

## ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئیدهای مرکبات و اثبات بیماری‌زایی آنها

لیلا ابراهیمی مقدم<sup>۱</sup>، محمد زکی عقل<sup>۱\*</sup>، بهروز جعفرپور<sup>۱</sup> و محسن مهرور<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶)

### چکیده

ویروئیدها آر آن‌های بیماری‌زا در گیاهان هستند که توانایی رمز کردن پروتئین را ندارند. تاکنون هفت ویروئید از چهار جنس خانواده *Pospiviroidae* از مرکبات گزارش شده‌اند. با ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئیدهای مرکبات امکان سنجش بیماری‌زایی آنها فراهم شد. از آر آن‌ها کل استخراج‌شده از نهال پرتقال خونی موروثی کامل ویروئیدهای *CEVd*، *HSVd*، *CBCVd*، *CDVd*، *CVdV* و *CBLVd* در واکنش RT-PCR تکثیر و توالی‌یابی شد. سپس ژنوم کامل هر ویروئید بطور جداگانه در ناقل دوتایی pBin62SK تحت کنترل پیشبر ۳۵s ویروس موزائیک گل کلم (*Cauliflower mosaic virus, CaMV*) قرار گرفت. بیماری‌زایی ویروئیدها در گیاهان خیار (*Cucumis sativus*)، گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata*) از طریق مایه‌زنی آگروباکتریوم حاوی سازه‌های عفونت‌زای آنها انجام شد. سه هفته پس از مایه‌زنی حضور ویروئیدها در برگ‌های جدید گیاهان مایه‌زنی‌شده با آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و هیبریداسیون نقطه ای با کاوشگر اختصاصی هر ویروئید تأیید شد. پنج هفته پس از مایه‌زنی، علائم ریزبرگی، پیسک و روخمشی توسط *CVdV* و *CBCVd*، پیسک توسط *CDVd* و علائم روخمش و بدشکلی برگ بوسیله *CEVd*، *HSVd* و *CBLVd* در برگ‌های گوجه‌فرنگی ظاهر شدند. مایه‌زنی مکانیکی عصاره آلوده به گیاهان سالم نیز علائم مشابهی را تولید کرد. ردیابی ویروئید در برگ‌های جدید گیاهان مایه‌زنی‌شده بیانگر عفونت‌زایی سازه ساخته شده است. همسانه‌های عفونت‌زای *CEVd*، *HSVd* و *CBCVd* پیش‌تر ساخته شده است ولی این اولین گزارش از ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئیدهای *CDVd*، *CBLVd* و *CVdV* است.

کلیدواژه: ویروئید، مرکبات، سازه عفونت‌زا، بیماری‌زایی

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zakiaghl@ferdowsi.um.ac.ir

۱. گروه گیاه‌پزشکی، بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

## Construction of infectious clones and demonstration of pathogenicity of citrus viroids

L. Ebrahimi-moghadam<sup>1</sup>, M. Zakiaghl<sup>1\*</sup>, B. Jafarpour<sup>1</sup>, and M. Mehrvar<sup>1</sup>

(Received: 29.5.2017; Accepted: 25.2.2018)

### Abstract

Viroids are pathogenic RNAs in plants without protein encoding capacity. Seven viroids belonging to four genera in the *Pospiviroidae* family have been reported from citrus species. By constructing the infectious clones of citrus viroids, it was possible to carry out their pathogenicity test. Full-length genome of CEVd, HSVd, CBCVd, CDVd, CVdV and CBLVd was separately amplified in RT-PCR using total RNA extracted from a Moro blood orange plant and resulting PCR products were sequenced. The full-length genome of each viroid was inserted under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in a pBin62SK binary vector. Pathogenicity of viroids was tested by agroinoculation of their infectious clones to cucumber (*Cucumis sativus*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). Three weeks after inoculation, viroids were detected in newly grown leaves of inoculated plants by RT-PCR using specific primers and by dot blot hybridization using viroid specific probes. Five weeks after inoculation, symptoms including little leaf, mottling and epinasty by CVdV and CBCVd, mottling by CDVd, and epinasty and leaf deformation by CEVd, HSVd and CBLVd in tomato leaves were observed. Mechanical inoculation of infected sap of infected tomato plants induced similar symptoms in healthy tomato plants. Identification of the viroids in newly grown leaves of inoculated plants indicated the infectiousness of the generated constructs. Infectious clones of CEVd, HSVd and CBCVd were previously made, but it is the first report of the construction of the infectious clone for CDVd, CBLVd and CVdV.

**Keywords:** Viroid, citrus, infectious clone, pathogenicity

---

\*Corresponding author's E-mail: Zakiaghl@ferdowsi.um.ac.ir

1. Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

## مقدمه

(Hadidi et al. 2003). علی‌رغم اینکه میزبان اصلی CBCVd گونه‌های مختلف مرکبات است اما اخیراً این ویروئید در آلودگی طبیعی در گیاهان رازک نیز گزارش شده است (Jakse et al. 2015). CDVd که سابق بر این *Citrus viroid III* نامگذاری شده بود، ۲۹۲-۲۸۰ نوکلئوتید طول دارد و موجب کوتولگی شدید درخت آلوده می‌شود (Murcia et al. 2009). این ویروئید در گیاه اتراک (*Citrus medica*, L.) علایم خم شدن برگ‌ها ناشی از انسداد آوندها در دمبرگ‌ها را ایجاد می‌کند (Rakowski et al. 1994). ویروئید CBLVd با نام قبلی *Citrus viroid I* دارای قسمتی از ناحیه مرکزی حفظ‌شده‌ی ویروئید Ashulin et al. (ASSVd) می‌باشد (1991). علایم CBLVd در اتراک آلوده شامل خم شدن برگ، نکروز رگبرگ میانی و خروج صمغ از پوست می‌باشد (Sera et al. 2008b). ویروئید پنج مرکبات (CVdV) نیز ابتدا در گونه‌ای از مرکبات به نام آتالانتیا (*Atalantia citroides*) شناخته شد. این گیاه به آلودگی CVdV حساس است لیکن به ویروئیدهای CEVd، HSVd و CBCVd، CBLVd و CDVd مقاوم است (Barbosa et al. 2002). ژنوم CVdV غنی از بازهای گوانین و سیتوزین بوده و ۲۹۳-۲۹۴ نوکلئوتید طول دارد (Serra et al. 2008b). این ویروئید بیشتر گونه‌های مرکبات را آلوده می‌کند (Sera et al. 2008a).

آلودگی همزمان CVdV، CBLVd و CDVd موجب هم‌افزایی اثرات ویروئیدها می‌شود که باعث شدید شدن علایم برگ‌گی و کوتولگی شدید در گیاه محک اتراک (*Citrus medica*) می‌گردد لیکن غلظت ویروئیدها تحت تاثیر آلودگی مخلوط قرار نمی‌گیرد. به نظر می‌رسد که خاموشی ژنی در اثر هم‌افزایی این ویروئیدها نقش داشته باشد (Sera et al. 2008a). آلودگی مخلوط CBLVd،

ویروئیدها مولکول‌های آر آن ۱ تک‌لای حلقوی کوچک به طول ۲۴۶ تا ۴۰۲ نوکلئوتید هستند. آنها فاقد پروتئین پوششی هستند و هیچ پروتئینی را رمزگذاری نمی‌کنند ولی در گیاه بطور مستقل همانندسازی نموده و ایجاد بیماری می‌کنند (Hadidi et al. 2003). در حال حاضر ویروئیدها بر اساس ساختار ثانویه و ترادف نوکلئوتیدی ژنوم در دو خانواده *Pospiviroidae* و *Avsunviroidae* طبقه بندی شده‌اند.

تاکنون هفت ویروئید، شامل ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) از جنس *Pospiviroid*، ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*, HSVd) از جنس *Hostuviroid*، ویروئید ترک خوردگی پوست مرکبات (*Citrus bark cracking viroid*)، از جنس *Cocadviroid* و ویروئیدهای تاخوردگی برگ مرکبات (*Citrus bent leaf viroid*)، (*CBLVd*)، کوتولگی مرکبات (*Citrus dwarfing viroid*)، ویروئید پنج مرکبات (*Citrus viroid V*)، (*CDVd*) و ویروئید شش مرکبات (*Citrus viroid VI*)، (*CVdVI-os*) از جنس *Apscaviroid* در گونه‌های مختلف مرکبات شناسایی شده‌اند (King et al. 2012).

بیماری اگزوکورتیس مرکبات توسط CEVd ایجاد می‌شود (Fawcett & Klotz 1948) علائم اگزوکورتیس در درختان مرکبات شامل کوتولگی درخت، شکاف‌های طولی روی پوست ساقه یا پایه درخت می‌باشد. این بیماری در تعدادی از گونه‌های مرکبات از جمله پرتقال، نارنج، گریپ فروت، نارنگی و راف لمون بدون علائم است (Bove 1995). ویروئید کوتولگی رازک ۳۰۳-۲۹۴ نوکلئوتید طول داشته و عامل بیماری کاککسیا در مرکبات می‌باشد

جداسازی شدند. پلاسمید حاوی رشته مکمل ویروئید پنج مرکبات (CVdV) نیز از دانشگاه پلی تکنیک والنسیا، اسپانیا (IBMCP, UPV, Spain) تهیه شد.

### استخراج اسید نوکلئیک از گیاه آلوده و تکثیر ژنوم ویروئیدها

استخراج اسید نوکلئیک براساس روش ساده‌شده‌ای از آستروس و همکاران (Astruce et al. 1996) انجام شد. به این منظور ۵۰۰ میلی گرم بافت برگ در ۱۰ برابر حجم بافر استخراج (۱۰۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک با اسیدیته ۸، ۱۰ میلی مولار بتا-مرکاپتواتانول، ۵۰ میلی مولار EDTA) عصاره گیری شد. عصاره با افزودن ۵۰ میکرولیتر از SDS ۲۰ درصد برای ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به مخلوط اضافه شد و برای ۲۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. مخلوط حاصل برای ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه میانگریزسازی شد و روشن‌ترین به لوله جدید منتقل شد. اسید نوکلئیک موجود در روشن‌ترین با افزودن ۲/۵ برابر حجم از اتانول ۹۶ درصد و ۰/۱ حجم از استات سدیم ۳ مولار با اسیدیته ۵/۲ و میانگریزسازی در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه، رسوب‌دهی شده و در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد.

آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز با ترانویسی معکوس (آر تی- پی سی آر<sup>۱</sup>) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئیدها انجام شد (جدول ۱). ساخت رشته مکمل ژنوم ویروئید با افزودن آر ان ا ویروئید به مخلوط واکنش انجام شد. مخلوط واکنش ترانویسی معکوس شامل آغازگر اختصاصی معکوس (۱۰ پیکومولار)، مخلوط نوکلئوتیدها (۴۰ میلی مولار)، بافر واکنش و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم

HSVd و CDVd در گیاه اتراک نیز اثر هم‌افزایی دارد، درحالی که در آلودگی مخلوط این ویروئیدها در Parson special mandarin اثر بازدارندگی مشاهده می‌شود (Eiras et al. 2013). در برهمکنش CDVd با ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus*, CTV) نیز غلظت ویروئید CDVd در اتراک آلوده افزایش می‌یابد (Serra et al. 2014).

سازه عفونت‌زای ویروئیدها، در بررسی بیولوژی و مکانیسم بیماری‌زایی، تعیین دامنه میزبانی و مطالعه برهمکنش ویروئید و گیاه میزبان استفاده می‌شود (Yoon et al. 2014, Ding 2009 و Flores et al. 2009).

تاکنون همسانه عفونت‌زای دایمری ویروئیدهای CEVd و HSVd و مونومری ویروئید CBCVd ساخته شده است (Gomez & Pallas 2006؛ Daros & Flores 2004؛ Podstolski et al. 2005؛ Gora-Sochacka et al. 1997؛ Jakse et al. 2015). ولی گزارشی از ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئیدهای CDVd، CBLVd و CVdV در دست نیست. در این تحقیق، همسانه عفونت‌زای مونومر ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBCVd، CDVd، CBLVd و CVdV تحت کنترل پیشبر ۳۵s CaMV ساخته شده و بیماری‌زایی آنها با استفاده از روش مایه‌زنی با آگروباکتریوم (agroinoculation) در گیاهان نارنج سه برگ، گوجه فرنگی و خیار اثبات شد.

### مواد و روش‌ها

#### منبع گیاهی آلوده به ویروئیدهای مرکبات

ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBCVd، CDVd و CBLVd از نهال پرتقال خونی مورو (Moro blood orange) آلوده (تهیه شد از یکی از نهالستانهای رامسر)

<sup>1</sup> RT-PCR

جدول ۱. مشخصات و ترادف آغازگرهای مورد استفاده در همانند سازی ژنوم ویروئیدهای مرکبات.

**Table 1. Characteristics and sequences of the primers used in amplification of the citrus viroids genomes.**

Viroid	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing Temp. (°C)	Position in genome (nt)	Reference
CEVd	CEV-RCEV-F	CCGGGGATCCCTGAAGGACTTGGAA ACCTGGAGGAAGTCGAG	60	78-99 99-119	Ito et al., 2002
HSVd	HSV-R HSV-F	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	60	59-82 82-102	Ito et al., 2002
CBCVd	CBCV-R CBCV-F	GGATCCCTCTTCAGGTATGT CCGGGGAAATCTCTTCAGACTC	57	48-67 68-89	Design in this study
CBLVd	CBLV-R CBLV-F	ACGACCAGTCAGCTCCTCTG CGTCGACGAAGGCTCCTCAGCT	60	75-94 95-116	Design in this study
CDVd	CDV-R CDV-F	CTCTGCGTTTTATTTTCGCA AGGAAAAGGGAACCTTACCTGTC	57	72-91 92-112	Design in this study
CVdV	CVdV-R CVdV-F	TCGACGAAGGCCGCTGAGCA CGACGACAGGTGAGTACTCTCTAC	60	64-87 88-107	Serra et al., 2008
T-DNA	T-DNAF T-DNAR	GGGAGATCTTGGCAGGATATATTGT GGGAGATCTCAAACAACACATAC	57	-	Design in this study

در ژل آگاروز یک درصد حاوی ۰/۲ میکروگرم از DNA *green viewer*<sup>TM</sup> (پارس طوس، ایران) انجام و عکس برداری در دستگاه GeneFlash (Syngene, UK) انجام شد.

#### همسانه سازی ژنوم ویروئیدها

ژنوم کامل هر ویروئید درون ناقل pTZ57R/T براساس دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo scientific) الحاق و در سلولهای مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 $\alpha$  همسانه سازی شد. استخراج پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج دی ان ا پلاسمید (دنازیست، ایران) انجام شد و توالی یابی قطعه همسانه سازی شده با استفاده از آغازگرهای عمومی pUC-M13 توسط شرکت ماکروژن (سنول، کره جنوبی) صورت گرفت.

#### ساخت ناقل دوتایی pBin62Sk

برای ساخت این ناقل پلاسمیدی دوتایی، تی-دی ان ا (T-DNA) ناقل پلاسمیدی pBin19 (Bevan 1984) با استفاده از برش با آنزیم *Bgl*III از آن خارج و ستون

رونوشت بردار معکوس (MMuLV) (با غلظت ۱۰ واحد در هر میکرولیتر) بود. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴۶ درجه سانتی گراد برای یک ساعت نگهداری شد و غیر فعال سازی آنزیم با تیمار حرارت در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

واکنش پی سی آر<sup>۲</sup> با استفاده از چهار میکرولیتر از رشته مکمل سنتز شده به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (۱۰ پیکو مولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش (PCR master mix) (۲X- Ampliqon, Denmark) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه دمایی واکنش شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی-گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر (جدول ۱) برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه و در نهایت مرحله گسترش نهایی برای پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. آشکار سازی محصول واکنش با الکتروفورز

<sup>2</sup> PCR

فقرات<sup>۳</sup> ناقل به اندازه تقریبی ۸۰۰۰ جفت باز با استفاده از کیت بازیابی اسید نوکلئیک (دنازیست، ایران) از ژل آگارز یک درصد خالص‌سازی شد. تی-دی ان ا پلاسمید آغازگرهای pGreen62sk (2005 Hellens et al.) با استفاده از آغازگرهای T-DNAF/R (جدول ۱) تکثیر و با آنزیم برشی *BglIII* (Thermo scientific) تیمار شد. سپس این قطعه در ستون فقرات پلاسمید pBin19 الحاق و در باکتری *Escherichia coli* سویه XL Gold همسانه‌سازی شد. به منظور تایید صحت سازه ساخته شده، توالی‌یابی انجام شد. پلاسمید دوتایی حاصل، ناقل pBin62Sk نامگذاری و در ساخت همسانه عفونت‌زا از آن استفاده شد.

### آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی به روش مایه‌زنی با آگروباکتریوم انجام شد. به این منظور سلول‌های آگروباکتریوم حاوی سازه ویروئید، بمدت ۴۸ ساعت در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین (۱ μg/mL) و کانامایسین (۱ μg/mL) کشت داده شدند. سلول‌های باکتری پس از رسوب دهی با میانگریزسازی در ۴۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه بروی یخ قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون باکتری (۳/۰ = O.D. 600) در برگ‌های کوتیلدونی خیار (*Cucumis sativus*)، ساقه‌ی گیاهان گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و رگبرگ میانی برگ‌های نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata*) تزریق شدند. بیست و یک روز پس از مایه‌زنی، اسید نوکلئیک از برگ‌های جدید و تلقیح نشده هر گیاه استخراج شد و ژنوم کامل هر ویروئید با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) در واکنش زنجیره ای پلی‌مراس با ترانویسی معکوس تکثیر و ژنوم کامل هر ویروئید توالی‌یابی شد.

هیبریدسازی لکه ای (Dot blot hybridization) اسید

### نوکلئیک

این روش به منظور تشخیص ویروئیدهای مرکبات در گیاهان آلوده براساس تلفیقی از چندین روش مختلف انجام شد (Eisel et al. 2008 Borkhardt 1994، Mumford et al. 2000، Nakahara et al. 1998 و Rio 2016). در ابتدا کاوشگرهای اختصاصی ویروئیدهای

فقرات<sup>۳</sup> ناقل به اندازه تقریبی ۸۰۰۰ جفت باز با استفاده از کیت بازیابی اسید نوکلئیک (دنازیست، ایران) از ژل آگارز یک درصد خالص‌سازی شد. تی-دی ان ا پلاسمید آغازگرهای pGreen62sk (2005 Hellens et al.) با استفاده از آغازگرهای T-DNAF/R (جدول ۱) تکثیر و با آنزیم برشی *BglIII* (Thermo scientific) تیمار شد. سپس این قطعه در ستون فقرات پلاسمید pBin19 الحاق و در باکتری *Escherichia coli* سویه XL Gold همسانه‌سازی شد. به منظور تایید صحت سازه ساخته شده، توالی‌یابی انجام شد. پلاسمید دوتایی حاصل، ناقل pBin62Sk نامگذاری و در ساخت همسانه عفونت‌زا از آن استفاده شد.

### ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئیدهای مرکبات

به این منظور ژنوم کامل ویروئید که در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شده بود در واکنش زنجیره ای پلیمراس با استفاده از آغازگرهای عمومی pUC-M13 تکثیر شد. سپس قطعه حاصل از ژنوم ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CBCVd، CDVd و CVdV به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های برشی *XbaI/PstI*، *SalI/KpnI*، *XbaI/BamHI*، *XbaI/PstI*، *PstI/HindIII* و *XbaI/BamHI* (Thermo scientific) تیمار شده و درون سایت آنزیمی مشابه در ناقل دوتایی pBin62SK الحاق شدند تا تحت کنترل پیشبر ۳۵s CaMV قرار گیرند. سازه‌های حاصل سپس به درون سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج دی ان ا پلاسمید (دنازیست، ایران) خالص‌سازی شدند. سازه‌های نو ترکیب ساخته شده به روش ذوب و یخ به درون سلول‌های باکتری

<sup>3</sup> backbone

گردد قرار داده شد. واسرشت‌سازی کاوشگر با قرار دادن آن در آب جوش برای مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس کاوشگر به بافر پیش هیبریدسازی اضافه شد و هیبریدسازی برای یک شب در دمای ۴۹ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس غشاء دو مرتبه در بافر شماره یک (SSC 2X و SDS 0.1%) در دمای اتاق و دو مرتبه هم در بافر شماره دو (SSC 0.1 X و SDS 0.1%) در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه شست‌شده شد. غشاء نایلون برای ۳۰ دقیقه در بافر آنتی بادی حاوی ۱۰۰ میلی مولار مالتیک اسید با اسیدیته ۷/۵، ۱۵۰ میلی مولار NaCl و ۳ درصد شیر کم چرب در دمای محیط حائل<sup>۵</sup> شد. ردیابی کاوشگر در بافر آنتی بادی حاوی Anti-dioxigenine-alkaline phosphatase (Roche) انجام شد. در نهایت رنگ آمیزی غشاء بوسیله NBT/BCIP (Roche) انجام شد.

### مایه‌زنی مکانیکی

مایه‌زنی مکانیکی با عصاره گیری برگ آلوده در پنج برابر حجم بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته-ی هفت انجام شد. از پودر کاربوراندوم برای ایجاد خراش بر روی برگ استفاده شد. ردیابی ویروئید سه هفته پس از مایه‌زنی در واکنش زنجیره ای پلی مرز با ترانویسی معکوس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد.

### نتایج

#### ردیابی ویروئیدهای مرکبات در پرتقال خونی مورو (Moro blood orange)

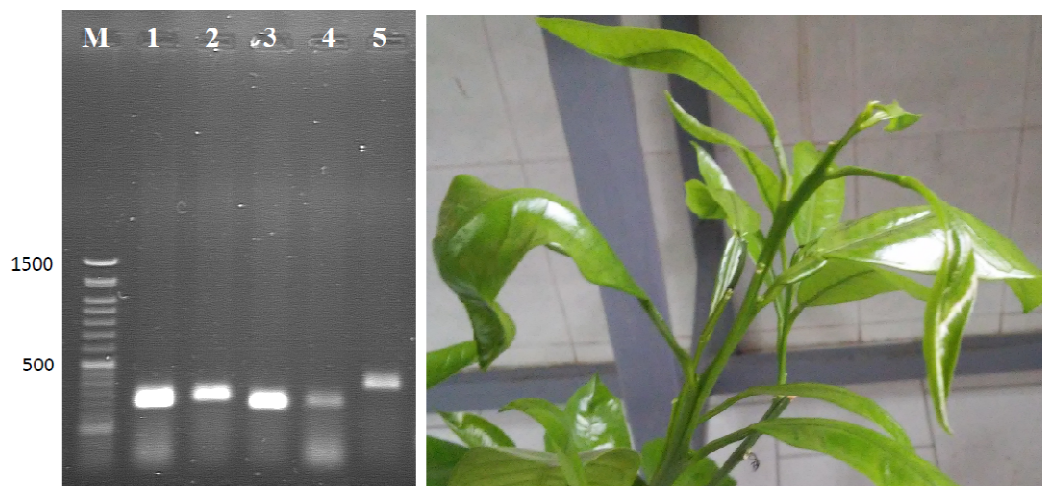
در واکنش زنجیره ای پلی مرز با ترانویسی معکوس

به وسیله آزمون زنجیره ای پلی مرز با استفاده از دو میکرولیتر از پلاسמיד حاوی ژنوم ویروئید به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی (۱۰ پیکو مولار) (جدول ۱)، ۱/۵ میکرولیتر از کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۵ میکرولیتر از بافر واکنش، دو میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها (۴۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر از MANNHEIM, BOEHRINGER) DIG<sup>۴</sup> (Germany, 1636 120) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم دی ان ا پلیمرز (پارس طوس، ایران) در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر تولید شد. بررسی کارایی کاوشگرهای ساخته شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Roche Diagnostics GmbH, 2008) انجام شد. واسرشت‌سازی و آماده‌سازی نوکلئیک اسید جهت انجام هیبریدسازی لکه ای با استفاده از روش ریو (Rio 2016) صورت گرفت. به این منظور به ۵۰ میکرولیتر از نوکلئیک اسید خالص‌سازی شده، ۵۰ میکرولیتر بافر واسرشته‌سازی (۶۰۰ میکرولیتر فرم آمید، ۱۰۰ میکرولیتر بافر تترابورات سدیم پنج میلی مولار، ۲۷۰ میکرولیتر فرمالدهید ۳۷٪ در حجم کلی ۱/۱۳ میلی لیتر) اضافه شد و مخلوط برای پنج دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سپس تا زمان استفاده بروی یخ قرار داده شد. لکه گذاری با استفاده از دستگاه لکه گذار نقطه ای بروی غشاء نایلون انجام شد و با قرار دادن غشاء نایلون در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ دقیقه، اتصال نوکلئیک اسید به غشا تثبیت شد.

سپس غشاء نایلون در بافر پیش هیبریدسازی (فرم‌آمید ۵۰ درصد، SDS ۷٪، بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار و بافر 5X SSC) برای دو ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی-

<sup>5</sup> Blocking

<sup>4</sup> PCR ELISA DIG Labling



شکل ۱. سمت چپ: نقوش الکتروفورزی ژنوم کامل *HSVd*، *CBLVd*، *CBCVd*، *CDVd* و *CEVd* به ترتیب در راهک‌های ۱ تا ۵ تکثیرشده از نهال پرتقال خونی مورو، **M**: نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز (دنازیست، ایران). سمت راست: علائم روخمشی شدید و پیچیدگی برگ در نهال پرتقال خونی مورو آلوده به ویروئیدهای مذکور.

**Fig 1.** Left panel: amplification of full length genome of the viroids from the Moro blood orange. Lanes 1-5 represent *HSVd*, *CBLVd*, *CBCVd*, *CDVd*, *CEVd*, respectively. **M**: 50bp DNA ladder (Denazist, Iran). Right panel: Symptoms of severe epinasty and leaf curl in the infected Moro blood orange.

ویروئید مشاهده شد (شکل ۲). تغییرات ژنوم جدایه ایرانی ویروئید *CEVd* نسبت به جدایه مرجع (رس شمار NC001464) در ناحیه P در موقعیت‌های T۴۹G، C۶۸A، G۲۹۹A، T۳۱۵A، A۳۱۴T، G۳۱۳A، T۳۰۰A، A۳۲۰C و G۳۲۱A در ناحیه حفاظت‌شده‌ی مرکزی (CCR) در موقعیت‌های T۲۷۸A، C۲۶۳A، C۲۹۰T و در ناحیه متغیر (V) در موقعیت‌های A۱۲۹G، G۱۳۰A، A۱۳۳G، C۱۳۸T، G۲۲۸A، C۲۳۱G، T۲۳۲C، G۲۳۳C، C۲۳۴T، G۲۳۵C، C۲۳۶G و G۲۳۷C بود. تنها موتاسیون در ناحیه‌ی انتهایی سمت راست (TR) در موقعیت A۱۸۵T و در انتهایی سمت چپ (TL) در موقعیت G۳۶۲T بود (شکل ۲).

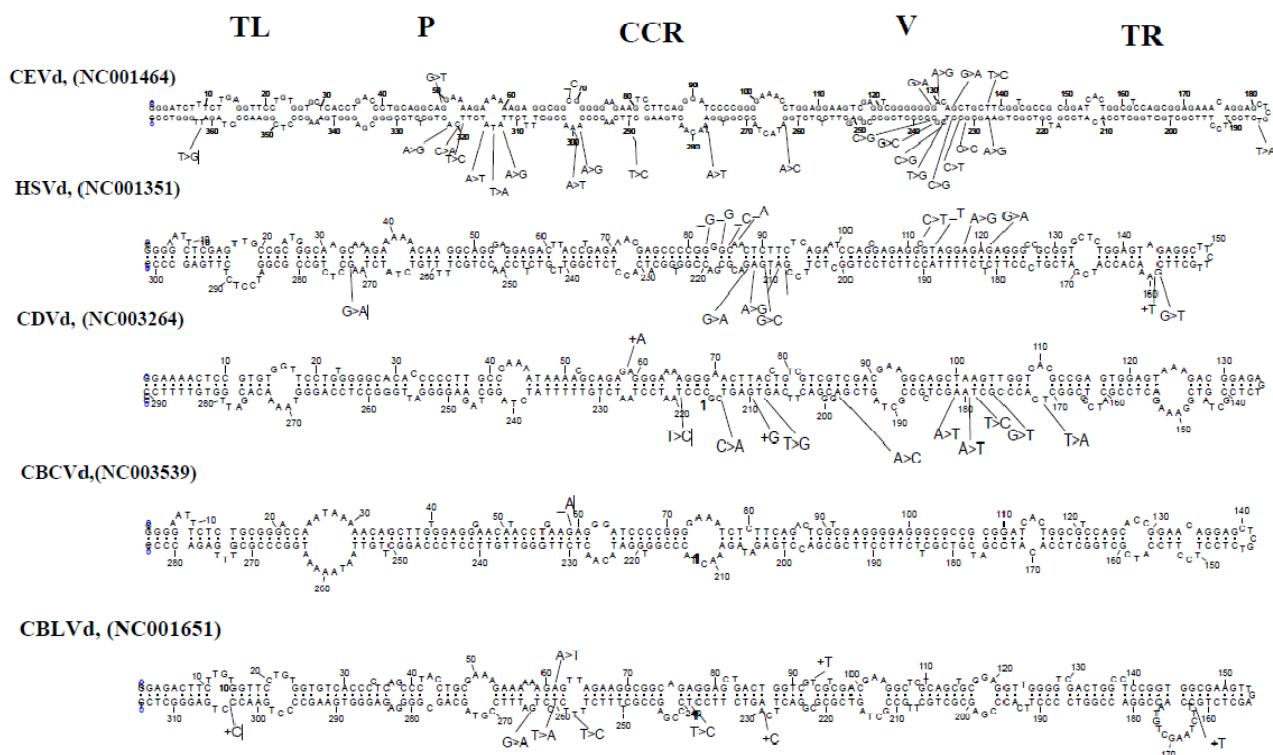
بیشترین میزان تغییرات در ژنوم *HSVd* (جدایه پرتقال خونی مورو) با ۲۹۸ نوکلئوتید، نسبت به ژنوم مرجع در نواحی CCR و V ساختار ثانویه ویروئید مشاهده شد. تغییرات در ژنوم ویروئید *HSVd* نسبت به جدایه مرجع

ژنوم کامل ویروئیدهای *CEVd*، *HSVd*، *CDVd*، *CBLVd* و *CBCVd* بترتیب به اندازه ۳۷۰، ۲۹۹، ۲۹۴ و ۳۱۹ جفت باز از نهال پرتقال خونی مورو تکثیر شدند. نهال پرتقال خونی مورو دارای علائم بدشکلی و روخمشی برگ بود (شکل ۱).

مقایسه توالی حاصل از قطعات تکثیرشده با سایر جدایه‌های ویروئید موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه ویروئیدهای *CEVd*، *HSVd*، *CDVd*، *CBCVd* و *CBLVd* بترتیب دارای ۹۲/۷۲٪، ۹۵/۳۸٪، ۹۶/۲۶٪، ۱۰۰٪ و ۹۷/۱۸٪ تشابه با ترتیب NC003264، NC001351، NC001464، NC003539 و NC001651 هستند.

بیشترین میزان تغییرات در ژنوم جدایه *CEVd* به طول ۳۷۰ نوکلئوتید نسبت به ژنوم مرجع در رشته پایینی در نواحی بیماری‌زایی (P) و متغیر (V) در ساختار ثانویه





شکل ۲. مقایسه تغییرات ژنوم و ساختار ثانویه جدایه های CEVd، HSVd، CDVd، CBCVd و CBLVd نسبت به ترادف مرجع هر ویروئید.

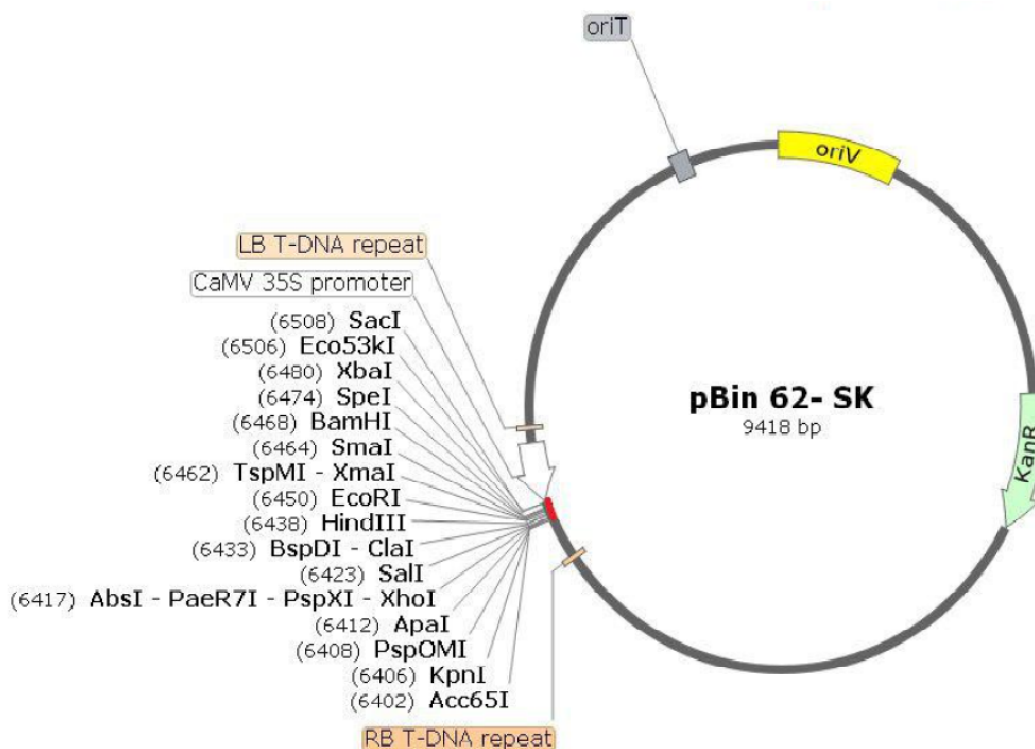
Fig 2. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of CEVd, HSVd, CDVd, CBCVd and CBLVd. The differences in sequence as compared with the corresponding reference genome of each virioid have been shown. The structural domains as proposed by Keese and Symons (1985) are T1 and T2, terminal domains; P, pathogenicity domain; C, central domain; V, variable domain.

در ناحیه V در موقعیت‌های T۲۲۰C و G۱۷۷T، T۱۷۱A در ناحیه P در موقعیت‌های T۱۷۹C، A۱۸۰T و A۱۸۱T بود. تنها موتاسیون در ناحیه CDVd در ساختار ثانویه در موقعیت A۵۸+ مشاهده شد (شکل ۲).

تغییرات در ژنوم ویروئید CBLVd نسبت به جدایه مرجع (رس شمار NC001651) در ناحیه P در موقعیت‌های A۶۱T، T۲۶۰A، G۲۶۴A و در ناحیه CCR در موقعیت‌های T۲۳۸C، T۲۳۰+، T۲۵۸C مشاهده شد. موتاسیون‌های T۱۶۳+ در ناحیه TR و C۳۰۴+ در ناحیه TL نیز تغییرات نواحی انتهایی ساختار ثانویه ویروئید بودند (شکل ۲). در ویروئید CBCVd موتاسیونی

(رس شمار NC001351) در ناحیه CCR در موقعیت‌های G۸۲Δ، G۸۴Δ، C۸۵Δ، A۸۶Δ، C۲۱۱G، G۲۱۲A و در ناحیه V در موقعیت‌های T۱۱۲C، T۱۱۴Δ، G۱۱۸A و A۱۲۱G، در ناحیه TR در رشته‌ی بالایی در موقعیت‌های T۱۵۹G و T۱۶۰+ و تنها موتاسیون در ناحیه P در رشته پایینی در موقعیت A۲۷۲G مشاهده شد.

بیشترین تغییرات ژنوم ویروئید CDVd نسبت به جدایه مرجع (رس شمار NC003264) در ناحیه CCR و V مشاهده شد. تغییرات در ژنوم CDVd در ناحیه CCR در موقعیت‌های A۱۹۷C، T۲۰۹G، G۲۱۰+، C۲۱۵A،



شکل ۳. ساختار شماتیک ناقل دوتایی pBin62-SK: ناحیه شروع همانند سازی پلاسمید؛ kanR: ژن مقاومت به کانامایسین؛ oriT: ناحیه شروع انتقال.

**Fig 3. Schematic representation of the pBin62-SK binary vector. Abbreviations: oriV: origin of plasmid replication; kanR: Kanamycin resistance gene; MCS: multiple cloning site; oriT: origin of transfer.**

پیشبر ۳۵s ویروس موزائیک گل کلم در بالادست سایت آنزیمی است که نسخه برداری از توالی پایین دست با غلظت زیاد را تضمین می‌کند. برخلاف ناقل pGreen62SK این ناقل برای همانندسازی در سلول‌های اگروباکتريوم احتیاجی به پلاسمید کمکی نداشته و با توجه به اندازه کوچکتر آن نسبت به ناقل pBin19 دستورزی آن راحت تر است.

#### ساخت سازه‌های عفونت‌زای ویروئیدهای مرکبات

ژنوم کامل ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CVdV و CDVd پس از تکثیر در واکنش زنجیره ای پلی مرز و هضم آنزیمی در ناقل پلاسمیدی pBin62Sk در پایین دست پیشبر ۳۵s ویروس موزائیک

نسبت به جدایه مرجع (رس شمار NC003539) مشاهده نشد.

#### ساخت ناقل دوتایی pGreen62SK

با قرار دادن تی - دی ان ا پلاسمید pGreen62SK در ستون فقرات پلاسمید pBin19، ناقل پلاسمیدی دوتایی pBin62Sk تولید شد (شکل ۳). پلاسمید pBin62Sk برخلاف ناقل pBin19 دارای سایت برشی آنزیمی غنی حاوی ترادف سایت برشی ۱۶ آنزیم اندونوکلاز محدود بر شامل آنزیم‌های SacI، SacII، NotI، XbaI، SpeI، ClaI، HindIII، EcoRV، EcoRI، PstI، SmaI، BamHI، XhoI، KpnI و ApaI می‌باشد که دستورزی آنرا آسان تر میکند. همچنین این ناقل دارای کاست دوتایی

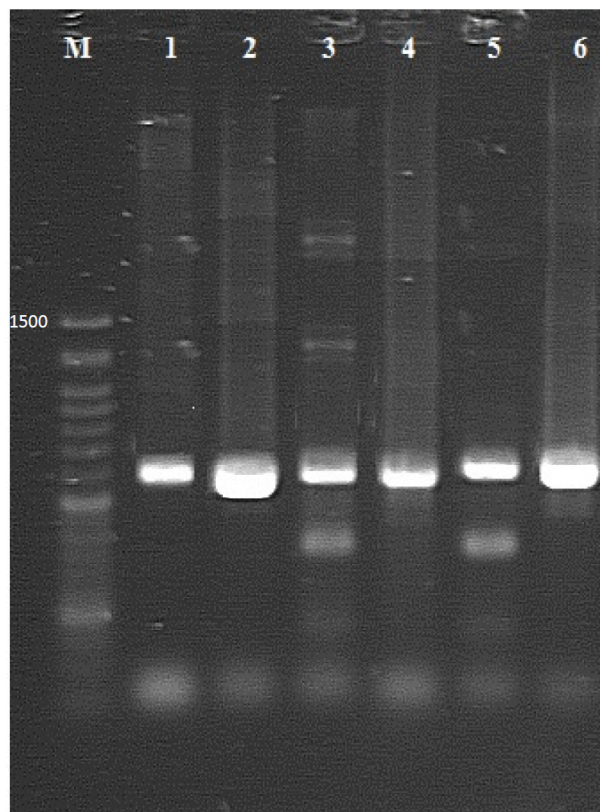
نشده گیاهان گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، خیار (*Cucumis sativus*) و نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata*) مایه‌زنی شده، اسید نوکلئیک استخراج شد. تکثیر ژنوم کامل هر ویروئید در واکنش زنجیره ای پلی مرز با ترانویسی معکوس بیانگر همانندسازی CEVd، HSVd، CBLVd، CBCVd، CDVd و CVdV در گیاهان گوجه فرنگی، خیار و نارنج سه برگ بود (شکل ۵). توالی یابی قطعه همانندسازی شده نیز ماهیت ویروئیدی آن‌ها را تایید کرد.

در آزمون هیبریدسازی لکه ای با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی هر ویروئید نیز رونوشت‌های ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CBCVd، CDVd و CVdV در اسید نوکلئیک استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده ردیابی شد.

همچنین انتقال ویروئیدها از گیاهان مایه‌زنی شده با آگروباکتریوم حاوی سازه‌های عفونت‌زای ویروئیدها به بوته‌های گوجه‌فرنگی‌های سالم بروش مایه‌زنی مکانیکی نیز انجام شد و ویروئیدها از گیاهان مایه‌زنی شده به روش مکانیکی نیز در واکنش زنجیره ای پلی مرز با ترانویسی معکوس ردیابی شدند (داده‌ها نشان داده نشد).

#### علائم ویروئید در گیاهان مایه‌زنی شده

پنج هفته پس از مایه‌زنی علائم بیماری در گیاهان گوجه فرنگی به‌خوبی توسعه یافته بود. در گیاهان گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با CEVd و CVdV علائم روخمش، بدشکلی برگچه‌ها و کپه‌ای شدن برگ مشاهده شد. علائم CDVd و HSVd در گیاهان گوجه فرنگی شامل بدشکلی برگ و روگوز بود در حالی‌که ویروئیدهای CBLVd یا CBCVd در گوجه فرنگی علائم روخمش و ریز برگ ایجاد کردند (شکل ۶).



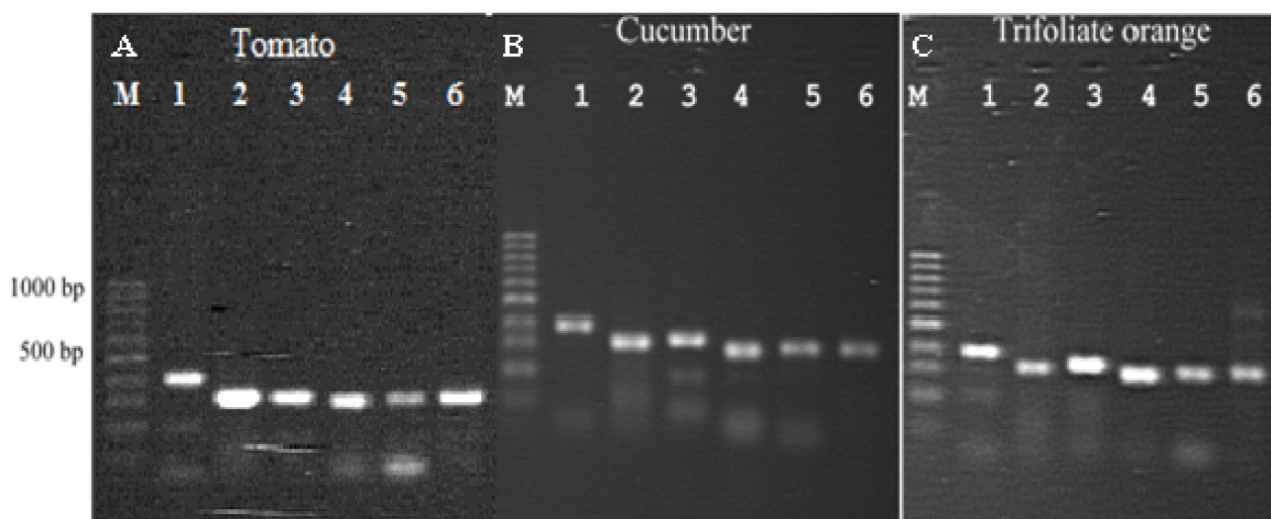
شکل ۴. نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر ژنوم کامل ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CBCVd، CDVd و CVdV (به ترتیب راهک‌های ۱ تا ۶) الحاق شده در ناقل پلاسمیدی pBin62Sk در واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای عمومی pUCM13؛ M: نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز (دنازیست، ایران).

**Fig 4. Amplification of full length viroid genome ligated in pBin62sk using pUCM13 primers in PCR. Lane1- 6: CEVd, HSVd, CBLVd, CBCVd, CDVd and CVdV, respectively; Ladder 50 bp (Denazist, Iran).**

گل کلم قرار گرفت (شکل ۴). با توجه به محل اتصال آغازگرها در ساختار ثانویه ویروئید، سازه‌های ساخته شده از رشته بالایی ناحیه حفاظت شده مرکزی آغاز و به رشته بالایی ناحیه بیماری‌زایی ختم می‌شوند.

#### اثبات بیماری‌زایی سازه‌های ویروئیدها

سه هفته پس از مایه‌زنی از برگ‌های جوان و تلقیح



شکل ۵. نقوش الکتروفورزی ژنوم کامل ویروئیدها تکثیر شده از برگ‌های جدید گیاهان گوجه‌فرنگی (Tomato) (A)، خیار (Cucumber) (B) و نارنج سه برگ (Trifoliate orange) (C) مایه زنی شده با آگروباکتریوم حاوی سازه‌های عفونت‌زای ویروئیدها در واکنش زنجیره ای پلی مرآز با ترانویسی معکوس سه هفته پس از مایه زنی. راهک ۱: CEVd، راهک ۲: HSVd، راهک ۳: CBLVd، راهک ۴: CBCVd، راهک ۵: CDVd، راهک ۶: CVdV. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (پارس طوس، ایران).

**Fig 5. Amplification of full length genome of the viroids from newly grown leaves of agroinfiltrated tomato (A), cucumber (B) and trifoliate orange (C) plants in RT-PCR at three weeks postinoculation. Lane1: CEVd, lane2: HSVd, lane3: CBLVd, lane4: CBCVd, lane5: CDVd, lane6: CVdV. M: 100bp DNA ladder (Parstous, Iran).**

شد. همسانه‌های CEVd با توالی تیپ وحشی ۹۹٪ مشابه بودند و نسبت به تیپ وحشی تنها در سه نوکلئوتید U۹۱A، U۹۲C، G۹۶C تغییر کرده بودند. این تغییرات در ناحیه بیماری‌زایی (P) در ساختار ثانویه ویروئید قرار داشت.

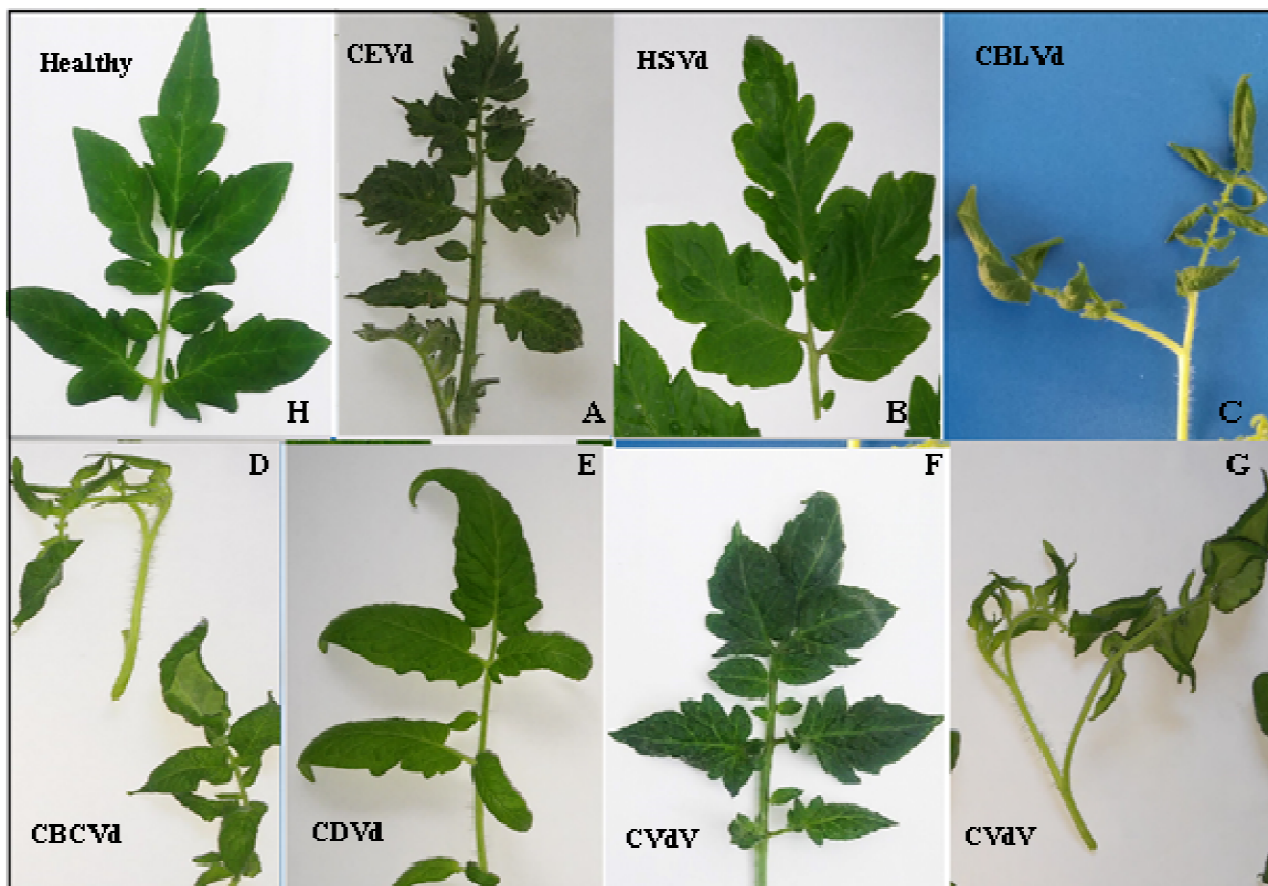
جدایه‌های HSVd با تیپ وحشی در نوکلئوتیدهای G۷۱A، C۷۲G، C۸۴A و U۱۵۸G تفاوت داشتند و نوکلئوتید یوراسیل در موقعیت ۱۵۹ نیز (U۱۵۹Δ) حذف شده بود. تغییرات ژنوم در HSVd در ناحیه بیماری‌زایی (P) و ناحیه انتهایی سمت راست (TR) در ساختار ثانویه ویروئید قرار داشت.

تکثیر CVdV در گیاهان گوجه‌فرنگی همراه با شش

در بوته‌های خیار مایه‌زنی شده، علی‌رغم آلودگی به ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CBCVd، CDVd و CVdV علائمی مشاهده نشد ولی بوته‌های آلوده کوتاه‌تر از بوته‌های سالم بودند. در نهال‌های نارنج سه برگ مایه‌زنی شده نیز برغم ایجاد آلودگی سیستمیک ویروئیدهای فوق تا هفته پنجم علائمی در گیاه مشاهده نشد.

### آنالیز توالی نتاج ویروئیدها

بمنظور تعیین اثر میزبان در تغییر در ژنوم ویروئیدهای تکثیر شده، طول کامل ژنوم هر ویروئید از اسید نوکلئیک استخراج شده از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده، همانندسازی و سه همسانه مجزا از هر ویروئید توالی‌یابی



شکل ۶. علائم ریز برگگی و بدشکلی برگچه‌ها در اثر CEVd (A)؛ بدشکلی برگ و روگوز در اثر HSVd (B)؛ علائم روخمشگی و ریز برگگی در اثر آلودگی به CBLVd (C)؛ علائم نخعی شدن، دفرمه شدن و روخمشگی برگچه‌ها در اثر آلودگی به CBCVd (D)؛ بدشکلی و پیچیدگی برگ در اثر CDVd (E) و علائم کپه‌ای شدن برگ‌ها (F)، ریز برگگی و دفرمه شدن برگچه‌ها (G) در اثر آلودگی به CVdV در گیاهان گوجه فرنگی مایه زنی شده با سازه عفونت زای ویروئیدهای مرکبات به روش مایه‌زنی با آگروباکتریوم حاوی سازه‌های عفونت زای ویروئیدها در مقایسه با برگ سالم (H).

**Fig 6. Symptoms of leaflet malformation induced by CEVd (A); leaflet deforming and leaf rugosity generated by HSVd (B); epinasty and little leaf symptoms generated by CBLVd (C); small leaf and severe leaf deformation generated by CBCVd (D); leaf curl and leaflet deformation induced by CDVd (E); bushy growth (F) and severe leaf deformation (G) induced by CVdV in agroinoculated tomato plants.**

۵۵۳G، A۴۸U، A۵۳G، A۵۹G، C۵۶A، G۵۵C، C۹۷G در نواحی بیماری‌زایی (P)، متغیر (V) و انتهای سمت راست (TR) در ساختار ثانویه ویروئید بود. متغیر (V) و انتهای سمت راست (TR) در ساختار ثانویه ویروئید تغییر کرده بودند.

تنها موتاسیون در نتاج CBLVd در موقعیت T۲۳AC

موتاسیون در ژنوم در موقعیت‌های A۴۸U، A۵۳G، A۵۹G، C۵۶A، G۵۵C، C۹۷G در نواحی بیماری‌زایی (P)، متغیر (V) و انتهای سمت راست (TR) در ساختار ثانویه ویروئید بود.

تکثیر CBCVd در گیاهان گوجه فرنگی همراه با بیشترین تغییرات در ژنوم ویروئید بود. در نتاج این ویروئید هشت تغییر در ژنوم ویروئید در موقعیت‌های



است، لیکن این اولین گزارش از ساخت همسانه عفونت‌زای CVdV، CDVd و CBLVd می‌باشد. البته آزمون بیماری‌زایی ویروئیدهای مذکور با استفاده از آن طبیعی<sup>6</sup> جداسازی شده از ژل پلی‌اکریل آمید انجام شده است (Singh & Boucher 1987). کوشش‌های گذشته برای ساخت سازه عفونت‌زای CVdV و آزمون بیماری‌زایی آن توام با موفقیت نبوده است (Sera et al. 2008a).

CEVd دارای دامنه میزبانی وسیعی است و علاوه بر مرکبات در گیاهان علفی نظیر گوجه فرنگی، خیار، رازک، باقلا و جینورا نیز بیماری‌زا است (Weathers & Calavan 1961، Weathers et al. 1967، Mishra et al. 1991، Fagoaga & Duran-Vila 1968، Weathers & Greer 1968، Semancik & Weathers 1972، 1996). HSVd علاوه بر مرکبات دارای دامنه میزبانی وسیعی از چندین خانواده از گیاهان علفی و درختانی نظیر انار، مرکبات، انگور، گلابی و انواع آلو و هلو می‌باشد (Astruc et al. 1996، Shikata 1990، Kofalvi et al. 1997 و Punccha et al. 1988). گیاهان خیار، گوجه فرنگی و نارنج سه برگ در دامنه میزبانی این ویروئیدها قرار داشته و بنابراین تکثیر این دو ویروئید در این گیاهان چندان دور از ذهن نیست.

CBCVd علاوه بر مرکبات، در طبیعت گیاهان رازک را نیز بیمار می‌کند (Jakse et al. 2015). لیکن CBLVd، CDVd و CVdV در طبیعت تنها در گونه‌های مختلف مرکبات یافت شده‌اند و دامنه میزبانی محدودی دارند (Hadidi et al. 2003). انتقال و تکثیر CVdV، CBCVd، CDVd و CBLVd در گیاهان علفی برای اولین مرتبه در این تحقیق صورت گرفته است.

در ناحیه‌ی CCR در ساختار ثانویه ویروئید بود و مترادف ژنوم نتاج ویروئید CDVd کاملاً با توالی ژنوم تیپ وحشی ویروئید یکسان بود.

## بحث

ساخت سازه عفونت‌زای ویروئید یکی از مراحل اولیه در بررسی بیولوژی مولکولی، بررسی مکانیسم‌های بیماری‌زایی ویروئید و تعیین صفات بیولوژیکی از جمله دامنه میزبانی و واکنش حساسیت ارقام گیاهان میزبان است.

در این تحقیق سازه‌های عفونت‌زای شش ویروئید مرکبات شامل CEVd، HSVd، CVdV، CBCVd، CDVd و CBLVd ساخته و آزمون بیماری‌زایی آنها انجام شد. نتایج آزمون بیماری‌زایی، واکنش زنجیره ای پلی‌مراس و هیبریدسازی لکه ای نشان داد که سازه‌های ساخته شده ویروئیدهای مذکور امکان تکثیر و همانندسازی موفق ویروئید در گیاه را فراهم می‌سازند. سازه‌های عفونت‌زای بنحوی ساخته شدند که دارای یک قطعه کامل از ژنوم ویروئید بوده و تحت کنترل پیشبر CaMV ۳۵s باشند. پیشتر نیز در طراحی سازه عفونت‌زای ویروئیدهای غده دوکی سیب زمینی (Potato spindle tuber viroid- PSTVd) (Gora et al. 1994) و (Reanwarakorn & Semancik 1988) از این روش استفاده شده است.

همسانه‌ی عفونت‌زای دایمری CEVd (Sano et al. 1992، Gandia et al. 2005)، HSVd (Reanwarakorn & Gomez 1988، Palacio-Bielsa et al. 2004، Semancik 1988، Pallas 2006) و مونومری CBCVd (Jakse et al. 2015) پیش از این ساخته شده و آزمون بیماری‌زایی آنها به ترتیب بر روی گیاهان اتراک، خیار مصری (Luffa aegyptiaca) و رازک (Humulus lupulus) انجام شده

<sup>6</sup> native

وجود چندین تغییر را در ژنوم آن‌ها آشکار کرد. مطالعات قبلی نشان داده که در اثر همانندسازی ویروئید در میزبانهای مختلف، در نتیجه فشار میزبان در همانندسازی ویروئید، واریانتهایی ایجاد می‌شوند که به شرایط موجود سازگاری بیشتری داشته باشند (Ambros et al. 1999, Gora-Sochacka et al. 1994, Owens et al. 2009) هر چند نقش این تغییرات در سازگاری ویروئید بطور قطع به اثبات نرسیده است.

بیشترین تغییرات در ژنوم ویروئیدها در ناحیه بیماری-زایی (P) در ساختار ثانویه ویروئید مشاهده شد. گزارش‌های قبلی نیز نشان داده که بیشترین تنوع در ویروئیدهای خانواده *Pospiviroidae* در ناحیه‌های P و V ژنوم ویروئید وجود دارد (Kofalvi et al. 1997). در CEVd و CLBVD نیز بیشترین تغییرات در ناحیه P و TL بدون تغییرات در ساختار ثانویه ویروئید مشاهده شده است (Fagoaga & Duran-Vila 1996, Duran-Vila 2004, Gandia & Duran-Vila 1996). تغییرات ژنوم در میزبان‌های جدید ممکن است به خاطر محافظت در برابر سیستم دفاعی میزبان و یا در راستای سازگاری با میزبان جدید اتفاق بیفتد. گزارش‌هایی از تولید واریانت‌های جدید در ویروئید موزائیک پنهان هلو (*Peach latent mosaic viroid-PLMVd*) و ویروئید ASSVd در اثر تغییر نوع میزبان نیز در منابع وجود دارد (Ambros et al. 1999, Walia et al. 2014).

پیش از این تصور می‌شد که ویروئیدهای جنس *Apscaviroid* تنها محدود به درختان چوبی هستند، لیکن بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی ویروئید پوست پینه ای سیب (ASSVd) نشان داد که این ویروئید قادر به همانندسازی در گیاهان علفی از قبیل گوجه فرنگی، نخود فرنگی (*Pisum sativum*)، خیار، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، توتون (*Nicotiana tabacum*)، بادمجان (*N. glutinosa, benthamiana*) و سلمک (*Chenopodium quinoa*) است و علایمی از قبیل کلروز و کوتولگی در گیاهان خیار و لوبیا ایجاد می‌کند (Walia et al. 2014).

برخلاف مطالعات قبلی که دامنه میزبانی CVdV، CDVd و CBLVd محدود به گونه‌های مرکبات ذکر شده بود (Hadidi et al. 2003) در تحقیق حاضر نشان داده شد که این ویروئیدها علاوه بر مرکبات در گیاهان خیار و گوجه فرنگی نیز قادر به تکثیر و همانندسازی هستند. بیماری‌زایی این ویروئیدها در خیار همراه با علائم نبود ولی در گوجه فرنگی علائمی از قبیل روخمش، ریز برگ، کپه ای شدن بوته، بدشکلی و تغییر شکل برگ ایجاد شد. اینطور به نظر می‌رسد که دامنه میزبانی ویروئیدهای مرکبات تنها محدود به این جنس نبوده و دارای دامنه میزبانی وسیعتری هستند.

مقایسه توالی نتاج حاصل از ویروئیدها در گیاهان علفی

## منابع

- Ambros S., Hernandez C. and Flores R. 1999. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *Journal of General Virology* 80: 2239-52.
- Ashulin L., Lachman O., Hadas R. and Bar-Joseph M. 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, Citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research* 19:4767.
- Astruc N., Marcos J. F., Macquaire G., Candresse T., Pallas V. 1996. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal Plant Pathology* 102: 837-846.
- Barbosa C. J., Pina J. A., Navarro L. and Duran-Vila N. 2002. Replication/accumulation and symptom expression

- of citrus viroids on some species of citrus and related genera. Fifteenth IOCV Conference 15: 264–271.
- Barbosa C. J., Serra P., Pina J. A., Navarro L., Daros J. A., Flores R. and Duran-Vila N. 2005. Identification and preliminary characterization of a viroid-like RNA in *Atalantia citroides*. Riverside CA, pp. 264-271. In: N. Duran-Vila, M.E. Hilf, M. Pena-Rocha (Eds). Proceedings, XVI International Conference Citrus Virologists.
- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711- 8721.
- Borkhardt B., Vongsasitorn D. and Albrechtsen S. E. 1994. Chemiluminescent detection of potato spindle tuber viroid in true potato seed using a digoxigenin labelled DNA probe. *Potato Research* 37: 249–255
- Bove J. M. 1995. Virus and Virus- like Diseases of Citrus in The Near East Region. FAO publication. 518 pp.
- Daros J. A. and Flores R. 2004. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proceeding of the national academy of Sciences* 101: 6792–6797.
- Ding B. 2009. The Biology of Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 47: 105-131.
- Eiras M., Silva S. R., Stuchi E. S., Carvalho S. A. and Garcez, R. M. 2013. Identification and characterization of viroids in “Navelina ISA 315” sweet orange, *Tropical Plant Pathology* 38: 58-62.
- Eisel D., Seth O., Grunewald-Janho S., Kruchen B., Ruger B. (Eds). 2008. DIG Application Manual for Filter Hybridization, Roche Diagnostics GmbH 207 pp.
- Fagoaga C. and Duran-Vila N. 1996. Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetable crops. *Plant Pathology* 45: 45-53.
- Fawcett H. S. and Klotz L. J. 1948. Exocortis on trifoliolate orange. *Citrus Leaves* 28:8.
- Flores R. Gas M. E., Molina-Serrano D., Nohales M. A., Carbonell A., Gago S., DelaPena M. and Daros J. A. 2009. Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* 1: 317-334.
- Gandia M. and Duran-Vila N. 2004. Variability of the progeny of a sequence variant of Citrus bent leaf viroid (CBLVd). *Archives of Virology* 149: 407–16.
- Gandia M., Rubio L., Palacio A. and Duran-Vila N. 2005. Genetic variation and population structure of an isolate of Citrus exocortis viroid (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. *Archives of Virology* 150: 1945–1957.
- Gomez G. and Pallas V. 2006. Hop stunt viroid is processed and translocated in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. *Molecular Plant Pathology* 7: 511-517.
- Gora A., Candresse T. and Zagorski W. 1994. Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates. *Archives of Virology* 138: 233.
- Gora-sochacka A., Kierzek A. and Candresse T. 1997. The genetic stability of potato spindle tuber viroid (PSTVd) molecular variants. *RNA* 3: 68-74.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W. and Semancik J. S. (Eds). 2003. Viroids. CSRO Publishing, Collingwood, Australia. 370 pp.
- Hataya T., Nakahara K., Ohara T., Ieki H. and Kano T. 1998. Citrus viroid Ia is a derivative of citrus bent leaf viroid (CVD-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. *Archives of Virology* 143: 971–980.
- Hellens R. P., Allan A.C., Friel E.N., Bolitho K., Grafton K., Templeton M.D., Karunairetnam S., Gleave A.P. and Laing W.A. 2005. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1: 13-27.
- Holsters M., De Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M. and Schell J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Gene Genetic* 163, 181-187.
- 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: 2105–14.
- Jakse J., Radisek S., Pokorn T., Matousek J. and Javornik B. 2015. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology* 64: 831-842.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B. and Lefkowitz E. J. (eds) 2012. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press
- Kofalvi S. A., Marcos J. F., Canizares M. C., Pallas V. and Candresse T. 1997. Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from Prunes species: Evidence for recombination between HSVd isolates. *Journal of General Virology* 78: 3177–3186.



- Mishra M. D., Hammond R.W., Owens R.A., Smith D.R. and Diener T.O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology* 72: 1781-1785.
- Mumford R. A., Walsh K. and Boonham N. 2000. A Comparison of Molecular Methods for the Routine Detection of Viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30: 431-435.
- Murcia N., Bernad L., Serra P., Bani Hashemian S. M. and Duran-Vila N. 2009. Molecular and biological characterization of natural variants of Citrus dwarfing viroid. *Archives of virology* 154:1329-34.
- Nakahara, K., Hataya, T., Hayashi, Y., Sugimoto, T., Kimura, I. and Shikata, E. 1998. A Mixture of Synthetic Oligonucleotide Probes Labelled with Biotin for the Sensitive Detection of Potato Spindle Tuber Viroid. *Journal of Virology Methods* 71: 219-227.
- Owens R. A. and Hammond R.W. 2009. Viroid pathogenicity: one process, many faces. *Viruses* 1: 298-316.
- Palacio-Bielsa A., Romero-Durban J. and Duran-Vila, N. 2004. Characterization of citrus HSDV isolates. *Archives of Virology* 149: 537-552.
- Podstolski W., Gora-sochacka A. and Zagorski W. 2005. Co-inoculation with two non-infectious cDNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTVd) leads to the appearance of novel. *Acta Biochimica Polonica* 52, 87-98.
- Puchta H., Ramm K., Luckinger R., Hadas R., Bar-Joseph M. and Sanger H. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid presents in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research* 19: 6640.
- Rakowski A. G., Szychowski J. A., Avena Z.S and Semancik J. S. 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroid. *Journal of General Virology* 75:3581-3584.
- Reanwarakorn K. and Semancik J. S. 1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *Journal of General Virology* 79: 3163-3171.
- Rio D. C. 2015. Denaturation and electrophoresis of RNA with formaldehyde. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015: 219-222.
- Sano T., Candresse T., Hammond R. W., Diener T. O. and Owens R. A. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10104-8.
- Semancik J. S. and Weathers L.G. 1972. Pathogenic 10s RNA from exocortis disease recovered from tomato bunchy-top plants similar to potato spindle tuber infection. *Virology* 49: 622-625.
- Serra P, Barbosa C. J., Daros J., Flores R. and Duran-Vila N. 2008b. Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* 370: 102-12.
- Serra P., Bani Hashemian S. M., Fagoaga C., Romero J., Ruiz-Ruiz S., Gorris M. T., Bertolini E. and Duran-Vila N. 2014. Virus-viroid interactions: Citrus Tristeza Virus enhances the accumulation of Citrus Dwarfing Viroid in Mexican lime via virus-encoded silencing suppressors. *Journal of Virology* 88: 1394-7.
- Serra P., Eiras M., Murcia N., Kitajima E. W., Daros J. A. and Flores R. 2008a. Citrus viroid V : Occurrence, Host Range, Diagnosis, and Identification of New Variants. *Virology* 98: 1199-1204.
- Shikata E. 1990. New viroids from Japan. *Seminars in Virology* 1: 107-115.
- Singh R. P. and Boucher A. 1987. Electrophoretic separation of a sever from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* 77: 1588-1591.
- Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A. A. and Hallan V. 2014. Identification of the herbaceous host range of Apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants. *Plant Pathology* 63: 684-690.
- Weathers L.G and Greer F.C. 1968. Additional herbaceous hosts of the exocortis virus of citrus. *Phytopathology* 58: 1071.
- Weathers L.G. and Calavan E. C. 1961. Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus. *Phytopathology* 51: 262-264.
- Weathers L.G., Greer F.C. and Harjungs M.K. 1967. Transmission of exocortis virus of citrus to herbaceous plants. *Plant Disease Reporter* 51: 868-871.
- Yoon J., Cho I., Choi G. and Choi S. 2014. Construction of Infectious cDNA Clone of a Chrysanthemum stunt viroid Korean Isolate. *Plant Pathology Journal* 30: 68-74.