

تعیین مشخصات مولکولی و تبارزایی ویروئید لکه زردی - 1 مو- (*Grapevine yellow speckle viroid*)

(I) از تاکستان‌های شمال غرب کشور

محمد حاجی‌زاده^{1*} و نعمت سخندان بشیر²

¹ استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

² دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: m.hajizadeh@uok.ac.ir

تاریخ پذیرش: 92/04/25

تاریخ دریافت: 91/10/13

چکیده

به منظور تعیین مشخصات مولکولی و بررسی ساختارهای ثانویه ویروئید لکه زردی - 1 مو، 137 نمونه از تاکستان‌های استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی جمع‌آوری گردید. اسید نوکلئیک کل از بافت برگ نمونه‌ها استخراج و پس از ساخت دی‌ان‌ای مکمل با استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، طول کامل این ویروئید با روش پی‌سی‌آر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئید لکه زردی - 1 مو، تکثیر شد. محصول پی‌سی‌آر پس از همسانه‌سازی در حامل pGEMT-easy، تعیین‌توالی گردید. نتایج نشان داد که واریانت‌های شناسایی شده در این تحقیق، دارای 367 یا 368 نوکلئوتید هستند و در مجموع هفت واریانت جدید از این ویروئید تشخیص داده شد. درخت تبارزایی نشان داد که واریانت 6 مشابه اعضای تیپ یک این ویروئید و شش واریانت بعدی در کنار تعدادی جدایه و واریانت دیگر تشکیل یک تیپ جداگانه (به نام پیشنهادی تیپ 4) را می‌دهند. در ساختار ثانویه واریانت‌های به دست آمده در این تحقیق، بیشترین تفاوت در منطقه متغیر و قسمت انتهایی چپ قرار داشت. ویروئید لکه زردی - 1 مو برای اولین بار از استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آرتی - پی‌سی‌آر، ساختار ثانویه، مو، واریانت

مقدمه

میزبانی، چرخه آلودگی‌شان را کامل می‌نمایند (وان چو واه و سیمونز 1997). اگرچه ویروئیدها علائمی مشابه ویروس‌ها ایجاد می‌کنند اما از لحاظ ساختار، عملکرد و منشأ تکامل منحصر به فرد هستند (فلورس و همکاران 2005). در نهمین گزارش ICTV، ویروئیدها به عنوان

ویروئیدها با ژنوم 246-401 نوکلئوتید، کوچک‌ترین عامل بیماری‌زای گیاهی هستند که از یک رشته آر‌ان‌ای تک‌لای حلقه‌ای تشکیل شده و توانایی ساخت پروتئین را ندارند (حدیدی و همکاران 2003). آن‌ها مستقل از هر نوع ویروس گیاهی همانندسازی می‌کنند و در برهم‌کنش با سنجه‌های

"کابرننت فرانک"⁷ جدا شد. در کل 62 درصد از توالی نوکلئوتیدی این ویروئید جفت شده‌اند و نوکلئوتیدهای جفت‌شده حاوی 53% G:C، 26% A:U و 21% G:U می‌باشند. محتوای G+C در این ویروئید حدود 60 درصد است که با سایر ویروئیدها قابل مقایسه است. هیچ کدون شروعی (AUG) روی رشته منفی وجود ندارد، اما روی رشته مثبت یک کدون شروع گزارش شده است (توالی 254-256) که بعد از آن چارچوب خواندنی شروع می‌شود و به‌طور بالقوه توانایی تولید یک پلی‌پپتید با 68 آمینواسید را دارد (لیتل و رضائیان 2003).

ویروئید لکه زردی-1 مو دارای 37 درصد مشابهت نوکلئوتیدی با ویروئید پوست پینه‌ای سیب (ASSVd)⁸ است. این ویروئید تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای دارد و بر اساس آن به سه تیپ تقسیم می‌شود. جدایه‌های تیپ یک، قادر به تولید علائم در گیاه میزبان نیستند ولی جدایه‌های تیپ دو قادرند علائم تولید کنند (ریگدن و رضائیان 1993). تیپ سه از ایتالیا گزارش شده است و از نظر علائم و توالی نوکلئوتیدی متفاوت از دو تیپ دیگر است (زیچووسکی و همکاران 1998). تاکنون این ویروئید در ایران از شیراز، بوانات و ارومیه گزارش شده است (زکی‌عقل و ایزدپناه 2009). با وجود آلودگی وسیع در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی به ویروئیدهای مو به استثنای CEVd که در هیچ‌کدام از این استان‌ها ردیابی نشد (حاجی‌زاده و همکاران 2010 و 2012 الف)، اطلاعات کافی در مورد ساختار، مشخصات مولکولی و تنوع ژنتیکی این ویروئیدها و از جمله GYSVd-1 در دسترس نیست. در این مقاله اطلاعاتی درباره ترادف نوکلئوتیدی، تنوع ژنتیکی و ساختار فیزیکی GYSVd-1 از منطقه شمال‌غرب کشور ارائه گردیده است.

عوامل بیماریزای زیروویروسی¹ شناخته شدند و بر اساس تکثیر، محل تجمع در داخل سلول، توالی نوکلئوتیدی، خصوصیات زیست‌شناختی و دیگر مشخصات به دو خانواده Pospiviroidae با پنج جنس (*Pospiviroid*, *Cocadviroid*, *Hostuviroid*, *Apscaviroid*, *Coleviroid*) و Avsunviroidae با دو جنس (*Avsunviroid*, *Pelamoviroid*) گروه‌بندی شدند (کینگ و همکاران 2012). شیکاتا و همکاران (1984) اولین بار ویروئید کوتولگی رازک را از مو در ژاپن گزارش کردند. تحقیقات بعدی وقوع گسترده آلودگی مو به ویروئیدها را آشکار کرد. امروزه، مشخصات این ویروئیدها تعیین شده و ساختار مولکولی آن‌ها معین و درک فعالیت‌شان ساده‌تر شده است. تاکنون، پنج ویروئید آلوده کننده مو شناسایی شده‌اند: ویروئید کوتولگی رازک (HSVd)² از جنس هوستوویروئید، ویروئید آگزوکورتیس مرکبات (CEVd)³ از جنس پوسپی-ویروئید، ویروئید لکه زردی-1 مو (GYSVd-1)⁴، ویروئید لکه زردی-2 مو (GYSVd-2)⁵ و ویروئید استرالیایی مو (AGVd)⁶ از جنس اسپسکاوویروئید (جیانگ و همکاران 2009).

ویروئید لکه زردی-1 مو از کشورهای ژاپن (سانو و همکاران 2000)، استرالیا (کلتنو و رضائیان 1988)، ترکیه (گزل و اولنج 2003)، ایتالیا (مینافرا و همکاران 1990)، آلمان (پولیوکا و همکاران 1996)، آمریکا (زیچووسکی و همکاران 1998)، نیوزیلند (وارد و همکاران 2011) و ایران (زکی‌عقل و ایزدپناه 2009) گزارش شده است. این ویروئید دارای 366-369 نوکلئوتید می‌باشد و اولین بار توسط کلتنو و رضائیان (1988) از رقم

1 - Subviral

2 - Hop stunt viroid

3 - Citrus exocortis viroid

4 - Grapevine yellow speckle-1

5 - Grapevine yellow speckle-2

6 - Australian grapevine viroid

7- Cabernt Franc

8 - Apple scar skin viroid

مواد و روش‌ها

طی سال‌های 1388 و 1389، نمونه‌برداری از برگ‌های تاک‌های دارای علائم ویروئیدی و در برخی موارد از تاک‌های بدون علائم، از مناطق شمال غرب کشور انجام شد. در مجموع، 137 نمونه (22 نمونه از استان اردبیل، 80 نمونه از استان آذربایجان شرقی و 25 نمونه از استان آذربایجان غربی) از نمونه‌های جمع‌آوری شده برای حضور ویروئید لکه زردی-1 مو با روش مولکولی آر تی-پی‌سی آر مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج آر ان‌ای کل از برگ نمونه‌ها مطابق روش فویساک و همکاران (2000) انجام گرفت. برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی⁹ و در واکنشی با حجم نهایی 20 میکرولیتر استفاده شد. دو میکرولیتر از محلول 0/2 میکروگرم در میکرولیتر این آغازگر با سه میکرولیتر از آب دیونیزه و پنج میکرولیتر آر ان‌ای از هر کدام از اسید نوکلئیک کل نمونه‌ها مخلوط و به مدت 90 ثانیه در دمای جوش قرار داده شد و سپس میکروتیوب‌ها بلافاصله به یخ منتقل و پس از دو دقیقه، 5/7 میکرولیتر آب دیونیزه، دو میکرولیتر بافر 5x واکنش آر تی، 0/8 میکرولیتر مخلوط dNTPs (10 میلی‌مولار)، 0/5 میکرولیتر RNasin (40 واحد در میکرولیتر) و 200 واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس (AB Applied Biosystems, CA, USA) به هر کدام از آن‌ها افزوده شد. میکروتیوب‌ها به مدت 10 دقیقه در 25 °C نگهداری شدند و سپس در ترموسایکلر مدل PERKIN ELMER CETUS، برنامه ساخت دی‌ان‌ای مکمل شامل یک چرخه دمای 42 °C به مدت دو ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه‌بردار معکوس و یک چرخه در درجه حرارت 85 °C به مدت پنج دقیقه برای غیرفعال کردن این آنزیم اجرا شد (سخندان و همکاران 1997).

جهت بررسی مولکولی و تجزیه تحلیل تبارزایی GYSVd-1، سه جدایه از سه استان مختلف شامل یک ایزوله از فخرآباد (استان اردبیل)، یک جدایه از مراغه (استان آذربایجان شرقی) و یک جدایه از ارومیه (استان آذربایجان غربی) به صورت تصادفی انتخاب و تکثیر طول کامل این ویروئید با آغازگرهای GV1M و GV2P، طراحی شده توسط پولیوکا و همکاران (1996) و آنزیم *Pfu DNA Polymerase (Fermantas)* که خاصیت تصحیحی¹⁰ دارد، انجام شد. سپس، تولیدات PCR در ژل آگارز 1/4 درصد الکتروفورز شدند. قطعات موردنظر با استفاده از کیت Quantum Prep™ Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio Rad, Hercules, CA, USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگارز خالص‌سازی گردید و دی‌ان‌ای خالص‌شده با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* به حامل pGEM-T-easy که دارای آویزه‌های تیمینی است، متصل گردید. واکنش فوق به مدت سه ساعت در دمای اتاق انجام شد و سپس در سلول‌های باکتریایی *Escherichia coli* سویه DH5α که با استفاده از روش کلریدکلسیم مستعد شده بودند، منتقل گردید. برای انتقال از روش شوک حرارتی و برای غربال‌گری سلول‌های نوترکیب از محیط کشت جامد انتخابی حاوی 30 میکرولیتر از X-Gal (50 میکروگرم در میکرولیتر) و آمپی‌سیلین (100 میکروگرم در میکرولیتر) استفاده شد. کلونی‌های سفید رشد کرده روی تشتک پتری، در سه میلی‌لیتر از محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (100 میکروگرم در میکرولیتر) به مدت یک شب رشد داده شدند و از باکتری‌های کشت‌شده برای استخراج حامل استفاده گردید. استخراج حامل با کیت NucleoSpin Plasmid (Macherey-nagel, Switzerland) مطابق راهنمای شرکت سازنده انجام و تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های این ویروئید توسط شرکت MWG/Operon (آلمان) با استفاده از

زردی در مو بستگی زیادی به شرایط اقلیمی دارد (استیلمچ و گوئن 1988) و در اغلب موارد علائم بیماری روی برگ قابل مشاهده نبوده و یا لکه‌ها به سختی قابل مشاهده هستند (لیتل و رضاییان 2003). به نظر می‌رسد که بهترین زمان برای مشاهده علائم این ویروئید، اواسط تا انتهای فصل تابستان باشد (زیچووسکی و همکاران 1995) در حالی‌که نمونه‌برداری‌ها برای این تحقیق در اوایل و اواسط فصل (تیر و مرداد) انجام شد. تحقیقات نشان داده است که در آلودگی توام این ویروئید با ویروس برگ بادبزی مو (GFLV)¹² بر شدت علائم افزوده می‌شود و تولید بیماری جدیدی به نام بیماری رگ‌نواری¹³ می‌نماید (زیچووسکی و همکاران 1998).

مشخص شده است که تنها دو ویروئید -GYSVd- 1,2 در میزبان مو علائم ایجاد می‌کنند (لیتل و رضاییان 2003). این دو ویروئید به همراه AGVd ویروئیدهای اختصاصی مو هستند. هرچند در صورت مساعد بودن شرایط اقلیمی ویروئیدهای عامل لکه زردی باعث بروز علائم در میزبان می‌شوند ولی AGVd علائم بخصوصی در میزبان ایجاد نمی‌کند (جیانگ و همکاران 2009). در این تحقیق مشخص شد که بعضی از نمونه‌ها با وجود آلودگی به ویروئید زردی مو، علائم خاصی ایجاد نکرده و سالم به نظر می‌رسند. در مورد بیماری‌های ویروئیدی مو علاوه بر وجود ویروئید، شرایط میزبانی و اقلیمی بسیار حائز اهمیت است (لیتل و رضاییان 2003).

در واریانت‌های ویروئید لکه زردی-1 مو تعیین توالی شده از منطقه شمال غرب، 81/4 تا 84/7 درصد تشابه نوکلئوتیدی با واریانت مرجع (NC- GYSVd-1) (001920. 92 تا 100 درصد مشابهت در بین جدایه‌های ایرانی و 80 تا 99 درصد با دیگر جدایه‌های موجود در

آغازگرهای عمومی M13F و M13R که توالی‌های آن‌ها در دو طرف محل اتصال دی‌ان‌ای خارجی در حامل PGEM-T-easy وجود دارند، صورت گرفت.

برای بررسی تبارزایی از نرم‌افزار Mega5 (تامورا و همکاران 2011) استفاده شد. داده‌های نوکلئوتیدی تعیین‌توالی‌شده با داده‌های نوکلئوتیدی واریانت‌های این ویروئیدها که از قبل در پایگاه اطلاعاتی موجود بودند، هم‌ردیف‌سازی شدند و بررسی تبارزایی آن‌ها انجام شد. ابتدا فواصل ژنتیکی داده‌های نوکلئوتیدی بر اساس روش تصحیح فاصله تاجیما و نی (1984) محاسبه و تخمین تبارزایی طبق روش UPGMA صورت گرفت. واریانت مرجع از ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی (PSTVd)¹¹ به عنوان توالی برون‌گروه تعیین گردید. هم‌چنین، ساختار ثانویه ویروئیدها با استفاده از نرم‌افزار mfold (زوکِر 1989) تخمین زده شد.

نتایج و بحث

در آرتی-پی‌سی‌آر، قطعه‌ای در حدود 367-368 جفت باز برای اکثر نمونه‌های مورد آزمایش تکثیر شد که معادل طول کامل این ویروئید (کلونو و رضاییان 1988) بوده و مشابه نتایج پولیوکا و همکاران (1996) می‌باشد. ویروئید لکه زردی-1 مو در 91 درصد نمونه‌ها (121 نمونه از 137 نمونه) ردیابی شد که در استان آذربایجان شرقی شیوع بیشتری نسبت به دو استان دیگر داشت. به طوری که این ویروئید به ترتیب در 95، 89 و 76 درصد نمونه‌ها از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل ردیابی گردید. تنها در 34 نمونه آلوده به GYSVd-1، علائم لکه زردی و یا رگ‌نواری مشاهده شد و در بقیه نمونه‌های آلوده به این ویروئید علائم اختصاصی آن مشاهده نگردید. ظهور علائم ناشی از ویروئیدهای لکه

12- Grapevine fanleaf virus

13- Vein banding disease

11- Potato spindle tuber viroid

طی کرده‌اند. جدایه‌های (DQ408542, FJ940920) تعیین توالی شده از جنوب کشور (زکی‌عقل و ایزدپناه 1389)، همراه با جدایه‌های مراغه (واریانت‌های 4 و 5)، مهاباد (واریانت 1) و ارومیه (واریانت 7) و نیز بعضی از جدایه‌های موجود در بانک ژن در یک گروه و جدایه فخرآباد (واریانت 6) همراه با اعضای تیپ یک این ویروئید در گروه دیگر قرار گرفت (شکل 2).

پایگاه اطلاعاتی بانک ژن تشابه به دست آمد (شکل 1). در این تحقیق، هفت واریانت جدید از این ویروئید شناسایی شد. جدایه‌های ایرانی GYSVd-1 دارای 367-368 نوکلئوتید بودند و از میزبان‌های دارای علائم لکه زردی مو و همچنین بدون علائم جداسازی شدند (جدول 1).

در بررسی تبارزایی جدایه‌های ایرانی این ویروئید با سایر توالی‌های مستخرج از پایگاه اطلاعاتی بانک ژن، جدایه‌های ایرانی در دو خوشه یا گروه مجزا قرار گرفتند و نشان داده شد که این جدایه‌ها دو مسیر تکاملی متفاوتی را

ref NC_001920	TCCTCGGATC	A-CTTTCCTG	TGGTTCCTGT	GGTTACACCT	CGGAAGGCCG	CCGCGGACCT	GCAAAGAAGA	AGAT	[73]
Variant1	..TC.....	TT...G.T..T.....	[74]
Variant2	..TC.....	TT...G.T..T.....	[74]
Variant3	..TC.....	TT...G.T..T.....	[74]
Variant4	..TC.....	TT...G.T..T.....	[74]
Variant5	..TC.....	TT...G.T..T.....	[74]
Variant6	..TC.....	TT...G.T..T.....G.....A.....G.....	[74]
Variant7	..TC.....	TT...G.T..T.....G.....	[74]
ref NC_001920	AGGGGCAGAG	GGGGAGTGAG	CCTC GTCGTC	GACGAAGGGG	TGCACTCCAA	AGCTCCGAAC	TGG-CGTCTG	CCGG	[146]
Variant1G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant2G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant3G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant4T.....G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant5G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant6TAC.....GTA..G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
Variant7G.....GTGC.T..G.....T..A.....A.....	[148]	
ref NC_001920	CTCTCCTCGG	AGCCTCGCTG	CTCTGGCGG	AAGAGCTTTC	TGACTTTTCT	AGCCTATTCA	GCATTGCGCT	CTTG	[220]
Variant1	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
Variant2	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
Variant3	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
Variant4	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
Variant5	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
Variant6	GA..A.....AC.....T.C...TC.....	[221]	
Variant7	GA..A.....T.C...TC.....	[221]	
ref NC_001920	AGGCCCGGCG	AAACGCGGTT	CGTCTGCTGA	GGATGCCTCC	GCTAGTCGAG	CGGACTTGGT	CTCTT-CCGC	CCAA	[293]
Variant1T.....	T.....C..T.GCCACCA.....T.....	[295]	
Variant2T.....	T.....C..T.GCCACCA.....T.....	[295]	
Variant3T.....	T.....C..T.GCCACCA.....T.....	[295]	
Variant4T.....	T.....C..T.GCCACC	[294]	
Variant5T.....	T.....C..T.GCCACC	[294]	
Variant6T.....	T.....C..T.GCCACCTA.....	[294]	
Variant7T.....	T.....C..T.GCCACC	[294]	
ref NC_001920	AGCCCTTTT	CTTCAACTG	AGCTTGTTCC	AACGCGCCC	GCGAGTGCAA	TCCCCGGAAC	CCCTGCAAAG	AGG	[366]
Variant1G.....C..T.....	[368]	
Variant2C..T.....	[368]	
Variant3C...TC..CT	[368]	
Variant4C..T.....	[367]	
Variant5C.....T.....CA..T.....	[367]	
Variant6C.....T.....C..T.....	[367]	
Variant7C..T.....	[367]	

شکل 1- تغییرات نوکلئوتیدی هفت واریانت ویروئید لکه زردی-1 مو جداشده از شمال غرب کشور در مقایسه با ویروئید تیپ یک این ویروئید (NC-001920)

جدول 1- مشخصات واریانتهای ویروئید لکه زردی-1 مو، جداشده از منطقه شمال غرب کشور

واریانتهای	کد	رس شمار در بانک ژن	منطقه جغرافیایی	علائم روی میزبان	طول کامل ویروئید	میزان تشابه با ویروئید تیپ	تیپ واریانت
واریانت 1	Amh1#12	JN008866	مهاباد	پیسک و بدشکل شدن برگ	368 نوکلئوتید	89 درصد	تیپ فرضی 4
واریانت 2	Amh1#13	JQ686708	مهاباد	پیسک و بدشکل شدن برگ	368 نوکلئوتید	90 درصد	تیپ فرضی 4
واریانت 3	Amh1#15	JQ686708	مهاباد	پیسک و بدشکل شدن برگ	368 نوکلئوتید	89 درصد	تیپ فرضی 4
واریانت 4	BM10#1	-	مراغه	رگ نواری	367 نوکلئوتید	90 درصد	تیپ فرضی 4
واریانت 5	BM10#2	-	مراغه	رگ نواری	367 نوکلئوتید	89 درصد	تیپ فرضی 4
واریانت 6	CF7#1	-	فخرآباد	بدون علائم	367 نوکلئوتید	94/8 درصد	تیپ 1
واریانت 7	AO14#1	-	ارومیه	رگ نواری	367 نوکلئوتید	90 درصد	تیپ فرضی 4

جدول 2- رس شمار، منشا (کشور) و جدایه‌های GYSVd-1 در بانک ژن

میزبان	جدایه یا استرین	کشور	رس شمار
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Takasumi</i>	CGVd 1-4	چین	DQ371471
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Guixiangyi</i>	Beijing	چین	DQ371463
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Thompson Seedless</i>	CGVd 1-8	چین	DQ371473
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Kyoho</i>	CGVd 1-11	چین	DQ371476
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Zhiyuan 540</i>	CGVd 1-1	چین	DQ371474
<i>Vitis vinifera</i>	GYSVd1 variant Vb	آلمان	X87917
<i>Vitis vinifera</i>	GYSVd1 variant VII	آلمان	X87920
<i>Vitis vinifera</i>	variant IIa	آلمان	X87907
<i>Vitis vinifera</i>	variant II	آلمان	X87906
<i>Vitis vinifera</i>	SD	ایران	DG408542
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>rish-baba</i>	IA	ایران	FJ940920
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Pinot noir</i>	GYSVd1.PN.21	مجارستان	GQ995472
<i>Vitis vinifera</i>	Kar-2	هندوستان	AB742223
<i>Vitis vinifera</i>	Cari 1-1	تونس	AF462167
<i>Vitis vinifera</i>	09-2009-2140g1	نیوزیلند	HQ447058
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Nebbiolo</i>	Clone 11	ایتالیا	EU682454
<i>grape cultivar White Malaga</i>	YS-SB6	تایلند	AY639607
<i>grape cultivar White Malaga</i>	YS-SB1	تایلند	AY639606
<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Nebbiolo</i>	Clone 1	ایتالیا	EU682453
<i>Vitis vinifera</i>	Japanese Steuben isolate	ژاپن	AB028465
<i>Vitis vinifera</i>	-	استرالیا	NC001920
<i>Vitis vinifera</i>	variant type 2pYS11	استرالیا	Z17225
<i>Vitis vinifera</i>	-	آمریکا	AF059712

در این تحقیق به استثنای واریانت 6 پیشنهاد می‌شود و تعیین‌توالی واریانت‌های بیشتر این ویروئید در منطقه شمال‌غرب و سایر مناطق انگورکاری کشور به روشن شدن بهتر کمک شایانی خواهد کرد. واریانت‌های تعیین-توالی شده در این تحقیق، 5 تا 10 درصد با توالی مرجع تیپ یک (X87905)، 6 تا 10 درصد با توالی مرجع تیپ دو (Z17225) و 16 تا 20 درصد با تیپ توالی مرجع سه (AF059712) اختلاف نوکلئوتیدی دارند.

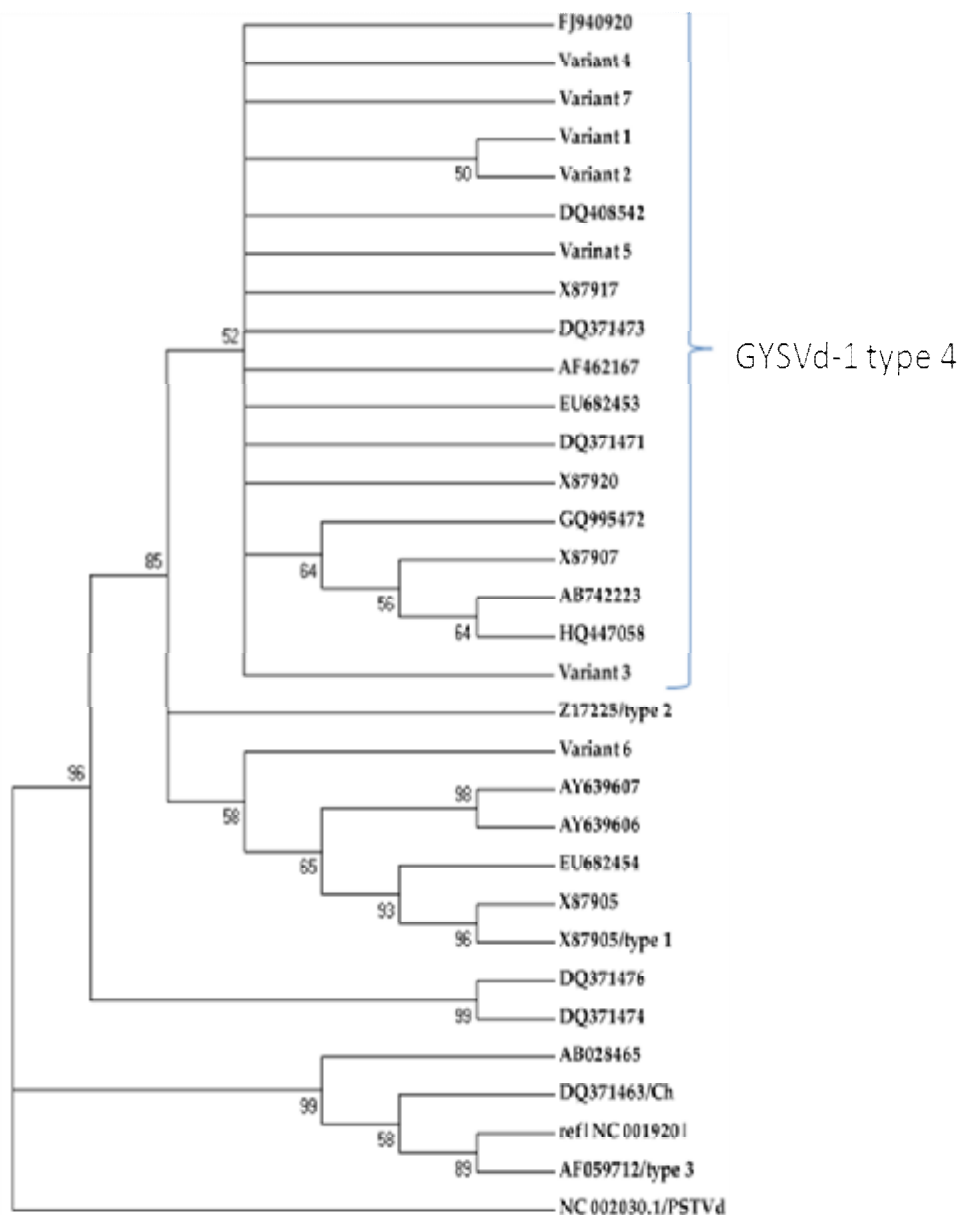
به‌عنوان مثال، واریانت 6 به ترتیب 5، 7 و 19 درصد با توالی‌های مرجع تیپ یک، دو و سه این ویروئید اختلاف نوکلئوتیدی نشان داد. بیشترین تفاوت در این واریانت با جدایه تیپ این ویروئید (NC-01920) در منطقه متغیر، و قسمت چپ انتهایی قرار داشت و در مناطق بیماری‌زایی، راست انتهایی و دو طرف منطقه حفاظت شده مرکزی نیز اختلاف دیده می‌شود (شکل 3).

به‌نظر می‌رسد که وجود یا فقدان علایم ناشی از واریانت‌های این ویروئید، نمی‌تواند در گروه‌بندی تیپ بیماری‌زایی آن‌ها عامل مناسبی باشد، زیرا چنان‌چه گفته شد ظهور علائم در بیماری‌های ویروئیدی مو روی میزبان، بستگی به شرایط میزبانی و اقلیمی دارد (استیلمچ و گوهن 1988). واریانت‌های 4 و 5 مثل جدایه‌های جنوب کشور (زکی‌عقل و ایزدپناه 2009) علائم بیماری لکه زردی مو را نشان دادند ولی در هیچ‌کدام از اعضای تیپ 2 و 3 قرار نگرفتند و همراه با جدایه‌های مهاباد در یک گروه تبارزایی جای گرفتند، ولی جدایه CF7 از فخرآباد در یک گروه تبارزایی مجزا قرار گرفته بود. جدایه‌های مراغه و مهاباد از لحاظ علائم کاملاً متفاوت بودند به‌طوری که در آلودگی با جدایه مهاباد، پیسک، بدشکل شدن برگ و به‌هم خوردن فاصله بین‌گره‌ها مشاهده شد ولی برای جدایه مراغه زیگزاگی شدن ساقه و رگ‌نوازی مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهند که تغییر علائم این ویروئید در مو ممکن است مانند علایم ناشی از ویروئید غده دوکی سیب-زمینی (واسینگیر و همکاران 1996) ناشی از تغییر یک یا چند نوکلئوتید باشد. هم‌چنین ثابت شده است که منطقه

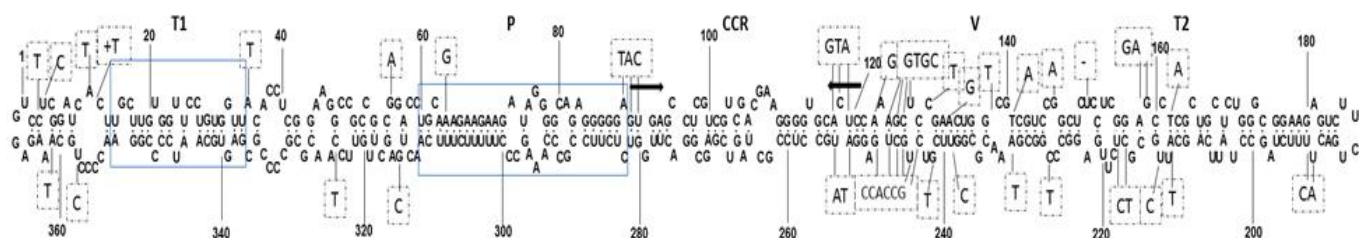
قرارگرفتن جدایه‌های تعیین‌توالی شده از منطقه شمال‌غرب در دو گروه متفاوت، دلیل منشا تکاملی مجزا، قدمت انگورکاری در این منطقه (ویتنز 1970) و آلودگی تاکستان‌های این منطقه به ویروئید مذکور از ابتدای کشت مو بوده است، زیرا برای انتشار ویروئیدهای مو ناقل مشخصی شناسایی نشده است (لیتل و رضاییان 2003). هر چند که اولین ویروئید در سال 1971 توسط دینر از سیب‌زمینی گزارش شد و علائم لکه زردی مو نیز یک سال بعد توصیف گردید (تایلور و ودهام 1972)، اما به‌نظر می‌رسد که ویروئیدهای مو از زمان‌های خیلی پیش در میزبان‌هایشان حضور داشتند ولی بعد از مدت زمان طولانی شناسایی شده‌اند.

ویروئید لکه زردی-1 دارای سه تیپ بیماری‌زایی مجزا است که از لحاظ توانایی و یا عدم توانایی در تولید علائم بر روی میزبان، توالی‌نوکلئوتیدی و ساختار ثانویه باهم تفاوت دارند (پولیوکا و همکاران 1996). تیپ یک، جدایه‌های بدون علائم (ریگدن و رضاییان 1992)، تیپ دو، جدایه‌های دارای توانایی ایجاد علائم (لیتل و رضاییان 2003) و تیپ سه که از ایتالیا گزارش شده است و تفاوت زیادی از نظر علائم و ترادف نوکلئوتیدی با دو تیپ قبلی دارد (زیچووسکی و همکاران 1998).

بررسی تبارزایی جدایه‌های ایرانی این ویروئید با توالی‌های این سه تیپ نشان داد که بعضی از جدایه‌های ایرانی در هیچ‌کدام از این سه تیپ شناخته‌شده قرار نمی‌گیرند. اختلاف‌ها در توالی نوکلئوتیدی و به دنبال آن در ساختار ثانویه به‌حدی بود که می‌توان اکثر جدایه‌های ایرانی را در تیپ جدیدی قرار داد (حاجی‌زاده و همکاران 2012) که نتایج حاصل از تحقیقات زکی‌عقل و ایزدپناه (1389) مبنی بر فرضیه تشکیل یک تیپ جدید برای GYSVd-1 را تقویت می‌کند. تنها واریانت 6 از فخرآباد همراه با اعضای تیپ 1 در یک گروه قرار گرفت که حدود 94/8 درصد باهم شباهت نوکلئوتیدی داشتند (شکل 2) و همانند اعضای این تیپ علائمی را روی مو ایجاد نکرده بود. بر این اساس، تیپ 4 برای واریانت‌های مورد مطالعه



شکل 2- بررسی رابطه تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروئید لکه زردی-1 مو با بعضی جدایه‌های ثبت‌شده در بانک ژن، ترسیم‌شده با نرم‌افزار **Mega5**. فاصله ژنتیکی توالی‌ها بر اساس روش **UPGMA** و درجه اطمینان **(Bootstrap)** 1000 تکرار در تخمین توپولوژی شجره اعمال شد. در تبارزایی حاصله، شاخه-زائی‌هایی که درجه اطمینان آن‌ها کمتر از 50 درصد بود حذف گردیدند. توالی **PSTVd** به‌عنوان توالی برون‌گروه در نظر گرفته شده است.



شکل 3- توالی نوکلئوتیدی و ساختمان ثانویه جدایه تیپ **GYSVd-1(NC-001920)**، که اختلاف نوکلئوتیدی آن با واریانت 6 شناسایی شده در این تحقیق، به صورت نوکلئوتیدهای داخل جعبه نقطه چین نشان داده شده است

می‌توان به میزان تنوع بالای این ویروئید نسبت داد (پولیوکا و همکاران 1996).

به‌طور میانگین واریانت‌های ایرانی GYVd-1 دارای (U)T(23%)، (C)C(31,4%)، (A)A(16,4%) و (G)G(29,3%) می‌باشند که با توالی مرجع تا حدود زیادی مطابقت داشت. تعداد کل نوکلئوتیدها برای همه جدایه‌های ایرانی 367 تا 368 نوکلئوتید است که در بعضی جدایه‌ها 1 تا 2 نوکلئوتید کمتر از جدایه تیپ بود. از آنجا که ویروئیدها مانند ویروس‌ها انگل اجباری هستند و راه‌کار شیمیایی برای مقابله با آنها وجود ندارد، مبارزه با آنها مبتنی بر بهداشت زراعی و یا مقاومت مولکولی است. اطلاعات به‌دست آمده از بررسی‌های حاضر، احتمالاً کمک شایانی به مقاومت مولکولی مو در برابر این عامل بیماریزا از جمله طراحی siRNAها به‌عنوان عوامل بالقوه برای مقاومت در برابر ویروئیدها در گیاه خواهد کرد.

نتایج ولپرت و همکاران (1995) در مطالعه‌های سه ساله روی اثر ویروئیدها در رشد و کاهش محصول انگور نشان داد که ویروئیدها به‌تنهایی تأثیری بر اجزای محصول ندارند ولی محصول تاک‌های آلوده، دارای اسیدیتیته کمتری بودند. به‌علاوه، مشخص شده است که ویروئید لکه زردی-1 در برهمکنش با ویروس برگ بادبزی مو باعث تشدید علائم می‌شود (زیچووسکی و همکاران 1998) که این مسائل اهمیت کنترل و پیشگیری در برابر این ویروئید را مشخص می‌کند.

بیماری‌زایی در ژنوم ویروئیدها در ظهور و یا تغییر علائم نقش دارند و تغییر نوکلئوتیدی در سایر مناطق ژنوم اثر قابل‌ملاحظه‌ای روی علائم ایجاد نمی‌کنند (سمانسک 2003). در همین ارتباط، جدایه فخرآباد علائم پیسک و بدشکل شدن برگ نشان داد که تقریباً با علائم جدایه مه‌باد مشابهت داشت ولی این جدایه از لحاظ تبارزایی تکامل کاملاً مستقلی از دو جدایه مه‌باد و مراغه داشت (شکل 2).

در بین واریانت‌های شناسایی‌شده، واریانت 3 از لحاظ ساختار انتهایی سمت چپ کاملاً با واریانت‌های دیگر و با توالی مرجع متفاوت بود. هم‌چنین، واریانت 5 از لحاظ ساختار انتهایی سمت چپ و منطقه بیماری‌زایی با واریانت‌های شناخته‌شده دیگر تفاوت داشت. با در نظرگرفتن تغییرات ژنومی جدایه ایرانی ویروئید لکه زردی-1 مو، ساختار ثانویه جدیدی را برای جدایه‌های ایرانی باید منظور نمود (شکل 3) که برای بررسی اثر این تغییرات لازم است همسازهای عفونت‌زا را از این جدایه‌ها روی میزبان اصلی مایه‌زنی کرد. اما، هنوز میزبان علفی برای این ویروئید شناسایی نشده (لیتل و رضائیان 2003) و این مسئله، تحقیقات را با مشکل جدی مواجه نموده است. بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی در این ویروئید در مقایسه با جدایه‌های چینی مشاهده شد و کمترین اختلاف نیز با جدایه‌های آلمانی به‌دست آمد. با وجود این، میزان مشابهت با بعضی از جدایه‌های چینی بسیار بالا بود. این تناقض را

دکتر فرانچسکو دی سریو و دکتر بیاتریز ناوارو به دلیل راهنمایی‌های ارزنده‌شان تقدیر به عمل می‌آید.

سیاس‌گزاری
از مرکز ویروس شناسی گیاهی CNR واحد باری
کشور ایتالیا، به‌خاطر انجام این پژوهش در آن مرکز و از

منابع

زکی عقل م و ایزدپناه ک، 1389. شناسایی و تعیین برخی مشخصات مولکولی ویروئیدهای مو در استان فارس. بیماریهای گیاهی، جلد چهل و ششم، شماره 3، صفحه‌های 249 تا 262.

Flores R, Hernández C, Martínez de Alba AE, Daros JA and Di Serio F, 2005. Viroids and viroid-host interactions. Annual Review of Phytopathology 43: 117-139.

Foissac X, Savalle-Dumas L, Gentil P, Dulucq MJ and Candresse T, 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulture 357: 52-59.

Gazel M and Onelge N, 2003. First report of grapevine viroids in the East Mediterranean region of Turkey. Plant Pathology, New Disease Report 52: 405.

Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semanick JS, 2003. Viroids. CSIRO Publishing, **Collingwood, Australia.**

Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS and Di Serio F, 2010. Multiple viroid infections in Iranian grapevines. Journal of Plant Pathology 92(S 4): 107-122.

Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS, Torchetti EM and Di Serio F, 2012a. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. Journal of Virological Methods 179(1): 62-69.

Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS and Di Serio F, 2012b. *Grapevine yellow speckle-1* Type 4: A new proposed type of grapevine yellow speckle-1. Pp. 108-109. Proceeding of the 17th Meeting of ICVG. California, Davis, USA.

Jiang D, Peng S, Wu Z, Cheng Z and Li S, 2009. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Australian Grapevine viroid* (AGVd) isolated from different grapevines in China. Virus Genes 38: 178-183.

King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ and Carstens EB, 2012. Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, USA.

Koltunow MA and Rezaian MA, 1988. *Grapevine yellow speckle viroid*: structural features of a new viroid group. Nucleic Acids Research 16: 849-864.

Little A and Rezaian MA, 2003. Grapevine viroids. Pp. 195-206 In: Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semancik JS (eds.), Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

Minafra A, Martelli GP and Savino V, 1990. Viroids of grapevine in Italy. Vitis 29: 173-182.

Polivka H, Staub U and Gross HJ, 1996. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: Novel *grapevine yellow speckle viroid-1* mutants show alterations of hairpin I. Journal of General Virology 77: 155-161.

Rigden JE and Rezaian MA, 1992. *In vitro* synthesis of an infectious viroid: Analysis of infectivity of monomeric linear CEV. Virology 186: 201-206.

- Sano T, Kobayashi T, Ishiguro A and Motomura Y, 2000. Two types of *Grapevine yellow speckle viroid-1* isolated from commercial grapevine had the nucleotide sequence of yellow speckle symptom-inducing type. *Journal of General Plant Pathology* 66: 68-70.
- Semancik JS, 2003. Pathogenesis. Pp. 61-66 In: Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semancik JS (eds.), **Viroids**. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Shikata E, Sano T and Uyeda I, 1984. An infectious low molecular weight RNA was detected in grapevines by molecular hybridization with hop stunt viroid cDNA. *Proceeding of the Japan Academy, Series B* 60: 202.
- Sokhandan NB, Gillings MR and Bowyer JW, 1997. Polymerase chain reaction detection and assessment of genetic variation in New South Wales isolates of *Passionfruit woodiness potyvirus*. *Australasian Plant Pathology* 26: 155-164.
- Stellmach G and Goheen AC, 1988. Other virus and virus-like diseases. Pp 53-54 In: Pearson RC and Goheen AC, (eds.) *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota.
- Szychowski JA, Credi R, Reanwarakorn K and Semancik JS, 1998. Population diversity in *Grapevine yellow speckle viroid-1* and the relationship to disease expression. *Virology* 248: 432-444.
- Szychowski JA, McKenry MV, Walker MA, Wolpert JA, Credi R and Semancik JS, 1995. The vein-banding disease syndrome: A synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. *Vitis* 34: 229-232.
- Tajima F and Nei M, 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1: 269-285.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Glen Stecher, Nei M and Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731- 2739.
- Taylor RH and Woodham RC, 1972. *Grapevine yellow speckle*-a newly recognized graft-transmissible disease of vitis. *Australian Journal of Agriculture Research* 23: 447-452.
- Vuittenz A, 1970. Fanleaf of grapevine. Pp. 217-228 In: Frazier NW (ed.). *Virus Disease of Small Fruits and Grapevine*. University of California, Berkeley.
- Wan Chow Wah YF and Symons RH, 1997. A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. *Journal of Virological Methods* 63: 57-69.
- Ward LI, Bumip GM, Liefting LW, Harper SJ and Clover RG, 2011. **First report of *Grapevine yellow speckle viroid 1* and *Hop stunt viroid* in grapevine (*Vitis vinifera*) in New Zealand**. *Plant Disease* 95(5): 617.
- Wassenegger M, Spieker RL, Thalmeir S, Gast FU, Riedel L and Sanger HL, 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226: 191-197.
- Wolpert JA, Szychowski JA and Semancik JS, 1995. Effect of viroids on growth, yield, and maturity indices of cabernet sauvignon grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* 47(1): 21-24.
- Zaki-Aghl M and Izadpanah K, 2009. Identification and partial characterization of grapevine viroids in Southern Iran. Pp. 354-355. *Proceeding of the 16th Meeting of ICVG, Dijon, France*.
- Zuker M. 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244: 48-52.

Identification, Molecular and Phylogenetic Analyses of *Grapevine yellow speckle viroid-1* from the Northwest Region of Iran

M Hajizadeh^{1*} and N Sokhandan Bashir²

¹ Assistant Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

² Associate Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

* Corresponding author: m.hajizadeh@uok.ac.ir

Received: 02 Jan 2013

Accepted: 16 Jul 2013

Abstract

Totally, 137 grapevines samples were collected from vineyards in East and West Azerbaijan and Ardabil provinces of Iran and tested for molecular characterization and study on the secondary structure of *Grapevine yellow speckle viroid-1* (GYSVd-1). Total nucleic acid was extracted from leaves and first-strand cDNA synthesized using random hexamer primer. PCR fragments corresponding to full length GYSVd-1 were amplified by the use of specific primers and cloned in pGEM-T-easy for sequencing. Results showed that the Iranian isolates were 367-368 nt in length, and accordingly seven new GYSVd-1 variants were identified. Phylogenetic analysis revealed that variant 6 was identical to the type 1 of GYSVd-1, whereas the other six variants together with some other isolates and variants of GYSVd-1 formed a distinct clad, which named as GYSVd-1 type 4. These variants were most different from other isolates in variable and left terminal domains of their secondary structure. This is the first report of grapevine infection with GYSVd-1 from Ardabil and East Azarbaijan provinces.

Keywords: Grapevine, RT-PCR, Secondary structure, Variant