

Molecular detection and identification of *Hop stunt viroid* isolates infecting grapevines in some regions of Iran

Sahar Barani

MSc Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: sbarani192@gmail.com

Hossain Massumi

*Corresponding author: Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran & Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: masoomi@uk.ac.ir

Mohammad Maddahian

Ph.D. Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: maddahian91@gmail.com

Jahangir Heydarnejad

Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: jheydarnejad@uk.ac.ir

Akbar Hosseinipour

Associate professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: hosseini@uk.ac.ir

Abstract

Objective

The *Hop stunt viroid* has the widest host range among viroids and is prevalent worldwide. This research aims to detect and characterize HSVd variants in the vineyards of Kerman province and some other parts of Iran and analyze the variants' phylogenetic status.

Materials and methods

Seventy-four leaf samples were collected from grapevines in Kerman, East Azerbaijan (Tabriz), and Fars (Beyza) provinces during the summers of 2018–2020. The samples were processed and subjected to RT-PCR to detect HSVd using specific primers. Then, complete genomes of seven

HSVd variants were sequenced and blasted into GenBank. In the MEGA 7.0 program, the neighbor-joining statistical method was used to construct a phylogenetic tree to consider relationships between the detected HSVd variants and those obtainable in GenBank. Furthermore, the homology of the grapevine-related variants was analyzed by SDT v1.2 software. Finally, eight plant species and varieties were experimentally inoculated by two HSVd variants to study symptom expression and determine host range.

Results

Throughout the world, HSVd variants have been grouped into five phylogenetic groups: Citrus, Hop, Plum, Plum-Hop/cit3, and Plum-Citrus. Accordingly, the identified seven HSVd variants in this study and several previously reported variants from grapevines in Iran and Germany were classified under the main group, Hop. The HSVd variants from grapevine had genome lengths ranging from 297 to 300 nucleotides, with 93.3–98.7% nucleotide sequence similarity. Three of the seven HSVd isolates identified in Kerman province vineyards and four isolates previously reported from grapevines in Iran and Germany formed a subgroup within the Hop cluster. In addition, the Hop group included four Iranian pistachio HSVd isolates from the Kerman province and some Tunisian pistachios HSVd isolates with Iranian provenance.

Conclusions

Given that HSVd infection of grapevines has been documented in Iran before pistachio infection, pistachios were most likely infected via HSVd inocula transferred from affected grapevines. Therefore, based on molecular studies and available evidence, grapevines can be assumed to be the source of infection for pistachio trees.

Keywords: *Hop stunt viroid*, Grapevine, Phylogeny

Paper Type: Research Paper.

Citation: Barani S, Massumi H, Maddahian M, Heydarnejad J, Hosseinipour A (2022) Molecular detection and identification of *Hop stunt viroid* isolates infecting grapevines in some regions of Iran. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 127-150.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 127-150. DOI: 10.22103/jab.2022.19022.1385

Received: May 15, 2022.

Received in revised form: July 04, 2022.

Accepted: July 05, 2022.

Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors

ردیابی و شناسایی مولکولی جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک آلوده کننده درختان مو در برخی از مناطق ایران


سحر بارانی

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

sbarani192@gmail.com


 حسین معصومی

*نویسنده مسئول: استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: masoomi@uk.ac.ir

 محمد مداحیان


دانش‌آموخته دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

maddahian91@gmail.com

 جهانگیر حیدرنژاد

استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

jheydarnejad@uk.ac.ir

 اکبر حسینی پور

دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

hosseini@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

چکیده

هدف: ویروئید کوتولگی رازک، (*Hop stunt viroid*, HSVd) گسترده‌ترین دامنه میزبانی را در بین ویروئیدها دارا می‌باشد و از مناطق مختلف دنیا گزارش شده‌است. هدف از این تحقیق، ردیابی، شناسایی و تعیین جایگاه تاکسونومیک جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک در تاکستان‌های استان کرمان و برخی نقاط دیگر کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در طی تابستان سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹، در مجموع ۷۴ نمونه‌ی برگ‌ی از درختان انگور استان کرمان و دو استان آذربایجان شرقی (تبریز) و فارس (بیضا) جمع‌آوری شد و آلودگی نمونه‌ها به HSVd توسط آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار

گرفت. توالی ژنوم کامل هفت جدایه HSVd حاصل تعیین ترادف گردید و با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی ترادف‌های بدست آمده با سایر ترادف‌های این ویروئید، از نرم افزار MEGA (version 7) و روش neighbor-joining استفاده شد. همچنین میزان همولوژی جدایه‌ها نیز توسط نرم افزار SDT v1.2 بررسی شد. جهت تعیین دامنه میزبانی و بررسی علائم از هشت گونه و رقم گیاهی استفاده گردید.

نتایج: مطابق با گزارش‌های پیشین توالی‌های HSVd به پنج گروه فیلوژنتیکی Plum-Hop/cit3, Plum, Hop, Citrus و Plum-Citrus تقسیم‌بندی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد اندازه ژنوم جدایه‌های تعیین توالی شده از درختان انگور متغیر (بین ۲۹۷ تا ۳۰۰ نوکلئوتید) و با یکدیگر، ۹۸/۷ - ۹۳/۳ درصد تشابه داشتند. براین اساس، هفت جدایه گزارش شده در این بررسی همراه با چند جدایه گزارش شده دیگر از درختان انگور از ایران و نیز کشور آلمان در گروه اصلی Hop واقع گردیدند. سه جدایه حاصل از درختان انگور باغات استان کرمان به همراه چهار جدایه گزارش شده از این درختان، از کشور آلمان و ایران، یک زیر گروه در گروه رازک تشکیل دادند. همچنین چهار جدایه ایرانی شناسایی شده از درختان پسته در استان کرمان با تعدادی جدایه گزارش شده از درختان پسته کشور تونس (با منشأ ایرانی) نیز در گروه رازک قرار گرفتند.

نتیجه گیری: از آنجائی که آلودگی درختان انگور در ایران نسبت به HSVd قبل از آلودگی درختان پسته گزارش گردیده، بنابراین احتمالاً آلودگی گیاهان پسته به HSVd در ایران به واسطه‌ی آلودگی متقاطع و انتقال آلودگی از درختان انگور به درختان پسته رخ داده است. براین اساس با توجه به نتایج حاصل از مطالعات ملکولی و شواهد موجود، درختان انگور می‌توانند به عنوان مبداء آلودگی درختان پسته در ایران باشند.

کلیدواژه‌ها: ویروئید کوتولگی رازک، درختان انگور، فیلوژنی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بارانی سحر، معصومی حسین، مداحیان محمد، حیدرنژاد جهانگیر، حسینی‌پور اکبر (۱۴۰۱) شناسایی و توصیف تبارزائی تعدادی از جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک یونجه مبتنی بر ترادف ژن پروتئین حرکتی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴ (۳)، ۱۵۰-۱۲۷.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

ویروئیدها کوچک‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی^۱ هستند که از نظر ساختاری شامل مولکول‌های آر.ان.ا. تک رشته‌ای حلقوی^۲ (به طول تقریبی ۲۵۰ تا ۴۰۰ نوکلئوتید)، دارای باز جفتی‌های درون رشته‌ای^۳، تعداد قابل توجهی حلقه^۴ و ساختارهای ثانویه^۵ قوی و فاقد پروتئین پوششی می‌باشند (Góra-Sochacka et al. 1997; Kawaguchi-Ito et al. 2009; Owens et al. 2012). اصطلاح ویروئید به معنای "شبه‌ویروس" نخستین بار توسط Diener (1971) جهت توصیف عامل بیماری دوکی شدن غده‌های سیب‌زمینی^۶ به کار برده شد (Diener 1987; Flores et al. 2005). ویروئید کوتولگی رازک^۷ به عنوان گونه تیپ^۸ جنس *Hostoviroidae* از خانواده *Pospiviroidae* شناخته می‌شود (Flores et al. 1998; Hayata et al. 2017). عضو دیگر این جنس ویروئید پنهان کوکب-۹^۱ می‌باشد (Di Serio et al. 2017). ویروئید کوتولگی رازک، گسترده‌ترین دامنه‌میزبانی را در بین ویروئیدها دارا می‌باشد و از مناطق مختلف دنیا نیز گزارش شده است. این ویروئید علاوه بر رازک قادر به تکثیر در تعداد زیادی از گیاهان چوبی^{۱۰} و علفی^{۱۱} نیز می‌باشد (Hataya et al. 2017; Singh et al. 2003). آلودگی به HSVd تاکنون از گیاهانی مانند بادام و انار (چین و اسپانیا) (Astruc et al. 1996; Zhang et al. 2012)، سیب (ایران) (Jahanshahi et al. 2015)، زردآلو (کشورهای مدیترانه‌ای و چین) (Amari et al. 2001; Zhang et al. 2012)، انواع مرکبات (گسترش جهانی) (Roistacher 1996; Sano et al. 1988)، خیار (هلند و فنلاند) (Lemmetty et al. 2011; Sano et al. 1984)، انجیر (سوریه، لبنان، تونس و ایران) (Elbeaino et al. 2012b; Elbeaino et al. 2013; Jahanshahi et al. 2007; Yakoubi et al. 2007)، انگور (گسترش جهانی) (Kawaguchi-Ito et al. 2009)، عنب (چین) (Zhang et al. 2009)، توت (ایتالیا، لبنان و ایران) (Elbeaino et al. 2012a; Jahanshahi et al. 2015)، ژاپن، اسپانیا و چین) (Kofalvi et al. 1997; Sano et al. 1989; Zhou et al. 2006)، ایلو (ایران) (Luigi et al. 2013)، آلو (اسپانیا و چین) (al. 2004)، گیلان و وحشی (یونان) (Kaponi et al. 2012)، ختمی چینی (ایتالیا) (Luigi et al. 2013)، آلو (اسپانیا و چین) (Astruc et al. 1996; Zhang et al. 2012)، به (ایران) (Jahanshahi et al. 2015)، رازک (ژاپن، اسلوانی، آمریکا و چین) (Eastwell & Nelson 2007; Guo et al. 2008; Radisek et al. 2008; Sasaki & Shikata 1977) و پسته (ایران، تونس و آمریکا) (Al Rwahnih et al. 2018; Elleuch et al. 2013; Maddahian et al. 2019) گزارش

¹ Smallest plant pathogenic agent

² Circular *single-stranded* Ribonucleic acid

³ Base pairing

⁴ Loops

⁵ Secondary structures

⁶ Potato spindle tuber disease

⁷ *Hop stunt viroid* (HSVd)

⁸ Type spices

⁹ *Dahlia latent viroid-1*, DLVd

¹⁰ Woody plants

¹¹ Herbaceous plants

شده است. در بررسی‌های اولیه، توالی‌های بدست آمده ویروئید کوتولگی رازک از گیاهان رازک، خیار، انگور، مرکبات، هلو و آلو به سه گروه تیپ رازک/انگور^۱، تیپ آلو^۲ و تیپ مرکبات^۳ تقسیم‌بندی شدند (Shikata 1990). در مطالعات بیشتر و همچنین در مقایسه گسترده‌تر در زمینه روابط تکاملی^۴ جدایه‌های این ویروئید، دو گروه نوترکیب^۵ دیگری به نام‌های تیپ آلو-مرکبات^۶ و تیپ آلو-رازک/cit3^۷ معرفی گردیدند (Amari et al. 2001; Kofalvi et al. 1997). گروه تیپ رازک نیز احتمالاً از نوترکیبی بین اعضای گروه آلو و مرکبات بوجود آمده است (Matousek et al. 2003; Kofalvi et al. 1997). تاکنون شش ویروئید مختلف همراه با درختان انگور گزارش شده است که چهار ویروئید از این شش عدد شامل ویروئید استرالیایی مو^۸، ویروئید پنهان مو^۹، ویروئید اگزوکورتیس مرکبات^{۱۰} و HSVd بر روی گیاهان انگور علائمی ایجاد نمی‌کنند و دارای آلودگی پنهان می‌باشند با این وجود به دلیل امکان انتقال ویروئید از درختان انگور بدون علائم، به گیاهانی مانند رازک، مرکبات، خیار و درختان هسته دار، همراهی ویروئید HSVd با درختان انگور مورد توجه می‌باشد (Kawaguchi-Ito et al. 2009). در این بین دو ویروئید لکه زرد شماره ۱ مو^{۱۱} و لکه زرد شماره ۲ مو^{۱۲} به دلیل ایجاد علائم رگبرگ‌نوازی چه در آلودگی مخلوط با ویروس برگ بادبزی مو^{۱۳} و یا به صورت آلودگی منفرد مورد توجه می‌باشند (Martelli 2014). به جز ویروئید پنهان انگور در کشور چین بقیه ویروئیدهای انگور گسترش جهانی دارند. شیوع دو ویروئید HSVd و GYSVd-1 در مناطق مختلف کشت انگور در دنیا زیاد می‌باشد (Martelli 2014; Zhang et al. 2014). ویروئید کوتولگی رازک تاکنون از نقاط و استان‌های متفاوت کشور و از میزبان‌های مختلف مانند انجیر (فارس و یزد)، توت (فارس، بوشهر و یزد) (Jahanshahi et al. 2015)، مرکبات (مازندران، کهگیلویه و بویراحمد و فارس) (Amiri-Mazhar et al. 2014b; Bani-Hashemian et al. 2016; Zaki-aghl et al. 2010)، سیب (فارس)، به (فارس)، هلو (یزد)، زردآلو (یزد) (Jahanshahi et al. 2015) و انگور (آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، فارس و زنجان) (Hajizadeh et al. 2012; Hajizadeh et al. 2015; Salami et al. 2022; Zaki aghl & Izadpanah 2010) گزارش گردیده است. همچنین HSVd تاکنون از درختان پسته و مرکبات در استان کرمان گزارش گردیده (Bani-Hashemian et al. 2016; Maddahian et al. 2019). ولی هیچ گونه مطالعه‌ای در زمینه وجود این ویروئید در

¹ Grape/hop-type

² Plum-type

³ Citrus-type

⁴ Phylogenetic relationships

⁵ Recombinant group

⁶ Plum-citrus-type

⁷ Plum-hop/cit3, P-H/cit3

⁸ Australian grapevine viroid (AGVd)

⁹ Grapevine latent viroid (GLVd)

¹⁰ Citrus cachexia viroid (CCaV)

¹¹ Grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1)

¹² Grapevine yellow speckle viroid-2 (GYSVd-2)

¹³ Grapevine fanleaf virus (GFVP)

تاکستان‌هان این استان صورت نگرفته است. باتوجه گستردگی آلودگی تاکستان‌های کشور نسبت به HSVd و عدم وجود پژوهشی در مورد آلودگی درختان انگور به این ویروئید در استان کرمان، لذا هدف از این تحقیق بررسی وجود و شناسایی HSVd در تاکستان‌های استان کرمان و همچنین برخی نقاط دیگر کشور و بررسی جایگاه تاکسونومیکی این جدایه‌ها نسبت به دیگر جدایه‌های گزارش شده این ویروئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بازدید و نمونه‌برداری: به‌منظور ردیابی و مطالعه ویروئید کوتولگی رازک، طی تابستان سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ از باغ‌های انگور واقع در استان‌های کرمان (شامل مناطق ماهان، سه‌کنج، شهر بابک، سیرجان، کرمان، جیرفت و جوپار، نصرآباد)، فارس (منطقه بیضا) و آذربایجان شرقی (باغ‌های انگور تبریز) بازدید به عمل آمد و از برگ‌های جوان درختان انگور ارقام عسکری و ریش بابا نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها، ۷۴ عدد، با ذکر مشخصات از جمله محل نمونه‌برداری و نوع رقم آن به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در دمای چهار درجه ی سانتیگراد نگهداری گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱. مناطق، رقم و تعداد نمونه‌های انگور جمع‌آوری شده در طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۹

Table 1. List of grapevine samples collected between 2018 and 2021, including variety, number, and geographic origin

Region	Variety	No of samples
Kerman-Kerman	Rishbaba	5
Kerman-Shahr-e-babak	Askari	10
Kerman-Sirjan	Rishbaba	7
Kerman-Jiroft	Askari	4
Kerman-Cekonj	Askari	7
Kerman-Naseraabad	Rishbaba	6
Kerman-Negar	Askari	10
Kerman-Mahan	Askari	8
Tabriz-Tabriz	Askari	10
Fars-Beyza	Askari	7
Total		74

۱ استخراج آر.ان.ا^۱ و واکنش‌های نسخه‌برداری معکوس^۲: به‌منظور ردیابی ویروئید کوتولگی رازک در نمونه‌های

انگور جمع‌آوری شده، با روش CTAB^۳ آر.ان.ا استخراج شد (Zhang et al. 1998). پس از استخراج آر.ان.ا ساخت رشته‌ی

¹ Ribonucleic acid (RNA)

² Reverse transcription reaction (RT)

³ Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

مکمل با استفاده از آغازگر معکوس^۱ VP-19 (Amari et al. 2001) و آنزیم نسخه برداری معکوس^۲ مطابق با روش Sharifi et al. (2008) انجام گردید (جدول ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳: آزمون RT-PCR جهت تکثیر طول کامل ژنوم HSVd با استفاده از آغازگرهای اختصاصی^۴ VP-19/VP-20 صورت گرفت (Amari et al. 2001) (جدول ۲). از آنزیم پلیمرز Taq^۵ جهت تکثیر ژنوم و پروتئید استفاده گردید. واکنش PCR در ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی اولیه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، اتصال آغازگرها یک دقیقه در دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و گسترش ساخت DNA یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرانجام جهت تکمیل ساخت قطعات، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (Amari et al. 2001)

Table 2. Characteristics of primers used in this research for detection of HSVd (Amari et al. 2001)

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	موقعیت ژنومی Genomic position
VP-19	5'- GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG -3'	Complementary to HpSVd residues 85-60
VP-20	5'- CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC -3'	Homologous to HpSVd residues 78-102

تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل داده‌ها: محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده جدایه‌های HSVd جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال گردیدند. جهت تعیین جایگاه تکاملی نتایج حاصل از تعیین ترادف‌ها فایل‌ها به فرمت الکتروگرام Chromas با استفاده از نرم افزار Chromas version 1.41 مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه‌ی ترادف‌های بدست آمده با توالی سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با برنامه فیلوژنتیکی ترادف‌های بدست آمده با سایر ترادف‌های این ویروئید، از نرم افزار MEGA (version 7) و روش neighbor-joining استفاده شد (Kumar et al. 2016). میزان همولوژی جدایه‌ها توسط نرم افزار SDT v1.2 ارزیابی شد (Muhire

¹ Reverse primers

² Reverse transcriptase enzyme

³ Polymerase chain reaction (PCR)

⁴ Specific primer

⁵ Taq DNA Polymerase enzyme

(et al. 2014). جهت بررسی و رسم ساختار ثانویه فرضی جدایه‌ها، از نرم افزار آنلاین Mfold structure استفاده گردید (Zuker, 2003).

تعیین دامنه‌ی میزبانی ویروئید در گیاهان علفی: جهت تعیین دامنه میزبانی و بررسی علائم از هشت گونه و رقم

گیاهی از دو خانواده استفاده گردید. بذور گیاهان مختلف در گلدان‌های کوچک حاوی یک قسمت شن و یک قسمت خاک برگ کاشته شده و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۴-۲۸ درجه سانتیگراد و نور مناسب نگهداری شدند. به منظور مایه‌زنی گیاهان، ۰/۵ گرم برگ گیاهان انگور که در آزمون RT-PCR آلودگی به ویروئید را نشان دادند با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با ۷ pH= عصاره‌گیری و با کمک پودر کاربورانوم بر روی سطح برگ‌های گیاهان محک، به روش سایشی یا از طریق تزریق با سرنگ انسولین به درون ساقه، مایه زنی گردیدند (Jahanshahi et al., 2015; Maddahian et al. 2019). گیاهان مورد بررسی قبل از مایه‌زنی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در داخل اتاقک تاریک نگهداری شدند. این گیاهان در شرایط گلخانه در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری و بررسی آلودگی هر یک از این گیاهان ۱۴-۱۰ روز و برخی بین ۲۵-۲۰ روز پس از مایه‌زنی با استفاده از آزمون RT-PCR صورت گرفت.

نتایج

ردیابی، واکنش RT-PCR و تعیین ترادف جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک از درخت انگور: از ۱۰

منطقه مورد بررسی، شش منطقه (شهر بابک (دو جدایه)، سه کنج (یک جدایه)، ماهان (یک جدایه) و ناصرآباد (یک جدایه) در استان کرمان و دو منطقه تبریز (یک جدایه) و بیضا (یک جدایه) به ترتیب در استان‌های آذربایجان شرقی و فارس) آلودگی آن‌ها نسبت به ویروئید کوتولگی رازک، توسط آزمون RT-PCR تایید گردید (جدول ۳). همچنین در مقایسه، در مجموع ۷۴ نمونه، ۵۶ نمونه انگور رقم عسکری، شش نمونه (۱۰/۷۱ درصد) و از مجموع ۱۸ نمونه انگور رقم ریش بابا، یک نمونه (۵/۵۵ درصد) نسبت به HSVd آلودگی نشان دادند. الکتروفورز محصول به دست آمده از آزمون پی‌سی‌آر در هفت جدایه انگور (از ۷۴ جدایه نمونه برداری شده) با استفاده از آغازگرهای VP-19/VP-20، منجر به تکثیر قطعه‌ی تقریباً ۳۰۰ جفت بازی مربوط به این ویروئید در ژل آگارز یک درصد گردید (شکل ۱). پس از تعیین ترادف محصولات پی‌سی‌آر مربوط به هر جدایه، هفت توالی مربوط به جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک از گیاه انگور در بانک ژن ثبت گردیدند (جدول ۳).

جایگاه تکاملی جدایه‌های HSVd حاصل از درختان انگور^۱: طول ژنوم جدایه‌های تعیین توالی شده از درختان

انگور متغیر (بین ۲۹۷ تا ۳۰۰ نوکلئوتید) و با هم ۹۸/۷ - ۹۳/۳ درصد تشابه دارند (جدول ۳) (شکل ۲). با هم‌مدیف سازی چندگانه^۲

¹ Iranian HSVd grapevine isolates

² Multiple sequence alignment

در محیط نرم افزار MEGA 7.0 توالی هفت جدایه بدست آمده از گیاهان انگور (مورد بررسی در این تحقیق)، شامل ۲۷۰ موقعیت نوکلئوتیدی غیرمتغیر^۱ و ۳۳ موقعیت متغیر^۲ نسبت به یکدیگر می باشند که ۲۷ موقعیت متغیر به صورت تک نوا^۳ بودند.

جدول ۳. مشخصات جدایه های ویروئید کوتولگی رازک ردیابی شده از درختان انگور در این تحقیق، شامل شماره دسترسی به بانک ژن، منشاء جغرافیایی، نوع رقم و اندازه توالی ژنوم

Table 3. Hop stunt viroid isolates identified in grapevines in this study, including origin, GenBank accession number, variety and genome length

جدایه Isolate	منطقه Location	رقم Variety	شماره دسترسی بانک ژن GenBank acc. No	طول ژنوم Genome length
Far.Bz.G6	Fars-Beyza	Askari	OL456179	300
Ker.Ck.G5	Kerman-Cekonj	Askari	OL456180	298
Ker.Dm.G6	Kerman-Shahr-e-babak	Askari	OL456181	300
Ker.Dr.G1	Kerman-Shahr-e-babak	Askari	OL456182	297
Ker.Na.G6	Kerman-Naseraabad	Rishbaba	OL830691	299
Tab.T.G10	Tabriz-Tabriz	Askari	OL456183	297
Tab.T.G31	Tabriz-Tabriz	Askari	OL456184	297

جهت رسم درخت فیلوژنی از ۹۲ توالی مربوط به HSVd (ثبت شده در بانک ژن) استفاده گردید. این توالی ها شامل هفت توالی مورد بررسی در این تحقیق، ۳۳ توالی ایرانی HSVd بدست آمده از گیاهان مختلف (بر اساس موقعیت جغرافیایی و نوع میزبان) و ۵۲ توالی این ویروئید گزارش شده از دیگر نقاط دنیا می باشند. همچنین یک توالی از ویروئید غده دوکی سیب زمینی (GQ583467) به عنوان عضو خارج گروه^۴ انتخاب گردید. بر اساس درخت فیلوژنی ایجاد شده، توالی های HSVd در پنج گروه شامل سه گروه اصلی Hop، Citrus و Plum و دو گروه نوترکیب Plum-Citrus و P-H/cit3 گروه بندی گردیدند (شکل ۳). بر این اساس، تمام جدایه های HSVd شناسایی شده در این تحقیق توأم با ۱۰ جدایه از گیاه انگور، ۱۰ جدایه از درختان پسته، دو جدایه از کدوئیان و یک جدایه از زردآلو در گروه رازک طبقه بندی شدند. سه جدایه حاصل از انگور شامل Ker.Ck.G5، Ker.Dm.G6 و Ker.Dr.G1 به همراه چهار جدایه گزارش شده از این گیاه، g4، g6 و g8 (از کشور آلمان) و جدایه Xatam (از ایران)، زیر گروه مستقلی را در گروه رازک تشکیل دادند. این در حالی است که چهار جدایه دیگر مورد بررسی در این تحقیق به صورت مجزا تشکیل یک زیر گروه

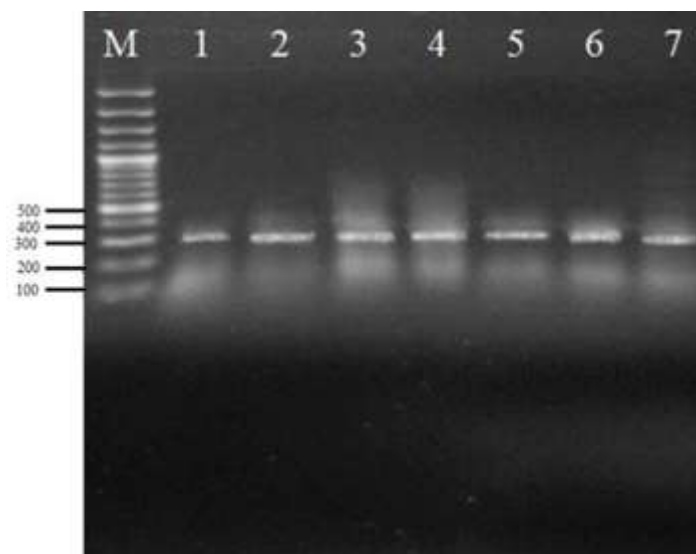
¹ Invariable (monomorphic) sites

² Variable (polymorphic) sites

³ Single tone sites

⁴ Out group

را داده‌اند. از نکات قابل توجه قرارگیری چهار جدایه ایرانی مجزا شده از درختان رقم پسته کله قوچی در استان کرمان در گروه رازک می‌باشد.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R9/F منجر به تشکیل باندها حدوداً ۳۰۰ جفت بازی مربوط به ژنوم جدایه های ایرانی HSVd درون ژل آگاروز یک درصد گردید. (M. نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™100b DNA Ladder, Fermentase). (۱-۷) نمونه‌های گیاهی آلوده به جدایه های ایرانی HSVd (جدول ۳)

Figure 1. A: Reverse transcription-polymerase chain reaction used for the detection of *Hop stunt viroid*. Lane M, 100b DNA ladder; lane 1-7 grapevines infected samples with Iranian HSVd isolates (Table 3)

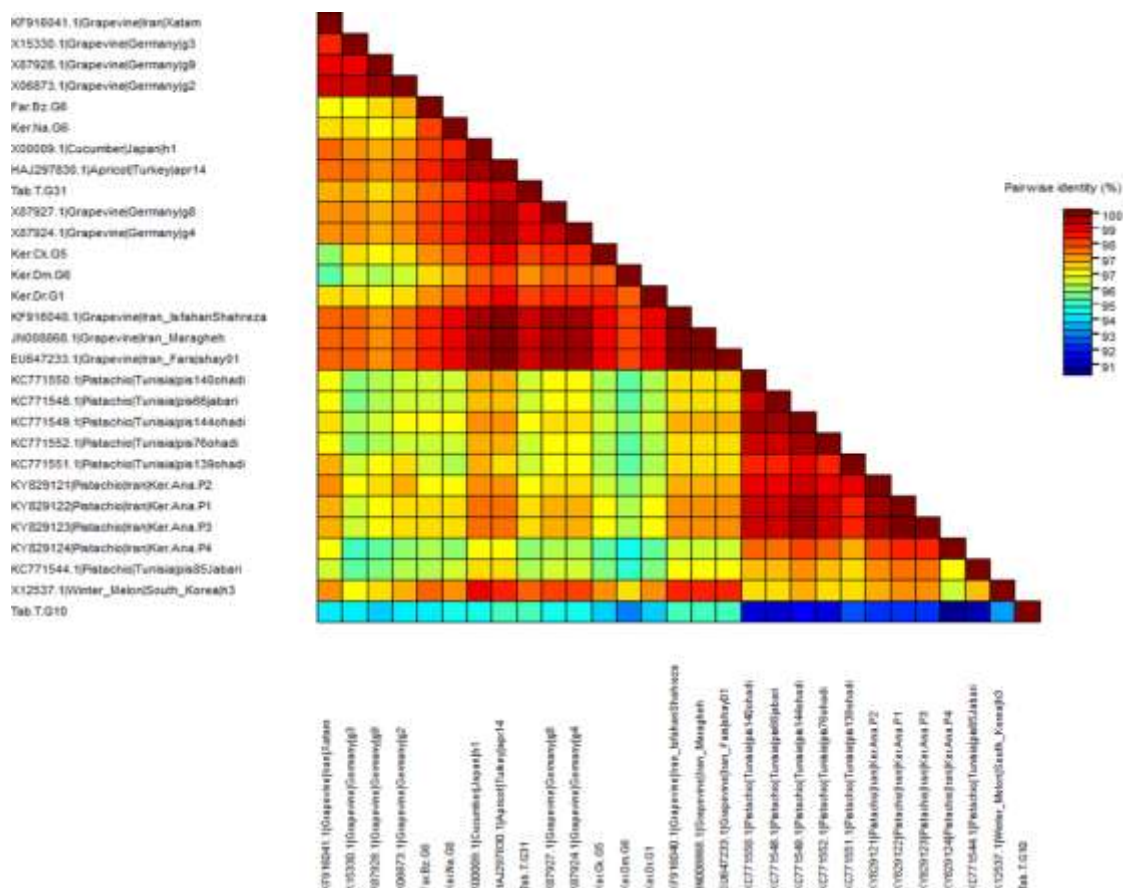
بیشترین درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌های انگور ایرانی مورد بررسی در این تحقیق و جدایه‌های مذکور ۹۷ درصد و بین دو جدایه Ker.Ana.P1 و Ker.Na.G6 می‌باشد. همچنین شش جدایه HSVd گزارش شده از کشور تونس، با منشاء ارقام ایرانی مانند اوحدی و جباری، نیز در این گروه قرار گرفته‌اند. از دیگر جدایه‌های انگور قرار گرفته در گروه رازک می‌توان به جدایه‌های Maragheh و Shahreza (از ایران) و g1 و g5 (از کشور آلمان) اشاره نمود (شکل ۳).

تعیین ساختار ثانویه: ساختار ثانویه مربوط به جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق توسط نرم‌افزار آنالین Mfold structure (version 2.3) رسم گردید (Zuker 2003). موتاسیون‌ها شامل جانشینی‌ها^۱ و جایگذاری‌ها^۲ در مقایسه با جدایه HSVd.h1 (X00009.1) به عنوان اولین توالی گزارش شده از این ویروئید مشخص گردیدند (Ohno et al. 1983)

¹ Substitution

² Insertion

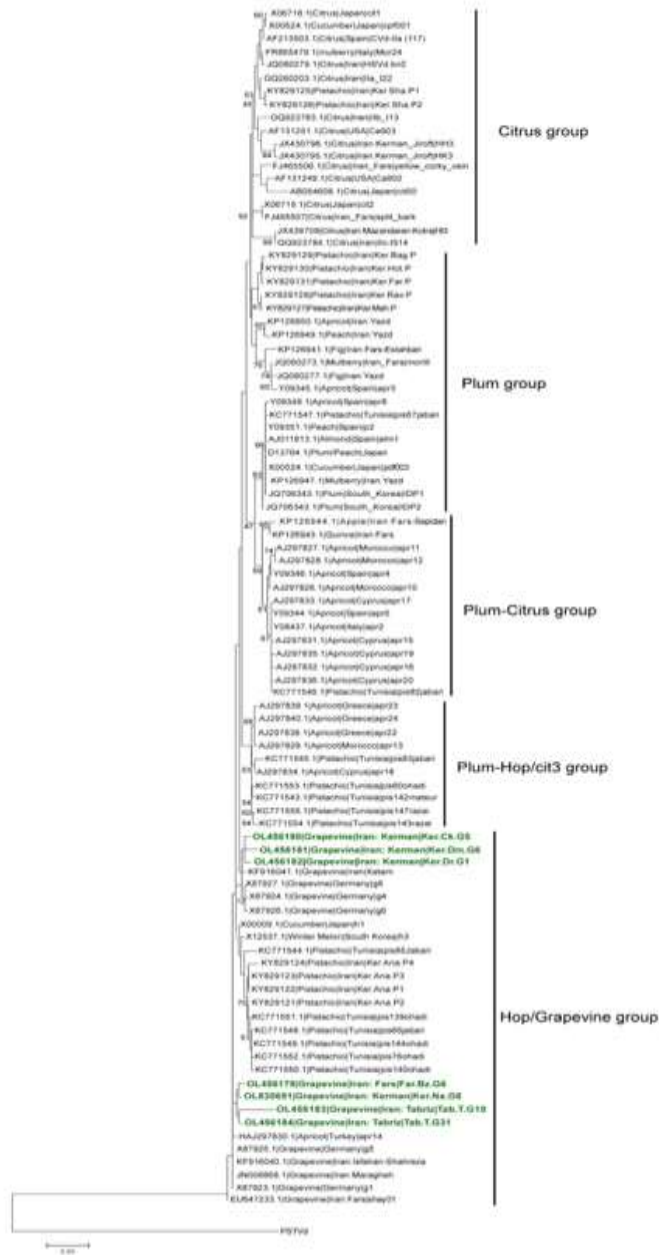
(شکل ۴). جدایه‌های حاصل از انگور دارای ۹۳-۹۹ درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد (HSVd.h1) می‌باشند. ساختار ثانویه رسم شده همانند سایر اعضاء خانواده *Pospiviroidae* به صورت میله‌ای با جفت بازهای فراوان و همراه با حلقه‌های کوچک می‌باشد. پنج ناحیه انتهایی سمت چپ^۱، ناحیه بیماری‌زایی^۲، ناحیه مرکزی حفاظت شده^۳، ناحیه متغیر^۴ و ناحیه انتهایی سمت راست^۵ مشخص گردیدند (شکل ۴). بیشترین تنوع در ساختار ثانویه جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق در ناحیه بیماری‌زایی و ناحیه متغیر دیده شد.



شکل ۲. تشابه ترادف‌های نوکلئوتیدی هفت جدایه ویروئید کوتولگی رازک ردیابی شده از درختان انگور در این تحقیق با توالی‌های گروه رازک. ماتریس تشابه با نرم افزار SDT v1.1 ایجاد شد

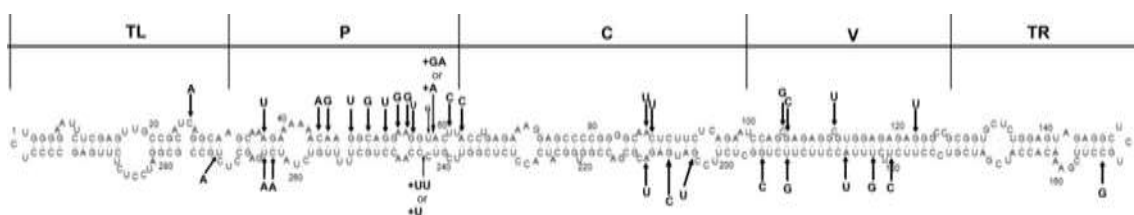
Figure 2. Sequence-based pairwise identity of seven *Hop stunt viroid* isolates identified in grapevines in this study and those clustered in Hop group using the SDT v1.2 program

¹ Terminal left regions (TL)
² Pathogenicity regions (P)
³ Central conserved regions (C)
⁴ Variable regions (V)
⁵ Terminal right regions (TR)



شکل ۳. روابط شجره‌ای بین جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک، بررسی شده در این تحقیق با جدایه‌های موجود در بانک ژن. جدایه‌های ایرانی با رنگ سبز مشخص شده‌اند. ترادف مربوط به ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی (PSTVd) نیز به عنوان خارج از گروه لحاظ شد

Figure 3. Phylogenetic relationships between the hop stunt viroid isolates characterized in the present study and those available in GenBank. The Iranian isolates are depicted in green. *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) was also included as an outgroup



شکل ۴. ساختار ثانویه ترسیمی جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک شناسایی شده در این تحقیق در مقایسه با جدایه مرجع HSVd.h1 با استفاده از نرم افزار Mfold. پنج ناحیه انتهای سمت چپ (TL)، بیماری‌زایی (P)، ناحیه مرکزی حفاظت شده (C)، متغیر (V) و انتهای سمت راست (TR) بر قسمت فوقانی ترادف جدایه استاندارد مشخص شده اند

Figure 4. Secondary structure predicted for the identified hop stunt viroid (HSVd) isolates in this study using the Mfold program, showing nucleotide substitutions compared to the reference isolate HSVd.h1. Five structural domains are conserved in the *Pospiviroidae*; terminal left (TL), pathogenicity (P), central (C), variable (V), and terminal right (TR) regions are indicated at the top of the reference sequence

تعیین دامنه‌ی میزبانی و علائم: به منظور بررسی علائم و تعیین دامنه میزبانی جدایه‌های ایرانی ویروئید کوتولگی رازک جداسازی شده از درختان انگور، با توجه به منطقه نمونه‌برداری شده و مطالعات مولکولی اولیه جدایه‌های مربوط به شهرستان شهربابک (استان کرمان) (Ker.Dm.G6 و Ker.Dr.G1) انتخاب گردیدند. نتایج حاصل از این آزمون در جدول (۴) بیان گردیده است. ارقام خیار مایه‌زنی شده با عصاره برگ گیاه انگور آلوده به HSVd، بعد از گذشت حدود چهار هفته از مایه‌زنی با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی VP-19/VP20، قطعه‌ی حدود ۳۰۰ نوکلئوتیدی مربوط به ویروئید کوتولگی رازک به دست آمد. در ارقام خیار (Beith alpha و Superina F1) مایه زنی شده، علائمی نظیر کوتولگی، ریزبرگی، چروکیدگی موزائیک و بدشکلی برگ در سطح برگ‌ها مشاهده گردید (شکل ۵). همچنین این دو جدایه (Ker.Dr.G1 و Ker.Dm.G6) علائم موزائیک و بدشکلی برگ بر روی دو رقم طالبی (زرد خارجی و آناناسی) نشان دادند. در صورتی که این دو جدایه هیچ گونه علائمی بر روی رقم ایرانی کدوخی و طالبی رقم سوغان و دو رقم توتون سامسون (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun.) و بنتامیانا (*Nicotiana bentamiana* L.) ایجاد نکردند. در تمام بوته‌هایی علائم‌دار در طی واکنش‌های RT-PCR قطعه مرتبط با ژنوم HSVd تکثیر شد.

بحث: براساس نتایج به‌دست آمده، درختان انگور در نقاط جمع‌آوری شده در استان کرمان و همچنین در استان‌های آذربایجان شرقی و فارس به ویروئید کوتولگی رازک آلوده بودند. پیش از این مطالعه از تاکستان‌های ایران ویروئیدهای عامل لکه

زرد مو ۱ و ۲، کوتولگی رازک و ویروئید استرالیایی مو گزارش شده است (Zaki-aghl et al. 2004; Zaki-aghl et al. 2006; Hajizadeh et al. 2012).

جدول ۴. علائم ناشی از مایه‌زنی دو جدایه ویروئید کوتولگی رازک جدا شده از انگور در این تحقیق بر روی گیاهان محک

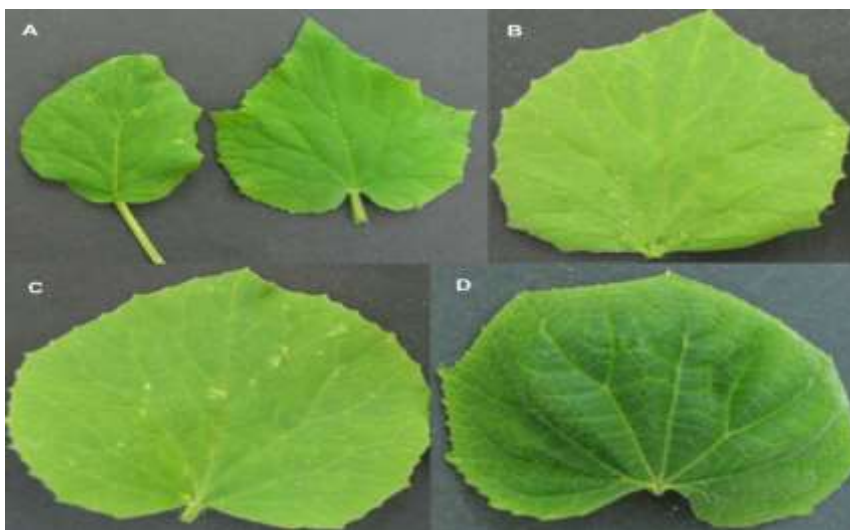
Table 4. Symptom expression on test plants inoculated with two-hop stunt viroid isolates from grapevines in this study

Test plant گیاه محک	Isolate جدایه	
	Ker.Dr.G1	Ker.Dm.G6
Cucurbitaceae		
<i>Cucurbita pepo</i> L. cv. Khoy	NS	NS
<i>Cucumis sativus</i> L. cv. Beith alpha	Y.LD.TL.M	VC.E.LD.M
<i>Cucumis sativus</i> L. cv. Superina F1	Y.M	LD.TL.M
<i>Cucumis melo</i> L. cv. Yellow	Y.VC.M	M
<i>Cucumis melo</i> L. cv. Soghan	NS	NS
<i>Cucumis melo</i> L. cv. Ananas	M	LD.M
Solanaceae		
<i>Nicotiana tabacum</i> var Samsun. N	NS	NS
<i>Nicotiana bentamiana</i> L.	NS	NS

E: epinasty; **LD:** leaf deformation; **M:** mosaic; **TL:** tiny leaf; **VC:** vein clearing; **Y:** yellowing; **NS:** no symptoms.

دو ویروئید GYSVd1 و HSVd در اغلب تاکستان‌های دنیا شیوع دارند و اکثراً به صورت آلودگی مخلوط هستند (Flores et al. 1988; Rezaian et al. 2017; Hadidi et al. 1985; et al.). همچنین در گذشته نیز ویروئید کوتولگی رازک از ارقام انگور در استرالیا، ایالت متحده، اروپا و ایران گزارش شده است (Hajizadeh et al. 2015; Koltunow et al. 1988; Sano et al. 1986; Semancik et al. 1988; al. 1986). نتایج بدست‌آمده از پژوهش حاضر به‌عنوان اولین گزارش از ویروئید کوتولگی رازک بر روی درختان انگور در استان کرمان می‌باشد. میزان آلودگی درختان انگور مورد آزمایش در این بررسی ۱۵/۹ درصد تعیین گردید. میزان آلودگی گیاهان انگور نسبت به HSVd در گزارش‌های مختلف موضوع مورد بحث بوده است. در تحقیقات Gambino et al. (2014) و Hajizadeh et al. (2015) آلودگی درختان انگور نسبت به این ویروئید ۱۰۰ درصد گزارش شده بود. نتایج تحقیق حاضر تقریباً با نتایج حاصل از بررسی‌های Moradi et al. (2018) و Salami et al. (2022) مطابقت دارد که میزان آلودگی را به ترتیب حدود ۱۳/۶ و ۲۰ درصد گزارش نموده‌اند. از دلایل اختلاف این داده‌ها می‌توان به تفاوت در ارقام نمونه‌برداری شده، موقعیت‌های جغرافیایی جهت نمونه‌برداری، شرایط آب و هوایی مختلف و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اشاره نمود. طبق بررسی‌های صورت گرفته توسط Hadidi et al. (2003)، جدایه‌های HSVd به پنج گروه تقسیم می‌گردند که به ترتیب گروه اول شامل آلو،

هلو، بادام و زردآلو، گروه دوم شامل انگور آلمانی، گروه سوم شامل گروه عمومی انگور-رازک، گروه چهارم شامل کاجکسیای مرکبات آمریکایی و گروه پنجم شامل گروه عمومی خیار-مرکبات می‌باشد.



شکل ۵. علائم ایجاد شده بر روی گیاهان محک کدوئیان مایه‌زنی شده توسط دو جدایه ایرانی ویروئید کوتولگی رازک، شناسایی شده در این تحقیق. A، علائم موزائیک، بدشکلی برگ و ریز برگ ایجاد شده بر روی گیاهان خیار (رقم Superina F1) توسط جدایه Ker.Dm.G6 در مقایسه با برگ سالم (سمت راست). B، علائم رگبرگ‌روشنی و زردی و C، علائم موزاییک خفیف بر روی برگ طالبی (رقم زرد) مایه‌زنی شده توسط جدایه Ker.Dr.G1. D، علائم بدشکلی و رگبرگ‌روشنی بر روی برگ گیاه خیار (رقم Beith alpha) مایه‌زنی

شده توسط جدایه Ker.Dm.G6

Figure 5. Symptom expression on cucurbitaceous test plants inoculated by two-hop stunt viroid isolates identified in grapevines in this study. A, mosaic, leaf deformation, and tiny leaf on cucumber (Superina F1 variety) inoculated with the Ker.Dm.G6 isolate versus control (right); B, vein clearing and yellowing; and C, mild mosaic on *Cucumis melo* (Yellow variety) inoculated with the Ker.Dr.G1 isolate. D, leaf deformation, and vein clearing on cucumber (Beith alpha variety) inoculated with the Ker.Dm.G6 isolate

همچنین جدایه‌هایی که از درختان انگور جداسازی شده‌اند در گروه عمومی رازک قرار می‌گیرند (Hadidi et al, 2003). به‌علاوه اینکه براساس پژوهش Amari et al. (2001) جدایه‌های ویروئید HSVd به پنج گروه تقسیم می‌گردند. بر این اساس سه گروه اصلی شامل تیپ آلو (Plum)، تیپ رازک (Hop) و تیپ مرکبات (Citrus) و دو گروه فرعی شامل تیپ آلو-مرکبات (Plum-Citrus) و تیپ آلو-رازک (Plum-Hop/cit3) می‌باشد که تصور می‌شود از نوترکیبی بین اعضای سه گروه بالا

بوجود آمده‌اند (Amari et al., 2001). براین اساس، جدایه‌های انتخاب شده جهت رسم درخت فیلوژنتیکی در این پژوهش در پنج گروه مذکور طبقه‌بندی گردیده و هفت جدایه گزارش شده در این پژوهش در گروه Hop قرار گرفتند که با نتایج گذشته مطابقت دارد. گیاهان محک علفی در مقایسه با گیاهان آزمون چوبی به دلیل دوره رشد کوتاه و ظهور سریع و مشخص تر علائم از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشند (Singh & Ready 2003; Walia et al. 2014). آزمون‌های تعیین دامنه میزبانی و علائم شناسی در موارد متعدد جهت شناسایی و بررسی تمایز خصوصیات زیست‌شناسی ویروئیدها و به‌خصوص HSVd مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ohshima et al. 1988; Matsushita et al. 2009; Walia et al. 2014). در این تحقیق دو واریانت ویروئید کوتولگی رازک از گیاه انگور (Ker.Dm.G6 و Ker.Dr.G1) به‌طور مشابه با گزارش‌های پیشین باعث ایجاد علائم متنوع این ویروئید شامل بدشکلی برگ، زردی، رگبرگ‌نواری، روخمشی برگ، موزائیک و ریزبریگی بر روی ارقام کدوئیان مورد استفاده در این تحقیق گردیدند (Sano 2003; Sasaki & Shikata 1977; Van Dorst & Peters 1974). این در حالی است که تفاوت‌هایی نیز در علائم ایجاد شده توسط هر کدام از جدایه‌های مورد بررسی بر روی گیاه محک مشاهده گردید. دو جدایه مذکور دارای ۹۷ درصد مشابهت ترادف نوکلئوتیدی و همچنین پنج موقعیت نوکلئوتیدی متفاوت نسبت به یکدیگر می‌باشند. این موقعیت‌های متفاوت در دو دامنه بیماری‌زایی و متغیر به عنوان نواحی موثر در بیان علائم و ایجاد بیماری‌زایی HSVd واقع گردیده‌اند (Keese & Symons 1985; Owens & Hammond 2009; Sano et al. 1992; Serra et al. 2008). تنها تغییر یک نوکلئوتید در موتیف القاء‌کننده‌ی علائم بیماری کاکسسیای مرکبات^۱، در استرین‌های غیر بیماری‌زای ویروئید کوتولگی رازک، باعث بروز و القاء علائم در گیاه توسط استرین‌های غیر-کاکسسیای مرکبات^۲ و تبدیل آن‌ها به استرین‌های بیماری‌زا می‌گردد (Serra et al. 2008). همچنین تغییر یک نوکلئوتید باعث تبدیل آر.ان.ا. غیر آلوده‌کننده^۳ ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی به آر.ان.ا. آلوده‌کننده^۴ می‌گردد (Wassenegger et al, 1996). بنابراین تفاوت‌های مشاهده شده بین علائم ایجاد شده توسط دو جدایه Ker.Dr.G1 و Ker.Dm.G6 بر روی گیاهان محک مانند ارقام خیار Superina F1 و Beith alpha و یا تفاوت علائم بر روی دو رقم طالبی زرد (Yellow) و آناناسی (Ananas)، در کنار عدم مشاهده علائم بر روی رقم طالبی سوغان (Soghan)، می‌تواند در نتیجه‌ی اختلاف ترادف نوکلئوتیدی دامنه‌های بیماری‌زایی و متغیر دو واریانت مذکور باشد. این موضوع بیان‌گر آن است که جهت تمایز جدایه‌های این ویروئید، علاوه بر استفاده از روش‌های مولکولی، از مشخصات بیولوژیکی نیز می‌توان به عنوان روش‌های تکمیلی استفاده نمود. با این وجود، مطالعات بیشتر جهت بررسی اثر تغییرات نوکلئوتیدی بین واریانت‌های ایرانی HSVd بدست آمده از گیاه انگور و علائم مشاهده شده بر روی گیاهان محک ذکر شده، لازم می‌باشد. ویروئید

¹ Citrus cachexia symptom inducing motif

² Citrus non-cachexia strain

³ non-Infectious RNA

⁴ infectious RNA

کوتولگی رازک از استان‌های مختلف کشور شامل آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، فارس، کرمان، مازندران و یزد و زنجان گزارش شده است (Amiri Mazhar et al. 2014a,b; Bani-Hashemian et al. 2016; Ebrahimi-Moghadam et al. 2019; Maddahian et al. 2019; Jahanshahi et al. 2014). به‌طور کلی انتقال ویروئیدهای مو به‌روش مکانیکی، از طریق پیوند و ابزارهای آلوده باغبانی صورت می‌گیرد (Staub et al. 1995; Taylor & Woodham 1972). به نظر می‌رسد تکثیر قلمه‌های انگور آلوده دلیل اصلی گسترش ویروئیدهای مو می‌باشد، به‌گونه‌ای که اغلب باغ‌های انگور در نقاط مختلف کشور، مانند فارس، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان و اکنون کرمان آلوده به ویروئیدهای مو هستند (Hajizadeh et al. 2010; Zaki aghl & Izadpanah 2010; Salami et al. 2022; Hajizadeh et al. 2015). طبق نظریه‌های پیشین، معمولاً علائم آلودگی‌های ویروئیدی تا سال‌ها بر روی گیاهان چوبی به صورت پنهان می‌باشد. به‌عنوان نمونه در این مورد می‌توان به ویروئیدهای درختان سیب که علائم تا زمان باردهی گیاه ظاهر نمی‌گردند و یا در مورد گیاه انگور که آلودگی نسبت به HSVd برای همیشه به صورت پنهان و فاقد علائم می‌باشد، اشاره نمود (Hurt et al. 1996; Kawaguchi-Ito et al. 2009; Singh et al. 2003). نمونه‌برداری‌های انجام شده در این تحقیق و عدم وجود علائم مشخص بیانگر آلودگی پنهان این ویروئید در انگور می‌باشد. لذا می‌بایست بررسی بیش‌تری نسبت به این ویروئید در سراسر تاکستان‌های ایران جهت جلوگیری از گسترش این بیماری صورت گیرد. ضمناً اگرچه ویروئید کوتولگی رازک در مو علائم خاصی ایجاد نمی‌کند (Polivka et al. 1996; Shikat 1990; Sano et al. 1985) اما بعضی از جدایه‌های خاص آن باعث به‌وجود آمدن بیماری کاکسکیا در مرکبات (Reanwarakorn & Semancik, 1999) و در درختان هلو و آلو سبب خالدار شدن میوه می‌شوند (Sano 2003). وجود علائم پنهان این ویروئید در درختان انگور می‌تواند به‌عنوان منبع آلودگی برای سایر میزبان‌ها، مورد توجه جدی واقع گردد. همچنین براساس بررسی‌های بدست آمده (Kawaguchi-Ito et al. 2009)، مشخص گردیده که منشأ اصلی این ویروئید درخت مو بوده و به‌دنبال آن از درختان مو به گیاه رازک منتقل شده است که در اپیدمی بیماری در کشور ژاپن دخیل بوده است (Sano et al. 2001). در حال حاضر، در کشور ترکیه همانند دهه‌های گذشته در استان کرمان، باغ‌های انگور و پسته به صورت کشت مخلوط هستند (Gursoz et al. 2010). بنابراین، به‌دلیل آنکه آلودگی نسبت به کوتولگی رازک در بوته‌های انگور در کشور ایران از نظر زمانی پیش‌تر گزارش شده است (Hajizadeh et al. 2015)، این احتمال وجود دارد که حتی درختان پسته در ایران به واسطه انتقال آلودگی از درختان انگور به این ویروئید آلوده شده باشند.

نتیجه‌گیری: از آنجائی که آلودگی درختان انگور در ایران نسبت به HSVd قبل از آلودگی درختان پسته گزارش گردیده، بنابراین احتمالاً آلودگی گیاهان پسته به HSVd در ایران به‌واسطه‌ی آلودگی متقاطع و انتقال آلودگی از درختان انگور به درختان پسته رخ داده است. بر این اساس با توجه به نتایج حاصل از مطالعات ملکولی و شواهد موجود، درختان انگور می‌توانند به‌عنوان مبداء آلودگی درختان پسته در ایران باشند. با توجه به آلودگی پنهان HSVd در درختان انگور، این عامل بیماری‌زا می‌تواند بدون

هیچ علائمی در بوته‌های انگور به عنوان منشاء آلودگی در بسیاری از گیاهان باشد (Kawaguchi-Ito et al. 2009). قبلاً نیز Bani-Hashemian et al. (2016) آلودگی درختان مرکبات را در استان کرمان نسبت به HSVd گزارش نموده‌اند. حال با توجه به گزارش‌های اخیر از آلودگی درختان پسته (Maddahian et al. 2019) و نتایج این پژوهش در مورد آلودگی درختان انگور استان کرمان، بررسی بیش‌تر این ویروئید در درختان انگور و سایر درختان میوه استان، به عنوان یکی از استان‌های مهم کشت محصولات باغی کشور، شاید بتواند به جلوگیری از گسترش آلودگی‌های بیشتر آن در سایر درختان کمک نماید.

سپا سگزاری: نگارندگان از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی به دلیل فراهم آوردن امکانات انجام این پروژه (طرح

پژوهشی شماره ۹۰۰/۱۰۶/پ) قدردانی می‌نمایند.

References

- Al Rwahnih M, Rowhani A, Westrick N, et al. (2018) Discovery of viruses and virus-like pathogens in pistachio using high-throughput sequencing. *Plant Dis* 102, 1419-1425.
- Amari K, Canizares MC, Myrta A, et al. (2001) Tracking *Hop stunt viroid* (HSVd) infection in apricot trees during a whole year by non-isotopic tissue printing hybridization. *Acta Hort* 550, 315-320.
- Amiri-Mazhar M, Bagherian SAA, Izadpanah K (2014a) Variants of *Hop stunt viroid* associated with mulberry vein clearing in Iran. *J Phytopathol* 162, 269-271.
- Amiri-Mazhar M, Bagherian SAA, Salahi-Ardakani AA, Izadpanah K (2014b) Nucleotide sequence and structural features of *Hop stunt viroid* and *Citrus bent leaf viroid* variants from blighted citrus plants in kohgiluyeh-boyerahmad province of Iran. *J Agr Sci Tech* 16, 657-665.
- Astruc N, Marcos JF, Macquaire G, et al. (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. *Eur J Plant Pathol* 102, 837-846.
- Bani-Hashemian SN, Bani-Hashemian SM, Ashkan SM (2016) Determination of the dominant variants of *Hop stunt viroid* in two different cachexia isolates from north and south of Iran. *J Agr Sci Tech* 18, 1431-1440.
- Di Serio F, Li SF, Pallas V, et al. (2017) Viroid Taxonomy. In: *Viroids and Satellites*. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P (Eds.), Elsevier AP pp 135-146.
- Diener TO (1971) Potato spindle tuber "virus": IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45, 411-428
- Diener TO (1987) Potato spindle tuber. In: *The Viroids*. Diener TO (Eds.), Plenum Press, New York, NY pp. 221-233.
- Eastwell KC, Nelson ME (2007) Occurrence of viroids in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) production areas of Washington State. *Plant Health Prog* 8(1), 1.

- Ebrahimi-Moghadam L, Bani-Hashemian SM, Elahi-Nia SA, Bani-Hashemian SN (2014) Identification of citrus viroids in commercial citrus varieties by molecular techniques J Plant Protect 28, 250-253.
- Elbeaino T, Abou Kubaa R, Choueiri E, et al. (2012a) Occurrence of *Hop stunt viroid* in Mulberry (*Morus alba*) in Lebanon and Italy. J Phytopathol 160, 48-51.
- Elbeaino T, Abou Kubaa R, Ismaeil E, et al. (2012b) Viruses and *Hop stunt viroid* of fig trees in Syria. J Plant Pathol 94, 687-691.
- Elbeaino T, Choueiri E, Digiario M (2013) First report of hop stunt viroid in Lebanese fig trees. J Plant Pathol 95, 218.
- Elleuch A, Hamdi I, Ellouze O, H et al. (2013) Pistachio (*Pistacia vera* L.) Is a new natural host of *Hop stunt viroid*. Virus Genes 47, 330-337.
- Flores R, Durnan-Vila N, Pallas V, Semancik JS (1985) Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. J Gen Virol 66, 2095-2102.
- Flores R, Hernández C, Alba AEMD, et al. F (2005) Viroids and viroid-host interactions. Annu. Rev Phytopathol 43, 117-139.
- Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M, Diener TO (1998) A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. Arch Virol 143, 623-629.
- Gambino G, Navarro B, Torchetti EM, et al. (2014) Survey on viroids infecting grapevine in Italy: identification and characterization of *Australian grapevine viroid* and *Grapevine yellow speckle viroid 2*. Eur J Plant Pathol 140, 199-205.
- Gora-Sochacka A, Kierzek A, Candresse T, Zagorski W (1997) The genetic stability of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) molecular variants. RNA 3(1), 68-74.
- Guo L, Liu S, Wu Z, et al. (2008) *Hop stunt viroid* (HSVd) newly reported from hop in Xinjiang, China. Plant Pathol 57, 764.
- Gursoz S, Gokoglu S, Ak BN (2010) Determination of mineral nutrition contents of grape and pistachio cultivars grown as inter planted orchard. Options Méditerr 94, 25-30.
- Hadidi A, Candresse T (2003) Polymerase Chain Reaction. In: Viroids. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semanick JS (Eds). CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. pp.115-122.
- Hadidi A, Vidalakis G, Sano T (2017) Economic Significance of Fruit Tree and Grapevine. In: Viroids and Satellites. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P (Eds). AP is an imprint of Elsevier pp. 15-25.
- Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS, et al. (2012) Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. J Virol. Methods 179, 62-69.

- Hajizadeh M, Torchetti EM, Sokhandan-Bashir N, et al. (2015) Grapevine viroids and *Grapevine fanleaf virus* in north-west of Iran. *J Plant Pathol* 97, 363-369.
- Hassen IF, Kummert J, Marbot S, et al. (2004) First report of pear blister canker viroid, peach latent mosaic viroid, and hop stunt viroid infecting fruit trees in Tunisia. *Plant Dis* 88, 1164.
- Hataya T, Tsushima T, Sano T (2017) Hop Stunt Viroid. In: *Viroids and Satellites*. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P (Eds). AP is an imprint of Elsevier pp. 199-209.
- Hurt SS, Podleckis EV, Howell WE (1996) Integrated molecular and biological assays for rapid detection of *Apple scar skin viroid* in pear. *Plant Dis* 80, 458-462.
- Jahanshahi Z, Izadpanah K, Afsharifar AR, Behjatnia SAA (2015) New hosts and comparison of biological and molecular characteristics of fig, mulberry, and citrus isolates of *Hop Stunt Viroid* in Iran. *Iran J Virol* 9, 22-30.
- Kaponi M, Luigi M, Kyriakopoulou PE (2012) Mixed infections of pome and stone fruit viroids in cultivated and wild trees in Greece. *New Dis Rep* 26, 8.
- Kawaguchi-Ito Y, Li SF, Tagawa M, et al. (2009). Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of *Hop stunt viroid* to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. *PLoS One* 4(12), e8386.
- Keese P, Symons RH (1985) Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4582-4586.
- Kofalvi SA, Marcos JF, Canizares M.C, et al. (1997) *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates. *J Gen Virol* 78, 3177-3186.
- Koltunow AM, Rezaian MA (1989) A scheme for viroid classification. *Intervirology* 30, 194-204.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Lemmetty A, Werkman AW, Soukainen M (2011) First report of hop stunt viroid in greenhouse cucumber in Finland. *Plant Dis* 95, 615.
- Luigi M, Manglli A, Tomassoli L, Faggioli F (2013) First report of hop stunt viroid in *Hibiscus rosa-sinensis* in Italy. *New Dis Rep* 27, 14.
- Maddahian M, Massumi H, Heydarnejad J, et al. (2019) Biological and molecular characterization of hop stunt viroid variants from pistachio trees in Iran. *J Phytopathol* 167, 163-173.
- Martelli GP (2014) Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J Plant Pathol* 96, 1-136.

- Matousek J, Orctova L, Patzak J, et al. (2003) Molecular sampling of *Hop stunt viroid* (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil Envir* 49, 168-175.
- Matsushita Y, Usugi T, Tsuda S (2009) Host range and properties of *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur J Plant Pathol* 124, 349-352.
- Moradi R, Koolivand D, Gandomani OE, Hajizadeh M (2018) Identification of some important viroids in vineyards from Zanjan. *Proc. 23th Iran Plant Protection Cong*, Gorgan, Iran pp. 625.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* 9, 1-8.
- Ohno T, Takamatsu N, Meshi T, Okada Y (1983) *Hop stunt viroid*: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res* 11, 6185-6187.
- Ohshima K, Sako T, Uyeda I, Shikata E (1988) Comparative studies on host range and the infectivity of hop stunt viroid-cucumber isolate (cucumber pale fruit viroid) native RNA and its cDNA. *Arch Phytopathol Plant Pro* 24, 475-484.
- Owens RA, Flores R, Di Serio F, et al. (2012) Viroids. In: *Virus Taxonomy -Ninth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds). AP is an imprint of Elsevier pp. 1221-1234.
- Owens RA, Hammond RW (2009) Viroid pathogenicity: one process, many faces. *Viruses* 1, 298-316.
- Polivka H, Staub U, Gross HJ (1996) Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel *Grapevine yellow speckle viroid 1* mutants show alterations in hairpin I. *J Gen Virol* 77, 155-161.
- Radisek S, Majer A, Jakse A, et al. (2012) First report of hop stunt viroid infecting hop in Slovenia. *Plant Dis* 96, 592.
- Reanwarakorn K, Semancik JS (1999) Correlation of *Hop stunt viroid* variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathol* 89, 568-574.
- Rezaian MA, Koltunow AM, Krake LR (1988) Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *J Gen Virol* 69, 413-422.
- Roistacher CN (1996) Indexing for viruses in citrus. Pages 301-319 in: *Plant virus disease control*. A Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H (Eds). APS Press: St Paul MN pp. 301-319.
- Salami S, Moradi R, Hajizadeh M, Koolivand D (2022) Detection and phylogenetic analysis of four important viroids from vineyards in Zanjan province. *J Appl Res Plant Prot* 10(4): 71-80.

- Sano T (2003) *Hop stunt viroid*. In: Viroids. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia pp. 207-212.
- Sano T, Candresse T, Hammond RW, et al. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Nat Acad Sci USA* 89, 10104-10108.
- Sano T, Hataya T, Shikata E (1988) Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Res* 16, 347.
- Sano T, Hataya T, Terai Y, Shikata E (1989) *Hop stunt viroid* strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J Gen Virol* 70, 1311-1319.
- Sano T, Mimura R, Ohshima K (2001) Phylogenetic Analysis of Hop and Grapevine Isolates of *Hop stunt viroid* supports a Grapevine Origin for Hop Stunt Disease. *Virus Genes* 22, 53-59.
- Sano T, Oshima K, Hataya T, et al. (1985) A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J Gen Virol* 66, 333-338.
- Sano T, Ohshima K, Hataya T, et al (1986) A viroid resembling *Hop stunt viroid* in grapevines from Europe, the United States and Japan. *J Gen Virol* 67, 1673-1678.
- Sano T, Uyeda I, Shikata E, et al. (1984) Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: homology to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Res* 12, 3427-3434.
- Sasaki M, Shikata E (1977) On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc Japan Acad* 53B, 109112.
- Semancik JS, Roistacher CN, Rivera-Bustamante R, Duran-Vila N (1988) *Citrus cachexia viroid*, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J Gen Virol* 69, 3059-3068.
- Serra P, Gago S, Duran-Vila N (2008) A single nucleotide change in *Hop stunt viroid* modulates citrus cacheixa symptoms. *Virus Res* 138, 130-134.
- Sharifi M, Massumi H, Heydarnejad J, et al. (2008) Analysis of biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. *Virus Genes* 37, 304-313.
- Shikata E (1990) New viroids from Japan. *Semin Virol* 1, 107-115.
- Singh RP, Ready KFM (2003) Biological indexing. In: Viroids. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (Eds) CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. pp 89-94.
- Singh R, Ready KFM, Hadidi A (2003) Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. In: Viroids. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia pp. 255-264.
- Staub U, Polivka H, Herrmann JV, Gross HJ (1995) Transmission of grapevine viroids is not likely to occur mechanically by regular pruning. *Vitis* 34, 119-123.

- Taylor RH, Woodham RC (1972) Grapevine yellow speckle a newly recognized graft-transmissible disease of Vitis. Aust J Agric Res 23, 447-452.
- Van Dorst HJM, Peters D (1974) Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. Neth J Plant Pathol 80, 85-96.
- Walia Y, Dhir S, Ram R, et al. (2014) Identification of the herbaceous host range of *Apple scar skin viroid* and analysis of its progeny variants. Plant Pathol 63, 684-690.
- Wassenegger M, Spieker RL, Thalmeir S, et al. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. Virology 226(2), 191-197.
- Yakoubi S, Elleuch A, Besaies N, et al. (2007) First report of hop stunt viroid and citrus exocortis viroid on fig with symptoms of fig mosaic disease. J Phytopathol 155, 125-128.
- Zaki-aghl M, Izadpanah K (2004) Identification and Transmission of Grapevine Yellow Speckle Disease in Iran. Proc. 16th Iran Plant Protection Cong, Tabriz, Iran pp. 359.
- Zaki-aghl M, Izadpanah K (2006) Sequencing and genome analysis of Iranian isolate of *grapevine yellow speckle viroid 1*. Proc. 17th Iran. Plant Protection. Cong., Karaj, Iran, pp. 358.
- Zaki-aghl M, Izadpanah K (2010) Identification and partial molecular characterization of grapevine viroids in Fars Province. Iran. J Plant Pathol 46(3), 249-262.
- Zhang BL, Liu GY, Liu CQ, et al. (2009) Characterization of Hop stunt viroid (HSVd) isolates from jujube trees (*Ziziphus jujuba*). Eur J Plant Pathol 125, 665-669.
- Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J Virol Methods 71, 45-50.
- Zhang Z, Shuishui-Qi S, Tang N, et al. (2014) Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. PLoS Pathog 10, e1004553.
- Zhang Z, Zhou Y, Guo R, et al. (2012) Molecular characterization of Chinese hop stunt viroid isolates reveals a new phylogenetic group and possible cross transmission between grapevine and stone fruits. Eur J Plant Pathol 134, 217-225.
- Zhou Y, Guo R, Cheng Z, et al. (2006) First report of hop stunt viroid from *Prunus persica* with dapple fruit symptoms in China. Plant Pathol 55, 564.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 31, 3406-3415.