

## ردیابی و آنالیز تبارزایی چهار ویروئید مهم آلوده کننده تاکستان‌های استان زنجان

سحر سلامی<sup>۱</sup>، رقیه مرادی<sup>۱</sup>، محمد حاجی‌زاده<sup>۲</sup>، داود کولیوند<sup>۱</sup>✉گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. <sup>۲</sup>گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

✉ Koolivand@znu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴

بازنگری: ۹۹/۱۱/۲۵

دریافت: ۹۹/۱۱/۱۳

## چکیده

ویروئیدها در دو خانواده آوسان‌ویروئیده با سه جنس (*Elaviroid* و *Avsunviroid*, *Pelamoviroid*) و پوسپی‌ویروئیده با پنج جنس (*Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Apscaviroid*, *Coleviroid* و *Cocaviroid*) طبقه‌بندی می‌شوند که ویروئیدهای شناخته شده انگور متعلق به سه جنس خانواده پوسپی‌ویروئیده هستند. به منظور بررسی وضعیت آلودگی به ویروئیدهای انگور از تاکستان‌های استان زنجان نمونه‌برداری به صورت انتخابی از گیاهان دارای علائم مشکوک و همچنین فاقد علائم ظاهری مشخص بیماری‌های ویروئیدی انجام و در مجموع ۱۲۱ نمونه گیاهی جمع‌آوری شد. استخراج آران‌ای کل از بافت‌های برگ و آوندی صورت گرفت و سپس، ساخت دی‌ان‌ای مکمل (cDNA) با استفاده از آغازگر تصادفی شش تایی انجام شد. آزمون نسخه برداری معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی‌سی‌آر) با استفاده از آغازگر اختصاصی ویروئیدهای برای ردیابی ویروئیدهای *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1)، *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2)، *Hop stunt viroid* (HSVd)، *Australian grapevine viroid* (ASGVd) انجام شد و نتایج حاکی از تکثیر قطعات اختصاصی مربوط به ویروئیدهای ذکر شده به ترتیب در ۱۶، ۱۹، ۲۴ و ۲۶ نمونه (حدود ۱۴٪، ۱۶٪، ۲۰٪ و ۲۲٪ نسبت به کل نمونه‌های آزموده شده) بود. تعیین ترادف نوکلئوتیدی هفت محصول پی‌سی‌آر به صورت انتخابی و بررسی روابط تبارزایی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه‌های جدید ردیابی‌شده در این تحقیق با جدایه‌هایی که قبلاً از ایران گزارش شده‌اند در یک گروه تبارزایی قرار می‌گیرند. علاوه بر این، آلودگی مخلوط ویروئیدهای مذکور نشان داد بیشترین آلودگی مخلوط مربوط به آلودگی با ویروئید کوتولگی رازک با سایر ویروئیدها در اکثر مناطق نمونه برداری شده بود. این مطالعه اولین گزارش از شناسایی ویروئیدهای مهم آلوده‌کننده تاکستان‌های استان زنجان بر اساس داده‌های مولکولی می‌باشد. کلمات کلیدی: آلودگی مخلوط، خانواده پوسپی‌ویروئید، مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، واکنش آر‌تی‌پی‌سی‌آر

## Detection and phylogenetic analysis of four important viroids from vineyards in Zanjan province

Sahar Salami<sup>1</sup>, Roghayeh Moradi<sup>1</sup>, Mohammad Hajizadeh<sup>2</sup>, Davoud Koolivand<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. <sup>2</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. ✉ Koolivand@znu.ac.ir

Received: 1 Feb 2021

Revised: 13 Feb 2021

Accepted: 3 Apr 2021

## Abstract

Viroids are classified in two families including Avsunviroid that consists of three genera (*Pelamoviroid*, *Avsunviroid* and *Elaviroid*) and pospiviroid including five genera (*Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Cocaviroid*, *Coleviroid* and *Pospiviroid*). Grapevine-infecting viroids belong to the three genera in the pospiviroid family. A total of 121 symptomatic and non-symptomatic leaf and green shoot samples were collected from the main vineyards in Zanjan province to detect the important viroids infecting grapevines. Total RNAs were extracted from the samples and then cDNAs were synthesized by cDNA synthesize Kit with a random hexamer primer. Specific primers used to detect *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1), *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Australian grapevine viroid* (ASGVd) in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results revealed that the specific DNA fragments corresponding to each viroids were amplified in PCR. Percentage of infections were 14%, 16%, 20% and 22% for GYSVd-1, GYSVd-2, HSVd and ASGVd relative to total number of examined samples, respectively. Sequencing of seven selected PCR-amplified fragments showed that each newly sequenced segment was classified in a clade with the previously reported respective isolates from Iran. In addition, the most mixed infection related to HSVd and other viroids. This is the first assay to detect the four important viroids infecting vineyards from Zanjan province.

**Keywords:** Pospiviroid, PCR, Mixed infection, RT-PCR

## How to cite:

Salami S, Moradi R, Hajizadeh M, Koolivand D, 2022. Detection and phylogenetic analysis of four important viroids from vineyards in Zanjan province. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (4): 71–80.

## مقدمه

قدیمی‌ترین شواهد در مورد تاریخ کشت انگور (*Vitis vinifera* L.) به قرن چهارم میلادی در خاورمیانه برمی‌گردد. گمان می‌رود انگور پیش از غلات، مورد استفاده انسان‌های اولیه بوده است. از این رو شاید بتوان انگور را مهم‌ترین و با ارزش‌ترین میوه دنیا دانست (Terral et al. 2010). ایران یکی از سرزمین‌های اولیه کشت این محصول به‌شمار می‌رود و تا قبل از جنگ جهانی دوم بزرگ‌ترین و مهم‌ترین کشور تولیدکننده کشمش و شیره انگور در جهان بود (Ataiean 2019). سه منطقه شمال غرب، شمال شرق و جنوب، عمده نواحی احداث تاکستان‌های کشور هستند. طبق آمار سازمان جهاد کشاورزی، استان زنجان جزو ۱۰ استان تولیدکننده اول کشور است و استان فارس با سهم ۱۶ درصدی، خراسان رضوی با سهم ۱۱ درصدی، قزوین با سهم ۱۰/۷ درصدی، آذربایجان شرقی با سهم ۱۰/۳ درصدی و همدان با سهم ۱۰/۱ درصدی به ترتیب در رتبه‌های اول تا پنجم تولیدکنندگان انگور کشور قرار دارند (Anonymous 2019).

ویروس‌ها، ویروئیدها و فیتوپلاسماهای زیادی انگور را در سراسر جهان آلوده می‌کنند و جزو عوامل مهم محدود کننده کشت انگور به‌شمار می‌روند. اکثر ویروئیدها دامنه میزبانی محدودی دارند اما، در سال‌های گذشته گزارش‌هایی در ارتباط با گسترش دامنه میزبانی ویروئیدها ارائه شده است (Hajizadeh et al. 2012). اولین ویروئید شرح داده شده در انگور جدایه‌ای از ویروئید کوتولگی رازک در ژاپن بود. تاکنون شش ویروئید و شبه‌ویروئید در آلودگی تاکستان‌ها شناخته شده است (Gambino et al. 2014).

انتقال ویروئیدهای انگور به‌طور عمده به‌طریق مکانیکی از راه پیوند یا مواد تکثیری آلوده انجام می‌شود. انتشار و انتقال توسط دست‌های آلوده، ادوات کشاورزی و تماس با ساقه‌های بالارونده هنگام جابجایی گیاه میسر است بنابراین بهترین و موفق‌ترین روش کنترل، حذف گیاهان آلوده و جایگزینی آنها با گیاهان سالم است (Kappagantu et al. 2017). سایر روش‌ها شامل حذف ویروئیدها از اندام‌های گیاهی با کمک حرارت درمانی یا تیمار سرمایی، کشت نوک شاخه (Shoot tip culture)، ریزپیوندی در شرایط آزمایشگاهی (Shoot-tip grafting in vitro) و یا شیمی‌درمانی (Chemotherapy)، جلوگیری از انتشار ویروئیدها، ریشه‌کشی ویروئید از اندام‌های گیاهی، حذف ویروئید با استفاده از اندام‌های گواهی شده و اعمال قرنطینه، مقاومت طبیعی و تراریخت در برابر بیمارگر، می‌باشد (Jafarpour & Sabokkhiz 2007).

ویروئیدهای لکه زردی یک (*Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) و دو (*rapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) انگور، ویروئید کوتولگی زارک (*Hop stunt viroid* (HSVd) گسترش جهانی دارند در حالیکه سایر ویروئیدهای انگور انتشار محدودتری دارند (Hajizadeh et al. 2012). از میان ویروئیدهای انگور تنها 2، 1 GYSVd باعث بروز علائمی نظیر لکه‌های زرد می‌شوند و مابقی ویروئیدهای آلوده کننده انگور علائمی ایجاد نمی‌کنند. آلودگی‌های مخلوط توسط انواع ویروئیدهای انگور معمول بوده و در مواقعی آلودگی هم‌زمان ویروس و ویروئید دیده می‌شود (Hajizadeh et al. 2012). علاوه بر ایجاد علائم منحصربفرد در ویروئیدهای ذکر شده در برخی مواقع ممکن است حالت هم‌افزایی علائم در آلودگی هم‌زمان ویروس‌های آلوده کننده انگور نیز ایجاد شود، مهم‌ترین مثال حالت هم‌افزایی به‌وجود آمده بین ویروس برگ بادبزنی انگور و عامل لکه‌زدی یک انگور (GYSVd-1) است که در نتیجه آن بیماری رگبرگ نواری شدیدی حاصل می‌شود (Jiang et al. 2012; Hajizadeh et al. 2009). آلودگی باغات انگور در برخی مناطق ایران به ویروئیدهای *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1)، *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) *Australian grapevine Hop stunt viroid* (HSVd) *viroid 2* (ASGVd) گزارش شده است (Hajizadeh et al. 2015). درصد آلودگی در باغات استان‌های شمال غربی کشور شامل آذربایجان غربی، شرقی، اردبیل و کردستان به ویروئیدهای مذکور به ترتیب ۹۱٪، ۶۴٪، ۱۰۰٪ و ۹۵٪ نمونه‌های بررسی شده بوده است.

ویروئید استرالیایی انگور در طبیعت محدود به انگور است و اولین بار توسط Rezaian et al. (1988) از انگورهایی که علاوه بر این ویروئید آلوده به ویروئیدهای لکه‌زدی یک و دو انگور، ویروئید اگزوکورتیس مرکبات و ویروئید کوتولگی رازک بودند، از استرالیا جدا شد متعاقب آن گزارشاتی از ایالت متحده آمریکا، تونس و چین ارائه شد (Zaki-Aghl et al. 1990; Rezaian 2014; Adkar-Purushothama et al. 2013). اولین گزارش از جنوب ایران، استان فارس توسط (Zaki-Aghl et al. 2013) ارائه شد. ویروئید کوتولگی رازک جدایه مربوط به انگور (HSVd) اولین ویروئید گزارش شده از انگور است که توسط Shikata et al. (1988) در ژاپن گزارش شد. سابقاً ویروئید کوتولگی رازک در ایران همراه با ویروئیدهای ۱ و ۲ لکه‌زدی از جنوب ایران گزارش شده است (Zaki-Aghl et al. 2013).

بیماری ایجاد شده توسط ویروئید لکه زردی انگور اولین بار توسط Taylore & Woodham (1972) در استرالیا شرح داده

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

طی بازدیدهای به عمل آمده در فصل‌های زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ با توجه به علائم توصیف شده مربوط به ویروئیدها در درختچه‌های انگور و برخی گیاهان بدون علائم، ۱۲۱ نمونه مشکوک از برخی تاکستان‌های استان زنجان شامل شهرهای زنجان، ابهر، خرمدره، قیدار، سلطانیه و آب‌بر شامل برگ و ساقه گردآوری شد. مشخصات نمونه‌ها مانند علائم مشاهده شده، محل و تاریخ نمونه‌برداری یادداشت و سپس نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه برای بررسی بیشتر منتقل شد. نمونه برداری در اواخر فصل بهار و تابستان و اوایل پاییز انجام شد.

### استخراج آران‌ای

انتخاب نمونه‌ها برای استخراج آران‌ای با توجه به علائم، اندام دارای علائم، محل جمع آوری نمونه‌ها و نمونه‌های بدون علائم بود. با توجه به گروه بندی نمونه‌های جمع آوری شده بر اساس علائم، منطقه و فصل جمع آوری شده استخراج آران‌ای از ۶۰ نمونه بافت برگ یا آوندی که عمدتاً دارای علائم مشخصه ویروئیدی بودند و برخی از نمونه‌های بدون علائم مطابق با روش روحانی (Rowhani *et al.* 1993)، انجام شد. استخراج از یک دهم گرم بافت انجام شد و در مرحله نهایی آران‌ای استخراج شده توسط ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد و در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از نمونه‌های آران‌ای استخراج شده، از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی (Random Hexamer) و کیت ساخت (cDNA) (HyperScript™) محصول شرکت GeneAll کره جنوبی در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر، استفاده شد. علاوه بر استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل، به منظور بررسی این آغازگرها، از آغازگرهای اختصاصی نیز برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل در مواردی استفاده شد (جدول ۱).

با توجه به cDNA های ساخته شده، واکنش زنجیره‌ای پلی-مرز با هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ویروئیدها و یا آغازگرهای اختصاصی خانواده‌های ویروئیدی (جدول ۲) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon, UK)، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۲/۵ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۱/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  برای دو دقیقه، و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵

شده است. نقش این ویروئیدها در سبب‌شناسی بیماری به صورت نامعلوم باقی مانده بود تا این که GYSVd-1، توسط Rezaian & Koltunow (1988) از رقم کابرننت فرانک (Cabernet Franc) معرفی شد. GYSVd-2، یک سال پس از ویروئید لکه‌زردی ۱ انگور توسط Rezaian & Koltunow (1989) از رقم کیوتو (Kyoto) که روی پایه رقم دوگریج (Dogridge) پیوند خورده و علائم لکه‌زردی را نشان می‌داد، جداسازی شد (Elleuch *et al.* 2002; Vozarova *et al.* 2016). در سال‌های بعد گزارش‌هایی از سراسر جهان مبنی بر حضور این ویروئیدها منتشر شده است. گزارش ویروئیدهای لکه‌زردی ۱ و ۲ انگور همراه با ویروئید کوتولگی (Zaki-Aghl *et al.* 2013) از تاکستان‌های استان‌های فارس و آذربایجان غربی وجود دارد.

علائم ایجاد شده توسط ویروئیدها شباهت بسیار زیادی به علائم ویروس‌های آلوده کننده دارند و غالباً علائم متمایز کننده‌ای بین بیماری‌های ویروسی و ویروئیدی وجود ندارد (Flores *et al.* 2005; Adkar-Purushothama *et al.* 2014). به دلیل وسعت کشت انگور در کشور و اهمیت فوق‌العاده آن در اقتصاد جهانی تلاش مضاعف در جهت شناسایی دقیق بیمارگر و بیماری‌های انگور با استفاده از روشی سریع با حساسیت بالا جهت اتخاذ تدابیر مناسب در جهت پیشگیری و مبارزه با عوامل بیماری‌زا ضروری است (Wilcon *et al.* 2015). روش‌های تشخیص مولکولی با استفاده از پروب‌های رادیواکتیو یا نشان‌دار آرتی‌پی‌سی‌آر، ایمونوکپچر آرتی‌پی‌سی‌آر (Immunocapture RT-PCR)، آرتی‌پی‌سی‌آر چندگانه (Multiplex PCR) و Real Time PCR از دقت، حساسیت و سرعت بالاتری برخوردار بوده و در مقایسه با روش‌های سرولوژیکی و سنتی به دلیل سادگی نسبی و حساسیت بالا در سال‌های اخیر کاربرد بیشتری یافته‌اند (Digiario *et al.* 2007; Bagherian *et al.* 2009; Cepin *et al.* 2010).

استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی عوامل بیماری‌زا می‌تواند باعث تسریع در روند تشخیص شود. همچنین، بررسی ویژگی‌های مولکولی و ارتباط‌های تبارزایی جدایه‌های ویروئیدی می‌تواند روابط جدایه‌های گزارش شده با جدایه‌های جدید را مشخص نماید. هدف این پژوهش، شناسایی ویروئیدهای آلوده کننده انگور از مناطق انگورکاری عمده استان زنجان، بررسی روابط تبارزایی و ساختارهای آنها و بررسی آلودگی‌های مخلوط آنها با همدیگر و برخی از ویروس‌های مهم آلوده کننده انگور با استفاده از روش‌های مولکولی است.

دقیقه (جهت تکمیل پلیمریزاسیون) و  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت سه دقیقه انجام گردید. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش آر تی پی سی آر، شش میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش پی سی آر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر TBE 1X الکتروفورز شد.

ثانیه،  $48^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵۰ ثانیه (دمای ذکر شده نسبت به آلودگی مورد بررسی پس از چند مرحله بهینه سازی دمایی با تغییرات دو درجه ای در دمای اتصال آغازگرها متغیر است)،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه و همچنین یک مرحله بسط نهایی  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ده

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت ردیابی ویروئیدهای آلوده کننده انگور.

**Table 1.** Sequences of primers that used to detect the grapevine viroids.

Viroid	Primer Sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Reference
GYSVd-1	GYSVd-1-mF CAAAGCCCTTTTCTTTCAACTGAG	250	Hajizadeh <i>et al.</i> 2012
	GYSVd-1-mRI CCCAGAGCAGCGTGGTCC		
	GYSVd-1-mR2 CCCAGAGCAGCGTGG(T/C)(C/T)(C/T)		
GYSVd-2	GYSVd-2-PI ACTAGTACTTTCTTCTATCTCCGAAGC	375	Hajizadeh <i>et al.</i> 2012
	GYSVd-2-P2 ACTAGTCCGAGGACCTTTTCTAGCGC		
HSVd	HSVd-78P AACCCGGGGCAACTCTTCTC	312	Hajizadeh <i>et al.</i> 2012
	HSV-83 M AACCCGGGGCTCCTTTCTCA		
AGVd	AG-cl CTCGACGACGAGTCGCCAGGTGAGTCTT	369	Wan and Symons 1997
	AG-h1 GTCGACGAAGGGTCTCAGCAGAGCACC		

فاصله بین گره ها)، میوه ها (رنگ پریدگی، بدشکل شدن پوست، ترک خوردگی پوست میوه و بزرگ شدن هسته) به علاوه علائم غیرواضح نظیر تاخیر در برگ دهی، گل دهی و رسیدگی میوه و بلوغ درخت یا درختچه بودند و تعداد محدودی نیز بدون علائم بودند (شکل ۱) ( Flores *et al.* 2005; Adkar-Purushothama *et al.* 2014). گرچه علائم مختلف در طول فصل رشد در باغات مختلف وجود داشت اما اغلب علائم خفیف تا شدید، در اواخر بهار و اوایل تابستان و یا اواخر تابستان و اوایل پاییز قابل مشاهده بودند.

#### نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرار

نتایج ساخت cDNA و انجام پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئید مورد بررسی حاکی از تکثیر قطعات مورد انتظار در آزمون پی سی آر بود. نتایج پی سی آر با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ویروئید استرالیائی انگور (AGVd) قطعه ۳۷۰ باز در ۲۲ درصد نمونه های بررسی شده، قطعات اختصاصی مربوط به ویروئیدهای زردی ۱ و ۲ انگور به ترتیب در ۱۴ و ۱۶ درصد نمونه های بررسی شده، و همچنین قطعات اختصاصی مربوط به ویروئید کوتولگی رازک در ۲۰ درصد نمونه های بررسی شده مشاهده شد.

#### تعیین توالی محصولات پی سی آر و رسم درخت تبارزایی

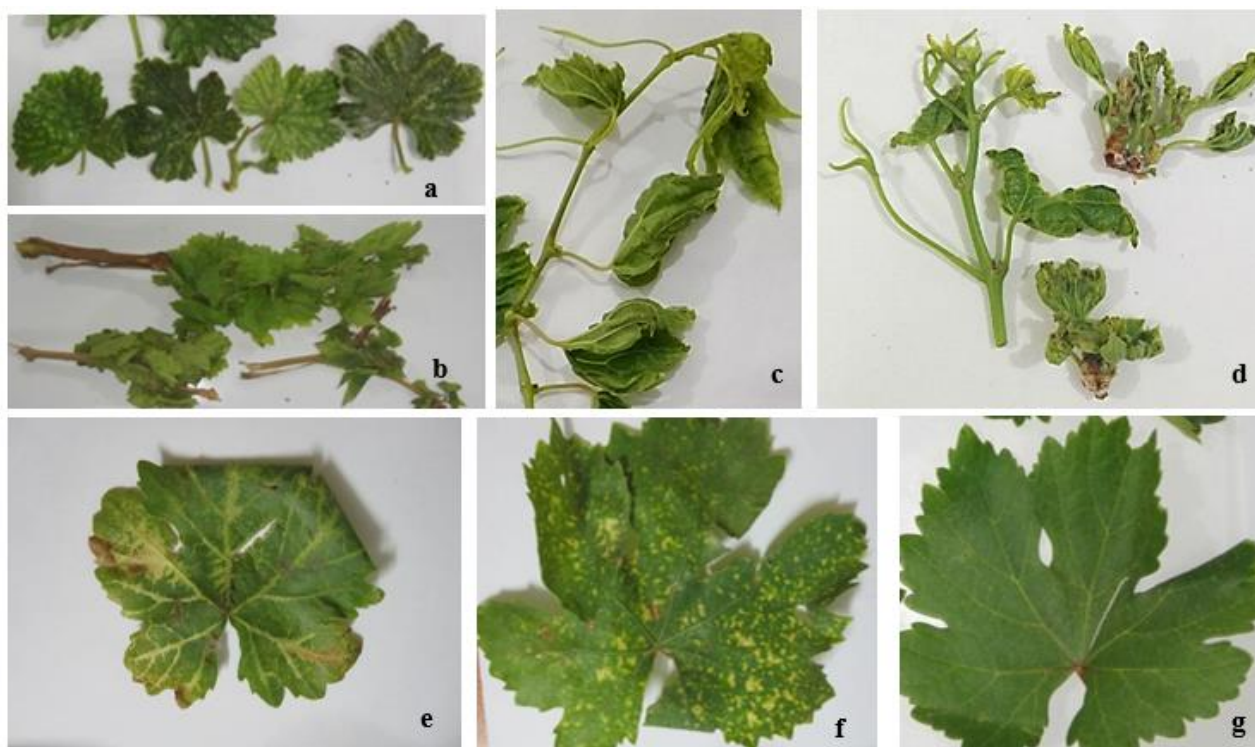
هفت محصول پی سی آر برحسب گونه ویروئید، موقعیت جغرافیایی جدایه و نوع علائم انتخاب و توسط شرکت پیشگام خالص سازی و توالی یابی شدند.

توالی های به دست آمده از محصولات پی سی آر با اطلاعات و توالی های موجود در ژن بانک (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۲). داده های نوکلئوتیدی توالی یابی شده با داده های نوکلئوتیدی هر کدام از ویروئیدها با جدایه های موجود مربوط به آن ویروئید در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم افزار MEGA 7 (Kumar *et al.* 2016) و روش Neighbor Joining هم ردیف سازی چندگانه شدند و در نهایت درخت تبارزایی با تکرار ۱۰۰۰ بوت استرپ ترسیم گردید.

#### نتایج و بحث

##### مشاهدات مزرعه ای

از مجموع ۱۲۱ نمونه ای که از مناطق مختلف استان زنجان در طی فصل های بهار، تابستان و پاییز سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ جمع آوری گردید، اغلب نمونه ها دارای علائم مشکوک ویروئیدی روی برگ (کلروز کامل یا لکه ای برگ، بدشکلی، ابلقی، تغییر رنگ رگبرگ ها، رگبرگ روشنی، نکروز، روخمش، چین داری)، اندام های ذخیره ای (بدشکلی اندام)، گل ها (کاهش اندازه، شکستگی رنگ گلبرگ ها)، تنه (پوسته پوسته شدن، ترک خوردگی و شانکر)، ساقه (ساقه آبله ای، کوتولگی، کاهش



شکل ۱. علائم در نمونه‌هایی که آلودگی آنها به ویروئیدها مثبت بوده است. a-f آلوده به GYSVd-1، b آلوده به GYSVd-2، c-d آلوده به ASGVd، e-g آلوده به HSVd.

**Figure 1.** Symptoms in positive samples infected by viroids. a-f. infected by GYSVd-1, b. infected by GYSVd-2, c-d. infected by ASGVd, e-g. infected by HSVd.

#### نتایج تجزیه و تحلیل تبارزایی

نتیجه بلاست توالی‌های به دست آمده از قطعات تکثیر شده در آزمون پی‌سی‌آر با توالی‌های موجود در ژن‌بانک نشان داد که قطعات تکثیر یافته، متعلق به ویروئیدهای بررسی شده می‌باشد که از آغازگر اختصاصی آنها برای تکثیر بخشی از ژنوم استفاده شده بود (شکل ۲).

تعیین ترادف نوکلئوتیدی برخی از محصولات به صورت انتخابی و بررسی روابط تبارزایی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه‌های جدید ردیابی شده در این تحقیق با جدایه‌هایی که قبلاً از ایران گزارش شده اند در یک گروه تبارزایی قرار می‌گیرند.

تجزیه تحلیل تبارزایی توالی‌های دریافت شده در یک درخت تبارزایی به صورت کلی انجام شد. همانطور که در نتایج درخت تبارزایی مشخص است هر گونه ویروئیدی یک زیرشاخه مختص به خود را تشکیل می‌دهد. جدایه‌های هر گونه ویروئیدی در زیرشاخه‌های مختص به خود قرار گرفتند که در درون هر زیرشاخه ویروئیدهای ردیابی شده دارای تنوع بودند در حالیکه در نزدیک جدایه‌های ایرانی قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج بررسی آلودگی‌های مخلوط نشان داد که آلودگی HSVd و GYSVd-1 در دو نمونه (یک نمونه از زنجان و یک نمونه از ابهر)، HSVd و GYSVd-2 در سه نمونه (یک نمونه از زنجان، یک نمونه از سلطانیه و یک نمونه از ایجرود)، GYSVd-1 و 2 در یک نمونه از سلطانیه، HSVd و ASGVd در سه نمونه مشاهده شد (یک نمونه از ابهر، یک نمونه از خرمدره و یک نمونه از زنجان). علاوه بر این آلودگی مخلوط سه تایی به ویروئیدها HSVd و GYSVd-1 و ASGVd در دو نمونه از زنجان و HSVd و GYSVd-1 و GYSVd-2 در یک نمونه از ابهر ردیابی شد. همچنین نتایج آلودگی مخلوط به ویروس‌های GFLV و ArMV و GVA نشان داد که آلودگی مخلوط HSVd و GFLV در دو نمونه (یک نمونه از زنجان و سه نمونه از سلطانیه) و آلودگی مخلوط ArMV و GYSVd-1 در یک نمونه از سلطانیه شناسایی شد. آلودگی مخلوط به GVA همراه با ویروئیدها شناسایی نشد در حالیکه دو نمونه آلودگی منفرد به GVA داشتند (جدول ۳).

برخی از مناطق استان زنجان دارای تاکستان‌هایی می‌باشد که قدمت بسیار زیادی در حدود ۱۰۰ سال دارد و از نظر ذخایر

پلی آکریل آمید، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و دو رگ‌گیری اسیدنوکلیک است.

گاهی در برخی از جدایه‌ها به دلیل تاثیر تنوع ژنومی ویروئید، ردیابی از طریق آر تی پی سی آر نیز دچار اشکال می‌شود که این مورد ناشی از عدم تطابق ترادف آغازگرها با توالی ژنوم ویروئید است. در مجموع نتایج تایید می‌کند که روش‌های مولکولی نظیر RT-PCR و انتخاب آغازگرهای اختصاصی روش حساس و دقیق برای ردیابی ویروئیدهای انگور بوده و این روش می‌تواند در برنامه صدور گواهی سلامت انگور نقش داشته باشد لذا، روش‌های زیادی جهت استخراج موفق و با کیفیت بالای آر ان ای از انگور بهینه‌سازی شده است (Osman *et al.* 2013).

در نمونه‌های مورد بررسی، بیشترین میزان آلودگی به ترتیب ویروئید کوتولگی رازک، ویروئید ۱ لکه زرد انگور و ویروئید ۲ لکه زرد انگور بودند. آزمون آلودگی‌های مخلوط به ویروئیدهای بررسی شده نشانگر حضور همزمان ویروئیدهای مختلف می‌باشد. این احتمال وجود دارد که استفاده از قلمه‌های ظاهراً سالم (اما آلوده)، عدم استفاده از ارقام مقاوم‌تر، از بین نبردن منابع آلودگی در تاکستان‌ها، وجین نکردن علف‌های هرز میزبان به منظور از بین بردن چرخه آلودگی می‌تواند از دلایل گسترش آلودگی ویروئیدی در مناطق مختلف استان باشد. ویروئید ۱ لکه زرد انگور تنوع ژنتیکی زیادی دارد و واریانتهای مختلفی از آن گزارش شده است. در اکثر موارد تغییرات توالی در ناحیه بیماری‌زای (PD) ژنوم این ویروئید رخ می‌دهد (Zaki-Aghl *et al.* 2013; Vozarova *et al.* 2016). یک رابطه هم افزایی بین ویروئیدهای لکه زردی انگور و ویروس برگ بادبزی مو وجود دارد و در درختچه‌هایی که به‌طور هم‌زمان به این بیمارگرها آلوده‌اند علائم بیماری شدت یافته و به‌صورت رگبرگ نواری مشاهده می‌شود (Szychowski *et al.* 1995; Gambino *et al.* 2014; Moradi *et al.* 2018).

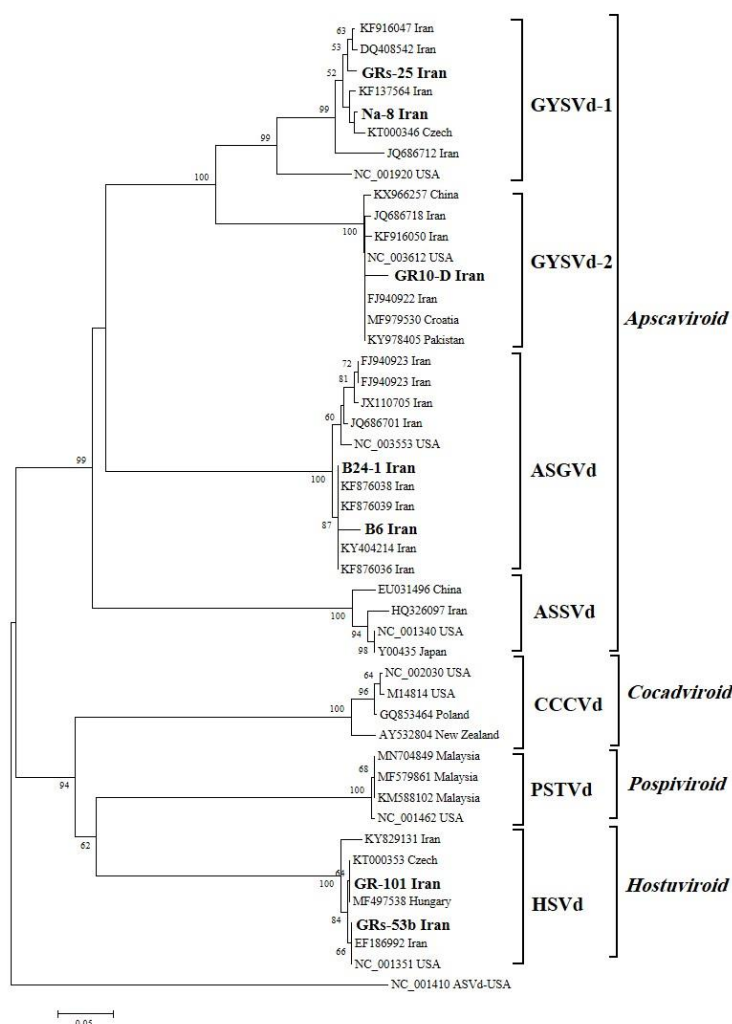
### سیاسگزاری

بدینوسیله از معانت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان تقدیر و تشکر می‌گردد.

ژنتیکی و ژن‌های مقاومت می‌تواند اهمیت بسیار بالایی داشته باشد. مشاهدات میدانی مؤید تنوع علائم ویروئیدی در تاکستان‌های مناطق مورد مطالعه بود که می‌تواند نشان دهنده وجود جدایه‌های متنوع ویروئیدی و پاسخ‌های متنوع ارقام مختلف انگور در مناطق متفاوت باشد از میان ویروئیدهای آلوده کننده انگور ویروئید کوتولگی رازک به‌عنوان ویروئید بومی در اکثر مناطق کشت انگور شناسایی شد به طوری که در تحقیق قبلی این ویروئید در صد درصد نمونه‌های برداشت شده که دارای علائم و یا فاقد علائم بودند شناسایی شدند (Hajizadeh *et al.* 2012).

تمام گیاهان آلوده به ویروئید علائم آشکار بیماری را نشان نمی‌دهند بلکه در برخی موارد یک ویروئید ممکن است در یک میزبان مخفی شود یا علائم خفیفی ایجاد کند که تا زمانیکه باعث ایجاد علائم شدید در میزبان دیگری شود، به‌سختی قابل رویت و ردیابی باشد (Hammond & Owens 2006). علائم مشاهده شده به طور اختصاصی مربوط به همان ویروئید ردیابی شده نمی‌باشد و ممکن است سایر عوامل بیمارگر زنده مانند سایر ویروئیدها و ویروس‌ها و یا عوامل غیر زنده مانند کمبودهای مواد غذایی، شرایط محیطی مانند بارش تگرگ و غیره در علائم نقش داشته باشند چرا که برای بررسی علائم منحصر به فرد هر ویروئید باید مطالعات روی بیماری‌زایی و علائم هر کدام از ویروئیدها به صورت جداگانه و عاری از هر نوع ویروئید یا بیمارگر زنده و غیر زنده بررسی شود. در مورد برخی از نمونه‌ها علیرغم مشاهده علائم در مشاهدات اولیه، نتیجه بررسی آلودگی به ویروئید برای تعدادی از نمونه‌ها منفی بود. ممکن است شرایط محیطی نامطلوب موجب کاهش غلظت ویروئیدهای شود، میزبان با سایر ویروئیدها آلوده شده باشد یا غالب بودن سایر ویروئیدهای بیمارگر چنین علائمی را در گیاه ایجاد کرده باشد (Osman *et al.* 2013).

از آنجا که ویروئیدها هیچ پروتئین اختصاصی تولید نمی‌کنند امکان استفاده از روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص وجود ندارد. بنابراین روش‌های تشخیص ویروئیدها محدود به آزمون‌های بیولوژیکی و روش‌های مولکولی (الکتروفورز ژل



**شکل ۲.** آنالیز تبارزایی جدایه‌های ویروئیدهای مختلف آلوده کننده انگور بر اساس داده‌های اسید نوکلئیک شامل جدایه‌های ایرانی که از قبل و در این تحقیق شناسایی شده اند. درخت با روش Neighbor-Joining در نرم افزار MEGA7 ترسیم شده است. بوت‌استرپ بیش از ۵۰ درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه‌های ایرانی به صورت پررنگ مشخص شده است. ASVd به عنوان عضو برون گروه انتخاب گردید.

**Figure 2.** Phylogenetic analysis of different viroids in grapevine based on nucleic acid information including new isolates in this research and previously reported Iranian isolates. The tree was created by MEGA7 software and Neighbor-Joining method. Branches with bootstrap values less than 50 were removed. The new Iranian isolates are shown in Bold. ASVd used as the outgroup.

**جدول ۲.** اطلاعات مربوط به جدایه‌های استفاده شده برای رسم درخت تبارزایی.

**Table 2.** Information on the isolates that used for phylogenetic tree.

Viroid	Isolate	Accession Number	Host	Country
GYSVd-1	-	NC_001920	-	USA
	GYSVd-1-CF7#1	JQ686712	-	Iran
	xatam	KF916047	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	Amh1#15	JQ686709	-	Iran
	Sh-8-1/3	DQ408542	-	Iran
	VD-102	MF979529	<i>Vitis vinifera</i>	Croatia
	TI_23	KT000346	<i>Vitis vinifera</i>	Czech
HSVd	HSVd-CY73	KX819244	<i>Citrus sp</i>	Cyprus
	TI_23	KT000353	<i>Vitis vinifera</i>	Czech
	HSV-HUMK4	MF497538	Grapevine	Hungary
	Ker.Far.P	KY829131	<i>Pistacia vera</i>	Iran



ادامه جدول ۲				
	IR-Gala	MN695313	<i>Malus domestica</i>	Iran
	LMSX2	EF186992	<i>Satsuma mandarin</i>	Iran
	gahro	KF876039	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	mahalat	KF876038	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
AGVd	AGVd-AO14#1	JQ686704	-	Iran
	AGVd-Bm10#2	JQ686701	-	Iran
	AGVd18	FJ940923	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	2	JX110705	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	AGVd-Iran6	KY404214	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	shahreza	KF876036	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
GYSVd-2	CZZ 1	KX966257		China
	gahro	KF916050	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
	GYSVd-2-CF7#2	JQ686718		Iran
	Bm10#1	JQ686716		Iran
	ys29	FJ940922	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
		NC_003612	<i>Vitis vinifera</i>	USA
	VB-108	MF979530	<i>Vitis vinifera</i>	Croatia
	SL13- I	KY978405	<i>Vitis vinifera</i>	Pakistan
PSTVd	PSTVd-PM1-46	GQ853464	<i>Solanum tuberosum</i>	Poland
		NC_002030		USA
		M14814		
		AY532804	<i>Capsicum annum</i>	New Zealand
ASSVd		NC_001340		USA
	Chrysanthemum	Y00435		Japan
	ASS_AP10	EU031496	Apricot	China
	AY10ch7	HQ326097	<i>Pyrus communis</i>	Iran
CCCVd	CP246	KM588102	<i>Cocos nucifera</i>	Malaysia
	UPM13D	MN704849		Malaysia
	720	MF579861	<i>Elaeis guineensis</i>	Malaysia
		NC_001462		USA

جدول ۳. اطلاعات مربوط به درصد آلودگی نمونه های مختلف ویروئیدهای جداسازی شده در این تحقیق.

**Table 3.** Percentage of infectivity to different viroids.

Number	Region	Infectivity Percentage			
		ASGVd	GYSVd-2	GYSVd-1	HSVd
Zanjan	25	24	12	16	20
Ijrood	10	20	20	10	20
Abhar	26	19.23	15.38	11.5	15.4
Khoramdareh	12	16.66	16.66	8.33	25
Tarom	13	23.07	7.69	7.69	23.07
Zanjanrood	14	21.42	28.57	21.42	14.28
Soltaniyeh	21	23.8	14.28	14.28	23.8
Total	121	21.48	15.7	13.22	19.83



## References

- Anonymous, 2019. Statistics reports of ministry of Jahad-Agriculture. <https://www.maj.ir>. [Accessed on 3 April 2021].
- Adkar-Purushothama CR, Kanchepalli PR, Yanjarappa SM, Zhang Z Sano T, 2014. Detection, distribution, and genetic diversity of Australian grapevine viroid in grapevines in India. *Virus Genes* 49(2): 304–311.
- Ataeian 2019.
- Bagherian SAA, Amid-Motlagh MH, Izadpanah K, 2009. A new sensitive method for detection of Viroids. *Iranian Journal of Virology* 3: 7–11.
- Cepin U, Gutiérrez-Aguirre I, Balazic L, Pompe-Novak M, Gruden K, *et al.* 2010. A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Virological Methods* 170: 47–56.
- Digiario M, Elbeaino T, Martelli GP, 2007. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of Virological Methods* 141: 34–40.
- Elleuch A, Fakhfakh H, Pelchat M, Landry P, Marrakchi M, *et al.*, 2002. Sequencing of *Australian grapevine viroid* and *Yellow speckle viroid* isolated from a Tunisian grapevine without passage in an indicator plant. *European Journal of Plant Pathology* 108: 815-820.
- Flores R, Hernadez C, Martinez de Alba AE, Daros JA, Di Serio F, 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117–139.
- Gambino G, Navarro B, Torchetti E, La Note P, Di Serio F, 2014. Survey on viroids infecting grapevine in Italy: identification and characterization of Australian grapevine viroid and Grapevine yellow speckle viroid 2. *European Journal of Plant Pathology* 140:199–205.
- Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS, Torchetti EM, Di Serio F, 2012. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. *Virological Methods* 179: 62–69.
- Hammond RW, Owens RA, 2006. Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> [Accessed on 3 April 2021].
- Jiang D, Guo R, Wu Z, Wang H, Li S, 2009. Molecular characterization of a member of a new species of grapevine viroid. *Archives of Virology* 154: 1563–1566.
- Jafarpour B, Sabokkhiz MA, 2007. Viroids (the smallest causal agent plants). Ferdowsi Mashhad University, 306 pp. (In Persian).
- Kappagantu M, Nelson ME, Bullock JM, Kenny ST, Eastwell KC, 2017. Hop Stunt Viroid: Effects on Vegetative Growth and Yield of Hop Cultivars, and Its Distribution in Central Washington State. *Plant Disease* 101: 607–612.
- Koltunow AM, Rezaian A, 1988. A scheme for viroid classification. *Intervirology* 30:194–201.
- Koltunow AM, Krake LR, Johnson SD, Rezaian MA, 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *Journal of General Virology* 70: 3411–3419.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Moradi R, Koolivand D, Eini O, Hajizadeh, M, 2018. Molecular identification of four important nepovirus from vineyards of Zanjan province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*. 49: 110–119.
- Osman F, Hodzic E, Omanska-Klusek A, Olineka T, Rowhani A, 2013. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A, B and D*. *Virological Methods* 194:138–145.
- Rezaian MA, 1990. *Australian greapevine viroid* – evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Research* 18: 1813–1818.
- Rezaian MA, Koltunow AM, Krake LR, 1988. Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *Journal of General Virology* 69: 413–422.
- Rowhani A, Chay C, Golino DA, Falk BW, 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine Tissue. *Plant Pathology* 83: 749–753.
- Shikata E, Sano T, Uyeda I, 1984. An infectious low molecular weight RNA was detected in grapevines by molecular hybridisation with hop stunt viroid cDNA. *Proceedings of Japan Academy Series B* 60:202.
- Szychowski JA, McHenry MV, Walker MA, Walpert JA, Credi R, *et al.*, 1995. The vein-banding disease syndrome: a synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. *Vitis* 34: 229–232.
- Terral JF, Tabard E, Bouby L, Ivorra S, Pastor T, *et al.* 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication

- syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany* 105: 443–455.
- Taylor RH, Woodham RC, 1972. Grapevine yellow speckle—a newly recognized graft-transmissible disease of *Vitis*. *Australian Journal of Agricultural Research* 23:447–452.
- Vojarova Z, Sihelska N, Predajna L, Soltys K, Glasa M, 2016. First report of grapevine yellow speckle viroid-1 infecting grapevines in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 98: 677–697.
- Wan Chow Wah J, Symons R, 1997. A highly sensitive RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. *Journal of Virological Methods* 63: 57–69.
- Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto JK, 2015. Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests. APS Press, The American Phytopathological Society. 232 pp.
- Zaki-Aghl M, Izadpanah K, Niazi, A, Behjatnia SAA, Afsharifar AR, 2013. Molecular and biological characterization of the Iranian isolate of the *Australian grapevine viroid*. *Journal of Agriculture Science and Technology* 15: 855–865.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)