

واریانت های جدید ویروئید شماره سه مرکبات استان فارس

سید علی اکبر باقریان^{1*}، کرامت اله ایزدپناه²

¹ عضو هیئت علمی دانشگاه جهرم و دانشجوی دکترای دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

² مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: 1389/11/23، تاریخ پذیرش: 1390/11/20

چکیده

ویروئید شماره سه مرکبات (Citrus viroid-III= CVd-III) دامنه میزبانی محدودی داشته و علائم اختصاصی در بالنگ اتراک ایجاد می کند که شامل ایجاد چین و چروک در دمبرگ، قهوه ای شدن و خمیدگی برگ، پژمردگی و کجی برگ به خاطر نکرور نقطه ای رگبرگ میانی می باشد. ویروئید شماره سه مرکبات باعث کاهش معنی دار قطر تنه درختان پیوندی والنسیا و پایه نارنج سه برگچه ای و حجم سایه انداز درختان آلوده می گردد. در این مطالعه، تعدادی نمونه بدون علائم مشخص از باغ های مرکبات استان فارس از نظر وجود ویروئید، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج آر. ان. ای. از گیاه، به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز با نسخه برداری معکوس، همسانه سازی و تعیین توالی ژنوم کامل، ویروئیدهای موجود در نمونه های آلوده بررسی گردیدند. در ادامه از نظر مولکولی (ترکیب نوکلئوتیدی، ساختمان اولیه و ثانویه، وزن مولکولی، روابط فیلوژنتیکی و درصد تشابه نوکلئوتیدی)، مقایسه ای بین واریانت های موجود انجام گرفت. در این مطالعه سه واریانت جدید CVd-III (واریانت های شماره 1، 2 و 3) از باغ های مرکبات استان فارس ردیابی گردید. از نظر ترادف نوکلئوتیدی، تشابه CVd-III-2 و CVd-III-3 بسیار زیاد (99%) است ولی این دو واریانت فقط 93% با CVd-III-1 شباهت دارند. گروه بندی فیلوژنتیکی نیز نشان داد که CVd-III-2 و CVd-III-3 به همراه CVd-III-11 (گزارش شده از فلسطین اشغالی) و CVd-III-12 (گزارش شده از ایالات متحده آمریکا) در یک گروه و CVd-III-1 به همراه CVd-III-a در گروه دیگری قرار می گیرند که امر تفاوت در منشأ تکامل واریانت های موجود در استان فارس را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: ویروئیدهای مرکبات، CVd-III، فیلوژنی.

باغ های مرکبات کالیفرنیا و اسپانیا دیده نشده اند (Diener 1972).

با استفاده از آزمون RT-PCR و تعیین ترادف باندهای تکثیر شده، Alavi et al. (2005) وجود ویروئید شماره سه مرکبات را در درختان مرکبات مازندران به اثبات رساندند. در این مطالعه سه واریانت جدید CVd-III از درختان مرکبات بدون علائم استان فارس جدا گردیده و با جدایه های دیگر این ویروئید مقایسه شده اند.

مواد و روش ها

در تابستان سال 1387 از مناطق مختلف مرکبات کاری شهرستان جهرم بازدید صورت گرفت و از 5 درخت لیموشیرین و 5 درخت پرتقال این شهر نمونه برداری انجام شد. نمونه ها بدون علائم مشخص بودند. مقداری شاخه و برگ جوان از هر درخت جدا و پس از انجماد در ازلت مایع، جهت انجام آزمایش های بعدی در دمای 70- درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج RNA از بافت گیاهی به روش Yang et al. (1992)، به صورتی که Alavi et al. (2005) انجام داده اند با تغییرات اندکی صورت گرفت. کلیه مراحل استخراج RNA در شرایط استریل انجام شد و تمامی محلول های مورد استفاده با آب استریل تیمار شده با DEPC تهیه شدند. پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده، در واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم 25 میکرو لیتری واکنش، مورد استفاده قرار گرفت.

ویروئیدها کوچکترین بیمارگرهای گیاهی و متشکل از مولکول های RNA تک رشته حلقوی، به طول 246 تا 401 نوکلئوتید، با ساختمان های ثانویه متعدد و فاقد پوشش پروتئینی هستند (Gora-Sochacka 2004;) (Tabler and Tsagris 2004). تا کنون شش ویروئید شامل Citrus exocortis viroid، Citrus Hop (Citrus viroid I=) bent leaf viroid، Citrus (Citrus viroid II=) stunt viroid و Citrus viroid III (CVd-III=) viroid IV، Citrus viroid V از مرکبات گزارش شده اند که همگی به خانواده Pospiviroidae تعلق دارند و در 4 جنس شامل *Apocaviroid*، *Pospiviroid*، *Hostuviroid* و *Cocaviroid* قرار می گیرند (Elleuch et al. 2006).

CVd-III یکی از اعضای جنس *Apocaviroid* است و دامنه ی میزبانی بسیار محدودی داشته و علائم بسیار اختصاصی در بالنگ اتراک ایجاد می کند که شامل ایجاد چین و چروک در دمبرگ، قهوه ای شدن و خمیدگی برگ، پژمردگی و کجی برگ به خاطر نکروز نقطه ای رگبرگ میانی می باشد. علائم ایجاد حلقه در طوقه که در ابتدا به عنوان CVd-III در درختان پیوند زده شده بر روی پایه ی نارنج سه برگچه ای توصیف شده بودند (Roistacher et al. 1993)، پایدار نبوده و ممکن است ناشی از انقباض طوقه در زمان تکثیر و یا رشد درخت جوان باشد. علائم مشابه این هرگز در درختان

واکنش ترانوئسی معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

این دو واکنش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی ویروئید شماره سه مرکبات (Bernad & Duran-Vila 2006) شامل آغازگر معکوس (5'-TTCGTCGACGACGACAGGTA-3' و آغازگر مستقیم (5'-GGCAGCTAAGTTGGTGACGC-3' که قطعه ای در حدود 300 جفت نوکلئوتید را تکثیر می کنند، انجام شد. عمل ترانوئسی معکوس در حجم 20 میکرو لیتری شامل 4 میکرو لیتر قالب RNA استخراج شده ویروئید، آغازگر معکوس به غلظت 1 میکرو مولار، یک میلی مولار از هر یک از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات، 10 میلی مولار dithiothreitol، 4/5 میکرو لیتر بافر اختصاصی MMuLV (5 x) و یک میکرو لیتر آنزیم MMuLV-Reverse transcriptase (U/μl) انجام گرفت. برای این منظور ابتدا مخلوط RNA و آغازگر معکوس به مدت 10 دقیقه در 70 درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler 5330 شرکت اپندورف آلمان) با دمای درپوش 105 درجه سلسیوس قرارداده شد تا RNA واسرشته گردد و سپس به سرعت به مدت سه دقیقه داخل یخ آب قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن به مدت چند ثانیه، بقیه مواد به میکروتیوب اضافه شد. مخلوط به آرامی دو تا سه بار پیپت شد و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت چند ثانیه، در دستگاه ترموسایکلر

Thermocycler 5330 شرکت اپندورف آلمان) با دمای درپوش 105 درجه سلسیوس قرارداده شد تا RNA واسرشته گردد و سپس به سرعت به مدت سه دقیقه داخل یخ آب قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن به مدت چند ثانیه، بقیه مواد به میکروتیوب اضافه شد. مخلوط به آرامی دو تا سه بار پیپت شد و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت چند ثانیه، در دستگاه ترموسایکلر

سیکل دمائی واکنش زنجیره ای پلیمرز عبارت از یک برنامه یک چرخه ای شامل دمای 94 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و یک برنامه 35 چرخه ای شامل دمای 94 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، 60 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و 72 درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سلسیوس نگهداری شد.

محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز 1 درصد در بافر TBE (10/8 گرم

آنتی بیوتیک آمپی سیلین، 20 µg/ml ماده IPTG و 20 µg/ml ماده X-gal، کلنی های سفید که قاعدتاً باید حاوی پلاسمید نوترکیب باشند، برداشته و هر کدام جداگانه در 2-5 میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی 100 µg/ml آمپی سیلین کشت و به مدت یک شب در 37°C در shaker incubator نگهداری شدند. برای استخراج دی ان اِ پلاسمید های نوترکیب از سلول های باکتری از روش جوشاندن (Holmes & Quigley 1981) استفاده شد. جهت تأیید قطعات وارد شده به پلاسمید مقدار یک میکرولیتر از دی ان اِ پلاسمید نوترکیب استخراج شده، به مخلوط واکنش PCR، طبق شرایط گفته شده، اضافه و پس از انجام PCR نتایج حاصله با الکتروفورز بررسی شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی

پس از تأیید صحت قطعه همسانه سازی شده، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و مجدداً کشت داده شد و پلاسمید آن با استفاده از High Pure Plasmid Isolation Kit (Fermentas) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و با روش هضم آنزیمی مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی موارد پس از غربال کردن به ازای هر محصول دو همسانه حاوی قطعات مورد نظر به منظور تعیین ترادف با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی و پروئید شماره سه مرکبات (Bernad & Duran-Vila 2006)، به شرکت Macrogen کشور کره جنوبی ارسال و از دو جهت تعیین ترادف شدند.

تریس، 5/5 گرم بوریک اسید و 0/73 EDTA در 1000 میلی لیتر آب مقطر، (pH=8/3) مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، با دستگاه UV transilluminator باندهای نوکلئیک اسید مشاهده و به وسیله دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری شد.

همسانه سازی (Cloning)

محصول PCR با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد. محصول خالص سازی شده واکنش PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas) در داخل ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T قرار داده شد. بدین منظور مخلوط پلاسمید و محصول PCR شامل 3 میکرولیتر ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T، 4 میکرولیتر محصول PCR، 3 میکرولیتر 10x Ligation buffer، 1 میکرولیتر PEG 4000 solution (50 w/v)، 1 میکرولیتر T4 DNA ligase (5 U/µl) و 16 میکرولیتر آب مقطر استریل برای وارد کردن cDNA به پلاسمید ناقل بمدت یک شب در دمای 22 درجه سلسیوس قرار داده شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* با استفاده از کیت Ins T/A Clone PCR Product (Fermentas) Cloning Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید. پس از یک شب کشت در محیط LB جامد حاوی 100 µg/ml

لیموشیرین جهرم شد. قطعات حاصل با موفقیت همسانه سازی و از دو جهت تعیین ترادف شدند. این نتایج نشان داد که ترادف نوکلئوتیدی در محل آغازگرها در همسانه های تعیین ترادف شده با آغازگرهای مورد استفاده یکسان است. با مقایسه ترادف حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLAST نزدیک بودن آنها با واریانت های مختلف ویروئید شماره سه مرکبات به اثبات رسید. در بقیه درختان مورد بررسی هیچ گونه بانندی از ویروئید شماره سه مرکبات ردیابی نگردید.

اندازه قطعات تکثیر شده در مورد سه نمونه از نمونه های پرتقال جهرم 293 نوکلئوتید و در مورد یک نمونه از نمونه های لیموشیرین جهرم 297 نوکلئوتید تعیین شدند و در بانک ژن (مراکز اطلاعات EMBL، GenBank و DDBJ) با رس شماره های GQ166529 تا GQ166531 تحت نام های CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3 نهاده شدند. ساختار اولیه و مقایسه همردیف سازی چند گانه ترادف نوکلئوتیدی CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3 با دیگر جدایه های CVd-III (جدول 1) در شکل 2 و مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی و مقایسه تعداد و نوع نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3 در جدول 2 نشان داده شده است.

ترادف های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف های موجود در GenBank مقایسه شدند.

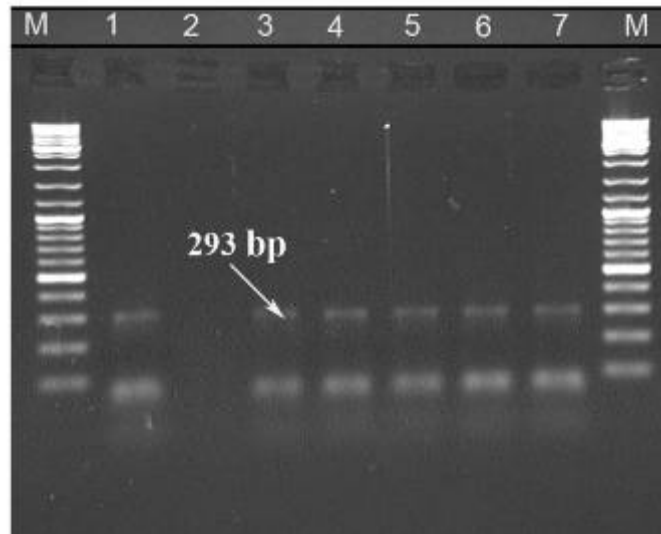
آنالیز ترادف های نوکلئوتیدی

مقایسه همردیف سازی چند گانه ترادف نوکلئوتیدی و محاسبه میزان اختلافات ژنتیکی بین جدایه های CVd-III از ایران و سایر نقاط دنیا (جدول 1) با استفاده از برنامه Vector NTI (InforMax, Bethesda, MD) 9 انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار DNAMAN (version 4.0.1.1) به انجام رسید. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) و بر اساس 10000 تکرار، رسم گردید.

مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی و رسم ساختار ثانویه جدایه های مورد بحث به ترتیب به وسیله نرم افزارهای BioEdit (version 5.0.9) و RNAstructure (version 4.6) به انجام رسید.

نتایج و بحث

انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز با ترانویسی معکوس با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی ویروئید شماره سه مرکبات منجر به تکثیر قطعه ای به اندازه حدود 293 جفت نوکلئوتید در سه درخت پرتقال جهرم (شکل 1) راهک های 1 و 3 تا 7، تکرار هر نمونه) و قطعه ای دیگر به اندازه حدود 297 در یک درخت



شکل 1- نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیر شده در RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروئید شماره سه مرکبات. درختان پرتقال جهرم (راهک های 3 تا 7). هیچ بانندی در نمونه سالم (راهک 2) مشاهده نشد. M= مارکر.

Figure 1- Electrophoresis pattern of DNA fragments amplified in RT-PCR with a specific CVd-III primer pair. 3-7 sweet orange trees from Jahrom; No band was observed in healthy control sample (lane 2). M= marker.

همراه CVd-III-a در گروه دیگری قرار می‌گیرند (شکل 4).

CVd-III-11 از فلسطین اشغالی و CVd-III-12 از ایالات متحده آمریکا گزارش شده است. بیشترین نقاط تغییر موجود در بین ویروئیدهای گروه 3 در ناحیه حفاظت شده مرکزی و ناحیه متغیر قرار گرفته است و اثر این تغییرات بر علائم تولیدی در گیاهان محک به خوبی مشخص نشده است (Owens *et al.* 2000).

از نظر ترکیب نوکلئوتیدی، تشابه CVd-III-2 و CVd-III-3 بسیار زیاد (99%) است، ولی این دو واریانت فقط 93% با CVd-III-1 شباهت دارند (شکل 2 و جدول 3). از سوی دیگر CVd-III-2 و CVd-III-3 تعداد 4 نوکلئوتید کمتر از CVd-III-1 دارند (جدول 2). در گروه بندی فیلوژنتیکی نیز نشان داده شده است که CVd-III-2 و CVd-III-3 به همراه CVd-III-11 و CVd-III-12 در یک گروه و CVd-III-1 به

جدول 1- مشخصات جدایه های ویروئید شماره سه مرکبات مورد استفاده در این مطالعه.

Table 1- Characteristics of CVd-III isolates used in this study.

Isolate جدایه	.Accession no رس شمار	Host میزبان	Origin منشاء	Number of nucleotides تعداد نوکلئوتید
CVd-III-1	GQ166531	لیموشیرین Sweet lime	فارس (جهرم) Fars (Jahrom)	297
CVd-III-2	GQ166529	پرتقال sweet orange	فارس (جهرم) Fars (Jahrom)	293
CVd-III-3	GQ166530	پرتقال sweet orange	فارس (جهرم) Fars (Jahrom)	293
CVd-III-4	EU382205	مرکبات: Citrus	چین: China	298
CVd-IIIa-5	S75465	مرکبات: Citrus	استرالیا: Australia	294
CVd-III-6	AF416374	مرکبات: Citrus	اروگوئه: Uruguay	294
CVd-III-7	AF123865	مرکبات: Citrus	آمریکا: USA	294
Citrus dwarfing viroid-8	AJ630356	مرکبات: Citrus	کوبا: Cuba	294
CVd-III-9	AB054619	مرکبات: Citrus	ژاپن: Japan	294
CVd-III-10	AB054627	مرکبات: Citrus	ژاپن: Japan	294
CVd-III-11	AF123873	مرکبات: Citrus	فلسطین اشغالی Occupied Palestine	293
Citrus dwarfing viroid-12	NC_003264	مرکبات: Citrus	آمریکا: USA	292
CVd-III-13	EU549774	لیموی تاهیتی Tahiti lime	اسپانیا Spain	293
CVd-III-14	AF447784	مرکبات: Citrus	آمریکا: USA	292
Citrus dwarfing viroid-15	FJ773282	مرکبات: Citrus	پاکستان: Pakistan	294
Citrus dwarfing viroid-16	EU938652	مرکبات: Citrus	ایتالیا: Italy	294
CVd-IIIa	S76452	مرکبات Citrus	آمریکا: USA	297
CVd-III b	AF184147	مرکبات Citrus	آمریکا: USA	294
CVd-IIIc	AF184149	مرکبات Citrus	آمریکا: USA	291
CEVd-1 (out group)	FJ626865	لیموشیرین Sweet lime	فارس (جهرم) Fars (Jahrom)	370

جدول 2- مقایسه ترکیب نوکلئوتیدی، تعداد و نوع نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده و تخمین وزن مولکولی RNA CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3 به وسیله نرم افزار BioEdit (version 5.0.9).

Table 2- Comparison of nucleotide composition, number and type of nucleotides and molecular weights of CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3 using BioEdit (version 5.0.9) program.

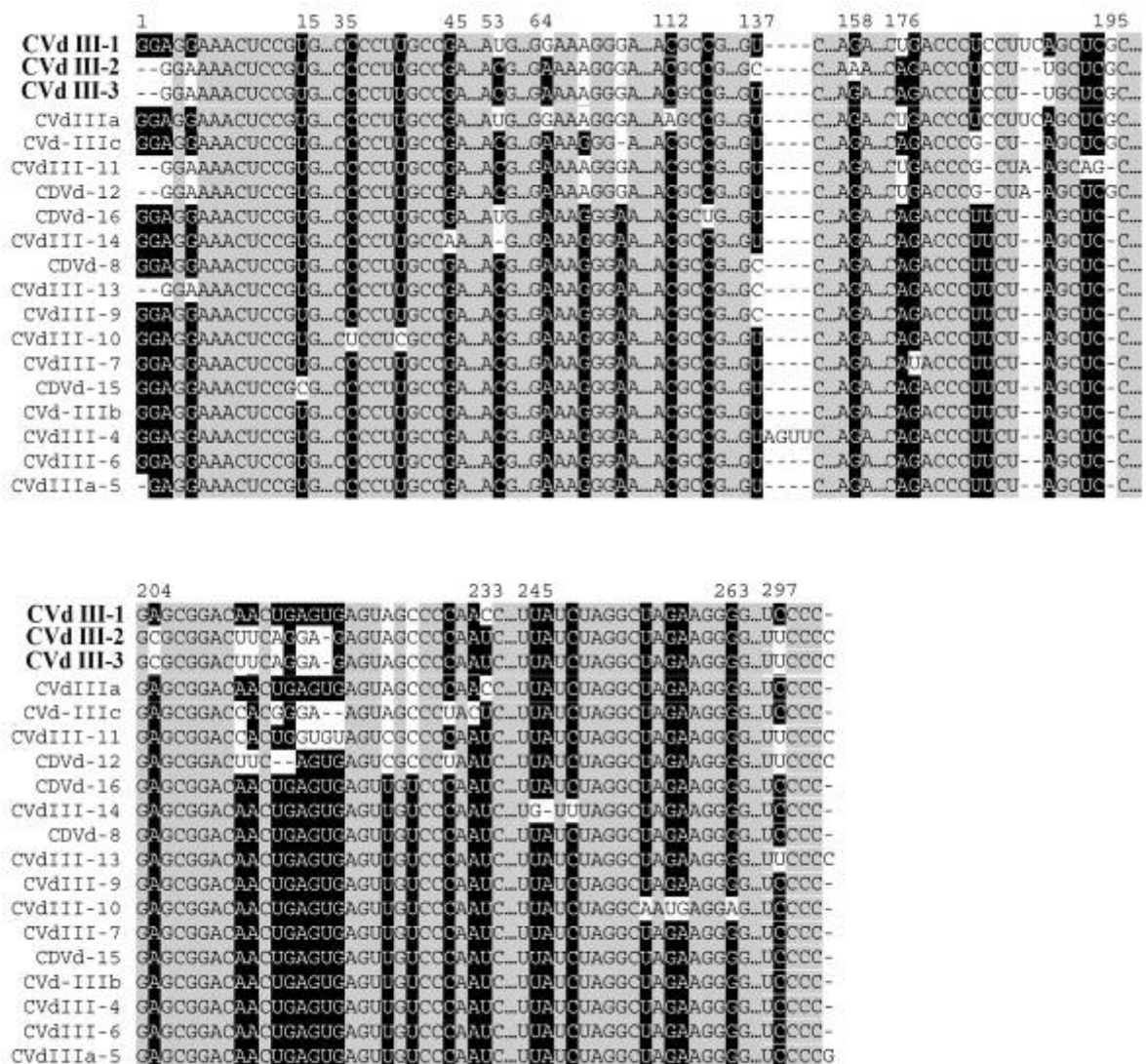
Viroid ویروئید	Number of nucleotides and proportion تعداد هر نوکلئوتید و سهم هر یک								Ratio نسبت		Ratio نسبت		Molecular Weight estimation تخمین وزن مولکولی	
	A		U		C		G		A+U	G+C	A/U	G/C	Single stranded	Double stranded
	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%	%	%	%	%	Daltons	Daltons
CVd-III-1	71	23.91	61	20.54	77	25.93	88	29.63	44.44	55.56	1.16	1.14	95210	190161
CVd-III-2	71	24.23	60	20.48	78	26.62	84	28.67	44.71	55.29	1.18	1.08	94033	187591
CVd-III-3	70	23.89	61	20.82	77	26.82	85	29.01	44.71	55.29	1.15	1.08	93970	187583

جدیدی از ویروئید شماره سه مرکبات ضروری است.

در پژوهشی Owens *et al.* (2000) نشان دادند که برخی واریانت های ویروئید شماره سه مرکبات بی آنکه علائم خاصی در درختان آلوده ایجاد کنند باعث کاهش سرعت رشد آنها می شوند. با توجه به اهمیت این ویروئید به عنوان عامل کاهنده رشد درختان مرکبات بدون ایجاد علائم مشهود، انجام بررسی های مرتبط با این عامل بیماری زا به ویژه در مرکبات جنوب کشور از طریق ساخت سازمان های عفونت زای آنها و انجام آزمایشات بیماری زائی و مشاهده علائم و انجام اقدامات پیشگیرانه جهت جلوگیری از خروج و انتقال بیمارگر از نواحی آلوده به وسیله پیوندک و یا انتقال مکانیکی، ضروری می باشد.

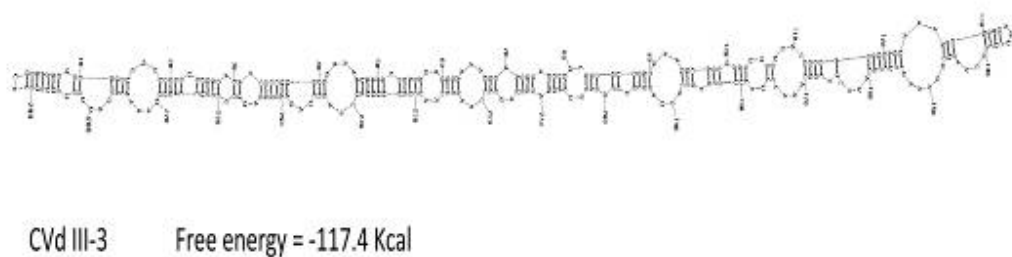
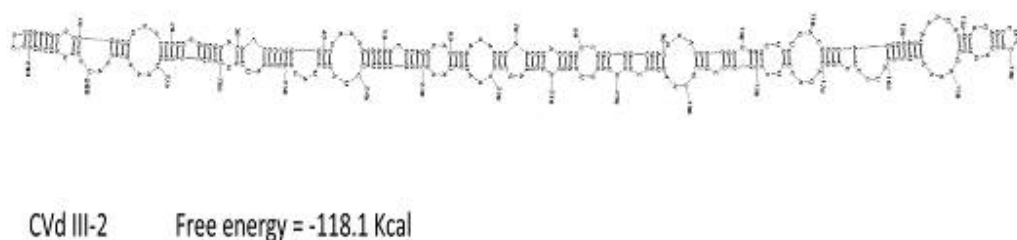
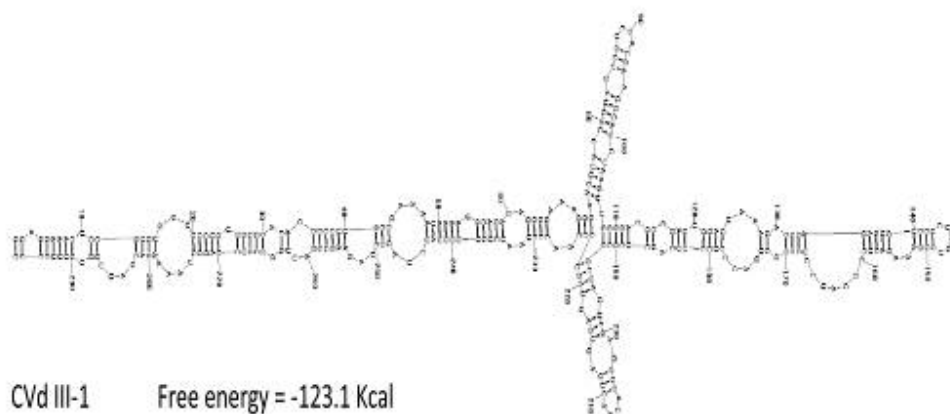
ساختار ثانویه ی CVd-III-2 و CVd-III-3 مانند همه واریانت های تیره ی *Pospiviroidae* میله ای شکل، حلقوی و دارای ساختارهای حلقه ای کوچک فراوان، می باشد. ساختار ثانویه ی CVd-III-1، وجود تفاوت در میزان پایداری و وجود و تعداد شاخه های جانبی ساختار ثانویه ی آن دو را با دیگر واریانت ها مشخص نمود (شکل 3). اختلاف زیاد در ترادف نوکلئوتیدی (شکل 3 و جدول 3)، ترکیب نوکلئوتیدی (جدول 2) و گروه بندی فیلوژنتیکی (شکل 4) این واریانت با CVd-III-2 و CVd-III-3، مؤید این اختلافات می باشد.

هر چند که تفاوت موجود بین جدایه های CVd-III استان فارس زیاد نمی باشد ولی با توجه تأثیر بسیار زیاد تغییر در حتی یک نوکلئوتید در ویروئیدها (Serra *et al.* 2008) معرفی این جدایه ها به عنوان واریانت های



شکل 2- ساختار اولیه و مقایسه همدیف سازی چند گانه ترادف نوکلئوتیدی جدایه های مختلف ویروئید شماره سه مرکبات از منابع مختلف. رس شمار هر جدایه قبلاً در جدول 1 نشان داده شده است. نوکلئوتید: ترادف حفاظت شده ، نوکلئوتید: ترادف یکسان، -عدم وجود نوکلئوتید.

Figure 2- Primary structures of CVd-III variants from various sources. Sequences are aligned for maximum homology. **Nucleotides**: Conserved sequences; **Nucleotides**: Identical sequences; -: lack of nucleotide.



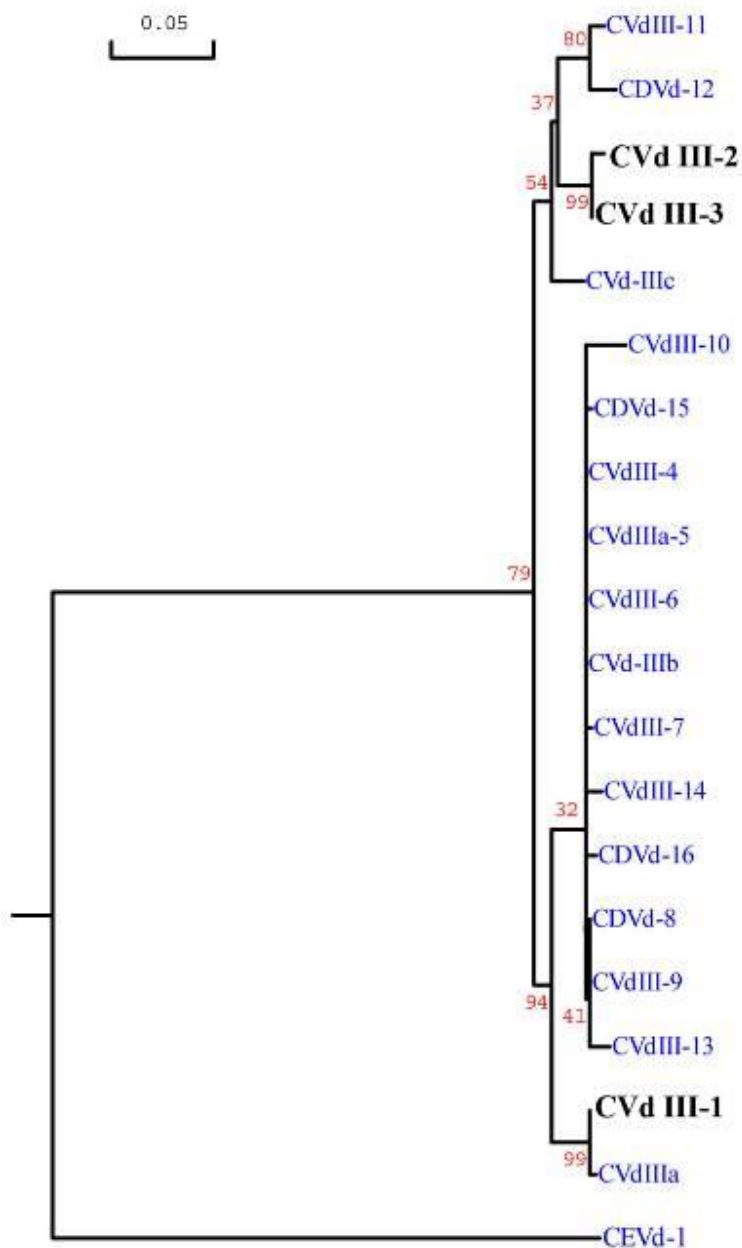
شکل 3- مقایسه ساختار ثانویه CVd-III-1، CVd-III-2 و CVd-III-3.

Figure 3- Comparison of secondary structures of CVd-III-1, CVd-III-2 و CVd-III-3.

جدول 3- درصد تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه های مورد استفاده ویروئید شماره سه مرکبات در این مطالعه.

Table 3- Percent sequence identity between selected CVd-III isolates used in this study.

	CVd-III-1	CVd-IIIa	CVd-III-2	CVd-III-3	CVd-IIIc	CVd-III-11	CDVd-12	CDVd-16	CVd-III-14	CDVd-8	CVd-III-13	CVd-III-9	CVd-III-10	CVd-III-7	CDVd-15	CVd-IIIb	CVd-III-4	CVd-III-6	CVd-IIIa-5	
CVd-III-1	100	100	93	93	94	93	94	96	95	96	94	96	94	96	96	96	95	96	95	
CVd-IIIa		100	92	93	94	92	93	96	94	95	93	95	94	95	95	96	94	96	95	
CVd-III-2			100	99	93	94	95	92	91	93	95	93	91	92	92	93	91	93	93	
CVd-III-3				100	94	95	96	93	92	93	95	93	91	93	93	93	92	93	94	
CVd-IIIc					100	93	93	95	94	95	93	95	93	95	95	95	94	95	95	
CVd-III-11						100	96	92	91	93	95	93	91	93	93	93	92	93	93	
CDVd-12							100	93	92	93	95	93	91	93	93	93	92	93	94	
CDVd-16								100	98	99	97	99	97	99	99	99	98	99	99	
CVd-III-14									100	98	96	98	96	98	98	98	97	98	98	
CDVd-8										100	98	100	98	99	99	100	98	100	99	
CVd-III-13											100	98	96	97	97	98	96	98	98	
CVd-III-9												100	98	99	99	100	98	100	99	
CVd-III-10													100	98	98	98	97	98	97	
CVd-III-7														100	99	100	98	100	99	
CDVd-15															100	100	98	100	99	
CVd-IIIb																100	99	100	99	
CVd-III-4																	100	99	98	
CVd-III-6																		100	99	
CVd-IIIa-5																				100



شکل 4- دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی 16 جدایه ویروئید شماره سه مرکبات (جدول 1) با استفاده از روش neighbor-joining و بر اساس 10000 تکرار. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند.

Figure 4- Phylogenetic tree constructed from the alignment of nucleotide sequences of 16 CVd-III isolates using the neighbor-joining method based on 10 000 replicates. The numbers indicate bootstrap percentage. See Table 1 for viroid accession numbers.

منابع

- Alavi M, Hashemi Sohi H, Ahoomanesh A, Rahimian H (2005). Molecular analysis and identification of Citrus exocortis viroid isolates in Mazandaran province. MSc. Thesis, College of Agriculture, Esfahan University. 86 P.
- Alavi SM, Ahoonmanesh A, Rahimian H (2006). Nucleotide sequence of Hop stunt viroid cDNA from Cachexia-infected citrus plants in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 43: 49-64.
- Bernad L, Duran-Vila N (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Molecular and Cellular Probes 20: 105–113.
- Diener TO (1972). Viroids and Viroid Diseases. John-Wiley and Sons. 252 P.
- Elleuch A, Khouaja FD, Hamdi I, Bsais N, Perreault JP, Marrakchi M, Fakhfakh H (2006). Sequence analysis of three citrus viroids infecting a single Tunisian citrus tree (Citrus, reticulata, Clementine). Genetics and Molecular Biology 29: 705-10.
- Gora-Sochacka A (2004). Viroids: Unusual small pathogenic RNAs. Acta Biochimica Polonica 51: 587-607.
- Holmes DS, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical Biochemistry 114: 193-197.
- Owens RA, Yang G, Gundersen-Rindal D, Hammond RW, Candresse T, Bar-Joseph M (2000). Both point mutation and RNA recombination contribute to the sequence diversity of citrus viroid III. Virus Genes 20: 243-251.
- Roistacher CN, Bash JA, Semancik JS (1993). Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* induced by three citrus viroids from three specific groups. In: 12th Conf. IOCV., IOCV, Riverside, p. 173-179.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406–425.
- Serra P, Gago S, Duran-Vila N (2008). A single nucleotide change in Hop stunt viroid modulates citrus cachexia symptoms. Virus Research 138: 130–134.
- Tabler M, Tsagris M (2004). Viroids: Petite RNA pathogens with distinguished talents. Trends in Plant Science 9: 339-348.
- Yang X, Hadidi A, Garnsey SM (1992). Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. Phytopathology 82: 279-285.

Novel Variants of Citrus Viroid-III in Fars Province

Bagherian S.A.A.^{1*}, Izadpanah K.²

¹ Faculty Member of Jahrom University and Ph. D. Student at College of Agriculture, Shiraz University, Fars, Iran.

² College of Agriculture, Shiraz University, Fars, Iran.

Summary

Citrus viroid-III (CVd-III) has narrow host range and induces specific symptoms on Etrog citron consist of petiole wrinkle and browning plus leaf twist, leaf droop and bent leaf induced by point necroses of the mid vein. Citrus Viroid-III causes significant reduction of the trunk cross section in Valencia scion and trifoliolate rootstock, and the canopy volume of infected trees. In this study a number of citrus trees with or without symptoms were sampled and subjected to RNA extraction followed by RT-PCR, cloning and sequencing of PCR products. Molecular properties (nucleotide composition, primary and secondary structures, molecular weights, phylogenetic relationships and percent nucleotide similarity) of viroid variants were compared. Three novel variants of CVd-III (1, 2 and 3) from Fars were selected and used for comparison with a number of other CVd-III sequences from GenBank. CVd-III-2 had 99 % sequence homology to CVd-III-3 but these two variants had only 93% homology with CVd-III-1. It was shown that on the basis of homology, CVd-III isolates from Fars province clustered in different groups.

Keywords: *Citrus viroids, CVd-III, Phylogeny.*

* Corresponding Author: Bagherian S.A.A.

Tel: 09173911625

Email: sabagherian@gmail.com