

ردیابی و تعیین خصوصیات ملکولی ویروئید فرورفتگی میوه سیب (*Apple Dimple Viroid*) در منطقه مراغه

وحید رومی^{۱*}

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه.

*مسئول مکاتبه vroumi@maragheh.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۹

چکیده

در تابستان سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ تعداد ۷۳ نمونه با علائم مشابه با ویروئید فرورفتگی میوه سیب از ارقام گالا و رد دلشیز منطقه‌ی مراغه جمع‌آوری شد. RNA کل از پوست ساقه و برگ نمونه‌های جمع‌آوری شده حاوی علائم لکه‌های فرورفته و خال‌های زرد با حاشیه نامنظم روی پوست میوه، استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژنوم کامل ویروئید به طول ۳۰۶-۳۰۷ جفت باز با آزمون RT-PCR تکثیر و ترادف ۱۰ نمونه تعیین گردید. جستجوی ترادف‌ها با BLASTn و هم‌ردیف‌سازی آنها با ترادف‌های مربوطه در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه دارای بیشترین و کمترین یکسانی ترادف به میزان ۱۰۰ و ۷۴/۴ درصد بترتیب با رس شماره‌های EF088662 (ایتالیا) و KF788291 (ایتالیا) می‌باشند. بیشترین تفاوت نوکلئوتیدی در بین نواحی CCR و TR قرار داشتند. آنالیز فیلوژنتیک با روش حداکثر احتمال نشان داد که جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌ها و واریانت‌های گزارش شده از ایتالیا در یک گروه قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: ردیابی، ویروئید، فرورفتگی میوه، سیب، ایران.

مقدمه

شانکر تاولی گلابی^۴ (PBCVd) سیب را آلوده می‌کنند (حدیدی و همکاران ۲۰۱۷). اخیراً ویروئیدی مشابه با ویروئید کوتولگی رازک^۵ بر روی سیب از ایران گزارش شده است (وامنانی و همکاران ۲۰۱۵). این ویروئیدها همانند اولین ویروئید شناسایی شده (داینر ۱۹۷۱) ساختار میله‌ای داشته و حاوی پنج ناحیه‌ی مشخصه این خانواده از جمله ناحیه‌ی حفاظت شده مرکزی (CCR^۶) می‌باشند و در هسته سلول‌های میزبان با روش دایره غلتان نامتقارن تکثیر می‌یابند (فلورز و همکاران ۲۰۰۵، دینگ ۲۰۰۹، گیگوئر و همکاران ۲۰۱۴).

ویروئیدها با ایجاد خسارت‌های کمی و کیفی محصولات کشاورزی را تهدید می‌کنند و در برنامه گواهی نهال اغلب کشورها قرار دارند (استانداردهای ایپو ۱۹۹۹).

ویروئیدها کوچکترین و ساده‌ترین بیمارگرهای گیاهی هستند که ژنوم آنها از یک RNA تک رشته‌ای، غیر کدکننده و حلقوی بطول ۲۴۶ تا ۴۰۱ نوکلئوتید تشکیل شده است (دی سربو و همکاران ۲۰۱۴) که با استفاده از فاکتورهای میزبان تکثیر و از طریق اختلال در بیان ژن‌های میزبان، ایجاد بیماری می‌کنند (فلورز و اونز ۲۰۰۸). ویروئیدها برای ایجاد بیماری به ترادف و ساختار خود وابسته هستند (گیگوئر و پرو ۲۰۱۷). چندین ویروئید از خانواده *Pospiviroidae* و جنس *Apscaviroid* (اونز و همکاران ۲۰۱۲) شامل ویروئید فرورفتگی میوه سیب^۱ (ADFVd)، ویروئید پوست پینه‌ای سیب^۲ (ASSVd)، ویروئید چروکیدگی میوه سیب^۳ (AFCVd)، و ویروئید

⁴ Pear blister canker viroid

⁵ Hop stunt viroid

⁶ Central conserved region

¹ Apple dimple fruit viroid

² Apple scar skin viroid

³ Apple fruit crinkle viroid

سیب از گل‌ابی (مالفیتانو و همکاران ۲۰۰۴) و انجیر (چیومنتی و همکاران ۲۰۱۴) نیز گزارش شده است. شهرستان مراغه یکی از قطب‌های عمده‌ی تولید سیب در کشور می باشد. استان آذربایجانشرقی از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید سیب رتبه دوم کشور را به خود اختصاص داده است. شهرستان مراغه با سطح زیر کشت ۱۰۵۰۰ هکتار و تولید ۲۰۰۰۰۰ تن محصول رتبه اول استان (۳۵٪ از کل تولید استان) را دارا می باشد (احمدی و همکاران ۱۳۹۵). در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی از سوی کشاورزان و کارشناسان جهاد کشاورزی منطقه مبنی بر ظهور و گسترش علائم مشابه با بیماری فرورفتگی میوه در مناطق مختلف کشت سیب صورت گرفته است. در این تحقیق ماهیت خال دار شدن و ایجاد لکه‌های فرورفته بر روی سیب با استفاده از روش‌های مولکولی مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۷۳ نمونه ساقه از درختان حاوی علائم مشابه با ویروئید فرورفتگی میوه سیب از مناطق عمده کشت سیب در مراغه جمع‌آوری و در آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه مراغه با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. RNA کل از برگ و ساقه نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) استخراج گردید. DNA مکمل با استفاده از RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA) ساخته شد. پنجاه نانوگرم از RNA کل به همراه یک میکرولیتر از آغازگر تصادفی هگزامر^۱ با آب مقطر استریل به حجم ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه‌ی سلسیوس واسرشته شد. سپس مخلوط بمدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد و پس از افزودن ۲ میکرولیتر بافر 5× RT buffer، نیم میکرولیتر از dNTPs (10Mm) و ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، بمدت یک ساعت در دمای

علائم ایجاد شده توسط ویروئیدها بسته به رقمی که آلوده می‌کنند متفاوت است. ویروئید فرورفتگی میوه سیب فقط در سیب‌های قرمز علائم ایجاد می‌کند و موجب کاهش محصول و از دست دادن بازاریابی میوه‌ها می‌شود. ارقام رد دلشیز و رالزجان علائم شدیدی بروز می‌دهند در حالی‌که آلودگی‌های بدون علامت نیز در برخی ارقام مانند گلدن دلشیز و گرانی اسمیت مشاهده شده است. ویروئیدها علائمی نظیر فرورفتگی سبز بر روی پوست میوه، لکه‌های بافت مرده در قسمت گوشت میوه، زخم‌های پینه‌ای و بدشکلی میوه ایجاد می‌کنند و در مواردی میوه بطور کامل نرسیده، کوچک و سنگی بوده و طعم ناخوشایندی دارند (حدیدی و همکاران ۲۰۱۷).

ویروئیدهای جنس *Apscaviroid* ساختار ثانویه پایداری داشته و در برابر تیمارهای حرارت و یا مواد شیمیایی مقاوم هستند و به آسانی توسط بذرهای آلوده، قلمه، پیوند ریشه و ابزارهای هرس منتقل می‌شوند. هرچند ویروئید فرورفتگی میوه سیب با بذر منتقل نمی‌شود و پیشروی آلودگی در باغات خیلی کند است (مالفیتانو و همکاران ۲۰۰۴). هنوز ناقلی برای این بیماری شناخته نشده ولی بطور مکانیکی قابل انتقال است (دی سیریو و همکاران ۲۰۰۱). ضد عفونی ابزارهای هرس (لینگ ۲۰۱۷)، استفاده از مواد تکثیر عاری از ویروئید، گرمادرمانی، سرمادرمانی، کرایوتراپی و پیوند نوک ساقه در دوره خواب از روش‌های مدیریت بیماری‌های ناشی از ویروئیدها هستند (باربا و همکاران ۲۰۱۷).

ویروئید فرورفتگی میوه سیب اولین بار از ایتالیا بر روی رقم استارکینگ دلشیز شناسایی شد و مشخص گردید یکسانی ترادف پایینی (۶۳٪/۵) با ویروئید پوست پینه‌ای سیب دارد (دی سیریو و همکاران ۱۹۹۶). این ویروئید بر روی رقم‌های مختلف سیب از لبنان (چوئری و همکاران ۲۰۰۷)، ژاپن (هی و همکاران ۲۰۱۰)، چین (یه و همکاران ۲۰۱۳) و ایران (رومی و همکاران ۲۰۱۷) گزارش گردید. این ویروئید ۳۱۱-۳۰۳ جفت باز طول داشته و بجز

¹Random Hexamer Primer

رشته‌ها بمدت ۱۰ دقيقه در دماى ۷۲ درجه‌ى سلسيوس صورت گرفت.

آغازگرهاى عمومى *ApScaviroid* شامل PBCV100C و PBCV194H كه ناحيه‌ى حفاظت شده مركزى ژنوم اعضاى اين جنس را تكثير مى كنند (هى و همكاران ۲۰۱۰) جهت غربالگرى نمونه‌هاى آلوده مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله‌ى بعد، نمونه‌هاى آلوده با استفاده از دو جفت آغازگرهاى اختصاصى (دى سريو و همكاران ۲۰۰۲) كه ژنوم كامل و پروئيد فرورفتكى سيب را تكثير مى كنند، مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱). محصول PCR روى ژل آگارز يك درصد (حاوى رنگ DNA Safe Stain) در بافر TBE به مدت يك ساعت الكتروفورز شد و نمونه‌ها روى UV transiluminator مشاهده شدند. ده نمونه از ژنوم كامل در دو جهت مستقيم و معكوس تعيين ترادف گرديد. ترادف آغازگرهاى مورد استفاده در اين تحقيق در جدول يك آورده شده است.

۴۲ درجه‌ى سلسيوس قرار داده شد. در نهايت آنزيم نسخه بردارى معكوس با قرار دادن تيوب‌ها در دماى ۸۰ درجه‌ى سلسيوس بمدت ۱۰ دقيقه غيرفعال شد.

واكنش PCR در حجم ۲۵ ميكروليتر انجام شد كه شامل دو ميكروليتر از DNA كامل به‌مراه يك ميكروليتر از هر يك از آغازگرهاى مستقيم و معكوس (10 μM)، ۰/۲۵ ميكروليتر (۲۰۰ واحد بر ميكروليتر) آنزيم Taq (Invitrogen, USA) DNA polymerase، ۲/۵ ميكروليتر از 10× PCR Buffer، ۰/۵ ميكروليتر از هر يك از dNTPs (10 mM) ۰/۷۵ ميكروليتر از MgCl₂ (50mM) و ۱۷ ميكروليتر آب مقطر استريل بود.

چرخه گرمابى شامل پنج دقيقه واسرشته‌سازى اوليه در دماى ۹۴ درجه‌ى سلسيوس، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازى بمدت ۳۰ ثانيه در دماى ۹۴ درجه‌ى سلسيوس، ۴۵ ثانيه اتصال در دماى ۵۸ درجه سلسيوس و امتداد بمدت يك دقيقه در دماى ۷۲ درجه‌ى سلسيوس بود. امتداد نهايى

جدول ۱- آغازگرهاى مورد استفاده در اين تحقيق. عدد ذكر شده در نام آغازگر، موقعيت آن بر روى ژنوم را نشان مى‌دهد.

نام آغازگر	ترادف آغازگر	اندازه قطعه (جفت باز)	منبع
AD-5	5'-GACGACGACAGGTAAGTCTCTTCA-3'	۳۰۶-۳۰۷	دى سريو و همكاران ۲۰۰۲
AD-6	5'-GACGAAGGCTGGTAAGCCG-3'	۳۰۶-۳۰۷	دى سريو و همكاران ۲۰۰۲
AD-34	5'-GGTTACCCCAAGAGCGCGAC-3'	۳۰۶-۳۰۷	دى سريو و همكاران ۲۰۰۲
AD-35	5'-CCTTTGAGACTTGACCGGTTTC-3'	۳۰۶-۳۰۷	دى سريو و همكاران ۲۰۰۲
PBCV100C	5'-AGACCCTTCGTCGACGACGA-3'	۲۲۰	هى و همكاران ۲۰۱۰
PBCV194H	5'-TGTCGCTAGTCGAGCGGA-3'	۲۲۰	هى و همكاران ۲۰۱۰

گرفت. بهترين مدل مناسب براى مجموعه داده‌ها با استفاده از نرم افزار مذكور انتخاب شد و درخت تبارزايى با استفاده از اين مدل و روش حداكثر احتمال^۱ با تكرار ۱۰۰۰ ترسيم شد (فلسن استين ۱۹۸۵). ساختار ثانويه و پروئيد با استفاده از نرم افزار mFold (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold) و تنظيمات پيش فرض براى ساختار RNA مورد مطالعه قرار گرفت.

ترادف هاى بدست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit (هال ۱۹۹۹) ويرايش و در بانك ژن ثبت گرديدند. ترادف كامل ژنوم ۲۶ جدايه يا همسانه و پروئيد فرورفتكى سيب از مناطق مختلف دنيا از بانك ژن بارگرى شد (جدول ۲). ترادف و پروئيد كوتولگى مركبات (CDVd) بعنوان گروه خارجى مورد استفاده قرار گرفت.

هم‌رديف‌سازى ترادف‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 7 (كومار و همكاران ۲۰۱۶) و روش Clustal W (تامسون و همكاران ۱۹۹۴) با تنظيمات پيش فرض صورت

¹Maximum Likelihood

جدول ۲- مشخصات جدایه‌ها و همسانه‌های مورد استفاده در این تحقیق. ترادف‌های بدست آمده از این مطالعه به صورت پررنگ نشان داده شده‌اند.

اندازه ژنوم	رقم	میزبان	جدایه/همسانه	واریانت	کشور	رس شمار
۳۰۶	Red Delicious	<i>Malus domestica</i>	IRN1	-	Iran	KX909575
۳۰۶	Red Delicious	<i>Malus domestica</i>	IRN2	-	Iran	KX909576
۳۰۶	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN3	-	Iran	MG516811
۳۰۷	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN4	-	Iran	MG516812
۳۰۷	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN5	-	Iran	MG516813
۳۰۷	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN6	-	Iran	MG516814
۳۰۶	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN7	-	Iran	MG516815
۳۰۷	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN8	-	Iran	MG516816
۳۰۷	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN9	-	Iran	MG516817
۳۰۶	Gala	<i>Malus domestica</i>	IRN10	-	Iran	MG516818
۳۰۶	cv. Starking Delicious	<i>Malus domestica</i>	-	-	Italy	X99487.1
۳۰۷	Golden Delicious	<i>Malus pumila</i>	AD-GD1	ADFVd-04	Italy	EF088660
۳۰۶	cv Royal Gala	<i>Malus pumila</i>	AD-RG 1	ADFVd-05	Italy	EF088661
۳۰۶	cv Golden Delicious	<i>Malus pumila</i>	AD-GD1	ADFVd-02	Italy	EF088658
۳۰۷	cv Annurca	<i>Malus pumila</i>	AD-A1	ADFVd-06	Italy	EF088662
۳۰۷	cv Annurca	<i>Malus pumila</i>	AD-A1	ADFVd-08	Italy	EF088664
۳۰۶	cv Golden Delicious	<i>Malus pumila</i>	AD-GD1	ADFVd-03	Italy	EF088659
۳۰۷	cv Annurca	<i>Malus pumila</i>	AD-A1	ADFVd-10	Italy	EF088666
۳۰۷	cv Annurca	<i>Malus pumila</i>	AD-A1	ADFVd-09	Italy	EF088665
۳۰۷	cv Annurca	<i>Malus pumila</i>	AD-A1	ADFVd-07	Italy	EF088663
۳۱۰	-	<i>Ficus carica sativa</i>	ADFVd-fig.1	-	Italy	KF788291
۳۱۰	-	<i>Ficus carica sativa</i>	ADFVd-fig.2	-	Italy	KF788292
۳۱۰	-	<i>Ficus carica sativa</i>	ADFVd-fig.3	-	Italy	KF788293

ادامه جدول ۲

KF788294	Italy	-	ADFVd-fig.4	<i>Ficus carica sativa</i>	-	۳۱۰
KC237730	China	-	SDQD-2	<i>Malus domestica</i>	-	۳۰۷
KC237731	China	-	SDYT-1	<i>Malus domestica</i>	-	۳۰۶
KC237732	China	-	SDYT-3	<i>Malus domestica</i>	-	۳۰۶
KC237733	China	-	XJ-1	<i>Malus domestica</i>	-	۳۰۶
LC133494	Japan	-	ADFVd-JG15-70	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۰
LC042215	Japan	-	ADFVd-J40	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC214529	Japan	-	JG16-2	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC042217	Japan	-	ADFVd-J27	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC042216	Japan	-	ADFVd-J22	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC133493	Japan	-	ADFVd-JG15	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC042218	Japan	-	ADFVd-J35	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۱
LC133492	Japan	-	ADFVd-JG15-75	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۰
LC214530	Japan	-	JG16-1	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Jonah Gold	۳۰۳
AB561003	Japan	-	Fuji	<i>Malus x domestica</i>	cultivar Fuji, No.7	۳۰۳

نتایج و بحث

علایم گزارش شده توسط دی سربو و همکاران (۲۰۰۱)، (۲۰۰۲) و یه و همکاران (۲۰۱۳) بود و هیچ علایمی بر روی برگ، ساقه و دیگر اندام های درختان آلوده مشاهده نشد (هائو و همکاران ۲۰۱۶، حدیدی و همکاران ۲۰۱۷).

علائم مشابه با ویروئید فرورفتگی میوه سیب در رقم گالا مشاهده شد. این علایم شامل لکه های فرورفته و خال- های زرد با حاشیه نامنظم بر روی پوست میوه به قطر چند میلی متر بود که گاهی بهم پیوسته و لکه های وسیع ایجاد می کنند (شکل ۱). علائم مشاهده شده مشابه با



شکل ۱- لکه های فرورفته و خالهای زرد با حاشیه نامنظم بر روی پوست میوه سیب در رقم گالا (تصویر بالا) و رقم رد دلشیز (تصویر پایین).

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های ایران و دیگر جدایه‌های گزارش شده در دنیا، از روش RT-PCR و تعیین ترادف کامل ژنوم استفاده شد. برای افزایش صحت تعیین توالی بازها و کاهش احتمال خطا توسط پلیمران، از تعیین ترادف در دو جهت استفاده شد و پس از مونتاژ دو ترادف و ویرایش آنها، ترادف نهایی در بانک ژن قرار گرفت.

جستجوی ترادف‌ها با BLASTn و هم‌ردیف‌سازی آنها با ترادف‌های مربوطه در بانک ژن، نشان داد که جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه، یکسانی ترادف بین ۹۱/۱ تا ۱۰۰ درصد دارند (جدول ۳). بر اساس معیار معرفی شده توسط فلورز و همکاران (۱۹۹۸) که حداقل اختلاف ۱۰ درصد در ژنوم کامل را بعنوان واریانت در نظر می‌گیرد هیچ یک از جدایه‌های ایرانی واریانت نبودند بلکه گونه‌های مختلف ویروئید فرورفتگی سیب می‌باشند. هم‌ردیف‌سازی ترادف‌ها و آنالیز آنها نشان داد بیشترین یکسانی ترادف بین جدایه‌های IRN5 و IRN6 از ایران و جدایه-ADFVd 06 از ایتالیا به میزان ۱۰۰ درصد می‌باشد و کمترین

تعداد ۷۳ نمونه حاوی علائم مورد آزمایش قرار گرفت که آلودگی آنها به ویروئید فرورفتگی میوه سیب محرز گردید. آغازگرهای عمومی در نمونه‌های حاوی علائم در واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای قطعه‌ای به اندازه ۲۱۵ جفت باز را تولید کردند و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AD5/AD6 و AD34/AD35 اندازه محصول در واکنش‌های مثبت بین ۳۰۶-۳۰۷ جفت باز متغییر بود که به ترتیب با نتایج هی و همکاران ۲۰۱۰ و دی سربو و همکاران ۲۰۰۲ مطابقت داشت. ظهور فزاینده علائم این ویروئید در باغ‌های آلوده احتمالاً به دلیل استفاده از ابزارهای باغبانی و قلمه‌های آلوده می‌باشد. در ایران تنها دو ویروئید^۱ PLMVd و ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی^۲ (PSTVd) در لیست قرنطینه قرار دارند (حیدری و همکاران ۲۰۱۷) و با توجه به وجود این ویروئید برقراری قرنطینه و برنامه‌های گواهی بذر و نهال برای این ویروئید نیز ضروری بنظر می‌رسد.

¹Peach latent mosaic viroid

²Potato spindle tuber viroid

ژاپن به میزان ۷۷ درصد بود. دو جدایه اخیر، واریانت هستند و یکسانی ترادف پایینی با دیگر جدایه‌های بانک ژن دارند (هی و همکاران ۲۰۱۰).

میزان یکسانی ترادف بین جدایه IRN3 و جدایه‌های انجیر از ایتالیا (ADFVd-fig 1-4) به میزان ۷۴/۴ درصد بود. کمترین یکسانی ترادف بین جدایه‌های سیب بین جدایه IRN3 از ایران و واریانت‌های Fuji و ADFVd-JG15 از

جدول ۳- آنالیز یکسانی ترادف (سمت چپ) و فاصله ژنتیکی (سمت راست) جدایه‌های ایرانی ویروئید فرورفتگی میوه سیب توسط روش

MEGA در نرم افزار Clustal W

***	IRN10	IRN9	IRN8	IRN7	IRN6	IRN5	IRN4	IRN3	IRN2	IRN1
IRN1	۹۲,۸	۹۲,۸	۹۲,۸	۹۲,۸	۹۲,۸	۹۳,۲	۹۳,۲	۹۰,۹	۹۳,۲	
IRN2	۹۹,۰	۹۹,۳	۹۹,۰	۹۹,۰	۹۷,۷	۹۹,۳	۹۹,۳	۹۱,۵		*** ۶,۵
IRN3	۹۰,۹	۹۱,۲	۹۰,۹	۹۰,۹	۹۱,۲	۹۱,۲	۹۱,۲		*** ۸,۳	۹,۱
IRN4	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۸,۴	۱۰۰,۰		*** ۹,۰	۰,۳	۶,۸
IRN5	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۹,۷	۹۸,۴		*** ۰,۰	۹,۰	۰,۳	۶,۸
IRN6	۹۸,۰	۹۸,۰	۹۸,۰	۹۸,۰		*** ۱,۷	۱,۷	۹,۰	۲,۰	۷,۲
IRN7	۹۹,۳	۹۹,۳	۹۹,۷		*** ۱,۷	۰,۰	۰,۰	۹,۱	۰,۳	۶,۹
IRN8	۹۹,۳	۹۹,۳		*** ۰,۰	۲,۰	۰,۳	۰,۳	۹,۴	۰,۷	۷,۲
IRN9	۹۹,۳		*** ۰,۷	۰,۳	۲,۰	۰,۳	۰,۳	۹,۰	۰,۳	۷,۲
IRN10		*** ۰,۳	۰,۳	۰,۰	۱,۷	۰,۰	۰,۰	۹,۱	۰,۳	۶,۹

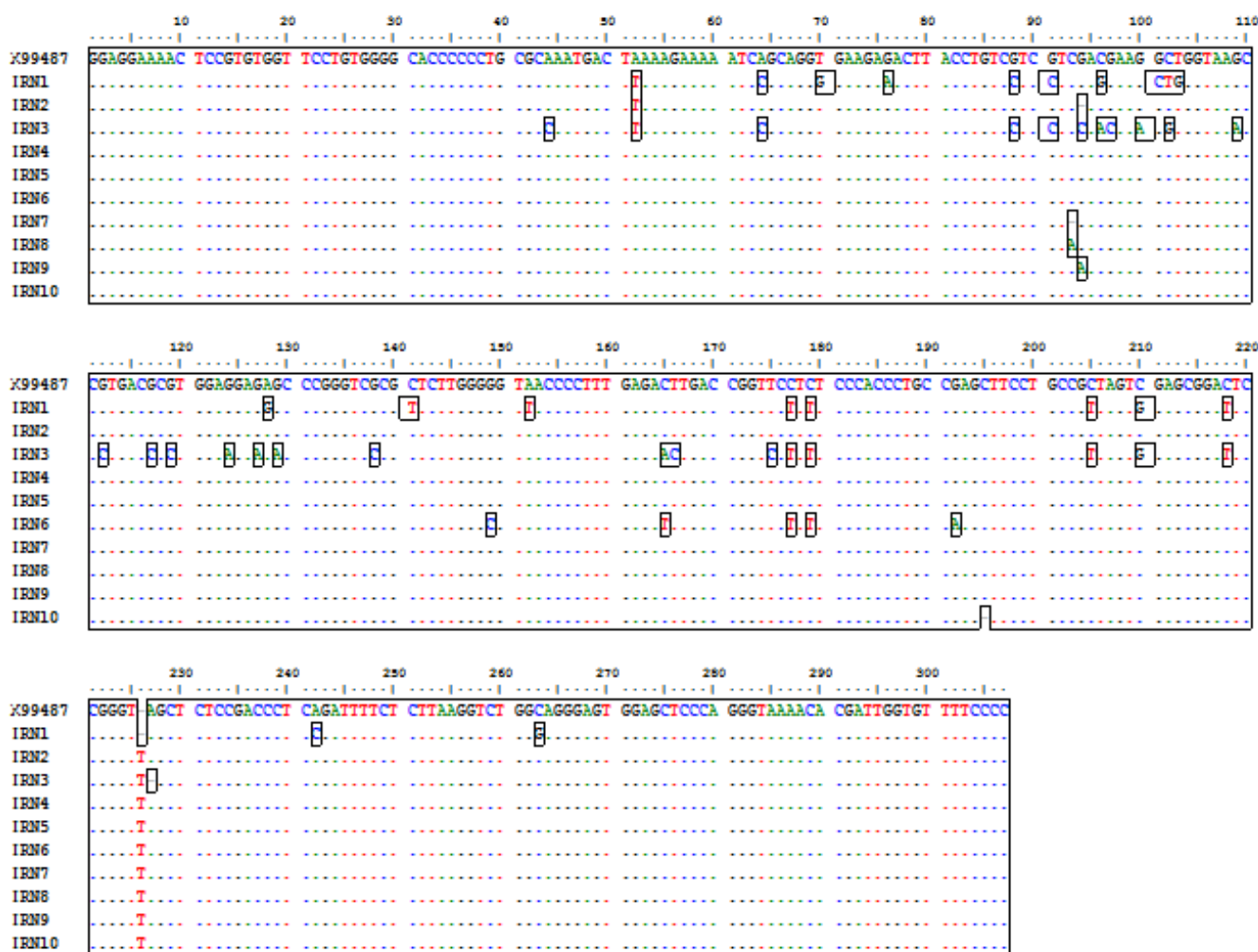
کاملاً حفاظت شده بود در حالیکه در جدایه‌های مختلف در ناحیه CCR جهش‌هایی رخ داده است. وقوع موتاسیون در این ناحیه در ویروئیدهای مختلف گزارش شده است (ایتو و همکاران ۲۰۰۰، هی و همکاران ۲۰۱۰). تغییرات در ناحیه CCR بایستی با تغییرات متقابلی در ژنوم جبران شود تا ساختار ساقه-حلقه حفظ شود (کیسی و سایمونز ۱۹۸۵) که با ساختار دو بعدی ویروئید‌های مورد مطالعه در این تحقیق مطابقت دارد.

به منظور بررسی ارتباط بین جدایه‌های ایران و دیگر جدایه‌ها و واریانت‌های موجود در بانک ژن، درخت تبارزایی با نرم افزار MEGA ۷.۷ ترسیم شد. مدل دو پارامتری کیمورا (کیمورا ۱۹۸۰) با توزیع گاما دارای کمترین BIC و AIC بعنوان بهترین مدل مناسب برای مجموعه داده‌های ترادف‌ها انتخاب شد و درخت ترسیم

هم‌ردیف سازی ترادف جدایه‌های ایران و جدایه مرجع ویروئید فرورفتگی میوه سیب (رس شمار X99487) نشان داد در موقعیت‌های ۴۴، ۵۲، ۶۴، ۷۰، ۷۶، ۸۸، ۹۱، ۹۳، ۹۴، ۹۶، ۹۷، ۱۰۰-۱۰۳، ۱۰۹، ۱۱۲، ۱۱۷، ۱۱۹، ۱۲۴، ۱۲۷-۱۲۹، ۱۲۸، ۱۴۱، ۱۴۹، ۱۵۲، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۷۵، ۱۷۷، ۱۷۹، ۱۹۲، ۲۰۵، ۲۱۰، ۲۱۸، ۲۲۶، ۲۴۲ و ۲۶۳ در یک یا چند جدایه جهش رخ داده است (شکل ۲). حذف سیتوزین در موقعیت شماره ۱۹۵ در جدایه IRN10، جاگذاری یوراسیل در موقعیت ۲۲۶ در جدایه‌های IRN2-IRN10 و حذف آدنین در موقعیت ۲۲۷ در جدایه IRN3 از دیگر تغییرات جدایه‌های ایرانی در مقایسه با جدایه مرجع بود. در کل، در جدایه‌های ایرانی، تعداد ۱ (IRN4) تا ۲۷ (IRN3) جهش در مقایسه با جدایه X99487 رخ داده است که نشان دهنده تنوع نسبتاً بالای این ویروئید است. ناحیه TCR

درخت فیلوژنتیک، بجز گروه یک، گروه‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی و میزبان (سیب و انجیر) تفکیک شده اند. قرار گرفتن جدایه های ایران و ایتالیا در یک گروه و یکسانی ترادف ۱۰۰ درصد برخی جدایه ها، می تواند حاکی از ورود این ویروئید از طریق مواد تکثیری آلوده باشد.

شده با این مدل (شکل ۳)، جدایه ها و همسانه های گزارش شده از ویروئید فرورفتگی سیب را در سه گروه قرار داد. جدایه های ایران به همراه جدایه های ایتالیا و چین در گروه یک، جدایه ژاپن در گروه دو و جدایه های جدا شده از انجیر در گروه سه قرار گرفتند. جدایه های چینی (SDYT-SDYT-3, XJ-1, SDQD-2, SDQD-1) یک گروه فرعی در گروه یک بوده و در کلاستر جداگانه ای قرار می گیرند. در این



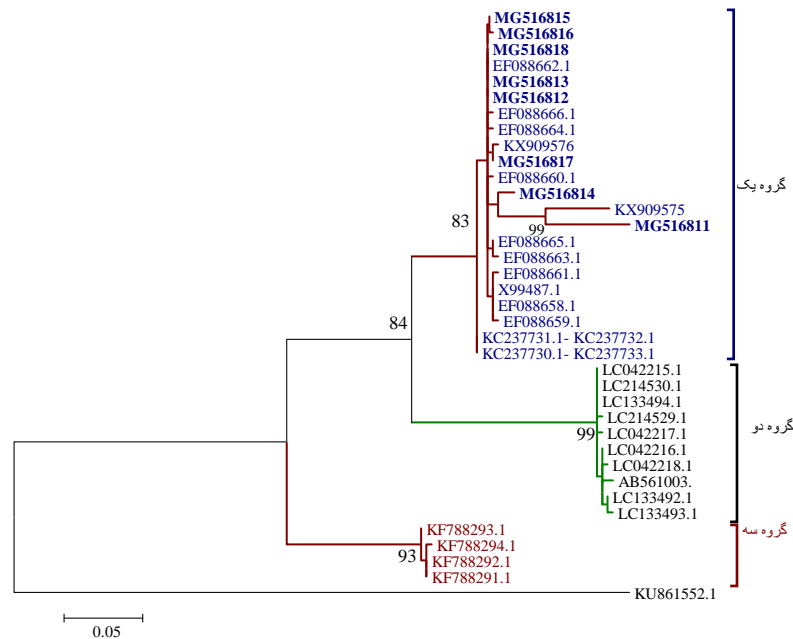
شکل ۲- هم‌ردیف سازی ترادف جدایه های ایران و جدایه مرجع X99487. موقعیت جهش‌ها بر روی جدایه‌ها مشخص شده‌اند.

انتظار برای ویروئیدهای جنس *Apscaviroid* بود (کیسی و سایمونز ۱۹۸۵). در ناحیه P یک لوپ نامتقارن در موقعیت های ۴۷-۴۲ و ۲۶۰-۲۵۹ تشکیل شد. ناحیه V، در

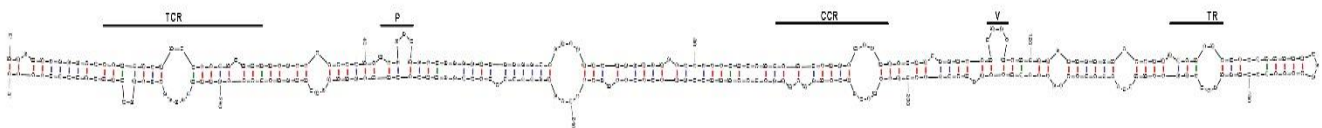
ساختار دوبعدی جدایه IRN4 ویروئید فرورفتگی میوه سیب (شکل ۴) با استفاده از نرم افزار mFold مورد مطالعه قرار گرفت که نشان دهندهی ساختار میله ای مورد

بسزایی دارد (تاکدا و دینگ ۲۰۰۹، گیگوئره و پرو ۲۰۱۷). ترادف بازها نیز در ویروئید اهمیت زیادی دارد و در همکنش با ژنوم میزبان در متیله شدن DNA یا در خاموشی ژن پس از ترجمه نقش دارد (دالاکوراس و همکاران ۲۰۱۶).

موقعیت ۱۱۶-۱۱۳ نیز بصورت ۴ نوکلئوتید بیرون زده وجود دارد. ناحیه TR در موقعیت ۱۴۰-۱۳۵ و ۱۶۸-۱۶۳ بصورت یک لوپ نسبتا بزرگی قابل مشاهده است که همگی مطابق شکل تأیید شده توسط گیگوئره و پرو (۲۰۱۷) با روش کاوش SHAP بودند. ساختار ثانویه ویروئیدها در همکنش با اجزای سلولی میزبان اهمیت



شکل ۳- درخت بازسازی فیلوژنتیکی با روش حداکثر احتمال و مدل دو پارامتری کیمورا با توزیع گاما. درخت دارای بالاترین لگاریتم احتمال نشان داده شده است. درصد تکرار بالای ۸۰ درصد در مجاور شاخه ها نشان داده شده است. طول شاخه ها بر اساس تعداد جایگزینی در هر جایگاه مقیاس بندی شده است. جدایه های ایران (پر رنگ) به همراه جدایه های ایتالیا و چین در گروه یک قرار گرفتند. گروه یک و دو شامل گونه های ADFVd گزارش شده بر روی سیب و گروه سه شامل گونه های گزارش شده بر روی انجیر هستند.



شکل ۴- ساختار ثانویه جدایه IRN4 ویروئید فرورفتگی میوه سیب و محل قرار گیری دامنه های مختلف بر روی ژنوم. از چپ به راست، TCR: ناحیه حفاظت شده انتهایی؛ V: ناحیه متغیر؛ TR: ناحیه انتهایی. CCR: ناحیه حفاظت شده مرکزی؛ P: ناحیه بیماریزایی؛ CCR: ناحیه حفاظت شده مرکزی؛ V: ناحیه متغیر؛ TR: ناحیه انتهایی.

جوان علائمی ایجاد نمی‌کنند (هائو و همکاران ۲۰۱۶). هرچند این ویروئید Golden Delicious را نیز بدون علامت آلوده می‌کند (دی سریو و همکاران ۲۰۰۲). بنابراین لازم است تحقیق بیشتری بر روی ارقام مختلف سیب، دیگر درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار و نیز گیاهان علفی انجام شود تا اتیولوژی این بیماری مشخص گردد.

سپاسگزاری

هزینه‌های این تحقیق از طرح پژوهشی شماره ۹۵/د/۴۷۳۳ دانشگاه مراغه تامین شده است. نگارنده از مدیریت پژوهشی دانشگاه مراغه سپاسگزاری می‌نماید.

در این تحقیق وقوع ویروئید فرورفتگی میوه سیب با استفاده از آزمون RT-PCR و تعیین ترادف تایید گردید. مطالعه ژنتیکی ویروئیدها می‌تواند در طراحی آغازگر به منظور تشخیص مطمئن این ویروئیدها و توسعه راهکارهای مناسب برای کنترل پایدار بیماری‌های ناشی از آنها موثر باشد. جدایه‌های ایران تشابه زیادی با جدایه‌های ایتالیا داشتند که احتمال ورود ویروس از طریق گیاهان آلوده را تقویت می‌کند. بنابراین در برنامه‌های گواهی نهال و در نهالستان‌ها و استفاده از قلمه برای پیوند بایستی توجه بیشتری صورت گیرد زیرا این ویروئید و چندین ویروئید و ویروس آلوده‌کننده‌ی سیب در درختان

منابع مورد استفاده

احمدی ک، قلیزاده ح، عبادزاده ح، حاتمی ف، حسینپور ر، کاظمی فرد ر و عبدشاه ه، ۱۳۹۵. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۴-۹۳، جلد سوم: محصولات باغبانی. وزارت جهادکشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۲۴۰ صفحه.

- Barba M, Hosakawa M, Wang QC, Taglienti A and Zhang Z, 2017. Viroid Elimination by Thermotherapy, Cold Therapy, Tissue Culture, In Vitro Micrografting, or Cryotherapy. Chapter 40. In: Viroids and Satellites. Elsevier Science. Pages: 425-435.
- Chiumenti M, Torchetti EM, Di Serio F and Minafra A, 2014. Identification and characterization of a viroid resembling *Apple dimple fruit viroid* in fig (*Ficus carica* L.) by next generation sequencing of small RNAs. *Virus Research* 188: 5-59.
- Choueiri E, El Zammar S, Jreijiri F, Hobeika C, Myrta A and Di Serio F, 2007. First report of *Apple dimple fruit viroid* in Lebanon. *Journal of Plant Pathology* 89 (2): 304.
- Dalakouras A, Dadami E, Wassenegger M, Krczal G and Wassenegger M. 2016. RNA-directed DNA methylation efficiency depends on trigger and target sequence identity. *Plant Journal* 87: 202-214.
- Di Serio F, Aparicio F, Alioto D, Ragozzino A, and Flores R 1996. Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *Journal of General Virology* 77: 2833-2837.
- Di Serio F, Flores R, Verhoeven J Th J, Li SF, Pallás V, Randles JW, Sano T, Vidalakis G and Owens RA, 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159 (12): 3467-3478.
- Di Serio F, Malfitano M, Alioto D, Ragozzino A and Flores R, 2002. *Apple dimple fruit viroid*: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of *Apple scar skin viroid*. *Journal of Plant Pathology* 84(1): 27-34.

- Diener TO 1971. Potato spindle tuber “virus” IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411–428.
- Ding B, 2009. The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 47: 105–131
- EPPO Standards, 1999. Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. Certification schemes PM, 4/27(1): 16.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flores R and Owens RA, 2008. Viroids. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, Oxford, Pages: 332–342.
- Flores R, Hernandez C, Martinez de Alba AE, Daro`s JA and Di Serio F, 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117–139.
- Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M and Diener TO, 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143: 623–629.
- Giguere T, Adkar-Purushothama CR and Perreault JP, 2014. Comprehensive Secondary Structure Elucidation of Four Genera of the Family *Pospiviroidae*. *PLOS ONE*, 9 (6): e98655.
- Giguere T and Perreault JP, 2017. Classification of the *Pospiviroidae* based on their structural hallmarks. *PLoS ONE*, 12(8): e0182536.
- Hadidi A, Flores R, Randles JW and Palukaitis P, 2017. *Viroids and Satellites*. Elsevier Science, 716 Pages.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hao L, Xie J, Chen S, Wang S, Gong Z, Ling KS, Guoa L, Fana Z and Zhou. T, 2016. A multiple RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of latent viruses and apscarviroids in apple trees. *Journal of Virological Methods* 234: 16–21.
- He YH, Isono S, Kawaguchi-Ito Y, Taneda A, Kondo K, Iijima A, Tanaka K and Sano T, 2010. Characterization of a new *Apple dimple fruit viroid* variant that causes yellow dimple fruit formation in ‘Fuji’ apple trees. *Journal of General Plant Pathology* 76(5): 324-330.
- Ito T, Ieki H and Ozaki K. 2000. A population of variants of a viroid closely related to citrus viroid-I in citrus plants. *Archives of Virology* 145: 2105–2114.
- Keese P and Symons RH, 1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 4582–4586.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-4.

- Ling KS, 2017. Decontamination Measures to Prevent Mechanical Transmission of Viroids. Chapter 41 in: *Viroids and Satellites*. Elsevier Science. Pages: 437-445.
- Malfitano M, Alioto D, Ragozzino A, Di Serio F, and Flores R, 2004. Experimental evidence that *Apple dimple fruit viroid* does not spread naturally. *Acta Horticulturae* 657: 357-360.
- Owens RA, Flores R, Di Serio F, Li S-F, Palla's V, Randles JW, Sano T and Vidalakis G, 2012. Viroids. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds), *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, London UK, Pages: 1221–1234.
- Roumi V, Gazel M, and Caglayan K, 2017. First report of *Apple dimple fruit viroid* in apple trees in Iran. *New Disease Reports* 35: 3.
- Takeda R and Ding B. 2009. Viroid intercellular trafficking: RNA motifs, cellular factors and broad impacts. *Viruses* 1: 210-21.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–4680.
- Vamenani R, Rahimian H, Alavi SM and Borhani B, 2015. A Viroid Resembling *Hop stunt viroid* in infected apple trees with apple scar skin disease in the Northeast of Iran. *Iranian Journal of Virology* 9(1): 32-35.
- Ye T, Chen SY, Wang R, Hao L, Chen H, Wang N, Guo LY, Fan ZF, Li SF and Zhou T, 2013. Identification and molecular characterization of *Apple dimple fruit viroid* in China. *Journal of Plant Pathology* 95: 637–641.

Detection and Molecular Characterization of *Apple Dimple Fruit Viroid* in Apple Trees in Maragheh Area

V Roumi^{1*}

¹Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Maragheh.

*Corresponding author: vroumi@maragheh.ac.ir

Received: 30 December 2017

Accepted: 25 April 2018

Abstract

During years 2016-2017 surveys in apple orchards of Maragheh region, 73 samples of Gala and Red delicious cultivars with symptoms resembling to those caused by *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd) were collected and subjected to two-step RT-PCR. Total RNA from stem bark and leaves of symptomatic plants showing dimple fruit and irregular yellow spots on fruit was extracted and full-length 306-307 base pairs genome of the isolates were amplified by using specific primer pairs. Ten amplicons with expected size were directly sequenced on both strands. Blast analysis and multiple sequence alignment of the sequences with those full-length ADFVd sequences deposited in GenBank, showed identities ranging from 74.4-100%. Iranian ADFVd isolates had the highest and lowest identity with two Italian isolates, accession Nos. EF088662 and KF788291, respectively. The region between CCR and TR domains was the most divergent. In phylogenetic analysis by maximum likelihood method, all Iranian isolates were clustered together with the Italian isolates and variants.

Keywords: Detection, Viroid, Dimple fruit, Apple, Maragheh.