اثبات بیماری زایی ژنوم همسانه سازی شده جدایه‌ی ایرانی ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندرقند در میزبان های آزمایشگاهی

Infectivity of the cloned genome of Iranian isolate of beet severe curly top virus in experimental hosts

غزال عبادزاد صحرائی، سید علی اکبر بهجت نیا*و کرامت اله ایزدپناه

مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت ۱۳۸۶/۴/۱۰ پذیرش ۸۷/۹/۶

چکیده

بمنظور ساخت همسانه‌ی عفونت زا و اثبات بیماری زایی ژنوم کامل جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندرقند (BSCTV-Ir) ابتدا قطعه ۱۹۴۲ جفت بازی (معادل ۷/ . ژنوم) در حامل pTZ57R همسانه سازی و سپس ژنوم کامل ویروس به آن متصل گردید تا سازه حاوی ۱/۷ ژنوم ویروس به دست آید. این سازه پس از اتصال به حامل دوتائی pBin20 به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل و از این طریق به چند گیاه مختلف مایه زنی گردید. علائم تیپیک آلودگی ۳۰ تا ۳۵ روز پس از مایه زنی در چغندر قند ظاهر شد. گوجه فرنگی، اسفناج و تاتوره (*Datura stramonium*) نیز علائم زردی و پیچیدگی برگ از خود نشان دادند. وجود ویروس در گیاهان مزبور با تکثیر قطعه ای از ژن پروتئین پوششی با استفاده از آغازگر های اختصاصی تایید گردید. وجود این همسانه عفونت زا زمینه را برای انجام تحقیقات بعدی در مورد این ویروس فراهم می سازد.

واژه های کلیدی: جمینی ویروس، ویروس پیچیدگی بوته چغندرقند، ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندرقند، همسانه عفونت زا، *Curtovirus*

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری پیچیدگی بوته یا کرلی‌تاپ یکی از بیماری های مهم اقتصادی چغندرقند است که توسط دست کم چهار گونه ویروس از جنس *Curtovirus* (تیرهٔ *Geminiviridae*) شامل *Beet curly top virus* (BCTV)، *Beet severe curly top virus* (BSCTV)، *Beet mild curly top virus* و *Spinach curly top virus* ایجاد می‌شود (Stenger 1998, Baliji *et al*. 2004). در ایران یک جدایه ازBSCTV (BSCTV-Ir) و ویروس جدیدی به نام ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند (Beet curly top Iran virus) گزارش و تعیین ترادف شده‌اند (Bolok Yazdi *et al*. 2008, Briddon *et al*. 1998).

مطالعه بر روی ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند و سایر جمینی ویروس ها به دلیل عدم امکان انتقال آسان و سریع آنها و ضرورت استفاده از حشرات ناقل برای انتقال، در گذشته با مشکل روبرو بوده است. تولید همسانه عفونت زای این ویروس ها که معمولاً بصورت کپی‌های دو پار (dimeric) و یا حتی دو پار ناقص (partial dimeric) از ژنوم ویروس در بین قلمروهای T-DNA حامل‌های دو گانه *Agrobacterium tumefaciens* (Grimsley *et al*. 1986; Elmer *et al*. 1988, Rigden *et al*. 1996) ساخته می شوند نه تنها کار انتقال ویروس ها را آسان می کند بلکه امکانات لازم برای مطالعات ژنتیکی از جمله تولید و آزمایش گیاه مقاوم را نیز فراهم می سازد. تحقیق حاضر به منظور تهیه سازه عفونت زای BSCTV-Ir و انتقال آن به گیاه به روش agroinoculation صورت گرفته است.

روش بررسی

ژنوم کامل BSCTV-Ir تهیه شده در حامل باکتریوفاژ M13mp18 (رس شمار X97203 در بانک ژن) (Briddon *et al*. 1998) با آنزیم *Sph*I از M13mp18 جدا و به حامل pTZ57R (Fermentas) که دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بود متصل شد. نام pTZ1.0 BSCTV-Ir برای سازه حاصل انتخاب گردید. برای ساخت همسانه عفونت زایBSCTV-Ir ، ابتدا قطعه۱۹۴۲ جفت بازی دی.ان.ای ویروس از pTZ1.0 BSCTV-Ir جدا و در جایگاه های *Eco*RI /*Sph*I پلاسمید pTZ57R همسانه سازی گردید تا پلاسمید نوترکیب pTZ0.7BSCTV-Ir حاوی ۷/ . ژنوم ویروس حاصل گردد. سپس ژنوم کامل BSCTV-Ir که در محل *Sph*I برش داده شده بود

Archive of SID

www.SID.ir

به pTZ0.7BSCTV-Ir چسبانیده گردید تا سازه pTZ1.7BSCTV-Ir حاوی ۱/۷ ژنوم ویروس ساخته شود. این سازه بر خلاف سازه pTZ1.0BSCTV-Ir حاوی چارچوب ژنی C1 ویروس به طور کامل است. جهت تکثیر چارچوب ژنی C1 که صحیح بودن سازه pTZ1.7BSCTV-Ir را نشان می داد از آغازگر های $BSCTVC_1F$ (5′-TGAAGCTTTACAAGGAAGTTTGATC-3′) و $BSCTVC_1R$ (5′-ACGAGCTCCCTTTTTACAAAAAAGCC-3′) در واکنش PCR استفاده شد. پس از اطمینان از صحت سازه pTZ1.7BSCTV-Ir، این سازه به جایگاه آنزیم *Hind* III حامل دو گانه pBin20 اتصال داده شد تا سازه pBin1.7BSCTV-Ir ساخته شود. . این همسانه به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 انتقال یافت.

بیماری‌زا بودن سازه pBin1.7BSCTV-Ir با مایه زنی گیاهچه‌های چغندرقند، گوجه‌فرنگی، تاتوره (*Datura stramonium*) و اسفناج با استفاده از روش agroinoculation صورت گرفت. این کار با کشت باکتری *A. tumefaciens* محتوی سازه pBin1.7BSCTV-Ir و تزریق باکتری به جوانه‌های جانبی و طوقه گیاهان سالم انجام شد . بعد از گذشت ۳۰ تا ۳۵ روز از زمان تلقیح علائم حاصل در گیاهان مایه زنی شده مورد بررسی قرار گرفت و وجود دی. ان. ا ویروس در گیاهان با انجام PCR و استفاده از آغازگر های $BSCTV\text{-}IrV_1V$ (5′-AGAAAATATACAAGAAATC-3′) و $BSCTV\text{-}IrV_1C$ (5′-TTAATAAAAATAACATCTAC-3′) که قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی ویروس را تکثیر می نمود بررسی شد.

نتیجه

انتقال ژنوم کامل BSCTV-Ir با ۲۹۲۳ جفت باز از حامل M13mp18 به سایت برشی *Sph*I در حامل pTZ57R با موفقیت انجام شد و سازه pTZ1.0BSCTV-Ir ساخته شد. در نتیجه هضم آنزیمی همزمان این سازه با آنزیم های *Sph*I و *Eco*RI قطعه هایی با اندازه های ۹۸۱ و ۱۹۴۲ جفت باز مربوط به ویروس و قطعه ای با اندازه ۲۸۸۶ جفت باز مربوط به حامل ایجاد شد (شکل 1A). قطعه ۱۹۴۲ جفت بازی ویروس از ژل استخراج و خالص گردید و به کمک آنزیم لیگاز به حامل pTZ57R که با آنزیم های *Sph*I و *Eco*RI برش داده شد بود متصل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

درستی سازه حاصل (pTZ0.7BSCTV-Ir) با استفاده از هضم آنزیمی همزمان آن با آنزیم های *Sph*I و *Eco*RI که نتیجه آن آزاد شدن قطعه ۱۹۴۲ جفت بازی از این سازه بود تایید شد (شکل ۱B).

در مرحله بعد اتصال قطعه کامل ژنوم BSCTV-Ir به سایت برشی *Sph*I سازه pTZ0.7BSCTV-Ir انجام شد. نتیجه این کار ساخت سازه pTZ1.7BSCTV-Ir بود که حاوی قطعه کامل ژنوم و قطعه تکراری ۱۹۴۲ جفت بازی ویروس است. با هضم آنزیمی این سازه با آنزیم های *Eco*RI و *Sph*I هر کدام به تنهایی قطعه کامل ژنوم ویروس باندازه ۲۹۲۳ جفت باز از سازه جدا شد (شکل ۱C راهک های ۶-۱). در حالی که با هضم آنزیمی همزمان سازه با *Eco*RI و *Sph*I می بایستی قطعات ۱۹۴۲ جفت بازی و ۹۸۱ جفت بازی ویروس آزاد شود که به همین ترتیب بر روی ژل مشاهده شد (شکل ۱C راهک های ۹-۷). با استفاده از آغازگرهای$BSCTVC_1F$ و $BCTVC_1R$ چارچوب ژنی C1 ویروس با اندازه ۱۰۵۸ جفت باز از سازه pTZ1.7BSCTV-Ir تکثیر شد که تایید بیشتری بر درستی سازه ساخته شده بود (شکل ۱D).

سازه pTZ1.7BSCTV-Ir پس از هضم توسط آنزیم *Hind* III به حامل دو تایی pBin20 بریده شده با همین آنزیم با موفقیت متصل شد تا سازه pBin1.7BSCTV-Ir که حاوی پلاسمید pTZ57R نیز بود ساخته شود. با هضم همزمان این سازه با آنزیم های *Eco*RI و *Hind* III ، قطعه ۱۹۴۲ و ۲۹۲۳ جفت بازی مربوط به ویروس، قطعات ۳۱۰ و ۱۲۰۰۰ جفت بازی مربوط به حامل pBin20 و قطعه ۲۸۸۶ جفت بازی مربوط به حامل pTZ57R حاصل شد که درستی سازه pBin1.7BSCTV-Ir را تأئید نمود (شکل ۱E).

عفونت زا بودن سازه pBin1.7BSCTV-Ir با مایه زنی دو عدد گیاهچه از هر یک از گونه‌های مختلف گیاهی مورد آزمایش با اگروباکتریوم های حاوی این سازه امتحان شد. ۳۰ تا ۳۵ روز بعد از مایه زنی علائم تیپیک بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند شامل پیچیدگی شدید برگها و تورم زگیل مانند بر روی رگبرگ ها در برگ های جوان هر دو گیاهچه چغندر قند مشاهده شد. لوله شدن و راست ایستادن برگها و کاهش رشد از دیگر علائم بود (شکل ۲A , B). بدین وسیله بیماری زائی همسانه ساخته شده به اثبات رسید. در هر دو

Archive of SID

www.SID.ir

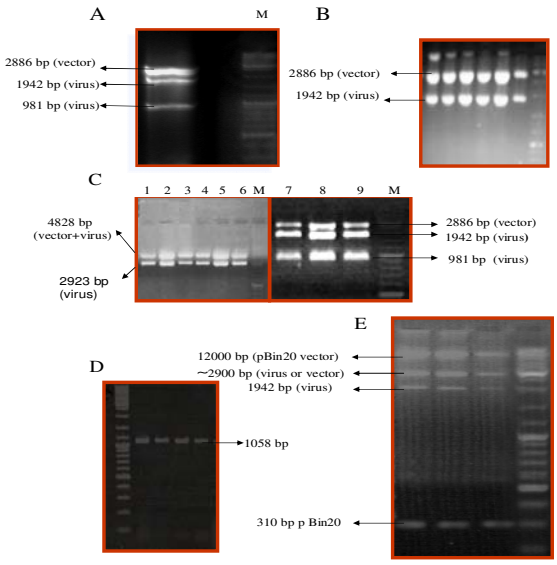
گیاهچه گوجه فرنگی علائم پیچیدگی برگها، کوچک شدن برگهای انتهائی، زردی و کوتولگی بوته مشاهده شد (شکل ۲C) . علائم بر روی دو بوته اسفناج به صورت پیچیدگی و مجتمع شدن برگ های میانی بوته، ضعف بوته ها، تورم خفیف رگبرگ و زردی (شکل ۲D) و بر روی دو بوته تاتوره بصورت زردی و پیچیدگی برگ های جوان مشاهده شد (شکل ۲E). وجود دی.ان.ای ویروس در گیاهان مایه زنی شده با تکثیر قطعه ای ازپروتئین پوششی ویروس با اندازه ۷۶۱ جفت باز با استفاده از آغازگر های BSCTV-IrV$_1$V و BSCTV-IrV$_1$C تایید شد (شکل ۲F).

در این تحقیق به منظور کارایی بیشتر همسانه عفونت زای BSCTV-Ir ساخت همسانه به نحوی طراحی شد که حاوی دو منشاء همانند سازی باشد . در این حالت پس از انتقال همسانه عفونت زا به گیاه ، ژنوم ویروس از طریق فرایند همانندسازی دایره غلتان که در آن همانند سازی از یک منشاء همانندسازی آغاز می شود و در منشاء همانند سازی دیگر ختم می گردد در گیاه آزاد می شود (Rigden *et al*. 1996). حامل دوگانه حاوی نسخه های تکراری ژنوم جمینی ویروس ها منتهی با یک نسخه از منشاء همانندسازی نیز در گیاه میزبان بیماری زا است. در چنین مواردی نوترکیبی خودی (homologous recombination) در آزاد سازی دی.ان.ای ویروس نقش دارد. این همسانه ها در مقایسه با همسانه ای که حاوی دو منشاء همانند سازی باشد راندمان آلودگی زایی کمتری دارند و در یک زمان واحد مقدار کمتری از فرمهای مختلف دی. ان. ا شامل ssDNA و dsDNA replicative را تولید می‌نمایند (Rigden, *et al*. 1996).

با انتقال همسانه عفونت زای BSCTV-Ir به استرین های خاصی از آگروباکتریوم ، منبع نامحدودی از مایه ویروس به دست می آید که در مواقع مورد نیاز مقدار کمی از باکتری جهت ایجاد آلودگی کافی می باشد. علاوه بر تعیین میز بان های ویروس، از این همسانه می توان به عنوان یک وسیله برای بررسی نقش ژن های ویروس، بررسی مقاومت ارقام مختلف چغندرقند، بررسی و ارزیابی مقاومت گیاهان تراژن حاصل از انتقال ژنهای ویروس به گیاهان میزبان، مطالعات خاموشی ژن (gene silencing) و موارد دیگر استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

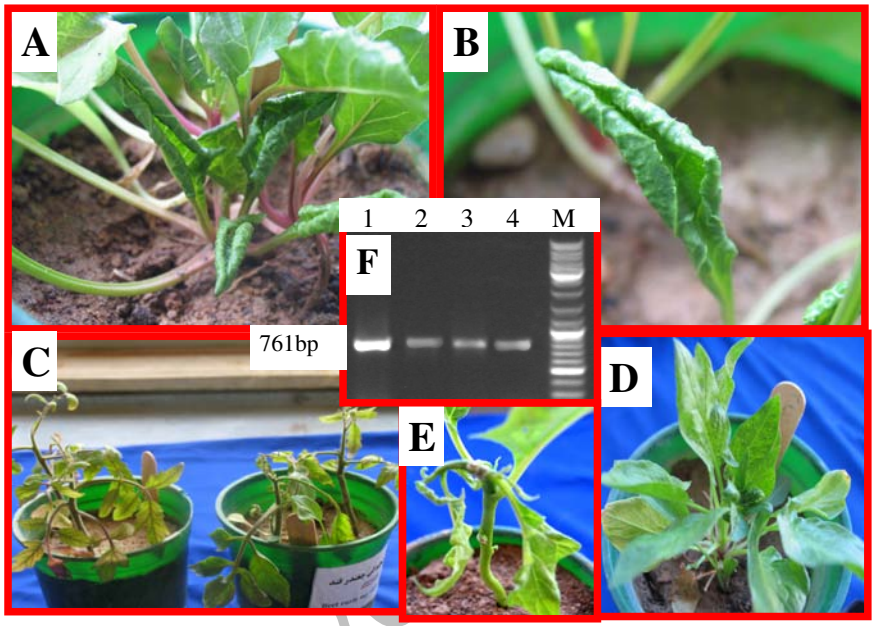


شکل ۱- نقوش الکتروفورزی (A) قطعات DNA حاصل از هضم سازه pTZ1.0BSCTV-Ir با آنزیم های *Sph*I و *Eco*RI ، (B) قطعات DNA حاصل از هضم ۶ سازه pTZ0.7BSCTV-Ir با آنزیم های *Sph*I و *Eco*RI ، (C) قطعات DNA حاصل از هضم سازه های pTZ1.7BSCTV-Ir با آنزیم های برشی *Sph*I به تنهایی (راهک های۱ تا ۳)، *Eco*RI به تنهایی (راهک های ۴ تا ۶) و همزمان آنزیم های *Eco*RI و *Sph*I (راهک های ۷ تا ۹) ، (D) محصول PCR چار چوب ژنی C1، تکثیر شده از سازه های pTZ1.7BSCTV-Ir با آغازگر های $BSCTVC_1F$ و $BSCTVV_1R$ و (E) قطعات DNA حاصل از هضم سازه های pBin1.7BSCTV-Ir با آنزیم های برشی *Hind* III و *Eco*RI. M=marker.

Fig. 1. Electrophoretic patterns of (A) DNA fragments released from a pTZ1.0BSCTV-Ir construct digested with *Sph*I and *Eco*RI, (B) DNA fragments released from 6 pTZ0.7BSCTV-Ir constructs digested with *Sph*I and *Eco*RI, (C) DNA fragments released from 3 pTZ1.7BSCTV-Ir constructs digested with *Sph*I (lanes 1-3), *Eco*RI (lanes 4-6) and *Sph*I plus *Eco*RI (lanes 7-9), (D) C1 ORF DNA fragment amplified from 4 pTZ1.7BSCTV-Ir constructs using $BSCTVC_1F$ and $BSCTVV_1R$ primers and (E) DNA fragments released from pBin1.7BSCTV-Ir constructs digested with *Hind* III and *Eco*RI. M=marker.

Archive

www.SID.ir



شکل ۲- کاهش رشد، لوله شدن و راست ایستادن برگها و تورم زگیل مانند رگبرگ ها در پشت برگ‌های چغندر قند (A و B)؛ پیچیدگی برگها، کوچک شدن برگهای انتهائی، زردی و کوتولگی بوته در گوجه فرنگی (C)؛ پیچیدگی و مجتمع شدن برگ های میانی بوته در اسفناج (D)؛ و زردی و پیچیدگی برگ ها در تاتوره (E) ناشی از مایه زنی همسانه عفونت‌زای BSCTV-Ir به این گیاهان. (F) تکثیر پروتئین پوششی BSCTV-Ir با استفاده از آغازگر های BSCTV-IrV$_1$V و BSCTV-IrV$_1$C در گیاهان مایه زنی شده چغندر قند (راهک ۱)، گوجه فرنگی (راهک ۲)، اسفناج (راهک ۳) و تاتوره (راهک ۴).

Fig. 2. Typical symptoms induced by BSCTV-Ir infectious clone in experimentally agroinfected plants (A and B) stunting, leaf rolling, erect leaves and vein swelling in beet; (C) leaf curling, small leaves, yellowing and bunchy growth in tomato; (D) leaf curling and bunchy growth in spinach; (E) leaf curling and yellowing in Jimson weed; (F) Amplification of BSCTV-Ir coat protein DNA fragment in PCR using BSCTV-IrV$_1$V and BSCTV-IrV$_1$C primers from agroinoculated beet (lane 1), tomato (lane 2), spinach (lane 3) and Jimson weed (lane 4) plants.

Archive

www.SID.ir

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (45-44) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: غزال عبادزاد صحرائی، سید علی اکبر بهجت نیا و کرامت اله ایزدپناه، مرکز تحقیقات ویروس‌ناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Archive of SID

www.SID.ir