نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ص. ۲۸۴-۲۷۷

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 277-284

نخستین بررسی ویروئید پوست پینه‌ای سیب در میزبان‌های سیب و گلابی در ایران و تعیین میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی

آرزو یازرلو[۱*]- بهروز جعفرپور[۲]- مینا کوهی حبیبی[۳]- سعید طریقی[۴]- جان دبلیو رندلز[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۳/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۴/۲۷

چکیده

ویروئید پوست پینه‌ای سیب، ASSVd (*Apple scar skin viroid*)، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروئیدی در میان درختان میوه دانه‌دار بوده و می‌تواند خسارات اقتصادی چشم‌گیری ایجاد نماید. علایم این بیماری شامل شکاف خوردگی، بدشکلی و خال‌دار شدن میوه در باغات سیب و گلابی در استان خراسان رضوی مشاهده گردید. نمونه‌برداری از باغات سیب و گلابی صورت گرفته و RNA از برگ‌های درختان با استفاده از روش به دام اندازی سلیکا (Silica capture method) استخراج گردید. ASSVd پس از انجام آزمون RT-PCR در نمونه‌های حاصل از این باغات شناسایی شد. محصول PCR خالص گردیده و با استفاده از ناقل pGEM®-T Easy همسانه‌سازی شده و پلاسمید نوترکیب حاصل توالی یابی شد. پس از انجام آنالیزهای لازم، ۱۲ جدایه جدید این ویروئید از میزبان‌های سیب و گلابی در بانک ژن (NCBI) ثبت گردید. این جدایه‌ها طولی بین ۳۳۴ -۳۲۹ نوکلئوتید داشتند. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از روش neighbor joining نشان داد که جدایه‌های ایرانی از سایر جدایه‌های این ویروئید مشخص بوده و در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. تنوع ژنتیکی از طریق نشان دادن جایگاه‌های جهش جدایه‌های ایرانی بر روی ساختار ثانویه مولکول مرجع ASSVd مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه اولین گزارش از شناسایی و بررسی صفات ویروئید پوست پینه‌ای سیب در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ASSVd، ساختار ثانویه، همسانه‌سازی، آنالیز فیلوژنتیکی

مقدمه

ویروئیدها ریزترین عوامل بیماریزای شناخته شده (۴۰۱ nt-۲۴۶) هستند که تنها در گیاهان یافت شده‌اند. ویروئیدها RNAهای حلقوی، تک رشته‌ای، غیر کد کننده، برهنه و بیماریزایی هستند که برای همانندسازی وابسته به میزبان خود می‌باشند (۴). ویروئید پوست پینه‌ای سیب نخستین بار از ایالت منچوری در چین و بر روی رقم سابیکا گزارش شد (۱۹). اولین بار در سال ۱۹۸۶ این ویروئید به عنوان عامل بیماری معرفی (۱۴) و سپس نام پوست پینه‌ای سیب بر روی آن نهاده شد (۱۲). این ویروئید متعلق به جنس *Apscaviroid* و خانواده *Pospiviroidea* می‌باشد (۷). با استفاده از آنالیز توالی نوکلئوتیدی ویروئید خال‌دار شدن میوه[۶] (۹) و پوست زنگاری گلابی[۷] (۳) ، نشان داده شد که این دو ویروئید واریانت مولکولی ASSVd می‌باشند (۲۵). ASSVd باعث ایجاد علایم شدید بر روی میوه دانه‌داران شامل زخم‌های پوستی، خال‌دار شدن و بد شکلی می‌شود که با توجه به رقم میوه متفاوت است و در اغلب شرایط، این علایم متمرکز در نزدیکی کاسه گل در ته میوه می‌باشند (۱۵). علایم پوست پینه‌ای در هر سال شدیدتر می‌شوند، در حالی‌که خال‌دار شدن تضعیف می‌گردد (۲۴). احتمالاً تمام گونه‌های سیب و گلابی به این ویروئید حساس می‌باشند (۵). ویروئید پوست پینه‌ای سیب در اروپا بسیار نادر است در صورتی‌که در آسیای شرقی بسیار گسترده می‌باشد (۱، ۵). این ویروئید از آمریکا، کانادا، انگلستان، ایتالیا و یونان نیز گزارش شده است (۲، ۱۰، ۱۷ و ۲۳). طول ASSVd بین ۳۲۹ و ۳۳۴ نوکلئوتید در منابع مختلف ذکر گردیده است (۱۲، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۴ و ۲۵). توالی نوکلئوتیدی هر یک از این واریانت‌ها می‌تواند یک ساختار ثانویه میله‌ای مانند که از صفات مشخصه خانواده *Pospiviroidae* می‌باشد را تشکیل دهد (۲۰). حذف، اضافه شدن و تغییرات نوکلئوتیدی در میان واریانت‌های این ویروئید، اغلب در نواحی بیماریزایی و انتهایی

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: arezou.yazarlou@adelaide.edu.au)
۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۵- استاد دانشگاه آدلاید، استرالیا

6- Dapple apple viroid

7- Pear rusty skin viroid

سمت چپ حادث می‌شوند (۱۲، ۲۰، ۲۵). ناقل شناخته شده‌ای برای ASSVd وجود ندارد اما به آسانی توسط پیوند زدن منتقل می‌شود و به طور آزمایشی به‌وسیله تیغه‌های آلوده و با ایجاد شکاف منتقل می‌شود (۱۴). تحقیقات نشان داده که بیماری به صورت طبیعی در میان درختان همسایه پراکنده است. انتقال در درختان همسایه احتمالاً در اثر پیوند ریشه‌ها صورت می‌گیرد (۵). ASSVd در دانه‌های سیب، به ویژه در پوشش بذر شناسایی شده است که نشان دهنده بذر زاد بودن این ویروئید است (۱۰).

سیب و گلابی از محصولات باغی دارای اهمیت اقتصادی در استان خراسان رضوی هستند. با توجه به مشاهده علایم مشابه با علایم این بیماری در باغات سیب و گلابی استان و عدم گزارش مبنی بر وجود این بیماری در کشور، نمونه‌برداری از باغات به منظور شناسایی این ویروئید صورت گرفت. در این مطالعه برای نخستین بار ASSVd از میزبان‌های سیب و گلابی از ایران گزارش و توصیف شده است.

مواد و روش‌ها

منابع گیاهی

نمونه‌برداری از برگ ارقام مختلف سیب و گلابی در شهرستان‌های استان خراسان رضوی صورت گرفت (جدول ۲). شاهد مثبت و منفی از آزمایشگاه دانشگاه آدلاید، استرالیا تأمین گردید.

استخراج اسید نوکلئیک

استخراج اسید نوکلئیک با استفاده از روش تغییر یافته به دام اندازی سلیکا[1] صورت گرفت (۸). مقدار ۰/۱ گرم برگ در یک میلی‌لیتر بافر خرد کننده (۴ M گوانیدین تیوسیانات، ۰/۲ M استات سدیم، pH ۵/۲، EDTA ۲۵ mM ، ۱ M استات پتاسیم، ۲/۵ ٪ PVP-40، ۱٪ بتا–مرکاپتواتانل) خرد گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از ترکیب خالص فوق به میکروتیوب جدید حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر N lauroyl sarcosyl ۱۰٪ انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد همراه با تکان دادن قرار داده شده و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوامیل الکل (۲۴:۱) به میکروتیوب اضافه کرده و پس از مخلوط نمودن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۵۰۰ میکرو لیتر از فاز رویی با ۳۰۰ میکرولیتر سدیم یدید ۶ مولار، ۲۰۰ میکرولیتر اتانل مطلق و ۶۰ میکرولیتر محلول سلیکا مخلوط گردیده و در دمای اتاق به آهستگی به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده شد. پس از سانتریفوژ در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه، رسوب سلیکا دو مرتبه با بافر شستشو (Tris-HCl ۱۰ mM، pH ۷/۵، EDTA ۰/۵ mM، NaCl ۵۰ mM، ۵۰ درصد اتانل) شسته شده و پس از خشک کردن رسوب، ۶۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کرده و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور فاز رویی حاوی اسید نوکلئیک به تیوب جدید منتقل شد.

سنتز cDNA

ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس[2] (Roche Diagnostics, GmbH) و آغازگرهای اختصاصی AS1 و ADAS36 (جدول ۱) انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش RT شامل ۱ میکرولیتر RNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای برگشت (۱۰ µM) و ۱۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ا دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. مرحله بعدی واکنش با اضافه کردن ۴ میکرولیتر بافر 5X، ۰/۵ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT (۴۰u/µl) و قرار دادن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت.

واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی و در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf GmbH انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۱/۵ میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر بافر 10X حاوی ۱/۵ mM Mg^{2+}، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ µM)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم DNA *Taq* پلیمراز (KAPA Biosystems, South Africa, ۴۰u/µl) بوده است. برنامه حرارتی شامل دمای آغازین ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۲ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد ، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. اطلاعات آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

همسانه‌سازی و توالی یابی

تعدادی از محصولات PCR از نواحی و میزبان‌های مختلف انتخاب شده و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل Qiaquick از شرکت کیاژن استخراج گردید. محصول PCR در ناقل pGEM®-T Easy با استفاده از کیت pGEM®-T Easy Vector System II (شرکت Promega) همسانه گردید.

1- Silica capture method

2- Reverse Transcriptase (RT)

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR

آغازگر	توالی	موقعیت	اندازه محصول (bp)	منبع
AS1	CCGGCCTTCGTCGACGACGA	۸۲-۱۰۱	۳۳۰	۱۲
AS3	TGAGAAAGGAGCTGCCAGCAC	۱۲۲-۱۰۲		
AS37	CGGTGAGAAAGGAGCTGCCAG	۱۱۹-۹۹	۳۳۰	۶
ADAS36	GCCTTCGTCGACGACGACAG	۷۹-۹۸		

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج HiYield mini kit (Biotech Corporation, Taiwan) مطابق دستورالعمل صورت پذیرفت. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم *EcoR* I انجام گرفت. پلاسمیدهای نوترکیب در مرکز Australian Genome Research Facility واقع در آدلاید توالی یابی شدند. توالی یابی با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 و در هر دو جهت صورت گرفت.

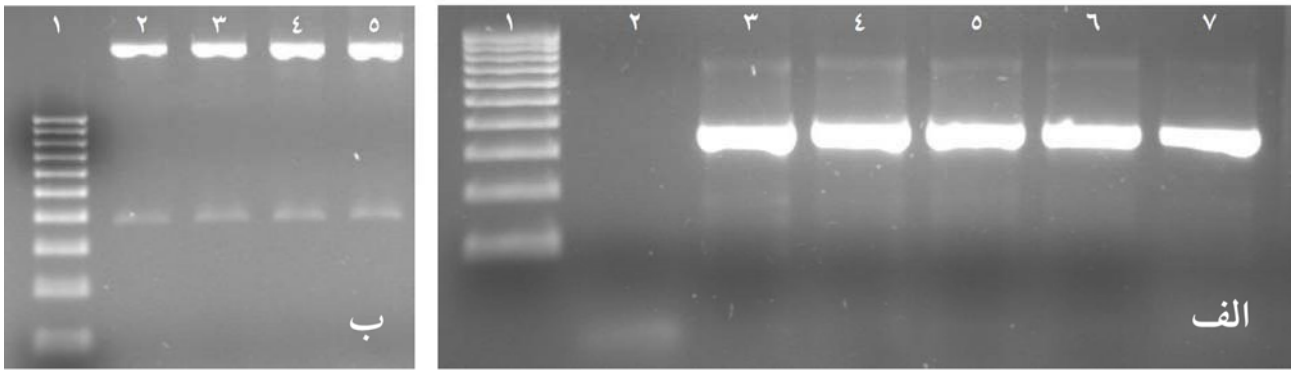
آنالیز توالی‌ها

توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit v7.0 (۱۱) مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌ردیف سازی چندگانه با استفاده از برنامه Clustal W (۱۸) انجام شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA 4.0 (۱۶) و پس از ۱۰۰۰ تکرار و با روش neighbor joining گروه‌بندی شد. ترسیم ساختارهای ثانویه دارای کم‌ترین انرژی آزاد با استفاده از نرم افزار Mfold (۲۶) صورت گرفت و جهش‌ها در طول این ساختار به منظور درک بهتر موقعیت آن‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی، نمایش داده شد.

شماره توالی‌های ثبت شده: دوازده توالی نوکلئوتیدی مربوط به جدایه‌های ایرانی گزارش شده در این مقاله در NCBI با شماره‌های HQ326087-HQ326098 ثبت شده‌اند.

جدول ۲- نواحی و ارقام مختلف نمونه‌برداری شده برای ASSVd

نواحی نمونه‌برداری	ارقام سیب	ردیابی ASSVd	ارقام گلابی	ردیابی ASSVd
درگز	Red delicious	-	Shekari	-
قوچان	Golden delicious	+	Spadana	-
	Abbasi	-	Shekari	-
چناران	Mashhad	+	Spadana	-
	Golab	-	Dargazi	+
	Golden delicious	+		
مشهد	Golab	-	Dargazi	-
	Abbasi	-	Shekari	-
نیشابور	Red delicious	-	Spadana	-
	Golden delicious	-	Shekari	-



شکل۱- الف) نمونه‌های مثبت حدود ۳۳۰ bp ASSVd (چاهک‌های ۷-۳)، چاهک‌های ۱و ۲ به ترتیب: نشانگر bp 100 و شاهد منفی از گیاه سالم ب) دو قطعه حاصل از هضم آنزیمی ۲ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب (بالا پلاسمید، پایین قطعه ویروئیدی وارد شده) با استفاده از *EcoR I* (چاهک ۵-۲)، چاهک ۱: نشانگر bp 100

نتایج

وقوع ASSVd در دو ناحیه از استان خراسان رضوی به اثبات رسید. نواحی نمونه‌برداری شده و هم‌چنین ارقام سیب و گلابی در جدول ۲ درج شده است. قطعه حدود ۳۳۰ bp حاصل از واکنش PCR برای ردیابی ویروئید مربوطه و نتایج هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب در شکل ۱ به ترتیب در دو بخش الف و ب نشان داده شده است.

مشخصات توالی‌ها، ساختار ثانویه

در این مطالعه ۱۲ جدایه جدید از میزبان‌های سیب و گلابی (در شکل ۳ مشخص شده‌اند) با طولی بین ۳۲۹ تا ۳۳۴ نوکلئوتید به دست آمد. این جدایه‌ها دارای ۹۹–۹۱ درصد شباهت با همدیگر و نیز با سایر جدایه‌های گزارش شده ASSVd در بانک ژن بودند. در شکل ۲ توالی‌های ایرانی ASSVd و سایر واریانت‌ها از میزبان‌ها و کشورهای مختلف با یکدیگر مقایسه شده اند. حذفیات، اضافات و تغییرات نوکلئوتیدی در طول مولکول ویروئید قابل مقایسه است (شکل ۲). همان‌گونه که در این شکل مشاهده می‌شود و بر پایه سایر تحقیقات (۱۲، ۲۰، ۲۵)، جهش‌ها در دامنه نوکلئوتیدی ۱ تا ۲۰ و ۷۶ تا ۱۰۷ که نواحی حفاظت شده انتهایی[1] TCR و حفاظت شده مرکزی[2] CCR هستند در مقایسه با نواحی بیماریزایی و انتهایی سمت چپ، بسیار نادر هستند.

در درخت فیلوژنتیک ترسیم شده (شکل ۳)، جدایه‌های ایرانی جدا از سایر جدایه‌ها از میزبان‌ها و کشورهای مختلف قرار گرفته است. مبدا و میزبان‌های این جدایه‌ها در شکل ۳ مشخص است. این درخت با استفاده از روش neighbor joining در برنامه MEGA 4.0 ترسیم شده است. گروه‌بندی پس از ۱۰۰۰ تکرار انجام شده است. شاخه‌هایی با bootstrap کم‌تر از ۵۰ درصد در هم ادغام شده‌اند (condensed version tree). در این درخت جدایه‌های ایرانی در دو گروه عمده جای گرفته‌اند، ۳ واریانت با واریانت X71599 و بقیه به صورت جداگانه در کنار هم قرار گرفته‌اند.

ساختار ثانویه ترسیم شده با برنامه Mfold که دارای کم‌ترین انرژی آزاد است در شکل ۴ به نمایش در آمده است. جهش‌های یافت شده در ۱۲ جدایه ایرانی در طول ساختار ثانویه توالی مرجع ASSVd (X17696)، نشان داده شده است. ناحیه TCR هیچ جهشی را نشان نمی‌دهد و جهش در ناحیه CCR بسیار نادر می‌باشد. چهار جایگاه جهش که شامل یک تبدیل پورین به پریمیدین[3] (A to U)، یک تبدیل پورین به پورین[4] (A to G)، و دو مورد اضافه شدن نوکلئوتیدی باشد در هر ۱۲ جدایه ایرانی اتفاق افتاده است که باعث ایجاد تفاوت چشم‌گیر در این جدایه‌ها نسبت به جدایه‌های دیگر می‌باشد.

هم‌چنین از دو گروه ایجاد شده در درخت فیلوژنتیکی، یک گروه شامل ۹ جدایه است که به طور مشابهی تعدادی جهش در تمام این ۹ جدایه مشترک است (شکل ۴).

بحث

ویروئید پوست پینه‌ای سیب یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروئیدی است که می‌تواند باعث خسارات اقتصادی چشمگیری در میوه‌های دانه‌دار گردد. این مطالعه وقوع این ویروئید در ایران را برای نخستین بار به اثبات رسانید. با توجه به این‌که این ویروئید قبل از این از ایران گزارش نشده است، اعمال مقررات قرنطینه‌ای به منظور جلوگیری از گسترش بیماری ضروری است. بررسی و نمونه‌برداری از سایر استان‌های ایران به منظور شناسایی این ویروئید نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. با توجه به اقلیم‌های متفاوت در ایران در صورت یافت شدن این ویروئید در سایر مناطق کشور، مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها به منظور درک بهتر تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های ایرانی باید مد نظر قرار گیرد.

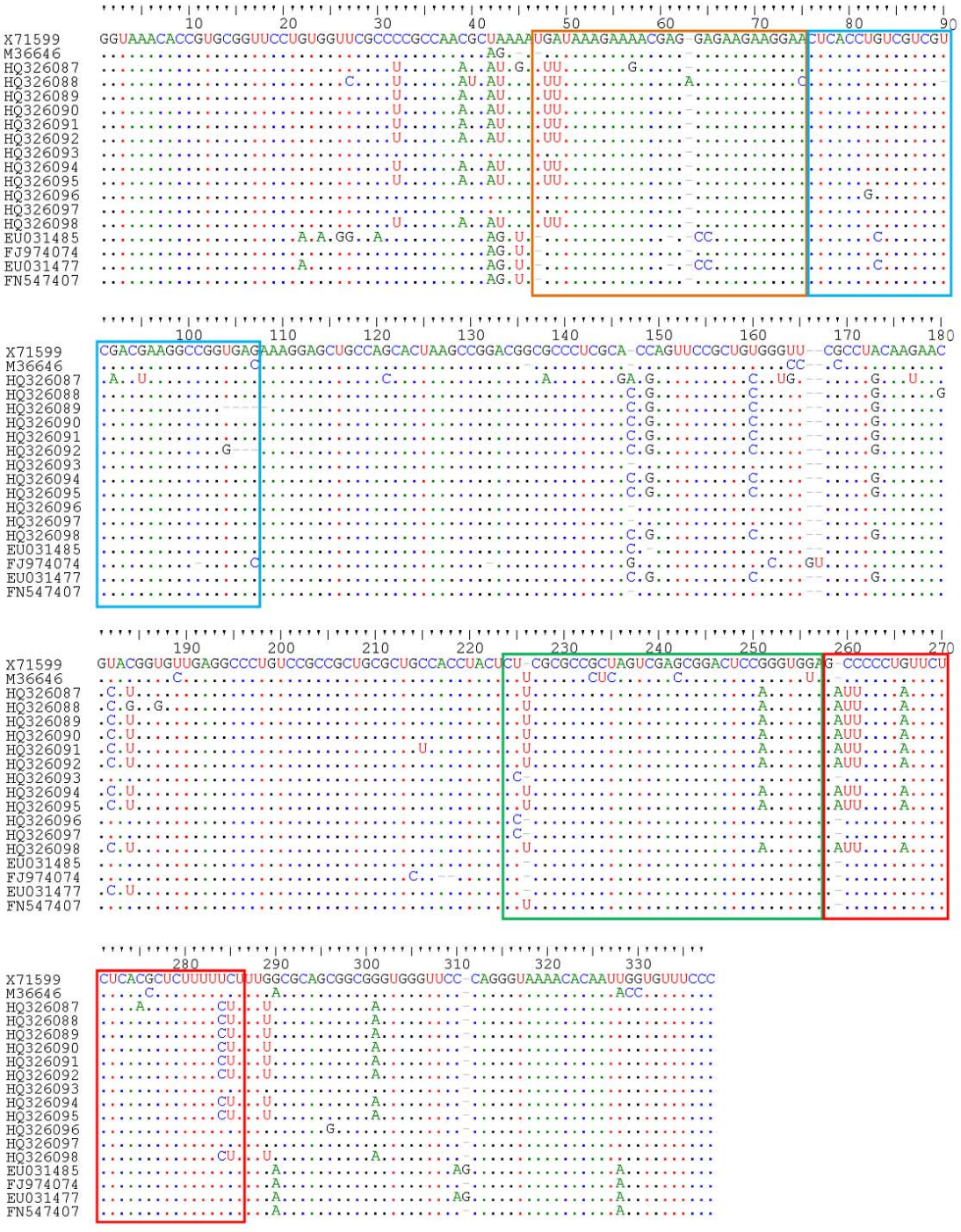
بررسی توالی‌های به دست آمده نشان داد که اکثر جهش‌ها در ناحیه بیماریزایی و ناحیه انتهایی سمت چپ گسترش دارند که این مطلب دستاوردهای سایر تحقیقات مبنی بر وجود تنوع در این نواحی را تایید می‌کند (۱۲، ۲۰، ۲۵). طبق مطالعات انجام شده این نواحی مسئول در تنوع بیماریزایی ویروئید می‌باشند (۲۱).

مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ایرانی در گروه جداگانه‌ای نسبت به جدایه‌های حاصل از میزبان‌ها و کشورهای مختلف قرار می‌گیرند. این گروه‌بندی احتمالاً نشان دهنده اهمیت ارتباطات جغرافیایی در مقایسه با نوع میزبان جدایه‌ها می‌باشد. این نتیجه در مورد جدایه‌های کشور چین نیز صادق است به‌طوری‌که جدایه‌هایی از میزبان‌های مختلف از این کشور در کنار یکدیگر قرار گرفته اند. مکان جغرافیایی ممکن است در تغییرات ژنتیکی نقش داشته باشد.

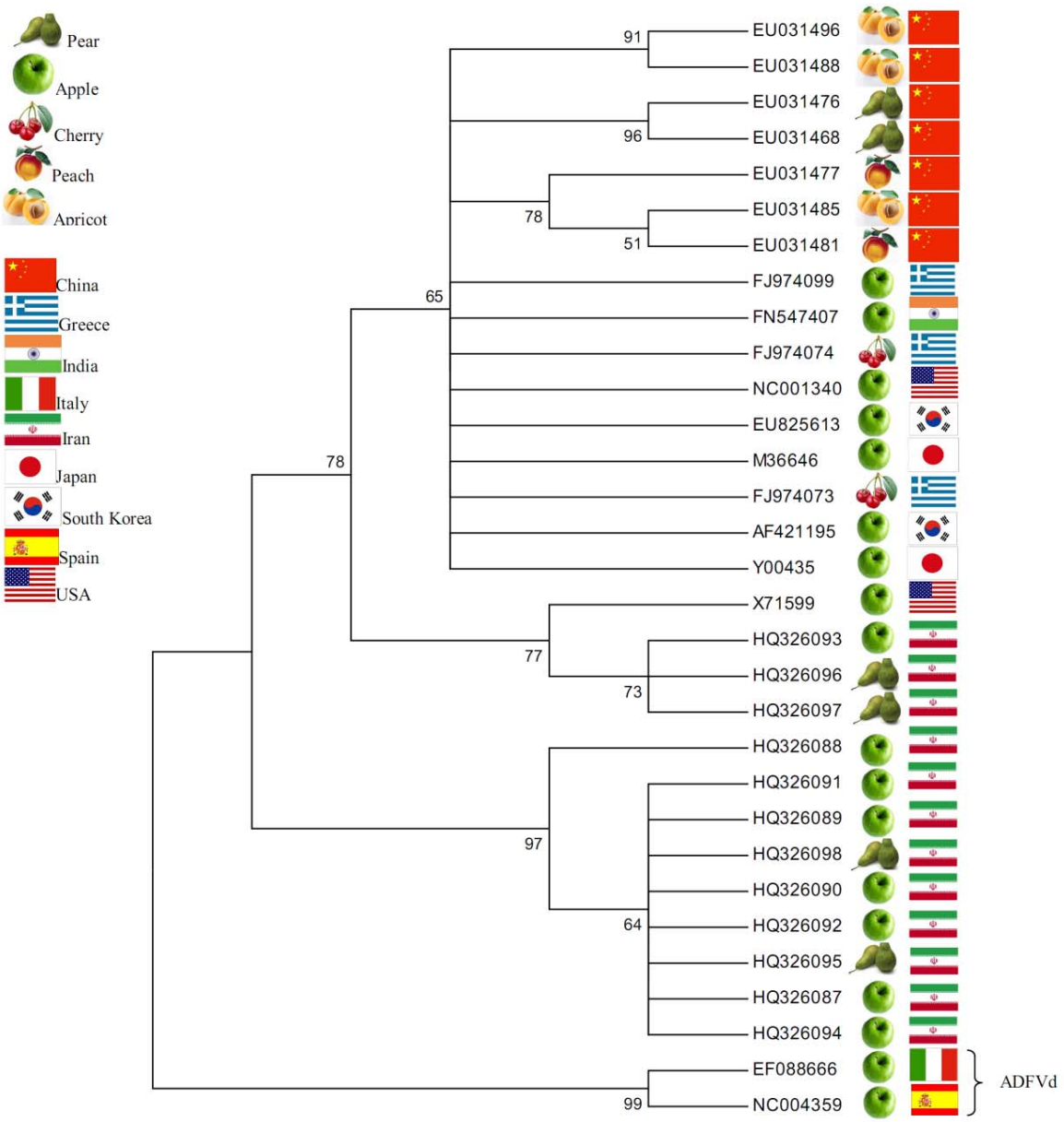
تنوع ژنتیکی نشان داده شده بر روی ساختار ثانویه می‌تواند اهمیت نقش اساسی بعضی از نواحی ویروئیدی را نشان دهد. ناحیه CCR نقش اساسی در پردازش و همانندسازی ویروئید بر عهده دارد (۲۱)، بنابراین نرخ پایین جهش در این ناحیه تأیید کننده اهمیت آن است. وقوع جهش‌ها با نحوه گروه بندی جدایه‌ها کاملاً هماهنگی

1- Terminal Conserved Region
2- Central Conserved Region
3- Transversion
4- Transition

دارد. ۱۲ جدایه ایرانی در دو گروه ۹ تایی و ۳ تایی قرار گرفته‌اند که تعدادی جهش در تمام آن‌ها مشترک بوده و تعدادی نیز تنها در ۹ جدایه مشاهده می‌شوند. این نتیجه می‌تواند دلیلی دیگر بر امکان ارتباط جغرافیایی بر روی مواد ژنتیکی باشد.



شکل ۲- همردیفی توالی‌های ۱۲ جدایه ایرانی به همراه جدایه‌های منتخب از میزبان‌ها و کشورهای مختلف (X71599 آمریکا؛ M36646 ژاپن؛ FN547407 هند از سیب. EU031485 چین از زردآلو. FJ974099 یونان از گیلاس. EU031477 چین از هلو). جعبه‌های نارنجی (دامنه نوکلئوتیدی ۷۵-۴۱) و قرمز (دامنه نوکلئوتیدی ۲۸۶-۲۵۸) نشان دهنده ناحیه بیماریزایی به ترتیب در قطب مثبت و منفی هستند. جعبه‌های آبی (دامنه نوکلئوتیدی ۱۰۷-۷۶) و سبز (دامنه نوکلئوتیدی ۲۵۷-۲۲۴) نشان دهنده ناحیه مرکزی به ترتیب در قطب مثبت و منفی می‌باشند.

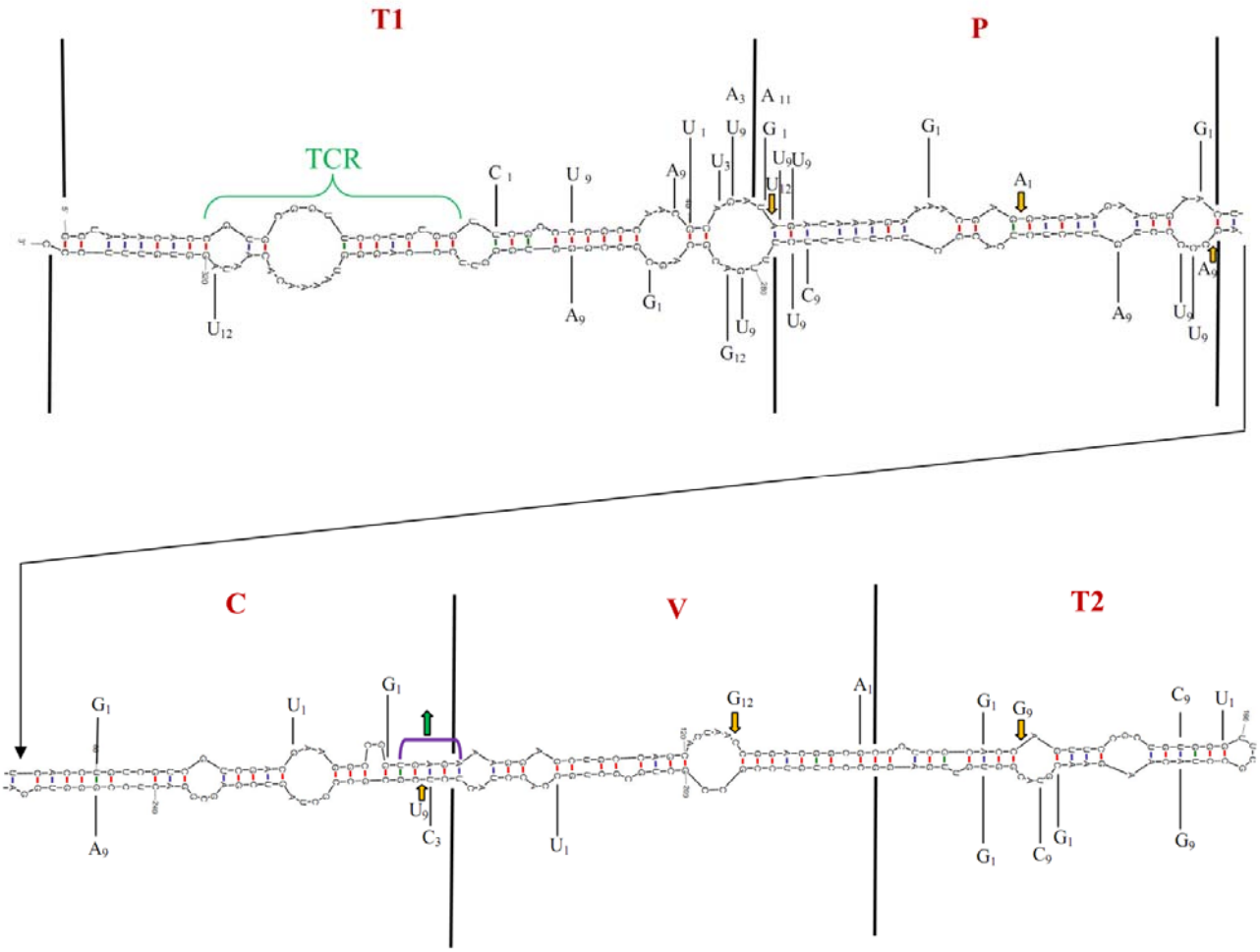


شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر روش neighbor joining نشان دهنده ارتباط تکاملی بین جدایه‌های ایرانی با جدایه‌هایی منتخب از سایر میزبان‌ها و کشورها. دو جدایه (EF08866 and NC004359) به عنوان out-group استفاده شده است.

این مطالعه نشان دهنده وقوع ویروئید پوست پینه‌ای سیب در باغات سیب و گلابی استان خراسان رضوی می‌باشد. مطالعات صورت گرفته بر روی تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی نشان می‌دهد که آن‌ها مشخصاً متفاوت از سایر جدایه‌های این بیماری قرار می‌گیرند. اهمیت تأثیرات جغرافیایی بر روی تنوع ژنتیکی بیماری را می‌توان با بررسی سایر مناطق کشور به منظور یافتن این ویروئید و بررسی جدایه‌های به‌دست آمده با نتایج حاصل روشن‌تر ساخت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه آدلاید (استرالیا) به پاس حمایت در انجام این تحقیق، از آقای مهندس سبک خیز بخاطر همیاری در ارسال گروهی از نمونه‌ها و همچنین از آقای دکتر هابیلی به پاس همکاری ارزنده‌شان بی‌نهایت سپاسگزاریم.



شکل ٤- توالی نوکلئوتیدی و ساختار ثانویه جدایه مرجع X17696 و جهش‌های جدایه‌های ایرانی در طول این ساختار نشان داده شده است. نواحی ساختاری ویروئید، T1[1]، TCR[2]، P[3]، C[4]، V[5]، T2[6]، در این شکل مشخص شده‌اند. پیکان‌های زرد (روشن) و سبز (تیره) به ترتیب نشان دهنده دخول یا حذف نوکلئوتیدی هستند.

منابع

1- Behl M.K., Khurana S.M.P., and Parakh D.B. 1998. Bumpy fruit and other viroid and viroid-like diseases of apple in HP, India. Acta Horticulturae, 472:627-629.
2- Campbell A.I., and Sparks T.R. 1976. Experiments with dapple apple virus. Acta Hort, 67:261-264.
3- Chen W., Yang X.C., Tien P. 1987. Pear rusty skin a viroid disease. In: 7th International Congress of Virology, Edmonton, Canada. pp 300.
4- Daros J.A., Elena S., and Flores R. 2006. Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. EMBO Rep, 7:593-598.

1- Left Terminal Domain
2- Terminal Conserved Region
3- Pathogenicity Domain
4- Central Domain
5- Variable Domain
6- Right Terminal Domain

5- Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., and Cornaggia D. 1999. Biological Properties of Apple Scar Skin Viroid: Isolates, Host Range, Different Sensitivity of Apple Cultivars, Elimination, and Natural Transmission. Plant Disease, 83:768-772.
6- Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Rogozzino A., and Flores R. 2002. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of apple scar skin viroid. Plant Pathology, 84:27-34.
7- Flores R., Randles J.W., Bar-Joseph M., and Diener T.O. 2000. Subviral agent: Viroids. In: Virus taxonomy 7th report of the international committee on Taxonomy of viruses. pp 1009-1024.
8- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J., Marais A., and Candresse T. 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: A polyvalent detection and characterization tool for tichoviruses, capilloviruses, and foveaviruses. Phytopathology, 95:617-625.
9- Hadidi A., Hansen A.J., Parish C.L., and Yang X. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. Research in Virology, 142:289-296.
10- Hadidi A., Huang C., Hammond R.W., and Hashimoto J. 1990. Homology of the agent associated with dapple apple disease to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids. Phytopathology, 80:263-268.
11- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp Ser, 41:95–98.
12- Hashimoto J., and Koganezawa H. 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. Nucleic Acids Research, 15:7045-7052.
13- Keese P., and Symons R.A. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular rearrangement and their contribution to viroid evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82:4582-4586.
14- Koganezawa H., Yang X., Zhu S.F., Hashimoto J., and Hadidi A. 2003. Apple scar skin viroid in apple. In: Hadidi A., Flores R., Randles J.W., and Semancik J.S. (eds.) Viroids. CSIRO Publishing, Australia. pp 137-141.
15- Koganezawa H. 1986. Further evidence for viroid etiology of apple scar skin and dapple diseases. Acta Hortic, 193:29-33.
16- Kumar S., Dudley J., Nei M., and Tamura K. 2008. MEGA: a biologistcentric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings Bioinformatics, 9:299–306.
17- Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., and Hadidi A. 2001. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. Plant Pathology, 83:51-62.
18- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., and Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23:2947–2948. Ohtsuka Y. 1938. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural, 9:282-286.
19- Puchta H., Luckinger R., Yang X., Hadidi A., and Sänger H.L. 1990. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid (ASSVd) from China. Plant Molecular Biology, 14:1065-1067.
20- Sano T., Candresse T., Hammond R.W., Diener T.O., and Owens R.A. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. Proc Natl Acad Sci, 89:10104–10108.
21- Walia Y., Kumar Y., Tanuja R., Bhardwaj P., Ram R., Thakur P.D., Sharma U., Hallan V., and Zaidi A.A. 2009. Molecular characterization and variability analysis of Apple scar skin viroid in India. Gen Plant Pathology, 75:307–311.
22- Welsh M.F., and Keene F.W.L. 1961. Diseases of apple in British Columbia that are caused by viruses or have characteristics of virus diseases. Can Plant Dis Surv, 41:123-147.
23- Yang X., Hadidi A., and Hammond R.W. 1992. Nucleotide sequence of apple scar skin viroid reverse transcribed in host extracts and amplified by the polymerase chain reaction. Acta Hort, 309:305-309.
24- Zhu S.F., Hadidi A., Hammond R.W., Yang X., Hansen A.J. 1995. Nucleotide sequence and secondary structure of pome fruit viroids from dapple apple diseased apples, pear rusty skin diseased pears and apple scar skin symptomless pears. Acta Horticulturae, 386:554-559.
25- Zucker M., and Stiegler P. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Research, 9:133-148.