد و بی‌درنگ در ازلت مایع قرار گرفت و پس از جابه‌جایی به آزمایشگاه جهت انجام آزمایش‌های پس‌از آن در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA کل و ویرایش برادری معکوس-واکنش زنجیره پلی‌مراز (RT-PCR) و همسانه‌سازی RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت پوست ساقه تک‌تک نهال‌های مایه‌زنی‌شده با RNA ویروئیدی و نیز آب دیونیزه (تیمار شاهد) و با به‌کارگیری P-Biozol Reagent (Bioflux, Japan) بنا بر دستورکار شرکت سازنده استخراج شد. در تکثیر تمام طول ویروئید از جفت آغازگر CEVd-R2 (GGGTAGTCTCCAGAGAGAAG) و CEVd- (GGTGGAAACA ACTGAAGCTT) F2 (Bernad & Duran-Vila, 2006) استفاده شد. جهت ساخت DNA مکمل یک میکروگرم RNA کل، ده میکرولیتر آب دیونیزه سترون به همراه ۰/۵ پیکومول آغازگر معکوس به لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل و برای زمانی برابر پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Mastercycler Personal, Germany) قرار داده شد. سپس لوله‌ها برای زمانی برابر سه دقیقه روی یخ تیمار و ۰/۵ میلی‌مول مخلوط dNTPs، دو واحد RNase inhibitor

چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای (Single-strand conformation polymorphism, SSCP) روشی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction, PCR) با یاری الکتروفورز برای بررسی تنوع ژنتیکی است که بنیاد آن حرکت مولکول‌های DNA تک‌رشته‌ای در ژل پلی‌اکریل‌آمید است. وجود تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی در یک مولکول ویروئید می‌تواند منجر به تغییر در ساختار مولکولی، شکل فضایی و در نتیجه جابه‌جایی مولکول در ژل پلی‌اکریل‌آمید و در نهایت موجب شکل‌گیری الگوهای متنوعی در ژل شود (Elleuch et al., 2013). در این پژوهش تنوع ژنتیکی واریانته‌های ویروئید اگزوکورتیس مرکبات برآمده از یک ترادف عفونت‌زا به روش‌های چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای و توالی‌یابی نوکلئوتیدی در دو پایه متحمل و حساس ارزیابی می‌شود تا گامی در راستای شناخت تأثیر میزبان در مسیر فرگشتی ویروئید باشد.

مواد و روش‌ها

ساخت همسانه عفونت‌زا

ژنوم کامل ویروئید CEVd جدایی‌یافته ایرانی S1 (رس‌شمار KY649365) جداسازی‌شده از درخت ۱۵ ساله پرتقال (Cv. Thomson navel) بر پایه سیترنج و دارای نشانه‌های بیماری اگزوکورتیس (Ghobakhloo et al., 2016)، به‌وسیله شرکت Bioneer (South Korea) ساخته شد و در سایت برشی آنزیم *EcoRI* حامل A-PBH قرار گرفت. در انتهای ۵' ژنوم، ترادف پیش‌بر T7 پلی‌مراز و در انتهای ۳' سایت برشی آنزیم *SmaI* طراحی شد. به‌منظور نسخه‌برداری در شرایط آزمایشگاه از ژنوم CEVd، نخست با به‌کارگیری آنزیم برشی *SmaI* سازه به‌صورت خطی در آمد. سپس با به‌کارگیری آنزیم T7 RNA Polymerase (Roche, Switzerland) واکنش نسخه‌برداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت انجام گرفت.

مایه‌زنی گیاهان و نمونه‌برداری

نهال‌های هفت‌ماهه نارنج (میزبان متحمل) و سیترنج

CEVd-S1) به روش لایز قلیایی، تکثیر قطعات الحاق شده با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی حامل و آنزیم *pfu* انجام شد. از سامانه الکتروفور عمودی و بستر ژل پلی اکریل آمید ۱۴ درصد به منظور شناسایی تغییرهای تک نوکلئوتیدی در ژنوم CEVd-S1 استفاده شد. به میزان پنج میکرولیتر از محصول PCR، در دستگاه ترموسایکلر برای زمانی برابر ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا رشته‌های DNA واسرشت شوند. نمونه‌های واسرشت شده برای زمانی برابر ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل جلوگیری شود. سپس با ۲۰ میکرولیتر از بافر بارگذاری (xylene cyanol/ EDTA/ Formamide/ Bromophenol Blue) مخلوط و درون هر چاهک ژل در اندازه ۲۰×۲۰ سانتی‌متر و به ضخامت یک میلی‌متر بارگذاری شد. سپس الکتروفورز برای زمانی برابر ۱۴ ساعت و با جریان ۲۰۰ ولت در دمای چهار درجه سلسیوس در بافر TBE انجام شد. در ادامه رنگ‌آمیزی ژل و آشکارسازی باندها با به کارگیری روش نیترا نقره (Creste *et al.*, 2001) انجام شد. در نهایت دو حامل از هر الگوی باندها با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی حامل توالی‌یابی شدند.

بررسی ساختار ثانویه RNA، تنوع ژنتیکی جمعیت و رابطه‌های تبارزایی

پس از توالی‌یابی، ساختار ثانویه ژنوم جدایه و واریانتهای مشتق شده از آن با به کارگیری نرم‌افزار RNAdraw ویرایش ۱.۱ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگاشته شد و ساختارهای سرسنجاقی و ساقه بررسی شدند. همچنین میزان انرژی آزاد ساختار RNA برای هر ژنوم به دست آمد (Matzura & Wennborg, 1996). جهت بررسی رابطه‌های تبارزایی واریانتهای، توالی نوکلئوتیدی واریانتهای حاصل با توالی‌های متناظر موجود در بانک ژن NCBI با به کارگیری نرم‌افزار Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) مقایسه شد. بر پایه نتیجه‌های این مقایسه، ۲۶ جدایه CEVd از میزبان‌ها و منطقه‌های مختلف دنیا انتخاب و با به کارگیری نرم‌افزار Bioedit، ویرایش ۷.۱.۳

(Thermo scientific)، چهار میکرولیتر RT-buffer 5X، دو واحد آنزیم M-M-MuLV (Moloney murine LeukemiaVirus reverse transcriptase enzyme, Thermo Scientific) و پنج میلی‌مول DTT به مخلوط واکنش افزوده و برای زمانی برابر ۵۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر DNA مکمل، ۱۶ میکرولیتر آب دیونیزه سترن، ۰/۵ پیکومول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر PCR-buffer 10X حاوی MgSO₄، ۰/۱ میلی‌مول dNTPs و ۲/۵ واحد آنزیم *Pfu* (Fermentas, Germany) تهیه شد. برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به صورت: واسرشت‌سازی نخستین برای زمانی برابر پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و گسترش یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در پایان گسترش پایانی برای زمانی برابر ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تنظیم شد. در نهایت مشاهده محصولات PCR، از طریق الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (Tris/Borat/EDTA) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد.

به منظور جداسازی ژنوم ویروئید تکثیر شده در یک نهال سیترنج و یک نهال نارنج آلوده، از قطعه‌های غیر هدف و زدودن اجزای باقی‌مانده از واکنش، از Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) بر پایه دستورکار شرکت سازنده استفاده شد. پس از الحاق قطعه در حامل خطی pJET1.2/blunt (Fermentas, Germany)، تراریزش درون یاخته‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α به روش تکانه حرارتی انجام شد (Sambrook & Russell, 2001). حامل نوترکیب به محیط کشت LB (Luria Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکرومولار) منتقل شد.

چندشکلی ساختاری رشته‌های منفرد (SSCP)

پس از استخراج حامل نوترکیب از ۱۲۰ کلنی باکتری (۶۰ کلنی از هر میزبان سیترنج و نارنج آلوده به

تکثیر و همسانه‌سازی شد. پس از تکثیر توالی الحاق‌شده ویروئید در ۱۲۰ کلنی باکتری (۶۰ کلنی از هر میزبان سیترنج و نارنج آلوده به CEVd-S1) با به‌کارگیری جفت آغازگر اختصاصی حامل، حرکت قطعه‌های تکثیرشده در ژل پلی‌اکریل‌آمید بررسی شد. بر پایه نتیجه‌ها، به ترتیب چهار و سه الگوی حرکتی در میزبان نارنج و سیترنج آلوده دیده شدند (شکل ۲) که نتیجه‌های توالی‌یابی نیز تفاوت در الگوی حرکتی را تأیید کردند. در هر دو میزبان هاپلوتایپ CEVd-S1 (منبع آلودگی) به‌عنوان واریانت برتر تعیین شد. نرخ فراوانی هر واریانت، نوکلئوتیدهای تغییریافته و همچنین رس‌شمار ثبت‌شده آن‌ها در بانک ژن در جدول ۱ نام برده شده‌اند.

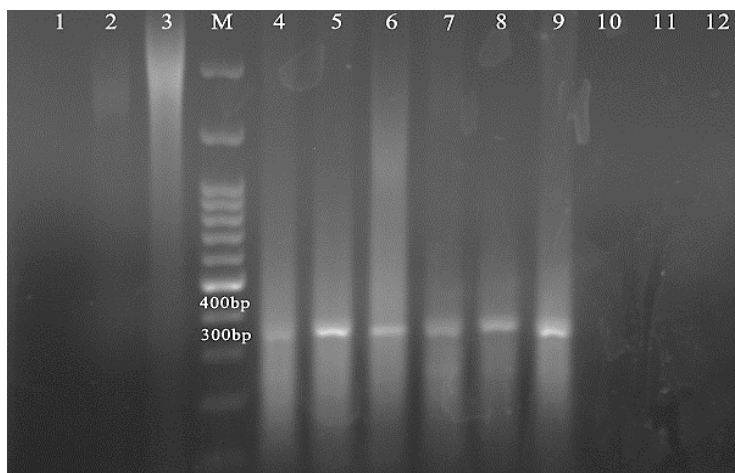
در پژوهش حاضر در واریانت V1 رخداد جهش از نوع جایگزینی انتقالی (Transition) در نوکلئوتید موقعیت ۱۰۳، موجب تغییر در حلقه E شد اما ساختار کلی آن را تغییر نداد (شکل A-۳). حلقه E واقع در ناحیه حفاظت‌شده مرکزی در ساختار میله‌ای شکل، در فرایند برش نقشی بنیادین دارد. برش و اتصال دو فرایند بنیادین در مسیر تولید مونومرهای ویروئیدی هنگام تکثیر هستند. افزون بر این، اهمیت حلقه E در بیماری‌زایی، اختصاصیت میزبانی و پدیدار شدن نشانه‌ها گزارش شده است (Flores *et al.*, 2003). با توجه به این‌که حلقه E در ویروئیدها جایگاه همکنش با پروتیین‌های میزبان است، از این‌روی پدیدار شدن تغییر در آن‌ها درون میزبان‌های مختلف دور از انتظار نیست. رخداد یک جابه‌جایی در نوکلئوتید موقعیت ۲۵۷ ویروئید PSTVd، واقع در ناحیه مرکزی موجب پدیدار شدن نشانه‌های کوتولگی شدید در گوجه‌فرنگی شد (Qi & Ding, 2003). همچنین رخداد جابه‌جایی در نوکلئوتیدهای موقعیت ۲۵۷ و ۲۵۹ جهش‌یافته‌هایی از PSTVd را ایجاد کرد که علیرغم دارا بودن توانایی تکثیر در آوندها، توانایی جابه‌جایی از آوند به سوی مزوفیل را نداشتند (Zhu *et al.*, 2002). افزون بر این موارد که اهمیت حلقه E در زیست‌شناسی ویروئید را روشن می‌سازد، گزارش‌های بی‌شماری نیز نمایان‌گر تأثیر تغییر میزبان در پدیدار شدن جهش در حلقه E وجود دارد.

هم‌ترازسازی چندگانه انجام شد (Hall, 1999). بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی در هم‌ترازها با به‌کارگیری نرم‌افزار MEGA ویرایش ۶ تعیین و درخت تبارزایی به روش Maximum likelihood و ۱۰۰۰ بار تکرار نگاشته شد (Tamura *et al.*, 2013). تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و پارامترهای فرگشتی و انتخاب طبیعی با به‌کارگیری برنامه DnaSP ویرایش ۵.۰ (Librado & Rozas, 2009) برآورد گردید. تنوع نوکلئوتیدی برای تمام واریانت‌ها با ارزش میانگین ۰/۰۵ برآورد شد.

نتایج و بحث

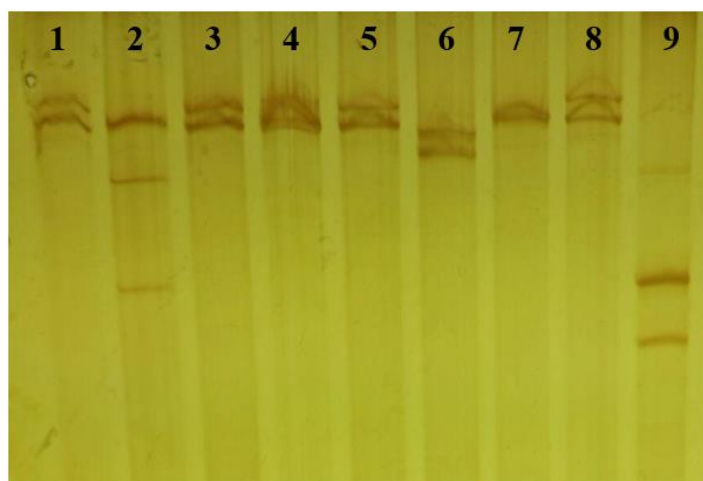
سه هفته پس از مایه‌زنی نهال‌های سیترنج و نارنج با جدایه CEVd-S1 و آب دیونیزه، RNA کل از بافت پوست ساقه نهال‌ها استخراج شد. پس از انجام RT-PCR با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی، باند ویروئیدی با اندازه کم‌وبیش ۳۷۰ جفت باز مشاهده و با انجام توالی‌یابی نوکلئوتیدی، آلودگی ویروئیدی در همگی نهال‌های مایه‌زنی‌شده با جدایه CEVd-S1 تأیید شد، درحالی‌که در نمونه مربوط به نهال‌های مایه‌زنی‌شده با آب دیونیزه هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۱). در این پژوهش، RNA ویروئیدی با انجام واکنش رونویسی در محیط آزمایشگاه از توالی ویروئید حاوی پیش‌بر T7 در حامل A-PBH به دست آمد. در بسیاری از پژوهش‌ها این روش در تولید RNA ویروئیدی دارای ویژگی عفونت‌زا موفق گزارش شده است (Szychowski *et al.*, 2005; Hajeri *et al.*, 2011). مایه‌زنی مکانیکی گیاهان با RNA ویروئیدی ایجاد برش‌های ظریف و اوریب در پوست ساقه به‌واسطه تیغ اسکالپل سترون، پایه اساسی در به‌دست‌آوردن موفقیت در این روند است. همانند پژوهش‌های پیشین، در پژوهش حاضر نیز مایه‌زنی مکانیکی سه نهال از هر میزبان نارنج و سیترنج با رونوشت‌های CEVd-S1 RNA منجر به آلودگی همه نهال‌ها شد (Garnsey & Jones, 1967; Barbosa *et al.*, 2002).

پس از استخراج RNA کل از یک نهال سیترنج و یک نهال نارنج سه هفته پس از مایه‌زنی، توالی تمام طول ویروئید با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی



شکل ۱. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (RT-PCR) نهال‌های مایه‌زنی شده با *Citrus exocortis viroid-S1* و آب دیونیزه (شاهد)، با به‌کارگیری جفت آغازگر اختصاصی. راهک‌های ۱، ۲ و ۳، نهال‌های نارنج شاهد. راهک‌های ۴، ۵ و ۶، نهال‌های نارنج آلوده. راهک ۷، ۸ و ۹، نهال‌های سیترنج آلوده. راهک‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲، نهال‌های سیترنج شاهد. M، نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی مثبت (GeneRuler™, SM0321, 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Germany).

Figure 1. RT-PCR product of viroid infected and negative control seedlings using specific primer pair. Lanes 1, 2 and 3, negative control of sour orange; lanes 4, 5 and 6, infected sour orange; lanes 7, 8 and 9, infected citrange; lanes 10, 11 and 12, negative control of citrange; M: 100bp plus DNA Ladder (GeneRuler™, SM0321, 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Germany).



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی SSCP واریانتهای *Citrus exocortis viroid* در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۴ درصد. راهک‌های ۱، ۳، ۴، ۵ و ۸، واریانت تیپ وحشی S1. راهک ۲، واریانت V2. راهک ۶، واریانت V1. راهک ۷، واریانت V3. راهک ۹، واریانت V4. Figure 2. Single strand conformation polymorphism analysis in 14% polyacrylamide gel of cloned full-length *Citrus exocortis viroid* sequences. Lanes 1, 3, 4, 5 and 8: wild type variant (CEVd-S1), lane 2, V2; Lane 6, V1; lane 7, V3; lane 9, V4.

جدول ۱. فراوانی رخداد و نوکلئوتیدهای تغییر یافته واریانتهای *Citrus exocortis viroid* در دو میزبان نارنج و سیترنج

مایه‌زنی شده با جدایی S1

Table 1. *Citrus exocortis viroid* sequence variation and occurrence frequency in the progeny generated in two citrus species inoculated with CEVd-S1

Haplotypes/ variant	Size (nt)	Occurrence frequency (%)		Mutations
		Citrange	Sour oranges	
KY649365	371	81.67	68.34	n/a*
V1	371	13.33	20	(A 103 G), (U 362 G)
V2	371	5	-	(U 185 A), (U 233 C), (U 362 G)
V3	371	-	5	(U 233 C), (U 362 G)
V4	371	-	6.66	(C 230 G), (U 362 G)

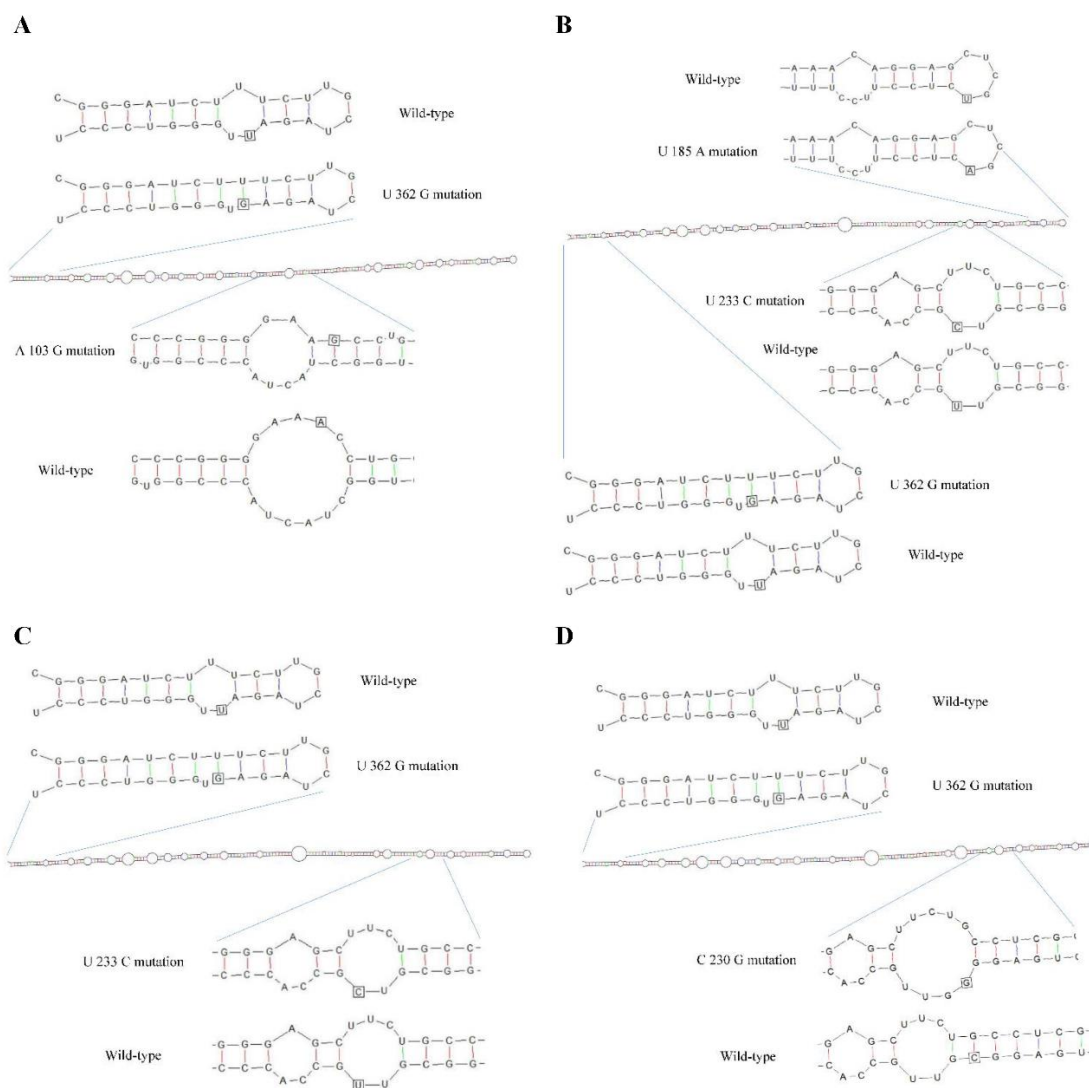
* n/a: not applicable.

رخداد جهش در ناحیه انتهایی سمت راست که نقش مهمی در این نوع از جابه‌جایی دارد، ممکن است منجر به عدم توانایی ویروئید در این فرایند شود.

در همگی واریانتهای مشتق‌شده در این پژوهش، جهشی مشترک از نوع جایگزینی متقاطع در نوکلئوتید موقعیت ۳۶۲ واقع در انتهای سمت چپ دیده شد. پژوهش‌های نخستین تنها جهش‌های رخ داده در ناحیه بیماری‌زایی ویروئید را کارآمد در پدیدار شدن درجه‌های مختلف نشانه‌های بیماری می‌دانستند اما پژوهش‌های پس‌از آن نشان داد ناحیه‌های دیگر حتی ناحیه متغیر از اهمیت بسزایی در پدیدار شدن نشانه‌ها برخوردار است (Hajeri, 2010). از جمله دلایل اهمیت ناحیه متغیر وجود موتیف P_R و بخشی از ساختار سرسنجاقی II در این ناحیه (به ترتیب در رشته بالایی و پایینی ساختار میله‌ای شکل) است. همان‌طور که در بخش‌های پیشین اشاره شد، توالی دو موتیف P_R و P_L وجه تمایز دو کلاس A و B دسته‌بندی‌شده CEVd از دیدگاه مولکولی است، بنابراین دور از انتظار نیست که رخداد جهش در ناحیه متغیر موجب پدیدار شدن تغییرهایی در شدت نشانه‌ها شود (Chaffai et al., 2007). دو جهش ردیابی‌شده در این پژوهش در موقعیت نوکلئوتید ۲۳۰ و ۲۳۳ واقع شده بود که خارج از موتیف P_R و ساختار سرسنجاقی II قرار داشت (شکل ۳-C و ۳-D). با توجه به ویژگی تغییرپذیری بسیار ناحیه متغیر، نرخ زیاد جهش در آن قابل پیش‌بینی است. به‌صورت کلی در این پژوهش هیچ‌گونه جهشی در ناحیه بیماری‌زایی ردیابی نشد و همگی جهش‌ها از نوع جایگزینی متقاطع و انتقالی بودند و در برابر هیچ‌گونه جهشی از نوع حذف یا اضافه ردیابی نشد.

نتیجه‌های تجزیه و تحلیل پارامترهای جمعیتی نشان داد که نرخ تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی در میزبان نارنج (میزبان متحمل) از سیترنج (میزبان حساس) بیشتر است (جدول ۲). این نتیجه‌ها می‌توانند به‌واسطه تفاوت در توانایی دفاعی هر میزبان توجیه شود. در میزبان متحمل در مقایسه با میزبان حساس، نیروهای بیشتری در تحمیل تنوع به ویروئید وارد شده و موجب افزایش نرخ تنوع می‌شوند.

جابه‌جایی پیاپی یک جدایه CEVd از پرتقال به میزبان‌های دیگری از جمله گوجه‌فرنگی، گیاه مخملی و بالنگ منجر به تولید افرادی در جمعیت شد که از لحاظ غلظت، نشانه‌ها و همچنین الگوی حرکت هنگام الکتروفورز متفاوت از بقیه بودند (Semancik et al., 1993). در همگی افراد نوظهور در گوجه‌فرنگی یک جهش در حلقه E مشترک بود که نام «امضای گوجه‌فرنگی» را روی آن نهادند. همانند ناحیه حفاظت‌شده مرکزی، موتیف دیگری در ناحیه انتهایی سمت راست با نام RY وجود دارد که در اعضای تیره Pospiviroidae حفاظت‌شده است (Nie et al., 2012). این ناحیه در همکنش مستقیم با پروتیین‌های گیاهی دخیل در حرکت فواصل دور در میزبان از جمله VirP1 (Viroid RNA-binding Protein) است و رخداد جهش در این موتیف، برهمکنش با ترکیبات اختصاصی میزبان را تغییر داده و جابه‌جایی میان سلولی را محدود می‌کند. باوجود اینکه حلقه انتهایی ناحیه سمت راست نقشی مستقیم در اتصال به پروتیین‌های میزبان دخیل در تکثیر نداشته اما نقش حمایتی در این فرایند دارد (Gozmanova et al., 2003). در پژوهش حاضر جهشی در موتیف RY ردیابی نشد و تنها یک جایگزینی از نوع متقاطع (Transversion) در نوکلئوتید ۱۸۵ واقع در حلقه انتهایی واریانت V2 در میزبان سیترنج رخ داد (شکل ۳-B) که وجود آن تغییری در ساختار ثانویه میله‌ای شکل ویروئید ایجاد نکرد. جهش‌های همانند با جهش مورد بحث (از لحاظ موقعیت و نوع نوکلئوتیدهای تغییریافته) در ویروئید CEVd از میزبان بالنگ (Semancik et al., 1993) و گوجه‌فرنگی (Visvader & Symons, 1985) که میزبان‌های تکثیری این ویروئید هستند، دیده شده است. در پژوهشی همانند نیز تنها در میزبان نارنج سه برگ که میزبانی حساس در برابر CEVd است در ناحیه انتهایی سمت راست (خارج از موتیف RY) تغییرهایی به وجود آمد و در میزبان نارنج این ناحیه کاملاً حفاظت‌شده باقی مانده بود (Bernad et al., 2009). جابه‌جایی ویروئید به‌صورت سیستمیک در میزبان متحمل در مقایسه با میزبان حساس، با موانع بیشتری روبرو است بنابراین



شکل ۳. ساختار ترمودینامیکی و ثانویه RNA با به کارگیری نرم افزار RNAdraw V. 1.1 نوکلئوتیدهای جهش یافته در طول توالی، با حاشیه مربع شکل مشخص شده اند. A: واریانت V1 (۱۳۹/۰۷- کیلوکالری بر مول)، جهش از نوع جایگزینی انتقالی در موقعیت ۱۰۳ (A→G) و جایگزینی متقاطع در موقعیت ۳۶۲ (U→G)، موجب تغییر در اندازه حلقه موجود در توالی شده است. B: واریانت V2 (۱۳۶/۲۹- کیلوکالری بر مول)، جهش از نوع جایگزینی متقاطع و انتقالی به ترتیب در موقعیت ۱۸۵ (U→A) و ۲۳۳ (U→C)، موجب تغییر در ساختار توالی نشد اما جهش از نوع جایگزینی متقاطع در موقعیت ۳۶۲ (U→G)، موجب تغییر در اندازه حلقه موجود در توالی شده است. C: واریانت V3 (۱۳۵/۹۶- کیلوکالری بر مول)، جهش از نوع جایگزینی انتقالی در موقعیت ۲۳۳ (U→C)، موجب تغییر در ساختار توالی نشد اما جهش از نوع جایگزینی متقاطع در موقعیت ۳۶۲ (U→G)، موجب تغییر در اندازه حلقه موجود در توالی شده است. D: واریانت V4 (۱۳۰/۸۱- کیلوکالری بر مول)، جهش از نوع جایگزینی متقاطع در موقعیت ۲۳۰ (C→G) و ۳۶۲ (U→G)، موجب تغییر در اندازه حلقه موجود در توالی شده است.

Figure 3. Primary and thermodynamic secondary structures of RNA as predicted by RNAdraw V. 1.1 RNA secondary structure calculation and analysis algorithm. Mutated nucleotide sites are presented in the square box. A: In variant 1, the transition from A to G at the position 103 resulted in a change in the size of the loop (-139.07 at 37 °C). B: In variant 2, the transversion from U to A at the position 185 and transition from U to C at the position 233 did not result in a change of the predicted secondary structure (-136.29 at 37 °C). C: In variant 3, the transition from U to C at the position 233 did not result in a change of the predicted secondary structure (-135.96 at 37 °C). D: In variant 4, the transversion, from C to G at the position 230, resulted in enlargement of the loop (-130.81 at 37 °C). The transversion from U to G at the position 362 in all of the variants was detected and resulted in a change in the size of the loop.

جدول ۲. ساختار جمعیتی واریانت‌های مشتق شده از *Citrus exocortis viroid* جدایه S1
Table 2. Population structure of *Citrus exocortis viroid*-S1 (CEVd-S1) sequence variants

Parameters	Citrange population	Sour oranges population	Total
Haplotype diversity ± S.E.	0.318 ± 0.071	0.494 ± 0.066	0.411 ± 0.050
Nucleotide diversity ± S.E.	0.00198 ± 0.00047	0.00266 ± 0.00035	0.00251 ± 0.00030
Haplotype	3	4	5
Average number of nucleotide differences	0.63616	0.98870	0.86737
Tajima's D	-0.02213 (P>0.10)	0.33319 (P>0.10)	-0.14490 (P>0.10)
Fu and Li's D	0.87333 (P>0.10)	0.98685 (P>0.10)	1.02152 (P>0.10)
Fu and Li's F	0.69966 (P>0.10)	0.91639 (P>0.10)	0.7584 (P>0.10)
Fu's F	1.026	1.003	0.206

مختلف ویروئیدها نیز باشد. در این پژوهش آزمون بی‌طرفی تاجیما و شناسه Fu and Li محاسبه شده در برنامه DnaSP، در هیچ‌یک از دو جمعیت مورد بررسی معنی دار نبود که این نتیجه‌ها نشان دهنده نبود انتخاب طبیعی در جمعیت‌های مورد بررسی است که ممکن است به دلیل تعداد کم واریانت‌های ردیابی شده در این پژوهش باشد.

بر پایه مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه CEVd-S1 با توالی نوکلئوتیدی ۲۶ جدایه CEVd در دسترس بانک ژن از میزبان‌ها و منطقه‌های جغرافیایی مختلف (جدول ۳)، بیش‌ترین درصد شباهت نوکلئوتیدی (۹۹/۷ درصد) با جدایه‌ای از کشور پرو و کمترین درصد شباهت (۹۳/۵-۹۳ درصد) با جدایه‌های کلاس A (JA، DE25 و E117) تعیین شد.

در میزبان‌های حساس، سازوکارهای دفاعی این اجازه را به ویروئید می‌دهند تا به واسطه یک واریانت برتر در جمعیت نشانه‌ها بیماری را موجب شود. ویروئیدها از راه سازگار کردن ساختار ثانویه برخی از واریانت‌های خود در جمعیت، می‌توانند از سازوکار خاموشی میزبان که به نظر می‌رسد مهم‌ترین سازوکار دفاعی در برابر ویروئیدها است، فرار کند (Gomez & Pallas, 2007). از طرفی هر نوع از میزبان نرخ متفاوتی از جهش را در بیمارگرهای با ماهیت RNA القا می‌کند. به‌عنوان نمونه در هر یک از گیاهان بابونه آلمانی، بابونه شاخی، تاج‌خروس و سیزاب آلوده به PSTVd، نرخ جهش متفاوتی در ویروئید گزارش شده است (Matousek et al., 2007). همین امر می‌تواند دلیلی دیگر در تفاوت نرخ جهش در میزبان‌های

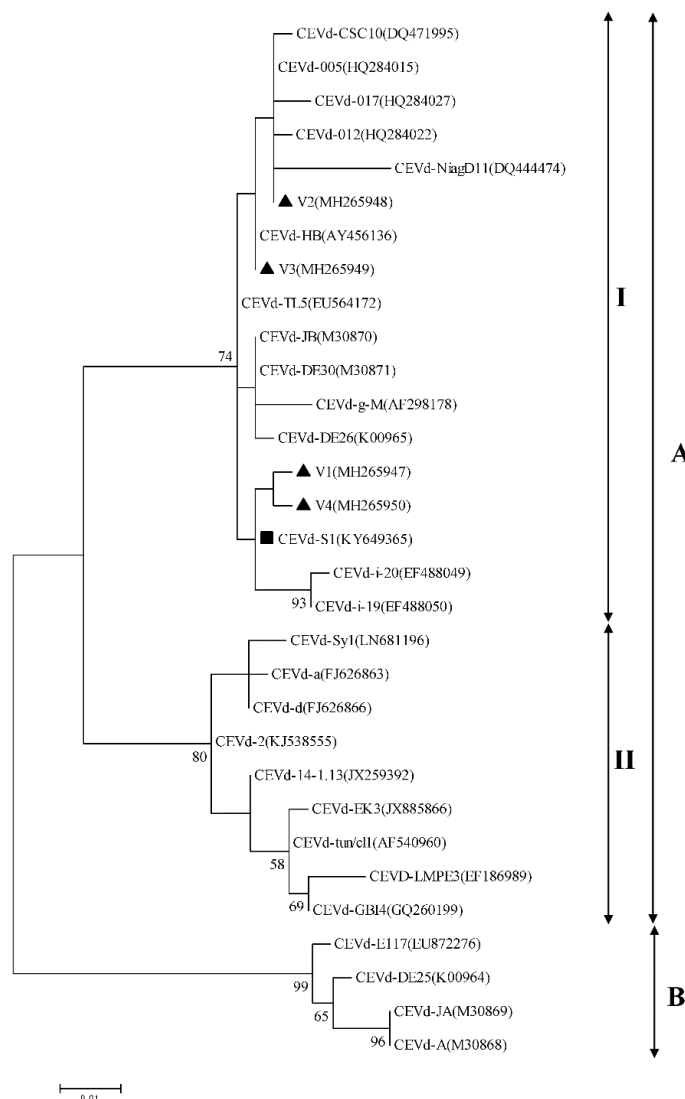
جدول ۳. ویژگی‌های جدایه‌های *Citrus exocortis viroid* موجود در بانک ژن به‌کاررفته در تحلیل تبارزایی با اشاره به درصد شباهت نوکلئوتیدی جدایه S1 واریانت‌های مشتق شده از آن در این پژوهش با دیگران

Table 3. Characteristics of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) isolates used in phylogenetic analysis with concerning nucleotide sequence identity values (percentage) among S1 and progeny variants in this study with others

Isolate/ Variant	Origin		Isolate/Variant				
	Country	Host	S1	V1	V2	V3	V4
S1 (KY649365)	Iran	<i>C. sinensis</i>	100	-	-	-	-
V1 (MH265947)	Iran	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. sinensis</i> / <i>C. aurantium</i>	99.4	100	-	-	-
V2 (MH265948)	Iran	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. sinensis</i>	99.1	99.1	100	-	-
V3 (MH265949)	Iran	<i>C. aurantium</i>	99.4	99.4	99.7	100	-
V4 (MH265950)	Iran	<i>C. aurantium</i>	99.7	99.7	99.4	99.7	100
005 (HQ284015)	China	Citrus tree	99.1	99.1	100	99.7	99.4
012 (HQ284022)	China	Citrus tree	98.9	98.9	99.7	99.4	99.1
017 (HQ284027)	China	Citrus tree	98.6	98.6	99.4	99.1	98.9
14-1.13 (JX259392)	Greece	<i>C. sinensis</i>	95.4	94.8	95.4	95.1	95.1
2 (KJ538555)	Tunisia	Citrus tree	96.2	95.4	95.9	95.6	95.6
a (FJ626863)	Iran	<i>C. sinensis</i>	94.9	94.8	95.4	95.1	95.1
A (M30868)	Australia	<i>C. sinensis</i>	93.2	92.4	92.7	93	92.7
CSC10 (DQ471995)	Brazil	<i>Vitis vinifera</i>	97.8	98.6	99.4	99.1	98.9
d (FJ626866)	Iran	<i>C. sinensis</i>	95.1	95.1	95.6	95.4	95.4
DE25 (K00964)	Australia	<i>C. sinensis</i>	93.5	92.7	93	93.2	93
DE26 (K00965)	Australia	<i>C. sinensis</i>	99.1	98.6	98.9	99.1	98.9
DE30 (M30871)	Australia	<i>C. sinensis</i>	98.9	98.3	98.6	98.9	98.6
E117 (EU872276)	Spain	<i>C. clementina</i>	93.5	92.7	93	93.2	93
EK3 (JX885866)	Greece	<i>C. sinensis</i>	95.1	94.8	95.4	95.1	95.1
g-M (AF298178)	USA	<i>Gynura aurantiaca</i>	98.6	97.1	98.1	98.3	98.1
GB14 (GQ260199)	Iran	<i>C. sinensis</i>	95.1	95.2	95.4	95.7	95.5
HB (AY456136)	China	-	99.4	99.4	99.7	100	99.7
i-19 (EF488050)	Spain	<i>Vicia faba</i>	99.1	98.9	98.6	98.9	98.1
i-20 (EF488049)	Spain	<i>V. faba</i>	98.9	98.6	98.3	98.6	98.9
JA (M30869)	Australia	<i>C. sinensis</i>	93	92.2	92.4	92.7	92.4
JB (M30870)	Australia	<i>C. sinensis</i>	98.9	98.3	98.6	98.9	98.6
LMPE3 (EF186989)	Iran	<i>C. sinensis</i>	94.3	94.1	94.7	94.5	94.5
NiagD11 (DQ444474)	Brazil	<i>V. labrusca</i>	96.4	97.3	98.1	97.8	97.5
Syl1 (LN681196)	Syria	Citrus tree	95.4	95.1	95.6	95.4	95.4
TL5 (EU564172)	Peru	<i>C. latifolia</i>	99.7	99.1	99.4	99.7	99.4
tun/c11 (AF540960)	Tunisia	<i>C. reticulata</i>	94.3	94.8	95.4	95.4	95.4

نوکلئوتیدی دارند. دو واریانت V2 و V3 به ترتیب با دو جدایی (HQ284015) 005 و (AY456136) HB از چین، توالی نوکلئوتیدی کاملاً یکسانی داشتند. در درخت تبارزایی نگاشته شده به روش Maximum likelihood (شکل ۴)، دو کلاد اصلی A و B تشکیل شد که به ترتیب کاملاً منطبق بر جدایه‌های کلاس B و کلاس A بود.

این جدایه شباهت نوکلئوتیدی بالاتری با جدایه‌های کلاس B (DE30، DE26، JB) نسبت به جدایه‌های کلاس A (۹۸/۹-۹۹/۱ درصد) نشان داد که بیانگر این نکته است که جدایی CEVd-S1 می‌تواند عضوی از کلاس B باشد. همچنین واریانت‌های مشتق شده در این پژوهش نیز، بیش از ۹۹ درصد با جدایی CEVd-S1 شباهت



شکل ۴. درخت تبارزایی جدایه‌های *Citrus exocortis viroid* بر اساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی ژنوم کامل جدایی ایرانی (جدایی S1 با علامت ■ مشخص شده است)، واریانت‌های آن در این پژوهش (واریانت‌های V1، V2، V3 و V4 با علامت ▲ مشخص شده است) و ۲۶ جدایی دیگر با به‌کارگیری نرم‌افزار MEGA6، به روش Maximum likelihood و ۱۰۰۰ تکرار. اعداد روی شاخه‌ها نشان‌دهنده درجه اعتبارسنجی (بیش از ۵۰ درصد) و خط شاخص نشان‌دهنده تغییر ۰/۰۱ نوکلئوتید در هر جایگاه است.

Figure 4. *Citrus exocortis viroid* phylogenetic tree constructed based on multiple alignment of full length genomic nucleotide sequences of Iranian isolate (S1, marked by the symbol “■”), progeny variants obtained in this study (V1, V2, V3, and V4, are marked by the symbol “▲”) and other 26 isolates using the Maximum likelihood method within MEGA 6. The numbers indicate bootstrap percentage values (more than 50%) based on 1000 random replicates and the scale bar is representing 0.01 nucleotide substitutions per site.

جدایه‌های مختلف میزبانی و جغرافیایی CEVd، می‌توان به صادرات و واردات اندام‌های رویشی گیاهی در سطح جهانی به‌عنوان عامل اصلی پراکنش این ویروئید و نیز نرخ بالای تغییرپذیری ژنوم آن اشاره کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتیجه‌های این پژوهش نشان می‌دهند ساختار جمعیتی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات در میزبان‌های حساس و متحمل متفاوت است. بر پایه نتیجه‌های این پژوهش، نرخ تنوع ژنتیکی جمعیت این ویروئید در میزبان متحمل بیشتر از میزبان حساس تعیین شد که دست‌یابی به سازگاری بیشتر با میزبان و کوشش در جهت فرار از سامانه خاموشی RNA آن از دلایل احتمالی این تنوع است. در میزبان حساس ویروئید موفق‌تر عمل کرده و با تکیه بر سازگاری بالای خود با میزبان، به راحتی جمعیت خود را افزایش می‌دهد. هیچ‌یک از جهش‌های ایجاد شده در طول ژنوم منتج به تغییر در ساختار ثانویه میله‌ای شکل ویروئید نشد. با توجه به اهمیت زیستی این ساختار، در تکمیل چرخه زیستی ویروئید، این امر محتمل است که جهش‌های منتج به تغییر این ساختار ثانویه (که قابل‌ردیابی در این پژوهش نبود) یا جهشی برگشت‌پذیر بوده و یا جهش‌یافته محکوم به نابودی بوده است. به‌منظور تعیین نقش هر یک از این جهش‌ها، بررسی‌های بیشتری در زمینه بیماری‌زایی، نرخ تکثیر و توانایی سیستمیک شدن این واریانت‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

نکته جالب‌توجه در این درخت این بود که جدایه CEVd-S1 و واریانت‌های آن به همراه جدایه‌هایی از چین، استرالیا، برزیل، پرو و اسپانیا در کلاد جداگانه‌ای (AI) از دیگر جدایه‌های ایرانی (a, b, GBI4) و LMPE3) و جدایه‌هایی از سوریه، یونان و تونس (کلاد AII) قرار گرفتند. واریانت‌های V1 و V4 به همراه جدایه CEVd-S1 در کنار جدایه‌هایی از اسپانیا و میزبان باقلا قرار گرفتند. دو واریانت V2 و V3 نیز در کنار جدایه‌هایی از چین و برزیل قرار گرفتند. به نظر می‌رسد با واردات انواع پیوندک و بذر از کشورهای گوناگون طی برهه‌های زمانی مختلف، این امری قابل‌درک باشد که جدایه‌های ایرانی از نظر شباهت نوکلئوتیدی و موقعیت در درخت تبارزایی رابطه نزدیکی باهم نداشته و برعکس با جدایه‌هایی از دیگر نقطه‌های جهان رابطه خویشاوندی نزدیک‌تری داشته باشند. بر پایه این درخت تبارزایی، رابطه نزدیکی میان تبارزایی، میزبان و منطقه‌های جغرافیایی جدایه/واریانت‌های CEVd به چشم نمی‌خورد که با نتیجه‌های پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی دارد. در پژوهش انجام‌گرفته به‌وسیله Lin *et al.* (2015)، ارتباطی میان رابطه‌های تبارزایی جدایه‌های CEVd، رقم‌های مختلف مرکبات (به‌عنوان میزبان) و منطقه‌های جغرافیایی یافت نشد. همچنین در پژوهش Eiras *et al.* (2006) درخت تبارزایی نتوانست جدایه‌های CEVd به‌دست‌آمده از میزبان‌های مرکبات و انگور کشورهای مختلف را از هم جداسازی کند. از دلایل احتمالی ناتوانی تحلیل‌های تبارزایی در جداسازی

REFERENCES

1. Bani-Hashemian, S. M., Taheri, H., Alian, Y. M., Bove, J. M. & Duran-Vila, N. (2013). Complex mixtures of viroids identified in the two main citrus growing areas of Iran. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 647-654.
2. Barbosa, C. J., Pina, J. A., Navarro, L. & Duran-Vil, N. (2002). Replication/accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: *Proceedings of International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, 1 Jan., University of California, Riverside, California, pp. 264-277.
3. Bernad, L. & Duran-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 105-113.
4. Bernad, L., Duran-Vila, N. & Elena, S. F. (2009). Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of *Citrus exocortis* viroid. *Journal of General Virology*, 90(8), 2040-2049.
5. Chaffai, M., Serra, P., Gandia, M., Hernandez, C. & Duran-Vila, N. (2007). Molecular characterization of CEVd strains that induce different phenotypes in *Gynura aurantiaca*: structure-pathogenicity relationships. *Archives of virology*, 152(7), 1283-1294.

6. Creste, S., Neto, A. T. & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299-306.
7. Di-Serio, F., Li, S. F., Pallas, V., Owens, R. A., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. T. J., Vidalakis, G. & Flores, R. (2017). Viroid Taxonomy. In: A. Hadidi, R. Flores, J. Randles & P. Palukaitis (Ed), *Viroids and Satellites* (pp. 135-146). Academic Press.
8. Elleuch, A., Hamdi, I., Bessaies, N. & Fakhfakh, H. (2013). Single-strand conformation polymorphism for molecular variability studies of six viroid species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(1), 182-188.
9. Eiras, M, Targon, M. L. P., Fajardo, T. V., Flores, R. & Kitajima, E. W. (2006). *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* doubly infecting grapevines in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31(5), 440-446.
10. Fawcett, H. S. & Klotz, J. (1948). Exocortis of trifoliolate orange. *California Agriculture*, 2(10) 13.
11. Flores, R., Daros, J. A. & Navarro, J. A. (2003). Replication. In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles & J. S. Semancik.(Ed.), *Viroids*. (pp. 55-60). CSIRO Publishing
12. Gandia, M., Bernad, L., Rubio, L. & Duran-Vila, N. (2007). Host effect on the molecular and biological properties of a *Citrus exocortis viroid* isolate from *Vicia faba*. *Phytopathology*, 97(80), 1004-1010.
13. Gandia, M., Palacio, A. & Duran-Vila, N. (2000). Variability of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). In: Proceedings of *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, 1 Jan., University of California, Riverside, California, pp. 265-272.
14. Garcia-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J.M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6(4), 225-232.
15. Garnsey, S. M. & Jones, J. W. (1967). Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. *Plant Disease*, 51, 410-413.
16. Ghobakhloo, M., Dizadji, A. & Yamchi, A. (2016). Infectivity of in vitro- transcribed *Citrus exocortis viroid* (CEVd) on citrange. In: Proceedings of 22nd *Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 August, University of Tehran, Alborz, Iran, pp 50.
17. Gomez, G. & Pallas, V. (2007). Mature monomeric forms of *Hop stunt viroid* resist RNA silencing in transgenic plants. *The Plant Journal*, 51(6), 1041-1049.
18. Gozmanova, M., Denti, M. A., Minkov, I. N., Tsagris, M. & Tabler, M. (2003). Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of *Potato spindle tuber viroid* RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5534-5543.
19. Habashi, M. (1988). Survey of citrus exocortis disease in northern of Iran. Project Annual Report. Plant Pests and Diseases Research Laboratory of Mazandaran.
20. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. & Semancik, J. (2003). *Viroids*. CSIRO Publishing.
21. Hadidi, A., Vidalakis, G. & Sano, T. (2017). Economic significance of fruit tree and grapevine viroids. In: A. Hadidi, R. Flores, J. Randles & P. Palukaitis (Ed), *Viroids and Satellites*. (pp. 15-25). Academic Press.
22. Hajeri, S. (2010). *Study of Molecular and Biological Properties of Citrus exocortis viroid and Dweet mottle virus*. Ph. D. dissertation, UC Riverside.
23. Hajeri, S., Ramadugu, C., Manjunath, K., Ng, J., Lee, R. & Vidalakis, G. (2011). In vivo generated *Citrus exocortis viroid* progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology*, 417(2), 400-409.
24. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
25. Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
26. Lin, C. Y., Wu, M. L., Shen, T. L., Yeh, H. H. & Hung, T. H. (2015). Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of *Hop stunt viroid* and *Citrus exocortis viroid* infecting citrus in Taiwan. *Virology Journal*, 12(1), 11.
27. Matousek, J., Orctova, L., Ptaek, J., Patzak, J., Dedic, P., Steger, G. & Riesner, D. (2007). Experimental transmission of *Pospiviroid* populations to weed species characteristic of potato and hop fields. *Journal of virology*, 81(21), 11891-11899.
28. Matzura, O. & Wennborg, A. (1996). RNAdraw: An integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Computer applications in the biosciences*, 12(3), 247-249.
29. Murica, N., Bernad, L., Duran-Vila, N. & Serra, P. (2011). Two nucleotide positions in the *Citrus exocortis viroid* RNA associated with symptom expression in Etrog citron but not in experimental herbaceous hosts. *Molecular Plant Pathology*, 12(2), 203-208.

30. Nie, X. (2012). Analysis of sequence polymorphism and population structure of *Tomato chlorotic dwarf viroid* and *Potato spindle tuber viroid* in viroid-infected tomato plants. *Viruses*, 4(6), 940-953.
31. Qi, Y. & Ding, B. (2003). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell*, 15(60), 1360-1374.
32. Roossinck, M. J. (2008). *Plant virus evolution*. Springer-Verlag.
33. Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed.). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. Semancik, J. S., Szychowski, J. A., Rakowski, A. G. & Symons, R. H. (1993). Isolates of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *Journal of General Virology*, 74(11), 2427-2436.
35. Szychowski, J. A., Vidalakis, G. & Semancik, J. S. (2005). Host-directed processing of *Citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology*, 86(2), 473-477.
36. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
37. Visvader, J. E. & Symons, R. H. (1985). Eleven new sequence variants of *Citrus exocortis viroid* and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research*, 13(80), 2907-2920.
38. Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R. & Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology*, 130(1), 138-146.