پراکنش ویروئید کوتولگی رازک در باغ‌های پسته استان کرمان و ارزیابی انتقال مکانیکی و برهمکنش دو رقم پایه پسته نسبت به این ویروئید

محمد مداحیان[۱]، حسین معصومی[۲،۳*]، جهانگیر حیدرنژاد[۳]، اکبر حسینی‌پور[۳]، مسعود خضری[۴]

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹

چکیده

ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*, HSVd) تعداد زیادی از درختان میوه مانند انگور، مرکبات، آلو، هلو، انجیر، توت، گلابی، پسته و بادام را آلوده می‌نماید. طی اردیبهشت ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۵ تعدادی از باغ‌های پسته استان کرمان به‌عنوان مهمترین منطقه پسته‌کاری کشور، به منظور آلودگی به ویروئید HSVd بررسی شدند. در مجموع ۱۰۶ نمونه جهت تعیین آلودگی به این ویروئید از برگ‌های درختان پسته با علائم موزائیک، زردی، رنگ‌پریدگی و تعدادی نیز بدون علائم جمع‌آوری شده و توسط آزمون‌های RT-PCR و هیبریداسیون نقطه‌ای ارزیابی گردیدند. نتایج به‌دست آمده آلودگی چهار رقم پسته کله‌قوچی، اوحدی، ممتاز و احمدآقایی را به HSVd تأیید کرد، اما در نمونه‌های رقم اکبری آلودگی مشاهده نگردید. جهت آزمون‌های زیست‌سنجی از واریانت ایرانی Ker.Ana.P1، جدا شده از درختان پسته منطقه انار، که قادر به ایجاد آلودگی و بیماری‌زایی روی گیاهان محک (ارقام خیار شناساگر) بود، استفاده گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های زیست‌سنجی شامل انتقال مکانیکی واریانت HSVd، از طریق روش‌های سایشی، برشی و تزریق RNA ویروئید به پایه‌های بادامی و University of California Berkeley-I (UCB-1) مشخص گردید که هر سه روش سبب آلودگی پایه‌های پسته می‌گردند و از بین آن‌ها، روش مایه‌زنی برشی، بالاترین راندمان انتقال HSVd با ۸۶/۶۷ و ۸۰ درصد در پایه‌های بادامی و UCB-1 را نشان داد. بر اساس نتایج

[۱] دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۲] پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۳] هیأت علمی گروه بیماری‌شناسی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
[*] نویسنده مسئول: masoomi@uk.ac.ir
[۴] هیأت علمی بخش مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

بدست آمده در این تحقیق، به‌نظر می‌رسد که آلودگی درختان پسته در استان کرمان نسبت به HSVd به‌دلیل عدم توجه به مسائل بهداشت زراعی و انتقال عوامل بیماری‌زا نظیر ویروئیدها در حین عملیات باغی مانند هرس رو به افزایش می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارقام پسته، آزمون‌های زیست‌سنجی، پروکاریوت‌ها

مقدمه

ویروئیدها عوامل بیماری‌زای محصولات کشاورزی، صنعتی و زینتی می‌باشند و بسیاری از ویروئیدهای شناخته شده، به دلیل ایجاد خسارات جدی در میزبان خود شناسائی شده‌اند. برخی از بیماری‌های ویروئیدی دارای اهمیت اقتصادی بالایی بوده و خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌نمایند (Randles, 2003; Diener, 1987). ویروئید کوتولگی رازک وسیع‌ترین دامنه میزبانی را در بین ویروئیدها دارا می‌باشد و از کشورهای مختلف دنیا نیز گزارش گردیده است. این ویروئید علاوه بر رازک قادر به تکثیر در تعداد زیادی از گیاهان چوبی (woody plants) و علفی (herbaceous plants) می‌باشد (Hataya *et al*., 2017; Singh & Ready, 2003). آلودگی به HSVd تاکنون از درختان میوه‌ای مانند بادام، سیب، زردآلو، انواع مرکبات، انجیر، انگور، عناب، توت، هلو، گلابی، پسته، گیلاس، آلو، انار و به گزارش گردیده‌است (Astruc *et al*., 1996; Elbeaino *et al*., 2012a; Elbeaino *et al*., 2012b; Elleuch *et al*., 2013; Hataya *et al*., 2017; Polivka *et al*., 1996; Roistacher,1996; Sano, 2003a; Sano *et al*., 1989; Shikata, 1990; Zhang *et al*., 2009). بیماری کوتولگی رازک (hop stunt disease) در دهه‌های ۴۰ و ۵۰ میلادی در کشور ژاپن مشاهده گردید. گیاهان رازک آلوده با علائم کوتولگی شدید و کاهش رشد (dwarf shape and stunted growth) از گیاهان سالم قابل تشخیص بودند. از جمله دیگر بیماری‌های ایجاد شده توسط این پاتوژن می‌توان به بیماری کاچکسیای مرکبات، بیماری چروکیدگی میوه هلو و آلو (dapple fruit disease of plum and peach)، اختلال کاهش و تبخیر آب میوه (degeneration, "Degeneracion") درگیاهان زردآلو و بیماری رنگ پریدگی میوه خیار اشاره نمود.

ویروئید کوتولگی رازک گونه تیپ جنس *Hostoviroidae* از خانواده *Pospiviroidae* است (Flores *et al*., 1998). از دیگر گونه‌های این جنس می‌توان ویروئید پنهان کوکب-۱ (*Dahlia latent viroid*-1, DLVd) را نام برد که در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است. لازم به ذکر است که تاکنون بیش از ۷۵۰ توالی نوکلئوتیدی مربوط به HSVd در پایگاه اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ثبت شده است. در ضمن از نظر تکاملی، تاکنون توالی‌های نوکلئوتیدی این ویروئید در پنج گروه فیلوژنتیک قرار

می‌گیرند (Hayata *et al*., 2017). در بررسی‌های اولیه، این توالی‌ها از گیاهان رازک، خیار، انگور، مرکبات، هلو و آلو به سه گروه تیپ رازک/انگور (Grape/hop-type)، تیپ آلو (Plum-type) و تیپ مرکبات (Citrus-type) تقسیم‌بندی گردیدند (Shikata, 1990). در مطالعات بعدی و همچنین در مقایسه گسترده‌تر در زمینه فیلوژنی واریانت‌های این ویروئید، دو گروه نوترکیب دیگر به‌نام‌های تیپ آلو-مرکبات (Plum-citrus-type) و تیپ آلو-رازک/cit3 (Plum-hop/cit3) معرفی شدند (Amari *et al*., 2001; Kofalvi *et al*., 1997). بر اساس مطالعات به نظر می‌رسد که گروه تیپ رازک احتمالاً از نوترکیبی بین اعضای گروه آلو و مرکبات تکامل یافته‌اند (Kofalvi *et al.,* 1997; Matousek *et al.,* 2003).

آزمون‌های زیست‌سنجی (Bioassays) نقش اساسی در تشخیص بیماری‌های ویروئیدی دارند. اغلب آن‌ها مکمل آزمون‌های مولکولی جهت ردیابی و تعیین خصوصیات بیولوژیکی ویروئیدهای گوناگون از جمله اثبات اصول بیماری‌زایی کخ (Fulfilment of Koch's postulates) هستند. امروزه این آزمون‌ها بخش مهمی از برنامه‌های تأیید گواهی سلامت مواد گیاهی را تشکیل می‌دهند (Hammond & Owens, 2006; Semancik & Vidalakis, 2005; Verhoeven *et al*., 2011). در این گونه تحقیقات، اهداف عموماً بر پایه‌ی شواهد بصری قابل اعتنا مانند ایجاد علائم و یا پتانسیل انتقال (Transmission potential rate) ویروئید استوار بوده است. این روش‌ها شامل انتقال از طریق پیوند، انتقال مکانیکی به میزبان‌های اولیه و ثانویه و یا انتقال از طریق مواد گیاهی قابل تکثیر می‌باشند (Singh & Ready, 2003).

به طور معمول در ویروئیدها تلقیح از طریق ایجاد زخم (wounding) یا پیوند زنی (graft-inoculation) صورت می‌گیرد و تنوع در روش‌های تلقیح از موارد موثر در بیان علائم ویروئیدی می‌باشند. در ویروئیدها روش‌های تلقیح مکانیکی (mechanical inoculation) مانند قطع کردن شاخه (cutting) ، برش دادن (slashing) و تلقیح سایشی (rubbing) از مهمترین روش‌ها جهت اثبات بیماری‌زایی اصول کخ بر روی گیاهان مختلف می‌باشند (Hadidi *et al*., 2017; Nie & Singh, 2017). Adams *et al.* (۱۹۹۵) تلقیح از طریق قطع شاخه را به‌عنوان روش موثرتر در مقایسه با روش سایشی جهت آلوده‌سازی گیاهان رازک نسبت به ویروئید پنهان رازک (*Hop latent viroid*, HLVd) معرفی نمودند. علاوه بر روش‌های مذکور جهت آزمون‌های زیست‌سنجی، انتقال مکانیکی از طریق تزریقِ (injection) آموده‌ی آلوده (infected preparation) به ویروئید نیز به‌کار برده می‌شود (Singh & Ready, 2003; Imperial *et al*., 1985; Kapari-Isaia *et al*., 2008).

نظر به اینکه که اولین بار واریانت‌های HSVd از روی درختان پسته در استان کرمان جداسازی و مطالعات

مولکولی آن‌ها صورت گرفته است (Maddahian *et al.*, 2019)، در این تحقیق از آزمون‌های زیست‌سنجی شامل مایه‌زنی مکانیکی و بیماری‌زایی جدایه ایرانی HSVd از گیاه پسته بر روی ارقام خیار و روش‌های مختلف انتقال مکانیکی جدایه مذکور بر روی دو رقم پایه پسته استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها

الف- نمونه‌برداری و تعیین پراکنش ویروئید کوتولگی رازک در باغ‌های پسته استان کرمان

به منظور بررسی و شناسایی ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*) در درختان پسته، در فاصله زمانی اردیبهشت ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۵، تعداد ۷۶ نمونه از درختان پسته ماده با نشانه‌هایی مانند زردی، موزائیک و کوتولگی، ۲۲ نمونه از درختان ماده بدون علائم، سه نمونه از درختان نر علائم دار و پنج نمونه از درختان نر بدون علائم از ۲۱ منطقه پسته‌کاری استان کرمان جمع‌آوری شد. نمونه‌های انتخابی در برگیرنده پنج رقم تجاری پسته در استان شامل اوحدی، کله‌قوچی، اکبری، ممتاز و احمدآقائی بودند. هر نمونه در یک کیسه پلاستکی قرار داده شده و با ذکر مشخصاتی مانند تاریخ، محل نمونه‌برداری و رقم درخت پسته بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۱). به منظور بررسی آلودگی نمونه‌های پسته به ویروئید کوتولگی رازک با استفاده از کیت (High pure viral nucleic acid kit, Roche, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده، در شرایط استریل، RNA ویروسی-ویروئیدی استخراج شده و سپس با استفاده از آزمون‌های RT-PCR و هیبریداسیون نقطه‌ای (Dot-blot hybridization) با استفاده از دستورالعمل کیت DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, (Cat No. 11745832910 Roche Diagnostics) مورد بررسی قرار گرفتند.

ب- آزمون‌های زیست‌سنجی

۱- استخراج RNA و آماده‌سازی اینوکولوم اولیه (Primary inoculum)

در این تحقیق آزمون‌های زیست‌سنجی شامل مایه‌زنی مکانیکی جدایه ایرانی HSVd از گیاه پسته بر روی گیاهان شناساگر علفی، ارزیابی روش‌های انتقال مکانیکی به پایه‌های پسته می‌باشند. جهت استخراج RNA از بافت برگ پسته، ابتدا دو گرم بافت برگ پسته با استفاده از ازت مایع پودر شده و سپس در بافر فسفات عصاره‌گیری انجام شد. مخلوط در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رونشین به منظور بررسی آلودگی نمونه‌های پسته به ویروئید کوتولگی رازک جهت استخراج RNA با استفاده از کیت (High pure viral nucleic acid kit, Roche, Germany, Cat. No. 11 858 874 001) مورد استفاده قرار گرفت.

۲- آزمون RT-PCR و تکثیر طول کامل ژنوم

پس از استخراج RNA، تهیه‌ی رشته‌ی مکمل با استفاده از آغازگرهای معکوس VP-19 و آنزیم نسخه‌برداری معکوس صورت گرفت. آزمون PCR جهت تکثیر طول کامل ژنوم HSVd با استفاده از آغازگرهای اختصاصی VP-19/VP-20 انجام شد (جدول ۲) (Amari *et al*., 2001; Sharifi *et al*., 2008). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ºC ۹۴، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی در دمای ºC ۹۴ به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در ºC ۵۸ به مدت یک دقیقه، مرحله گسترش در دمای ºC ۷۲ به مدت یک دقیقه و مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ºC ۷۲ صورت گرفت. قطعات تکثیر شده در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۱- مناطق، ارقام و تعداد نمونه‌های برگ پسته جمع‌آوری شده از باغ‌های پسته استان کرمان طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵.

ردیف	منطقه نمونه‌برداری	رقم نمونه‌برداری شده	تعداد نمونه			
			درخت ماده علائم دار	درخت ماده بدون علائم	درخت نر علائم دار	درخت نر بدون علائم
۱	انار	کله‌قوچی	۱۶	۵	۱	۱
۲	باغین - رباط	اوحدی	۲	۱	-	-
۳	باغین - سعدی	اوحدی	۲	۱	-	-
۴	چترود – کاظم‌آباد	کله‌قوچی	۲	۱	۱	۱
۵	چترود - هوتک	اوحدی	۲	۱	-	-
۶	راور	ممتاز	۳	-	-	-
۷	رفسنجان – کبوترخان	کله‌قوچی	۶	۲	-	۱
۸	رفسنجان – همت‌آباد آگاه	اوحدی	۶	۱	-	-
۹	زرند – ابراهیم‌آباد	اکبری	۳	۱	-	۱
۱۰	زرند – فخرآباد	اکبری	۲	-	-	-
۱۱	زرند – عزیز¬آباد	اوحدی	۳	۱	۱	-
۱۲	زرند – مطهر¬آباد	اوحدی	۳	۱	-	-
۱۳	سیرجان - زیدآباد	اوحدی	۳	۱	-	-
۱۴	شهربابک	اوحدی	۸	۲	-	-
۱۵	کرمان - اختیارآباد	کله‌قوچی	۳	۱	-	-
۱۶	کرمان – فرحآباد	اوحدی	۲	۱	-	-
۱۷	کرمان – شاهرخ‌آباد	اوحدی	۲	-	-	-
۱۸	کرمان – زنگی‌آباد	اکبری	۳	۱	-	۱
۲۰	ماهان - ریگ	احمد آقائی	۳	۱	-	-
۲۱	ماهان - لنگر	اوحدی	۲	۱	-	-
		جمع کل	۷۶	۲۲	۳	۵
		مجموع نمونه‌ها	۱۰۶			

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (جایگاه برشی جهت آنزیم *Sma*I مشخص گردیده‌است).

نام آغازگر	توالی آغازگر	موقعیت ژنومی
VP-19	5´- GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG -3´	Complementary to HpSVd residues 85–60
VP-20	5´- CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC -3´	Homologous to HpSVd residues 78–102
VP-98	5´- CTCCAGAGCACCGCGGCCCTC -3´	Complementary to HpSVd residues 120–140
VP-99	5´- CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGC -3´	Homologous to HpSVd residues 1–23

جدول ۳- مواد لازم جهت انجام آزمون PCR در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری.

ماده	مقدار (میکرولیتر)
10x PCR buffer	2.5
dNTPs (10mM)	0.5
Primer Forward (10µM)	1
Primer Reverse (10µM; Reverse)	1
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.3
cDNA	3
$MgCl_2$ (50mM)	0.5
Deionized distilled water	16.2
Total	**25**

۳- تهیه همسانه تک پار آلوده کننده (monomeric infectious colone)

cDNA جدایه Ker.Ana.P1 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی VP-19/VP-20 تکثیر و سپس با استفاده از کیت (InsTA cloneTM PCR Cloning Kit) در پلاسمید pTZ57R/T در سویه JM 107 باکتری *Escherichia coli* وارد و همسانه‌سازی گردید. به منظور دستیابی به همسانه تک پار آلوده کننده این ویروئید، پلاسمید نوترکیب حاوی طول کامل جدایه Ker.Ana.P1 به درون باکتری *E. coli* منتقل گردیده و سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Germany, Cat No:11 754 785 001) خالص‌سازی شد. پلاسمیدهای خالص شده طی واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *Sma*I هضم گردیده و سپس درون ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. محصول واکنش هضم آنزیمی متشکل از دو باند ۲۸۸۶ جفت بازی پلاسمید و باند تقریبی ۳۰۰ جفت بازی ویروئید می‌باشد. باند مربوط به جدایه ویروئید کوتولگی رازک با استفاده از کیت (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Cat. No. 11 696 505 001, Roche Diagnostics) از درون ژل استخراج گردید.

۴- مایه‌زنی واریته‌های گیاه خیار با استفاده از قطعه DNA مکمل تک پار HSVd

بذرهای دو رقم خیار (*Cucumis sativus* L. cv. Beith alpha) و (*C.* Superina F1) ضد عفونی شده و در گلدان‌های ۱۰ لیتری کاشته شدند. در مرحله ۲ برگ حقیقی گیاهان با استفاده از روش مکانیکی و با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار pH=7 مایه‌زنی شدند. سپس گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۵ روز از مایه‌زنی، برگ‌های گیاهان مایه‌زنی شده و شاهد برداشت شدند. برگ‌های برداشت شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شدند. سپس از هر برگ ۱۰ گرم بافت برداشت شد و با استفاده از کیت (Qiagen, Germany, Cat No:69104) DNA استخراج گردید. DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای VP-19/VP-20 تکثیر شد. محصول واکنش هضم آنزیمی متشکل از دو باند ۲۸۸۶ جفت بازی پلاسمید و باند تقریبی ۳۰۰ جفت بازی ویروئید می‌باشد. باند مربوط به جدایه ویروئید کوتولگی رازک با استفاده از کیت (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Cat. No. 11 696 505 001, Roche Diagnostics) از درون ژل استخراج گردید.

sativus L. cv. Superina F1) در گلدان‌های حاوی خاک متشکل از یک قسمت شن و یک قسمت خاکبرگ گشت گردیدند و در دمای ۲۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد در شرایط گلخانه و عاری از حشره نگهداری شدند. پس از رشد گیاهان خیار تا مرحله دو برگی (برگ‌های کوتیلدونی) هر گیاه با استفاده از دو میکروگرم از قطعه cDNA ویروئید به دست آمده حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب، به روش سایشی و با استفاده از پودر کاربراندم مایه‌زنی گردید (Kofalvi *et al.*, 1997; Maddahian *et al.*, 2019). آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده به HSVd پس از چهار هفته با استفاده از آزمون RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

ج- کشت و تهیه نهال‌های پسته

دو پایه‌ی پسته بادامی زرند و (*P.atlantica x P.integerrima*) UCB-1 جهت آزمایش‌های زیست‌سنجی انتخاب شدند. بدین منظور یک توده بذر از رقم بادامی زرندی تهیه و جهت کاشت آن‌ها ابتدا بذرها با آب معمولی شستشه شدند و سپس به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ده درصد ضد عفونی گردیدند. بذرها پس از آبکشی به مدت یک شبانه روز در آب مقطر استریل قرار داده شدند. پس از آن، بذرها با استفاده از قارچ‌کش کاپتان ده درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی گردیدند. بذرهای آماده شده درون پارچه نم‌داری که قبلا اتوکلاو شده بود در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از حدود سه تا پنج روز، جوانه‌های پسته ظاهر شده و هر بذر درون کیسه پلاستیکی کشت نهال پسته با ترکیب خاک متشکل از یک قسمت شن، یک قسمت خاک رس و یک قسمت خاک‌برگ کشت گردیدند. همچنین نهال‌های UCB-1، تکثیر شده از طریق کشت بافت، از شرکت نهال طوبی کرمان تهیه گردیدند. تمامی پایه‌های پسته در شرایط دمایی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط گلخانه و عاری از حشره نگهداری شده و نهال‌ها در طول مدت آزمایش به صورت منظم از لحاظ آفات، بیماری‌ها و تغذیه گیاهی با کود ارژن ۲۰-۳ (سه گرم در هزار سی‌سی آب به صورت دو هفته یک‌بار) و سموم موونتو (نیم در هزار سی‌سی آب) و الیت (۲/۵ گرم در هزار سی‌سی آب) تحت نظر بودند.

د- مایه‌زنی مکانیکی جهت انتقال ویروئید کوتولگی رازک به پایه‌های پسته

به منظور بررسی امکان انتقال مکانیکی ویروئید کوتولگی رازک به پایه‌های پسته، از جدایه ویروئید Ker.Ana.P1 که از منطقه انار و پسته رقم کله‌قوچی جداشده بود، استفاده گردید. در تمامی روش‌های مایه زنی، تعداد ۱۵ گیاه جهت مایه‌زنی با HSVd و ۱۵ گیاه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. از عصاره برگ گیاه خیار سالم و آب مقطر جهت مایه‌زنی گیاهان شاهد استفاده گردید. بررسی آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده به HSVd پس از ۱۲-۶ ماه با استفاده از آزمون RT-PCR و مایه‌زنی

برگشتی بر روی گیاهان خیار به عنوان گیاه شناساگر صورت گرفت (Singh & Ready, 2003).

۱- مایه‌زنی به روش سایشی

عصاره گیاه آلوده از بوته‌های خیار آلوده به HSVd در هاون چینی به نسبت ۰/۱ گرم برگ علائم دار به ازای یک سی‌سی بافر فسفات نیم مولار تهیه و بر روی نهال‌های پسته بادامی در مرحله ۲ تا ۴ برگی و نهال‌های UCB-1 در مرحله ۵ تا ۱۰ برگی با استفاده از پودر کاربراندوم مایه‌زنی گردیدند.

۲- مایه‌زنی به روش برشی (Slash inoculation)

در این روش تیغ آلوده به عصاره تازه استخراج شده (از گیاهان خیار آلوده به HSVd)، ۵ تا ۱۰ بار به‌طور عرضی تا ناحیه‌ی چوب گیاه و با ظرافت فرو برده شد. محل مایه‌زنی زیر جوانه یکی از گره‌های ساقه انتخاب گردید (Garnsey & Widden, 1973; Yazarlou *et al.,* 2012).

۳- مایه‌زنی RNA ویروئید با تزریق سرنگی (RNA injection)

در این روش RNA ویروئید با استفاده از کیت (High pure viral nucleic acid kit, Roche, Germany) و طبق دستورالعمل شرک سازنده، از گیاهان خیار آلوده استخراج و سپس به میزان شش میکروگرم به ازاء هر گیاه، با استفاده از سرنگ اتوماتیک (Automatic syringe injector) در ناحیه‌ی زیر یکی از گره‌های ساقه به درون گیاه تزریق گردید.

۵- محاسبات آماری

داده‌های حاصل به صورت فاکتوریل ۳×۲ در قالب طرح کاملاتصادفی با ۱۵ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. فاکتورهای آزمایش شامل سه روش تلقیح و دو واریته پسته بودند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش ANOVA در نرم افزار SAS (version 9.2) از نظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

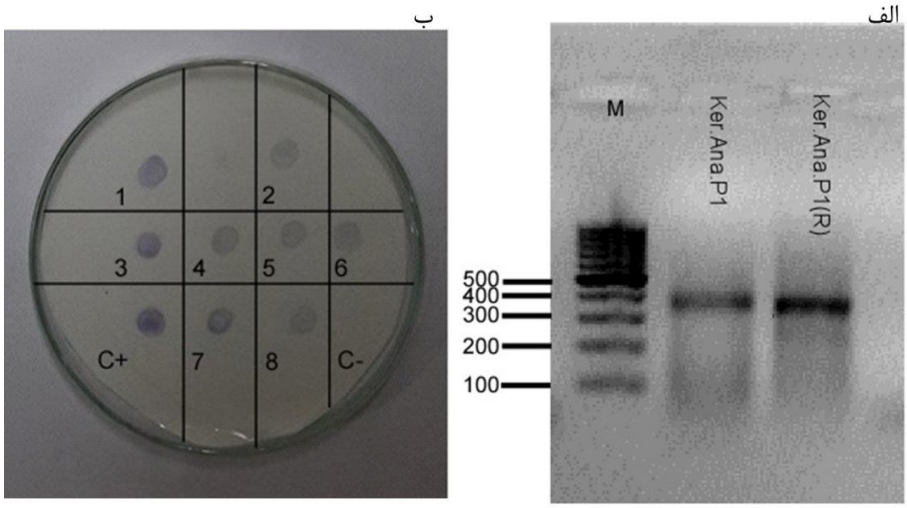
الف- شناسایی، تعیین پراکنش و علائم جدایه Ker.Ana.P1 بر روی گیاه پسته

از مجموع ۱۰۶ نمونه مورد بررسی آلودگی ۱۱ جدایه (۱۳ درصد) طی آزمون‌های RT-PCR و هیبریداسیون نقطه‌ای مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). دربین نمونه های مورد بررسی در هیچ‌کدام از ۲۷ نمونه پسته بدون علائم (شامل ۲۲ نمونه از درختان بارده و پنج نمونه از درختان نر) آلودگی به این ویروئید ردیابی نگردید. در ارقام بررسی شده آلودگی به HSVd در چهار رقم کله‌قوچی (منطقه انار)، اوحدی (مناطق رباط-باغین، فرح‌آباد-کرمان، هوتک-چترود و شهربابک)، ممتاز (منطقه راور) و احمدآقایی (منطقه ریگ-ماهان) تأیید گردید. در حالی که هیچ گونه آلودگی در رقم اکبری نسبت به HSVd مشاهده نگردید. علائم درختان آلوده در برگ‌ها شامل موزائیک (منطقه انار)، زردی و رنگ‌پریدگی

(منطقه شهربابک) و موزائیک و رنگ‌پریدگی (مناطق راور، هوتک، فرح‌آباد و رباط) ثبت گردید (جدول ۴). علائم بر روی برگ‌های جدایه Ker.Ana.P1 به صورت موزائیک و رنگ‌پریدگی برگ مشخص بودند (شکل ۲).

ب- بیماری‌زایی و علائم جدایه Ker.Ana.P1 بر روی ارقام خیار

پس از گذشت چهار هفته، آلودگی ارقام خیار مایه‌زنی شده توسط قطعه تک‌پار همسانه سازی شده واریانت ایرانی HSVd، طی آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی VP-19/VP-20به HSVd مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج حاصل از این آزمون منجر به تشکیل قطعه تقریبی ۳۰۰ جفت بازی مربوط به ویروئید کوتولگی رازک گردید. آلودگی به HSVd در ارقام خیار مایه‌زنی شده با قطعه DNA مکمل تک پار HSVd، باعث ایجاد علائم رایج این ویروئید شامل کوتولگی، پژمردگی گل‌آذین (کوچک شدن، چروکیدگی و پژمردگی)، ریزبرگی، روخمشی دو رقم خیار Beith alpha و Superina F1 (به‌عنوان گیاه شناساگر) گردید (شکل ۴).

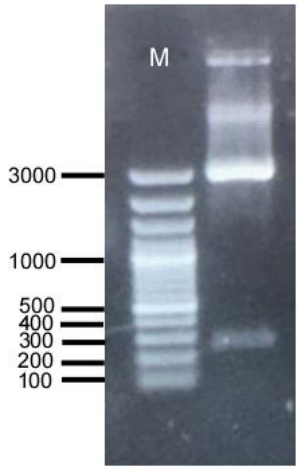


شکل ۱- الف) الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی VP19/VP20 منجر به تشکیل باند تقریباً ۳۰۰ جفت بازی مربوط به جدایه Ker.Ana.P1 درون ژل آگارز یک درصد گردید. Ker.Ana.P1(R): تکرار PCR. M: نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™100bp DNA Ladder, Fermentase). ب) آزمون هیبریداسیون نقطه‌ای تعدادی از گیاهان پسته که پاسخ آزمون آن‌ها به آلودگی توسط HSVd مثبت ارزیابی گردید. +C: نمونه کنترل مثبت گیاه آلوده به HSVd. -C: نمونه کنترل منفی و گیاه عاری از آلودگی.

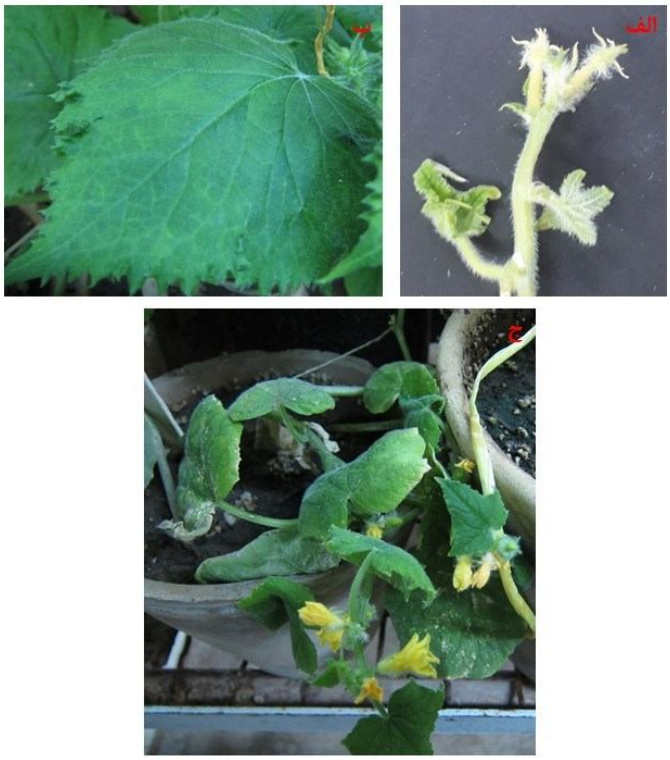
جدول ۴- تعداد، ارقام و علائم نمونه¬های پسته آلوده به ویروئید کوتولگی رازک جمع¬آوری شده از باغات پسته استان کرمان (۱۳۹۵-۱۳۹۳) بر اساس آزمون‌های RT-PCR و هیبریداسیون نقطه‌ای.

ردیف	منطقه نمونه‌برداری	رقم نمونه‌برداری شده	(تعداد درختان آلوده) تعداد درختان نمونه‌برداری شده	علائم نمونه‌های آلوده
۱	انار	کله‌قوچی	۲۳(۴)	موزائیک
۲	باغین - رباط	اوحدی	۳(۱)	موزائیک و رنگ‌پریدگی
۳	باغین - سعدی	اوحدی	۳(۰)	-
۴	چترود – کاظم‌آباد	کله‌قوچی	۵(۰)	-
۵	چترود - هوتک	اوحدی	۳(۱)	موزائیک
۶	راور	ممتاز	۳(۱)	رنگ‌پریدگی
۷	رفسنجان – کبوترخان	کله‌قوچی	۹(۰)	-
۸	رفسنجان – همت‌آباد آگاه	اوحدی	۷(۰)	-
۹	زرند – ابراهیم‌آباد	اکبری	۵(۰)	-
۱۰	زرند – فخرآباد	اکبری	۲(۰)	-
۱۱	زرند – عزیز¬آباد	اوحدی	۵(۰)	-
۱۲	زرند – مطهر¬آباد	اوحدی	۴(۰)	-
۱۳	سیرجان - زیدآباد	اوحدی	۴(۰)	-
۱۴	شهربابک	اوحدی	۱۰(۲)	زردی و رنگ‌پریدگی
۱۵	کرمان - اختیارآباد	کله‌قوچی	۴(۰)	-
۱۶	کرمان – فرحآباد	اوحدی	۳(۱)	موزائیک و رنگ‌پریدگی
۱۷	کرمان – شاهرخآباد	اوحدی	۲(۰)	-
۱۸	کرمان – زنگی‌آباد	اکبری	۴(۰)	-
۲۰	ماهان - ریگ	احمد آقائی	۴(۱)	رنگ‌پریدگی
۲۱	ماهان - لنگر	اوحدی	۳(۰)	-
		جمع کل	۱۰۶ (۱۱)	
		درصد آلودگی	۱۰,۳۷	

شکل ۲- علائم مشاهده شده بر روی درختان پسته آلوده به ویروئید کوتولگی رازک در باغات پسته استان کرمان. علائم موزائیک و رنگ‌پریدگی بر روی برگ‌های جدایه Ker.Ana.P1 پسته رقم کله قوچی نمونه‌برداری شده از منطقه انار.



شکل ۳- الکتروفورز پلاسمید نوترکیب هضم شده با آنزیم *Sma*I منجر به تشکیل باند تقریبا ۳۰۰ جفت بازی مربوط به قطعه DNA تک‌پار جدایه Ker.Ana.P1 و باند ۲۸۸۶ جفت بازی پلاسمید pTZ57R/T درون ژل آگارز یک درصد گردید. M: نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™100bp DNA Ladder, Fermentase).



شکل ۴- علائم ایجاد شده توسط جدایه Ker.Ana.P1 گیاهان خیار در شرایط گلخانه، الف) بدشکلی گل‌های خیار، از بین رفتن گل آذین، ریز برگی و بدشکلی برگ در رقم Beith alpha. ب)علائم موزائیک ایجاد شده بر روی گیاه خیار رقم Superina F1. ج) کوتولگی و بدشکلی گیاه و برگ بر روی گیاه خیار رقم Superina F1.

ج- مایه‌زنی مکانیکی پایه‌های پسته با استفاده از جدایه Ker.Ana.P1

یک‌سال پس از مایه‌زنی با استفاده از سه روش برشی، سایشی و تزریق RNA، HSVd توسط هر دو آزمون RT-PCR و مایه‌زنی برگشتی بر روی ارقام خیار در پایه‌های تیمار شده‌ی پسته، ویروئید ردیابی گردید (جدول ۵). این در حالی است که علی‌رغم انتقال HSVd به پایه‌های مورد آزمایش، ۱۸ ماه پس از مایه‌زنی هیچ‌گونه علائمی در ارقام پسته مذکور مشاهده نگردید.

د- محاسبات آماری

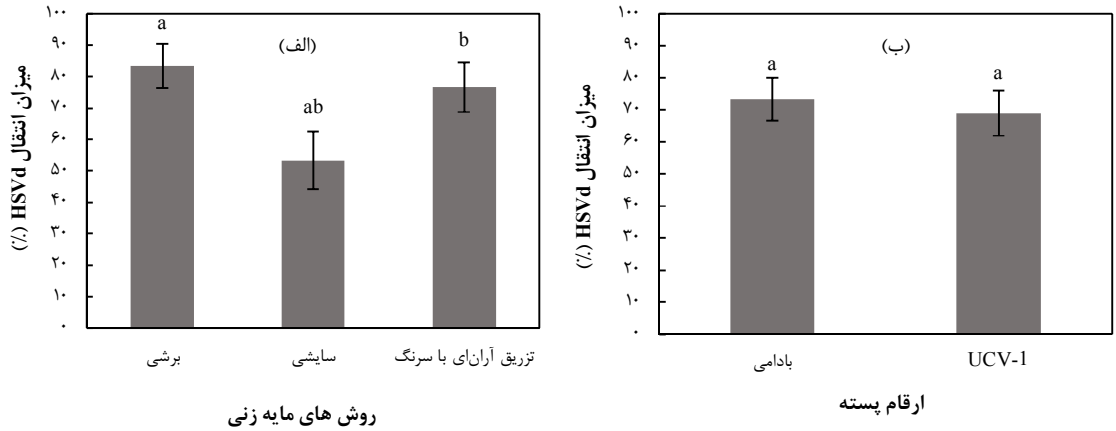
راندمان انتقال HSVd بر روی پایه‌های پسته بین ۸۶-۴۶ درصد متغیر بود. از بین سه روش به‌کار برده شده، مایه‌زنی برشی بالاترین راندمان انتقال HSVd به ترتیب برابر با ۸۶/۶۷ و ۸۰ درصد جهت پایه‌های بادامی و UCB-1 را نشان داد (جدول ۵). محاسبات آماری نیز بیانگر اختلاف معنی‌دار بین روش‌های انتقال برشی و سایشی می‌باشد ($P<$ ۰/۰۵) (شکل ۵- الف). در ضمن هیچ‌کدام از دو روش ذکر شده تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با

روش تزریق RNA نشان ندادند. همچنین در مورد تاثیر واریته‌های پسته بر میزان قابلیت انتقال توسط HSVd اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P= ۰/۶۴) (شکل ۵-ب).

آزمایش‌های زیست‌سنجی از نخستین و مهمترین روش‌های به‌کار رفته جهت تشخیص ویروئیدها و بیماری‌های ناشی از آن ها بوده و تاکنون نیز از کاربرد وسیعی برخوردار می‌باشند (Hodgson *et al*., 1998; Raymer & O'Brien, 1962; Roistacher, 1996; Singh & Ready, 2003). در این تحقیق، روش های زیست‌سنجی شامل روش های سایشی، برشی، تزریق RNA بر روی نهال‌های پسته و انتقال مکانیکی HSVd به پایه‌های پسته استفاده گردید.

جدول ۵- میزان انتقال واریانت Ker.Ana.P1 ویروئید کوتولگی رازک به پایه‌های پسته با استفاده از سه روش مختلف.

روش مایه‌زنی	رقم مورد استفاده	
	Badami	UCB-1
	(%)تعداد گیاه مایه‌زنی شده/تعداد گیاهان آلوده شده	
برشی	۱۳/۱۵ (۸۶,۶۷٪)	۱۲/۱۵ (۸۰٪)
سایشی	۹/۱۵ (۶۰٪)	۷/۱۵ (۴۶,۶۷٪)
تزریق RNA	۱۱/۱۵ (۷۳,۳۳٪)	۱۲/۱۵ (۸۰٪)
مقدار P	۰/۶۸	



شکل ۵- الف) مقایسه میانگین اثر روش‌های مختلف مایه‌زنی بر میزان انتقال HSVd. ب) مقایسه میانگین اثر پایه‌های مختلف پسته بر میزان انتقال HSVd. میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین سطوح مختلف هر عامل آزمایشی براساس آزمون توکی می‌باشند ($P < 0.05$).

در مورد HSVd ارقام مختلف گیاه خیار به عنوان گیاه شناساگر مناسب و رایج شناخته می‌شوند (Hataya *et al*., 2017; Sano, 2003a; Sasaki *et al*., 1989; Yang *et al*., 2008). علائمی از قبیل کوتولگی، عدم باردهی و بدشکلی گل‌آذین (پژمردگی، چروکیدگی و کوچک شدن)، ریز برگی و کاهش فاصله میان گره‌های ساقه به عنوان علائم شاخص ویروئید کوتولگی رازک بر روی ارقام خیار مورد استفاده در این تحقیق (Beith alpha و Superina F1)، تأیید کننده ایجاد آلودگی و بیماری‌زایی واریانت‌های ایرانی جدا شده از گیاه پسته بر روی گیاه شناساگر این ویروئید می‌باشند (Sano, 2003a, b; Van Dorst & Peters, 1974).

ویروئید کوتولگی رازک یک عامل قابل انتقال از طریق پیوند و مایه‌زنی مکانیکی می‌باشد (Barbosa *et al*., 2005; Reanwarakorn & Semancik, 1999). لذا در این تحقیق، از انتقال مکانیکی نمونه‌ی آلوده به HSVd به پایه‌های سالم پسته مورد استفاده قرار گرفت. به طور معمول، ویروئید کوتولگی رازک در گیاهان چوبی و درختی از غلظت پائینی برخوردار می‌باشد (Semancik, 2003). لذا جهت دستیابی به آموده‌ی خالص در غلظت‌های بالا و مناسب، از عصاره و همچنین RNA حاصل از ارقام خیار آلوده استفاده گردید. ویروئید کوتولگی رازک در ناحیه حفاظت شده داخلی (CCR) ژنوم خود دارای یک محل برش (restriction site) اختصاصی جهت آنزیم برشی (restriction enzyme) *Sma*I می‌باشد، به همین دلیل در ابتدای جفت آغازگرهای مذکور یک محل برش جهت این آنزیم در نظر گرفته شده است و آغازگرهای رفت و برگشت نسبت به هم حالت هم‌پوشان (overlap) داشته و طول تکثیر شده ده نوکلئوتید بلندتر از طول حقیقی ویروئید می‌باشد. این ارقام خیار توسط قطعه DNA مکمل تک پار HSVd آلوده و سپس به منظور آلوده‌سازی پایه‌های پسته استفاده گردیدند. نتایج حاصل از آزمون‌های انتقال مکانیکی بیانگر انتقال HSVd به عنوان یک عامل آلوده کننده گیاه پسته با راندمان بالا به پایه‌های مورد نظر گیاهان پسته می‌باشد. نتایج این تحقیق، مشابه نتایج Garnsey & Whidden (۱۹۷۳) و Roistacher *et al.* (۱۹۸۳)، تأیید کننده کارایی بالای روش برشی جهت انتقال این ویروئید به گیاهان چوبی و درختی است. انتقال از طریق تزریق RNA یا عصاره آلوده با استفاده از سرنگ به عنوان یکی از روش‌های عمده و مهم انتقال ویروئید کادانگ کادانگ نارگیل (*Coconut cadang-cadang viroid*) جهت ایجاد آلودگی در این گیاه گرمسیری گزارش شده است (Hanold & Randles, 1998; Hodgson *et al*., 1998; Imperial *et al*., 1985). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان‌دهنده‌ی کارایی مناسب این روش جهت انتقال HSVd به نهال‌های پسته می‌باشد.

ویروئید کوتولگی رازک به‌عنوان عامل بیماری کاچکسیا مرکبات شناخته می‌شود (Reanwarakorn &

Semancik, 1999). در یک مطالعه، Al Rwahnih *et al.* (۲۰۱۸) نیز ویروئید ترک‌خوردگی پوست مرکبات را از گیاهان پسته کشور آمریکا (در مواردی از ارقامی با منشاء ایرانی) گزارش نمودند. علاوه بر ویروئید کوتولگی رازک، تاکنون ویروئیدهای اگزوکورتیس مرکبات، کوتولگی مرکبات (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd) و تاخوردگی برگ مرکبات از ایران گزارش گردیده‌اند (Ebrahimi Moghadam *et al.*, 2014). با در نظر گرفتن پاتوژن ویروئیدی آلوده کننده گیاهان مرکبات از گیاه پسته، و همچنین گسترش کشت‌وکار وسیع گیاهان پسته و مرکبات در سطح کشور، از جمله استان کرمان، توجه به این مسئله از لحاظ امکان انتقال عوامل ویروئیدی دیگر به گیاه پسته لازم می‌باشد.

شناسایی ارقام مقاوم و متحمل نسبت به بیماری‌های گیاهی از جمله در زمینه ویروس‌های گیاهی از سابقه و اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. در این زمینه می‌توان به معرفی پایه‌ی نارنج (Scion/rootstock combination) متحمل به ویروئید اگزوکورتیس مرکبات، پایه‌ی *Poncirus trifoliata* متحمل به ویروس تریستزای مرکبات، پایه‌ی پرتقال ترش (Sour orange) متحمل به ویروئید کوتولگی رازک (واریانت‌های گروه CVd-IIb) و ارقام سیب Golden Delicious و یا Granny Smith متحمل به ویروئید پوست پینه‌ای سیب اشاره نمود (Koganezawa *et al.*, 2003; Lee, 2015). همچنین برخی از ویروس‌ها و ویروئیدهای مرکبات در ارقام پایه و پیوندک دارای آلودگی پنهان می‌باشند و ظهور علائم بستگی به ترکیب پایه/پیوندک استفاده شده دارد (Bani-Hashemian *et al.*, 2010; Lee, 2015). در این بررسی در رقم اکبری هیچگونه آلودگی نسبت به HSVd مشاهده نگردید، اگر چه تعداد بوته‌های مورد بررسی حدود ۱۰ درصد از کل درختان مورد آزمایش بودند. رقم اکبری از ارقام سریع‌الرشد می‌باشد. بنابراین، این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. باتوجه به مطالب مذکور، انجام تحقیقات تکمیلی جهت ارزیابی میزان تحمل ارقام مختلف پسته و بیان ویروئید کوتولگی رازک در این گیاهان، به‌خصوص بررسی ترکیب‌های متفاوت پایه/پیوندک، نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

نتیجه‌گیری کلی

تاکنون سه عامل ویروسی و ویروئیدی (شبه‌ویروسی) شامل *Pistachio ampelovirus A*، ویروئید ترک‌خوردگی پوست مرکبات و ویروئید کوتولگی رازک از درختان پسته در دنیا (کشورهای تونس، ایران و آمریکا) گزارش گردیده‌اند (Elleuch *et al.*, 2013; Al Rwahnih *et al.*, 2018; Maddahian *et al.*, 2019). طی بررسی‌ها و نمونه‌برداری‌های صورت گرفته در این تحقیق نیز، علائم شبه ویروسی و ویروئیدی در باغ های پسته استان مشاهده شدند که تنها آلودگی یا عدم آلودگی آن‌ها نسبت به

HSVd بررسی گردید. این مسئله به ویژه از آن جهت قابل توجه می‌باشد، که علائم برخی از بیماری‌های مهم ویروئیدی از قبیل اگزوکورتیس مرکبات، در ابتدا با عوامل فیزیولوژیکی ارتباط داده شده بود (Reichert & Perlberger, 1934; Moreira, 1938). از آنجایی که منشاء احتمالی آلودگی گیاه پسته به HSVd در کشور تونس ارقام ایرانی پسته و کشور ایران می‌باشد (Maddahian *et al.*, 2019) و همچنین با در نظر گرفتن جداسازی دو عامل ویروسی و ویروئیدی دیگر (PAVA و CBCVd) از ارقام پسته با منشاء ایرانی مانند دامغان، کرمان، بادامی و Iran Larg از باغ های پسته آمریکا، لزوم تحقیقات بیشتر را در ارتباط با وجود عوامل ویروسی – ویروئیدی، به‌عنوان یک پدیده نوظهور و جدید مرتبط با گیاه پسته در کشور را یادآوری می‌نماید (Al Rwahnih *et al*, 2018). با شناخت و معرفی عوامل ویروسی - ویروئیدی در ارتباط با این گیاه و اهمیت این گروه از عوامل بیماری‌زا در ارتباط با گیاهان چند ساله و درختان میوه، می‌بایست این مسئله از سوی مراکز تحقیقاتی و اجرایی مرتبط با صنعت پسته کشور در مواردی از جمله مدیریت و قرنطینه، پیشگیری، رعایت نکات مربوط به بهداشت زراعی و سلامت مواد گیاهی جهت جلوگیری از گسترش و ایجاد خسارت احتمالی توسط این گروه از پاتوژن‌های گیاهی مد نظر قرارگیرند. تلفیق و استفاده همزمان از آزمون‌های زیست‌سنجی و مولکولی می‌تواند در این راستا مورد توجه قرار گیرد. لذا کاربرد ابزارهای تشخیصی از قبیل گیاهان شناساگر و آزمون‌های PCR جهت شناسایی مناطق آلوده و جلوگیری از گسترش این عوامل به مناطق سالم از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند.

سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی به دلیل فراهم آوردن امکانات انجام این پروژه (طرح پژوهشی شماره۹۰۰/۱۰۶/پ) قدردانی می‌نمایند.

منابع

1- Adams, AN, Barbara, DJ, Morton, A, Darby, P, & Green, CP. (1995). The control of hop latent viroid in UK hops. *Acta Horticulturae, 385*, 91-97.

2- Al Rwahnih, M, Rowhani, A, Westrick, N, Stevens, K, Diaz-Lara, A, Trouillas, F, Preece, JE, Kallsen, CE, Farrar, K, & Golino, AD. (2018). Discovery of viruses and virus-like pathogens in pistachio using high-throughput sequencing. *Plant Disease, 102*, 1419-1425.

3- Amari, K, Gomez, G, Myrta, A, Di Terlizzi, B, & Pallás, V. (2001). The molecular characterization of 16 new sequence variants of Hop stunt viroid reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *Journal of General Virology, 82*, 953-962.

4- Astruc, N, Marcos, JF, Macquaire, G, Candresse, & T, Pallas, V (1996). Studies on

5- Bani-Hashemian, SM, Barbosa, CJ, Serra, P, & Duran-Vila, N. (2010). Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. *Plant Pathology, 59*, 413-421.

6- Barbosa, CJ, Pina, JA, Pérez-Panadés, J, Bernad, L, Serra, P, Navarro, L, & Duran-Vila, N. (2005). Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease, 89*, 749-754.

7- Diener, TO. (1987). Potato spindle tuber. pp. 221-233, In: TO, Diener (eds.), The Viroids. Plenum Press, New York, NY

8- Ebrahimi Moghadam, L, Bani-Hashemian, SM, Elahi Nia, SA, & Bani-Hashemian, SN. (2014). Identification of citrus viroids in commercial citrus varieties by molecular techniques. *Journal of Plant Protection, 28*, 250-253.

9- Elbeaino, T, Abou Kubaa, R, Choueiri, E, Digiaro, M, & Navarro, B (2012a). Occurrence of hop stunt viroid in Mulberry (Morus alba) in Lebanon and Italy. *Journal of Phytopathology, 160*, 48-51.

10- Elbeaino, T, Abou Kubaa, R, Ismaeil, E, Mando, J, & Digiaro, M. (2012b). Viruses and hop stunt viroid of fig trees in Syria. *Journal* of *Plant Pathology*, *94*, 687-691.

11- Elleuch, A, Hamdi, I, Ellouze, O, Ghrab, M, Fkahfakh, H, & Drira, N. (2013). Pistachio (*Pistacia vera* L.) is a new natural host of *Hop stunt viroid*. *Virus Genes, 47*, 330-337.

12- Flores, R, Randles, JW, Bar-Joseph, M, & Diener, TO. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology, 143*, 623-629.

13- Garnsey, SM, & Whidden, R. (1973). Efficiency of mechanical inoculation procedures for citrus exocortis viroids. *Plant Disease Report*, *57*, 886-889.

14- Hadidi, A, Flores, R, Randles, JW, & Palukaitis, P. (2017). Viroids and Satellites. Academic Press is an imprint of Elsevier. 716 pp.

15- Hammond, RW, & Owens, RA. (2006). Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet Features.

16- Hanold, D, & Randles, JW. (1998). Report on ACIAR-funded research on viroids and viruses of coconut palm and other tropical monocotyledons 1985-1993. ACIAR Monograph No. 45. ACIAR, Canberra. Available at http: // www.aciar.gov.au/node/7321

17- Hataya, T, Tsushima, T, & Sano, T. (2017). Hop Stunt Viroid. pp 199-210, In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles, P, & Palukaitis, P. (eds.), Viroids and Satellites, Elsevier Academic Press, Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00019-X.

18- Hodgson, RAJ, Wall, GC, & Randles, JW. (1998). Specific identification of *Coconut tinangaja viroid* for differential diagnosis of viroids in coconut palm. *Phytopathology*, *88*, 774-781.

19- Imperial, JS, Bautista, RM, & Randles, JW. (1985). Transmission of the *Coconut cadang-cadang viroid* to six species of palm by 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 solvants. *European Journal of Plant Pathology*, *102*, 837-846.

inoculation with nucleic acid extracts. *Plant Pathology*, *34*, 391-401.

20- Kapari-Isaia, T, Kyriakou, A, Papayiannis, L, Tsaltas, D, Gregoriou, S, & Psaltis, I. (2008). Rapid in vitro microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology*, *57*, 348-353.

21- Kofalvi, SA, Marcos, JF, Canizares, MC, Pallás, V, & Candresse, T. (1997). *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from Prunus species: evidence for recombination between HSVd isolates. *Journal of General Virology*, *78*, 3177-3186.

22- Koganezawa, H, Yang, X, Zhu, SF, Hashimoto, J, & Hadidi, A. (2003). *Apple scar skin viroid* in apple. pp. 137-141, In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles & JS, Semancik (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, Australia.

23- Lee, RF. (2015). Control of virus diseases of citrus. *Advances in Virus Research, 91*, 143-173.

24- Maddahian, M, Massumi, H, Heydarnejad, J, Hosseinipour, A, Khezri, A, & Sano, T. (2019). Biological and molecular characterization of hop stunt viroid variants from pistachio trees in Iran. *Journal of Phytopathology, 167*, 163-173.

25- Matousek, J, Orctova, L, Patzak, J, Svoboda, P, & Ludvikova, I. (2003). Molecular sampling of *Hop stunt viroid* (HSVd) frm grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant, Soil and Environment*, *49*, 168-175.

26- Moreira, S. (1938). Xyloporosis. *Hadar, 11*, 234-237.

27- Nie, X, & Singh, RP. (2017). Viroid Detection and Identification by Bioassay. pp 347-356. In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles, P, Palukaitis. (eds.), Viroids and Satellites, Elsevier Academic Press. pp 347-356.

28- Polivka, H, Staub, U, & Gross, HJ. (1996). Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *Journal of General Virology*, *77*, 155-161.

29- Randles, JW. (2003). Economic impact of viroid diseases. pp. 3-11, In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles & JS, Semancik (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, VIC.

30- Raymer, WB, & O'Brien MJ. (1962). Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. *American potato journal, 39*, 401-408.

31- Reanwarakorn, K, & Semancik, JS. (1999). Discrimination of cachexia disease agents among citrus variants of *Hop stunt viroid*. *Annals of Applied Biology*, *135*, 481-487.

32- Reichert, I, & Perlberger, J. (1934). Xyloporosis, the new citrus disease. *Agricultural Experiment Station Rehoboth Palestine Bull, 12*, 49.

33- Roistacher, CN. (1996). Indexing for viruses in citrus. Pages 301-319, In: A, Hadidi, RK, Khetarpal, & H, Koganezawa (eds.), Plant virus disease control, APS Press: St. Paul, MN.

34- Roistacher, CN, Gumpf, DJ, Nauer, EM, & Gonzales, R. (1983). Cachexia disease: virus or viroid. *Citrograph, 68*, 111-113.

35- Sano, T. (2003a). *Hop stunt viroid* in plum and peach. pp. 165-167, In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles, & JS, Semancik (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

36- Sano, T. (2003b). *Hop stunt viroid*. pp. 207-212. In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles, &

JS, Semancik (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

37- Sano, T, Hataya, T, Terai, Y, & Shikata, E. (1989). Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *Journal of General Virology, 70*, 1311-1319.

38- Sasaki, M, Fukamizu, K, Yamamoto, T, Ozawa, M, Kurokawa, M, & Kagami, Y. (1989). Epidemiology and control of hop stunt disease. *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases*, 165-178.

39- Semancik, JS. (2003). Host considerations. pp. 87-88. In: A, Hadidi, R, Flores, JW, Randles, & JS, Semancik, (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

40- Semancik, JS, & Vidalakis, G, (2005). The question of citrus viroid IV as a cocadviroid. *Archives of Virology*, *150*, 1059-1067.

41- Shikata, E. (1990). New viroids from Japan. *Seminars in Virology, 1*, 107-115.

42- Sharifi, M, Massumi, H, Heydarnejad, J, Hosseini Pour, A, Shaabanian, M, & Rahimian, H. (2008). Analysis of biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. *Virus Genes, 37*, 304-313.

43- Singh, RP, Ready, KFM. (2003). Biological indexing. pp. 89-94. In: A, Hadidi, R, Flores, JW Randles & JS, Semancik (eds.), Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

44- Van Dorst, HJM, & Peters, D. (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology, 80*, 85-96.

45- Verhoeven, JTJ, Botermans, M, Jansen, CCC, & Roenhorst, JW. (2011). First report of *Pepper chat fruit viroid* in capsicum pepper in Canada. *New Disease Report, 23*, 15.

46- Yang, Y, Wang, HQ, Wu, ZJ, Cheng, ZM, & Li SF. (2008). Molecular variability of *Hop stunt viroid*: identification of a unique variant with a tandem 15-nucleotide repeat from naturally infected plum tree. *Biochemical Genetics, 46*, 113–123.

47- Yazarlou, A, Jafarpour, B, & Tarighi, S. (2012). New Iranian and Australian peach *Latent Mosaic Viroid* variants and evidence for rapid sequence evolution. *Archives of Virology, 157*, 343-347.

48- Zhang, BL, Liu, GY, Liu, CQ, Wu, ZJ, Jiang, DM, & Li, SH. (2009). Characterization of hop stunt viroid (HSVd) isolates from jujube trees (*Ziziphus jujuba*). *European Journal of Plant Pathology, 125*, 665-669.

Hop stunt viroid Distribution in Pistachio Gardens of Kerman Province and Evaluating the Mechanical Transmission and Reaction of Two Pistachio Rootstocks to this Viroid

Abstract

Hop stunt viroid (HSVd) infects a large number of woody plants such as grapevine, citrus, plum, peach, fig, mulberry, pear, pistachio, and almond. Kerman province is the most major pistachio-growing region in Iran. During 2015–2016, pistachio cultivars were surveyed in the province to detect HSVd. A total of 106 asymptomatic and symptomatic leaf samples showing mosaic, yellowing, and chlorosis symptoms were collected from pistachio trees and assayed for the HSVd infection by reverse transcription polymerase chain reaction, and dot-blot hybridization. Results showed that four pistachio cultivars (Momtaze, Kalleh-Ghouchi, Ohadi, Ahmad-aghaei) are infected by HSVd, while no HSVd infection was detected in the Akbari cultivar. In this study, bioassay tests including the mechanical transmission of viroid to pistachio rootstocks were used to evaluate the biological characteristics of Iranian HSVd pistachio variants. The infectivity of one HSVd variant (Ker.Ana.P1) was further verified by mechanical inoculation. The viroid variant was transmitted to two different healthy pistachio rootstocks (Badami, University of California Berkeley I (UCB-1)) using infected sap by three inoculation methods i.e. slashing, rubbing, and RNA injection. Results indicated that all three methods cause infection of the pistachio rootstocks with HSVd. However, the slashing inoculation showed higher transmission efficiency in Badami and UCB-1 at the rate of 86.67 and 80 percent, respectively. According to this study, it seems that HSVd infection is increasing on pistachio trees in Kerman province due to lack of attention to sanitary measures during agricultural operations such as pruning, which leads to transmission of disease agents like viroids.

Keywords: Biological indexing, Pistachio cultivars, Prokaryotes