اثبات بیماری زایی ژنوم همسانه‌سازی شده، انتقال و دامنه میزبانی جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی*

سید علی‌اکبر بهجت نیا[۱]**، امید عینی گندومانی[۲] و رسول رسول‌پور[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۲۷)

چکیده

جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی است که توسط سفید بالک انتقال می‌یابد. به‌منظور اثبات بیماری‌زایی ژنوم کامل این ویروس یک همسانه ۱/۵ برابر ژنوم در حامل دوگانه pBin19 ساخته شد و به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل و از این طریق به گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، توتون، تاتوره و چند گیاه دیگر مایه‌زنی گردید. علائم خفیف شامل پیچیدگی خفیف برگ‌ها و زردی آنها ۳۰ تا ۴۵ روز بعد از زمان مایه‌زنی در گیاهان گوجه‌فرنگی مشاهده شد و بدین‌وسیله بیماری‌زایی دی ان ای همسانه‌سازی شده ویروس به اثبات رسید. فاز بعدی علائم شامل باریک شدن ساقه‌های جوان، رشد برگ‌های ریز و پیچیدگی برگ‌ها ۳-۲ ماه بعد از زمان مایه‌زنی در همان گیاهان گوجه‌فرنگی بروز نمود. علائم شدید پیچیدگی برگ‌ها به‌همراه کوچک ماندن آنها در *Nicotiana benthamiana* نیز مشاهده شد. هیچ‌گونه علائم، روی دیگر گیاهان مایه‌زنی شده دیده نشد ولی آزمایش‌های هیبریداسیون نقطه‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به ترتیب با استفاده از شناسگر و آغازگرهای اختصاصی TLCV-Ir وجود دی ان ای ویروس را در گیاهان توتون و تاتوره به اثبات رساند و نشان داد که این گیاهان میزبان‌های فاقد علائم TLCV-Ir می‌باشند. براساس دامنه میزبانی، زمان ظهور و میزان شدت علائم در گیاهان میزبان در مقایسه با یک جدایه شدید ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی مانند جدایه استرالیایی این ویروس به‌نظر می‌رسد که TLCV-Ir یک جدایه خفیف باشد. در همین مطالعه انتقال TLCV-Ir از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده به روش Agroinoculation توسط یک عدد سفید بالک *Bemisia tabaci* بالغ به گیاهان سالم گوجه‌فرنگی میسر گردید و علائم تیپیک بیماری در آنها ظاهر شد. همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir منبع نامحدودی از ویروس برای مایه‌زنی گیاه و ارزیابی مقاومت ارقام و مطالعات دیگر فراهم کرده است.

واژه‌های کلیدی: جمینی ویروس، جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی، همسانه عفونت‌زا، انتقال، سفید بالک توتون

مقدمه

بیماری پیچیدگی برگ (leaf curl) گوجه‌فرنگی یکی از بیماری‌های مهم و خسارت‌زای این محصول در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان است که توسط چند جمینی ویروس به‌نام‌های ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*Tomato leaf curl virus* = TLCV) و ویروس پیچیدگی برگ

* : این تحقیق بر اساس طرح تحقیقاتی شماره ۸۵-AG-۱۷۸۰۲-C۳۴۶ دانشگاه شیراز انجام گرفته است.

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behjatni@shirazu.ac.ir

۱. به‌ترتیب استادیار و کارشناس‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

Archive of SID

www.SID.ir

زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus* = TYLCV) متعلق به تیره *Geminiviridae* و جنس *Begomovirus* ایجاد می‌شود (Czonek & Laterrot 1997; Moriones & Navas-Castillo 2000). این ویروس‌ها دارای پیکرهای ایزومتریک هستند که اغلب به‌صورت دوقلو به‌هم چسبیده‌اند و ژنوم اغلب آنها را یک حلقه دی ان ای تک لا (ssDNA) به اندازه ۲/۵-۳ کیلو باز تشکیل می‌دهد (Kheypour *et al*. 1991, Navot *et al*. 1991, Stanley *et al*. 2005). همانندسازی ژنوم ویروس در هسته گیاه از طریق تولید دی ان ای دو لای حد واسط (intermediate dsDNA) و به روش دایره غلتان صورت می‌گیرد (Saunders *et al*. 1991, Stenger *et al*. 1991).

ویروس‌های ایجاد کننده پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی مانند سایر بگوموویروس‌ها توسط سفید بالک توتون (*Bemisia tabaci* Gen.) به‌حالت گردشی و پایا انتقال می‌یابند (Cohen and Nitzany 1966; Caciagli *et al*. 1995). گسترش این ویروس‌ها در سال‌های اخیر با گسترش جهانی بیوتیپ B حشره همراه بوده است. وجود این بیوتیپ نیز در ایران تأیید شده است (*بهجت‌نیا و همکاران*، اطلاعات منتشر نشده). این بیوتیپ نسبت به بیوتیپ‌های دیگر، دامنه میزبانی وسیع‌تری دارد، قدرت باروری و زاد و ولد آن بیشتر و رفتار تغذیه‌ای آن با تهاجم بیشتری همراه است (De Barro *et al*. 1995; Czosnek & Laterrot 1997, Bedford *et al*. 1994).

ترادف کامل ژنوم جدایه‌های ایرانی TYLCV (TYLCV-Ir) و TLCV (TLCV-Ir)جدا شده از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان ایرانشهر در استان سیستان و بلوچستان به ترتیب با ۲۷۷۱ و ۲۷۶۳ نوکلئوتید تعیین و تحت شماره‌های AJ 132711 و AY 297924 در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شده است (Bananej *et al*. 2004, Behjatnia *et al*. 2004). ژنوم هر دو ویروس یک بخشی و دارای سازمان ژنی مشابه و حاوی شش چارچوب ژنی (ORF) حفاظت شده هستند. دو چارچوب ژنی V1 و V2 برروی رشتهٔ ژنومی و ٤ چارچوب ژنی به نام‌های C1، C2، C3 و C4 برروی رشتهٔ مکمل قرار دارند. چهارچوب ژنی V2 پروتئین پوششی را کد می‌کند که در حرکت ویروس در گیاه و انتقال با ناقل نقش دارد و چهارچوب ژنی C1 پروتئین همراه با همانندسازی ویروس (Rep) که جهت نسخه‌برداری و تکثیر ژنوم ویروس لازم است را کد می‌کند. یک ناحیه بین ژنی (IR) نیز در ژنوم وجود دارد که حاوی عناصر لازم برای همانندسازی ویروس و نسخه برداری می‌باشد (شکل ۱A).

علاوه بر ایرانشهر بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی ازدیگر استان‌های جنوبی ایران نیز گزارش شده (Hajimorad *et al*. 1996) و در سال‌های اخیر در مزارع گوجه‌فرنگی در استان‌های تهران، خراسان، کرمان، هرمزگان، فارس و خوزستان گسترش یافته است (Bananej *et al*. 1998, Shahriary & Bananej 1997, Behjatnia *et al*. 2004, Fazeli *et al*. 2008, Pakniat *et al*. 2008). این مطالعات نشان می‌دهد که گونه‌های مختلفی از TYLCV در ایجاد بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در ایران دخالت دارند. اخیرا" *فاضلی و همکاران* (Fazeli *et al*. 2008) تنوع ژنتیکی و پراکنش ویروس‌های عامل بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی را از مناطق مرکزی و جنوبی ایران گزارش کرده‌اند. بر اساس این گزارش بیشتر جدایه‌ها ژنوم یک بخشی داشته و شبیه به جدایه Gezira ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی از کشور سودان بوده‌اند. چهار جدایه نیز ژنوم دو بخشی داشته‌اند که همگی شبیه به *Tomato yellow leaf curl New Delhi virus* از کشور هندوستان بوده‌اند. اطلاعات مربوط به این ویروس‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شده است(Fazeli *et al*. 2008).

مطالعه دامنه میزبانی و تعیین و غربالگری ارقام مقاوم، مستلزم آلوده‌سازی آسان و مطمئن گیاهان توسط ویروس مورد مطالعه است. در مورد بگوموویروس‌ها انجام این کار تنها با تولید همسانه عفونت‌زا (Infectious clone) میسر است. علاوه

Archive of SID

www.SID.ir

بر این چنین همسانه هایی امکان انتقال ژن‌های دستکاری شده از جمله ژن‌های مقاومت ناشی از بیمارگر را فراهم می‌سازند. هدف از این تحقیق ساخت یک همسانه عفونت‌زا از جدایه ایرانی TLCV و استفاده از آن برای تعیین دامنه میزبانی این ویروس در گلخانه می‌باشد. راندمان آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی که میزبان اصلی و اقتصادی ویروس می‌باشد در روش‌های agroinoculation و انتقال با حشره ناقل (*B. tabaci*) نیز مورد مطالعه قرار می‌گیرد. انجام این تحقیق یک پیش نیاز برای انجام تحقیقات بعدی بخصوص مطالعات مقاومت است.

روش بررسی

ساخت همسانه عفونت‌زای جدایه ایرانی TLCV و اثبات بیماری‌زایی آن

در این مطالعه ساخت همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir طوری طراحی شد که حاوی ۱/۵ برابر ژنوم ویروس شامل قطعه کامل ژنوم با سایت برشی I *Sal* و قطعه تکراری ۱۳۷۷ جفت بازی حد فاصل سایت‌های برشی I *Sal* و HI *Bam* در ژنوم ویروس باشد (شکل ۱).

برای تکثیر ژنوم کامل ویروس با سایت برشی I *Sal* در انتهای آن از جفت آغازگر اختصاصی، $P1540^{C}$ و $P1535^{V}$ (جدول ۱)، استفاده شد. قطعه تمام طول ژنوم ویروس حاصل از PCR پس از برش با آنزیم I *SaI* در حامل (pBS) pBluescript که با همین آنزیم برش داده شده بود همسانه‌سازی شد. این سازه به‌عنوان قالب (Template) برای تهیه همسانه عفونت‌زا به‌کار برده شد. برای این کار ابتدا این سازه با آنزیم‌های I *Sal* و HI *Bam* مورد برش قرار گرفت تا قطعه ۱۳۷۷ نوکلئوتیدی I *Sal* I/*Bam*H دی ان ای TLCV-Ir آزاد شود. این قطعه در pBS همسانه‌سازی شد تا همسانه pBS0.5TLCVIr ساخته شود. سپس ژنوم کامل TLCV-Ir که در محل I *SaI* برش داده شده بود به محل I *SaI* همسانه pBS0.5TLCVIr چسبانیده گردید. همسانه حاصل pBS1.5TLCVIr نامیده شد. این سازه و حامل دوتایی pBin19 با آنزیم I *Kpn* بریده شدند و پس از حذف گروه فسفات از انتهای ′۵ حامل pBin19، اتصال بین حامل pBin19 و همسانه pBS1.5TLCVIr انجام شد تا سازه pBin19-1.5TLCVIr که حاوی پلاسمید pBS نیز بود ساخته شود. این همسانه که قاعدتا" باید عفونت‌زا باشد به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 انتقال یافت.

گیاهان گوجه‌فرنگی با استفاده از روش Agroinoculation (Dry *et al*. 1993) با باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب مایه‌زنی و بیماری زایی ویروس آزمایش شد. پس از اثبات بیماری زایی جهت تعیین دامنه میزبانی آزمایشی ویروس تعدادی از گیاهان خانواده *Solanaceae* شامل تاتوره (*Datura stramonium*)، توتون معمولی (*Nicotiana tabacum*) ، *N. glutinosa*، *N. benthamiana*، فلفل دلمه‌ای، بادنجان و گیاهان معرف دیگر شامل لوبیا معمولی، لوبیا چشم بلبلی، باقلا، خیار، خربزه، کدو و *Chenopodium quinoa* با باکتری حاوی همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir مایه‌زنی شدند. در تمام موارد هر گیاهچه با ۵۰ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری حاوی همسانه عفونت‌زا مایه‌زنی شد.

استخراج DNA

استخراج دی ان ای گیاه به‌وسیله روش (Dry *et al*. 1993) انجام شد. در این روش ۱۵۰ میلی‌گرم بافت برگ گیاه مورد آزمایش در ازت مایع تبدیل به پودر شده و با دو حجم بافر حاوی 50mM Tris HCl, pH 8.0، 100 mM NaCl، 1% (V/V) β-mercaptoethonol، 1% (W/V) SDS و 0.01 mM EDTA مخلوط شد. اسیدهای نوکلئیک طی چهار مرتبه با مخلوط فنول: کلروفرم (نسبت ۴ : ۱) استخراج و با اتانول رسوب داده شدند و سپس با آنزیم ریبونوکلئاز مورد تیمار قرار گرفتند تا فقط DNA باقی بماند. DNA مجدداً با مخلوط فنول: کلروفرم استخراج و با اتانول رسوب داده شد. رسوب حاصل در آب خالص حل شد. از این DNA در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Archive of SID

www.SID.ir

(Polymerase Chain Reaction = PCR) استفاده شد.

آزمایش‌های هیبریداسیون (Hybridization tests)

از هیبریداسیون نقطه‌ای (dot blot hybridization) برای تعیین آلودگی گیاهان تلقیح شده با همسانه عفونت‌زای ویروس و از روش سادرن بلات(Southern blot hybridization) برای نشان دادن فرم‌های قابل همانندسازی ویروس در گیاهان آلوده استفاده شد. لکه‌گذاری نقطه‌ای و سادرن بلات به‌ترتیب طبق روش تشریح شده توسط *بهجت‌نیا و همکاران* (Behjatnia,*et al.* 2004) و *بهجت‌نیا و همکاران* (1996) انجام شد. در هر دو روش ازیک شناسگر (probe) طراحی شده بر مبنای ژنوم تمام طول TLCV-Ir استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction = PCR)

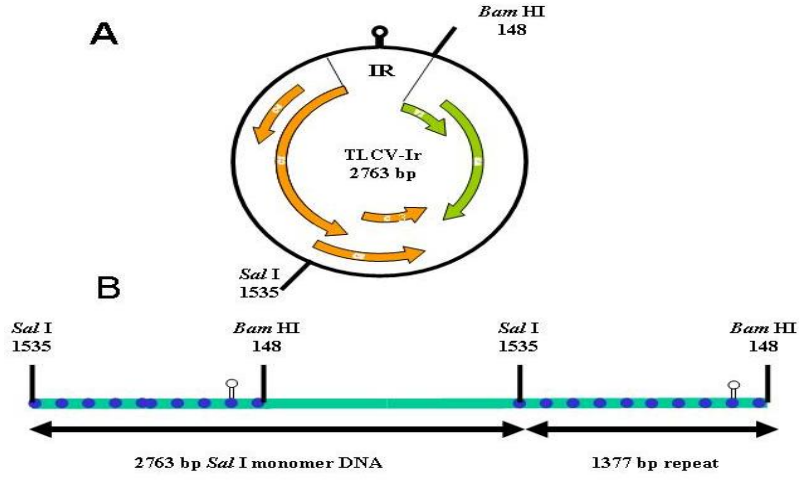
از روش PCR نیز برای تعیین آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده استفاده شد. برای این منظور از یک جفت آغازگر اختصاصی TLCV-Ir ، $P1540^{C}$ و $P419^{V}$ (جدول ۱) که برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۱۲۲ جفت باز طراحی شده بود استفاده گردید. عمل PCR در حجم‌های ۲۰ یا ۵۰ میکرولیتری شامل قالب دی.ان.ای استخراج شده از بافت برگ، آغازگرها (هر کدام به غلظت یک µM)، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از چهار دِاُکسی ریبونوکلئوتیدتری فسفات ، ۰/۵ یا ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq* دی ان اِ پلی مراز در بافر مخصوص آنزیم انجام شد. PCR شامل یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای شامل دمای $94^{o}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای$55^{o}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای $72^{o}C$ به‌مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط PCR به‌مدت ۷ دقیقه در $72^{o}C$ نگه‌داری شد. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز در آگاروز ۱/۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. DNA مورد نظر از ژل بریده شد و DNA با استفاده از Qiaquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) از ژل استخراج و در مواردی دی ان ای مورد نظر همسانه‌سازی و تعیین ترادف شد.

تعیین راندمان انتقال ویروس توسط حشره ناقل

برای تعیین راندمان انتقال ویروس توسط حشره ناقل از یک کلنی سفید بالک توتون (*B. tabaci*) جمع‌آوری شده از یک مزرعه در شهرستان فسا استفاده شد. تاکنون بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در مزارع این شهرستان دیده نشده است و به‌نظر می‌رسد این منطقه عاری از این بیماری است و سفید بالک‌ها نیز عاری از ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی باشند. با وجود این جهت اطمینان طی چند مرحله اجازه داده شد که سفید بالک‌های مذکور زاد و ولد نموده و در نهایت از سفید بالک‌هایی که از پوره‌های تازه تولد شده به‌وجود آمدند برای انتقال ویروس استفاده شد. سفید بالک‌ها روی گیاهان توتون معمولی (*Nicotiana tabacum* cv. Turkish) پرورش داده شدند. برای گیرش ویروس، سفید بالک‌ها از توتون به گیاهان گوجه‌فرنگی کولتیوار Grosse Lisse که با همسانه عفونت‌زای ویروس تلقیح شده بودند و آلودگی آنها از طریق آزمایش هیبریداسیون نقطه‌ای به اثبات رسیده بود انتقال داده شدند و به آنها اجازه داده شد به‌مدت ۳ روز ازگیاهان گوجه‌فرنگی تغذیه نمایند. سپس گروه‌های یک، دو، سه و ۱۰ تایی از سفید بالک‌ها به هر یک از گیاهان گوجه‌فرنگی سالم (مجموعا" ۴۸ گیاه گوجه‌فرنگی در گروه‌های ۱۲ تائی) انتقال داده شدند و به آنها اجازه داده شد به‌مدت ۳ روز ازگیاهان گوجه‌فرنگی سالم تغذیه نمایند تا ویروس را انتقال دهند. بعد از این مدت سفید بالک‌ها از روی گیاهان گوجه‌فرنگی برداشته شده و گیاهان گوجه‌فرنگی با محلول یک درصد سم Confidor از شرکت Bayer CropScience آلمان سمپاشی گردیدند. گیاهان گوجه‌فرنگی در قفس‌های عاری از سفید بالک نگه‌داری شدند. برای هر تیمار ۱۲ گیاهچه گوجه‌فرنگی با سفید بالک مایه‌زنی شدند. یک ماه، دو ماه و ۷۵ روز بعد اززمان مایه‌زنی، گیاهان گوجه‌فرنگی از نظر وجود علائم بیماری و ایجاد آلودگی به ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفته و وجود دی ان ای

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. (A) سازمان ژنوم TLCV-Ir – چهارچوب های ژنی روی رشته ویروسی (V1 و V2) و روی رشته مکمل (C1 ، C2 ، C3 و C4) با پیکان‌ها و موقعیت ساقه و حلقه (stem-loop) و ناحیه میان ژنی (IR) نشان داده شده‌اند. (B) دی ان ای ۱/۵ برابر ژنوم TLCV-Ir.

Fig. 1: (A) Genome organization of TLCV-Ir. ORFs on both the virion-sense strand (V) and the complementary–sense strand (C) are displayed by arrows. The position of the conserved stem-loop structure and intergenic region (IR) are indicated. (B) Linear map of 1.5TLCV-Ir DNA.

جدول ۱. آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی TLCV-Ir مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 1. TLCV-Ir specific oligonucleotide primers used in this study

Primers آغازگر	Size اندازه (nt)	Nucleotide positions[P] موقعیت	Sequences from 5′ to 3′ ترادف (5′ - 3′)	Underlined restriction enzyme آنزیم برشی موجود در آغازگر
P419[V]	25	419-443	CAAGGCAAAGGCATGGGCGAACAGG	
P812[V]	23	812-834	CGACCAGCGTGATCGTTTTCAGG	
P1540[C]	26	1515-1540	GTCGACGAGTTGATCTACCGTGTGGC	*Sal* I
P1535[V]	26	1535-1560	GTCGACGCCTGGTCCCTCTCTTGGCT	*Sal* I

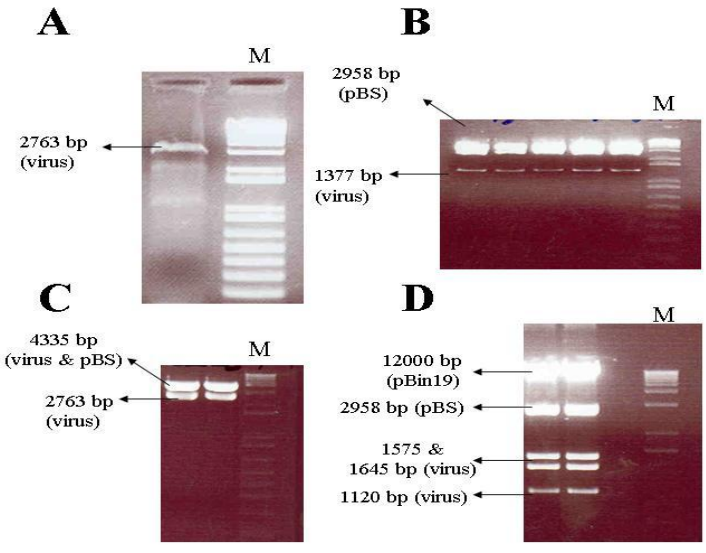
یروس در گیاهان با روش هیبریداسیون نقطه‌ای یا انجام PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی P1540[C] و P812[V] (جدول ۱) که قطعه‌ای از ژنوم ویروس با اندازه ۷۲۹ جفت باز را تکثیر می‌کند بررسی شد.

نتیجه

ساختن همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir

با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی مجاور هم TLCV-Ir و دارای آنزیم برشی *Sal* I در انتهای ′۵ هر یک، قطعه ژنوم کامل با اندازه ۲۷۶۳ جفت باز به‌دست آمد (شکل ۲A). پس از برش محصول PCR با آنزیم *Sal* I امکان همسانه‌سازی ژنوم کامل TLCV-Ir در محل برش *SaI* I حامل pBluescript (pBS) حاصل شد. سازه حاصل pBS1.0TLCVIr نامیده شد. در نتیجه هضم آنزیمی هم‌زمان این سازه با آنزیم‌های *Sal* I و *Bam* HI قطعه‌ای با اندازه ۱۳۷۷ جفت باز مربوط به ویروس ایجاد شد. قطعه ۱۳۷۷ جفت بازی ویروس از ژل استخراج و خالص

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲. نقوش الکتروفورزی (A) ژنوم کامل TLCV-Ir حاصل انجام PCR با یک جفت آغازگر اختصاصی و قطعات DNA حاصل از هضم: (B) ۵ همسانه pBS0.5TLCVVIr با آنزیم‌های I *Sal* و *Bam*HI؛ (C) دو همسانه pBS1.5TLCVVIr با آنزیم HI *Bam* و (D) دو همسانه pBin1.5TLCVIr با آنزیم‌های RI *Eco* و HI *Bam*. M=marker.

Fig. 2. Electrophoretic pattern of (A) TLCV-Ir full-length PCR product using P1540^{C} and P1535^{V} specific primers (Table 1) and DNA fragments released from: (B) five pBS0.5TLCVIr constructs digested with *Sal* I and *Bam* HI; (C) two pBS1.5TLCVIr constructs digested with Bam HI and (D) two pBin1.5TLCVIr constructs digested with *Bam* HI and *Eco* RI. M=marker.

گردید و به کمک آنزیم لیگاز به حامل pBS که با آنزیم‌های *Sal* I و *Bam* HI برش داده شد بود متصل شد. درستی سازه حاصل (pBS0.5TLCVIr) با استفاده از هضم آنزیمی همزمان آن با آنزیم‌های *Sal* I و *Bam* HI که نتیجه آن آزاد شدن قطعه ۱۳۷۷ جفت بازی از این سازه بود تایید شد (شکل ۲B).

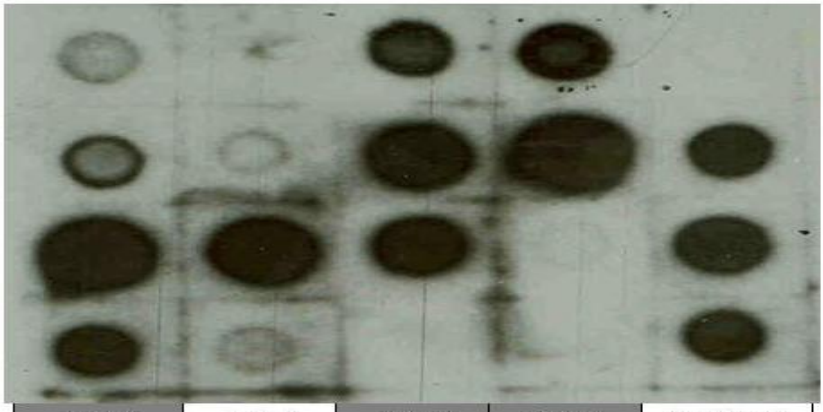
در مرحله بعد اتصال قطعه کامل ژنوم TLCV-Ir به سایت برشی *Sal I* سازه BS0.5TLCVIr انجام شد. نتیجه این کار ساخت سازه pBS1.5TLCVIr بود که حاوی قطعه کامل ژنوم و قطعه تکراری ۱۳۷۷ جفت بازی ویروس است (رجوع به شکل ۱B). با هضم آنزیمی این سازه با آنزیم *Bam* HI می‌بایستی قطعه کامل ژنوم ویروس باندازه ۲۷۶۳ جفت باز آزاد شود که به همین ترتیب بر روی ژل مشاهده شد (شکل ۲C). همسانه pBS1.5TLCVIr پس از هضم توسط آنزیم برشی*Kpn*I به ناقل دو تایی pBin19 بریده شده با همین آنزیم با موفقیت متصل شد. درستی سازه حاصله (pBin1.5TLCVIr) با استفاده از هضم آنزیمی همزمان با آنزیم‌های برشی*Eco* RI و*Bam* HI مشخص شد (شکل ۲D). با هضم آنزیمی همزمان این سازه باید قطعات ۱۱۲۰، ۱۵۷۵ و ۱۶۴۵ جفت باز مربوط به ویروس و قطعات ۱۲۰۰۰ جفت باز مربوط به حامل pBin19 و قطعه ۲۹۵۸ جفت باز مربوط به حامل pBS حاصل شود که بهمین ترتیب در شکل۲D مشاهده می‌شود.

اثبات بیماری‌زایی همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir

عفونت‌زا بودن سازه pBin1.5TLCVIr با مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و *Nicotiana benthamiana* با اگروباکتریوم‌های حاوی این سازه امتحان شد. آنالیز دی ان ای استخراج شده از برگ‌های تازه رشد کرده این گیاهان با روش هیبریداسیون نقطه‌ای ۲۱ روز بعد از زمان مایه‌زنی وجود ویروس را در اکثر

Archive of SID

www.SID.ir



گوجه فرنگی Tomato	گوجه فرنگی Tomato	گوجه فرنگی Tomato	گوجه فرنگی Tomato	گوجه فرنگی سالم Healthy tomato
گوجه فرنگی Tomato	گوجه فرنگی Tomato	*N.benthamiana*	*N benthamiana*	*N. benthamiana*
N. benthamiana	*N benthamiana*	*N.benthamiana*	Healthy *N.benthamiana*	*N benthamiana*
N. benthamiana	*N benthamiana*	Blank	Blank	دی ان ای شناسگر Probe DNA

شکل۳. شناسایی دی ان ای TLCV-Ir در عصاره گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و توتون *Nicotina benthamiana* مایه‌زنی شده با اگروباکتریوم حاوی همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir به‌وسیله روش هیبریداسیون نقطه‌ای ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی. در این آزمایش ازیک شناسگر (probe) طراحی شده بر مبنای ژنوم تمام طول TLCV-Ir استفاده شد. رنگ خاکستری و رنگ سفید در خانه‌های جدول زیر بلات به ترتیب نشان دهنده واکنش مثبت و منفی دی ان ای استخراج شده از گیاهچه‌ها با شناسگر TLCV-Ir در لکه‌های معادل در بلات بالا است.

Fig. 3. Detection of TLCV-Ir DNA in extracts of tomato and *Nicotiana benthamiana* plants agroinoculated with TLCV-Ir infectious clone by dot blot hybridization assay 21 days post-inoculation. The blot was hybridized with a ^{32}P-labeled full-length TLCV-Ir probe. Gray and white colors in the cells of the table below the blot indicate positive and negative reactions of the plant DNAs with the TLCV-Ir probe, respectively.

گیاهان تلقیح شده نشان داد (شکل ۳). بدین وسیله بیماری‌زایی همسانه ساخته شده به اثبات رسید.

به‌منظور بررسی کارایی همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir، تعداد بیشتری گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و هم‌چنین تعدادی گیاهچه تاتوره (*Datura stramonium*) و توتون با این همسانه و هم‌زمان تعدادی گیاهچه نیز با همسانه عفونت‌زای جدایه استرالیایی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TLCV-Au) مایه‌زنی شدند. این گیاهان نیز با روش هیبریداسیون نقطه‌ای ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی برای وجود ویروس‌های مربوطه مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج این آزمون‌ها وجود دی ان ای جدایه استرالیایی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی را در تمام گونه‌های مایه‌زنی با این جدایه نشان داد. اما راندمان آلوده کردنTLCV-Ir در تمام گیاهان کامل نبود و میانگین گیاهچه‌های آلوده به TLCV-Ir پس از مایه‌زنی با همسانه عفونت‌زای این ویروس بسته به نوع گیاه متفاوت بود. نتایج مربوط به این آزمون‌ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود راندمان آلودگی‌زایی همسانه عفونت‌زای TLCV-Au در تمام گیاهان آزمایش شده ۱۰۰ درصد است در حالی‌که همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir تمام گیاهان توتون مورد آزمایش را آلوده کرده است اما کارایی این همسانه در آلودگی‌زایی تاتوره و گوجه‌فرنگی به ترتیب ۶۸ و ۵۴ درصد

www.SID.ir

جدول۲. راندمان آلودگی زایی همسانه‌های عفونت‌زای جدایه‌های ایرانی و استرالیایی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TLCV-Ir و TLCV-Au) در میزبان‌های آزمایشگاهی

Table 2. Average infection rate of TLCV-Ir and TLCV-Au infectious clones in tested plants

گیاه Plant	TLCV-Ir		TLCV-Au	
	تعداد گیاهچه‌های آلوده به گیاهچه‌های مایه‌زنی شده No. of plants infected/No. of plants inoculated	میانگین گیاهچه‌های آلوده (%) Average infection rate (%)	تعداد گیاهچه‌های آلوده به گیاهچه‌های مایه‌زنی شده No. of plants infected/No. of plants inoculated	میانگین گیاهچه‌های آلوده (%) Average infection rate (%)
گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum*	15/28	54	10/10	100
توتون *Nicotiana benthamiana*	9/9	100	10/10	100
تاتوره *Datura stramonium*	17/25	68	10/10	100
توتون معمولی *Nicotiana tabacum*	2/2	100	Not tested	-

بوده است. می‌توان گفت که گیاهانی مانند *N. benthammian* و توتون میزبان‌های مناسب‌تری نسبت به گوجه‌فرنگی برای TLCV-Ir می‌باشند و این گیاهان می‌توانند به‌عنوان منابع نگه‌داری ویروس در طبیعت نقش بسزایی ایفا نمایند.

آلوده نشدن تمام گیاهان برخی میزبان‌ها توسط همسانه‌ی عفونت‌زای TLCV-Ir به دلیل مشکل تکنیکی نیست چون عفونت‌زایی این همسانه قبلا" در آنها به اثبات رسید بود بلکه نشان دهند آن است که جدایه ایرانی این ویروس در مقایسه با جدایه استرالیایی که یک جدایه شدید (severe) محسوب می‌شود از کارایی کمتری در ایجاد آلودگی در برخی میزبان‌ها برخوردار است و با توجه به شواهد دیگر که در بخش‌های بعدی این تحقیق آورده شده TLCV-Ir به‌عنوان یک جدایه خفیف از ویروس‌های مولد بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در نظر گرفته می‌شود. قبلاً نیز جدایه‌های خفیف ویروس‌های ایجاد کنترل بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی از کشورهای دیگر مانند استرالیا و اسرائیل گزارش شده‌اند(Antignus & Cohen 1994, Behjatnia *et al.* 2001).

شناسایی شکل‌های همانندسازی ویروس (dsDNA replicative-forms) در گیاهان آلوده

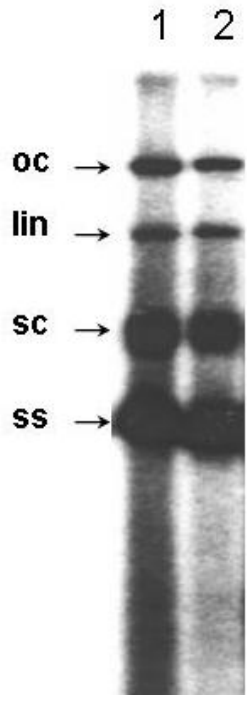
آنالیز دی ان ای استخراج شده از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir به روش سادرن بلات وجود باندهای محتوی دی ان ای تک لای حلقوی (circular ssDNA) و فرم‌های دو لای قابل همانندسازی دی ان ا (dsDNA replicative-forms) ویروس که نشانه آزاد شدن ژنوم ویروس از سازه pBin1.5TLCVIr و همانندسازی آن در بافت گیاه است را نشان داد (شکل ۴).

علائم گیاهان مایه‌زنی شده با همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir

هم‌زمان با آنالیز دی ان ای گیاهان مایه‌زنی شده تغییرات فنوتیپی آنها نیز بررسی گردید. در گیاهان *N. benthamiana*، ۲۱ تا ۳۵ روز بعد از مایه‌زنی علائمی شامل

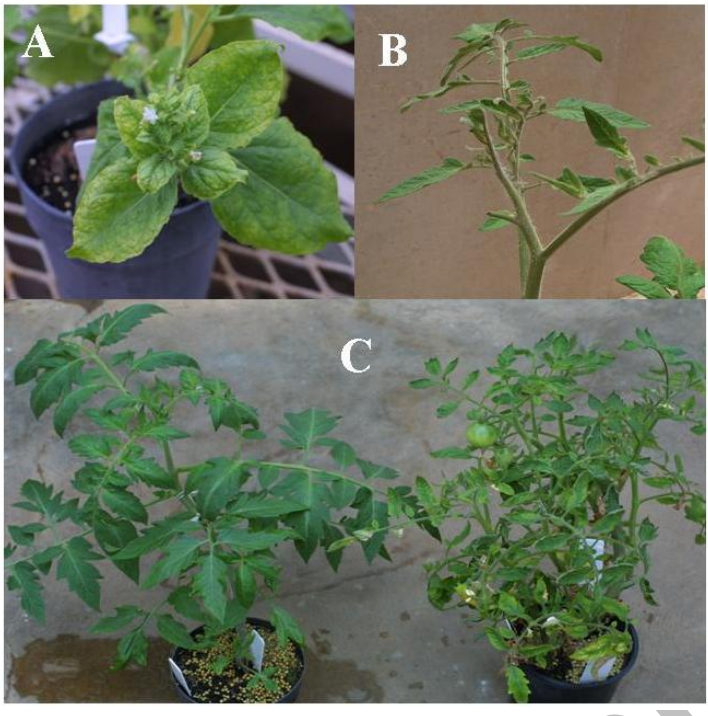
Archive of SID

www.SID.ir



شکل۴. آنالیز دی ان ای استخراج شده از عصاره دو گیاه گوجه‌فرنگی (۱ و۲) مایه‌زنی شده با همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir. فرم‌های دی ان ا: lin, linear dsDNA; oc, open circular dsDNA; sc, supercoiled dsDNA; ss circular single-stranded DNA.

Fig. 4. Southern blot analysis of replicative DNAs extracted from leaves of two tomato plants (lanes 1 and 2), agroinoculated with TLCV-Ir infectious clone. DNA forms: lin, linear dsDNA; oc, open circular dsDNA; sc, supercoiled dsDNA; ss circular single-stranded DNA.



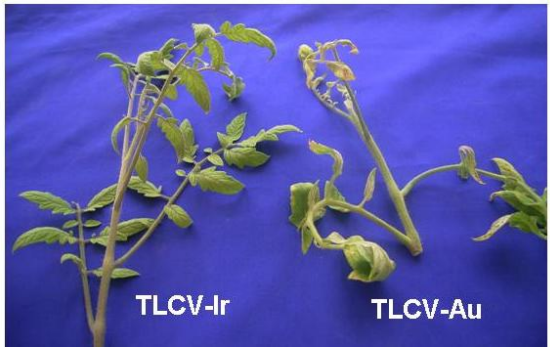
شکل۵. (A) کوچک شدن برگ‌های انتهایی، پیچیدگی و زردی برگ‌ها در یک بوته *Nicotiana benthamiana* ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی ، (B) پیچیدگی و زردی خفیف برگ‌های جوان در یک بوته گوجه‌فرنگی ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی و (C) شاخه‌های باریک و بلند با برگ‌های ریز و شدیداً فنجانی شده یک بوته گوجه‌فرنگی دو ماه بعد از مایه‌زنی (سمت راست) در مقایسه با یک بوته گوجه‌فرنگی همسن سالم (سمت چپ). گیاهان آلوده با همسانهٔ عفونت‌زای TLCV-Ir مایه‌زنی شده بودند.

Fig. 5. Symptoms induced by TLCV-Ir infectious clone in experimentally agroinfected (A) *Nicotiana benthamiana* plants showing small crumpled and upward curled leaves 30 dpi; (B) tomato plants showing mild curling and yellowing of the young leaves 30dpi and (C) tomato plants showing elongated spindly shoots, smaller leaves and severe leaf cupping 60 dpi compared with a healthy tomato plant on the left.

کوچک شدن برگ‌های انتهائی، پیچیدگی و زردی برگ‌ها و تورم و ضخیم شدن رگبرگ‌ها ایجاد شد (شکل ۵A). منتهی گیاهان گوجه‌فرنگی در این زمان کمتر تحت تأثیر آلودگی ویروس قرار گرفته و تنها علائم خفیفی شامل پیچیدگی و زردی خفیف برگ‌ها نشان دادند (شکل ۵B). با وجود این، در گیاهان گوجه‌فرنگی کم‌کم علائم تیپیک بیماری مانند پیچیدگی و لوله شدن برگ‌های انتهایی مشاهده شد. این گیاهان دو تا سه ماه بعد از زمان مایه‌زنی فاز بعدی علائم را که شامل ایجاد شاخه‌های باریک و بلند با برگ‌های ریز و شدیداً فنجانی شده بود نشان دادند. این مشاهدات نیز بیماری‌زایی همسانه ساخته شده را تأیید نمود (شکل ۵C).

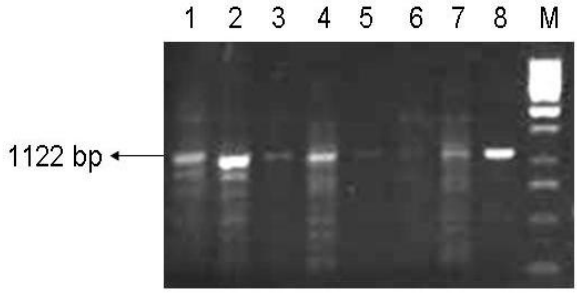
در گیاهان گوجه‌فرنگی که با باکتری حاوی همسانه عفونت‌زای TLCV-Au مایه‌زنی شده بودند علائم تیپیک و

www.SID.ir



شکل۶. (سمت راست) کوچک شدن برگچه‌ها و زردی و پیچیدگی شدید آنها در گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه استرالیایی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TLCV-Au) در مقایسه با (سمت چپ) پیچیدگی و زردی خفیف برگچه‌ها در گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TLCV-Ir) ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی.

Fig. 6. Severe symptoms in a tomato plant agroinoculated with Australian isolate of TLCV (right) compared with mild symptoms in a tomato plant agroinoculated with Iranian isolate of TLCV (left).



شکل۷. تکثیر قطعه ۱۱۲۲ جفت بازی ژنوم TLCV-Ir از گیاهان توتون معمولی(*Nicotiana tabacum*) ، راهک‌های ۱ و۲)، *Nicitiana glutinosa* (راهک‌های ۳ تا ۷) و گوجه‌فرنگی (راهک ۸) مایه‌زنی شده باهمسانه عفونت‌زای TLCV-Ir. گیاهان توتون (راهک‌های ۱ تا ۷) فاقد علائم و گیاه گوجه‌فرنگی با علائم تیپیک بیماری بودند.

Fig. 7. Amplification of a TLCV-Ir 1122 bp fragment from symptomless *Nicotiana tabacum* m (lanes 1 and 2), symptomless *N. glutinosa* (lanes 3-7) and a tomato plant with typical symptoms (lane 8), all agroinoculated with a TLCV-Ir infectious clone.

شدید بیماری ۲۱ تا ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی مانند آنچه در شکل ۶ نشان داده شده ظاهر گردید در حالی‌که گیاهان آلوده به TLCV-Ir هم‌زمان علائم بسیار خفیف نشان دادند. با این مقایسه می‌توان گفت که جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یک جدایه خفیف این ویروس است.

میزبان‌های آزمایشگاهی TLCV-Ir

از میان ۱۴ گونه گیاه که با باکتری حاوی همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir مایه‌زنی شده بودند گونه‌های حساس براساس علائم ایجاد شده و وجود دی ان ای ویروس در گیاهان مایه‌زنی شده با تکثیر قطعه‌ای از ژنوم ویروس با اندازه ۱۱۲۲ جفت باز با استفاده از آغازگرهای $P419^{V}$ و $P1540^{C}$ (جدول ۱) تعیین شدند. گیاهان فلفل دلمه‌ای، بادنجان، لوبیا معمولی، لوبیا چشم بلبلی، باقلا، خیار، خربزه، کدو و *Chenopodium quinoa* هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند و آزمون PCR نشان داد که حاوی دی ان ای ویروس نبودند. مابقی گونه‌ها میزبان ویروس بودند. سه گیاه تاتوره (*D. stramonium*)، توتون معمولی (*N. tabacum* var. Turkish) و *N. glutinosa* علائمی نشان ندادند و در گیاهان گوجه‌فرنگی و *N. benthamiana* علائم مانند آنچه که در بالا توضیح داده شد ظاهر شدند. اما واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز وجود دی ان ای ویروس را در تمام این گیاهان ۲۱ روز بعد از زمان مایه‌زنی به اثبات رساند. (شکل ۷). تعیین ترادف نوکلئوتیدی دی ان ای تکثیر شده از گیاهان گوجه‌فرنگی و تاتوره یکسان بودن آن را با قطعه ۱۱۲۲ ژنوم ویروس حاوی نوکلئوتیدهای ۴۱۹ تا ۱۵۴۰ تأیید نمود. این آزمایش‌ها نشان داد که گیاهان توتون و تاتوره میزبان‌های فاقد علائم TLCV-Ir می‌باشند. بنابراین می‌توان نتیجه گیری نمود که TLCV-Ir دامنه میزبانی کمی دارد و میزبان‌های آن به بعضی گیاهان خانواده Solanaceae محدود می‌شوند.

از میان میزبان‌های فاقد علائم TLCV-Ir، تاتوره می‌تواند به‌عنوان یک میزبان تشخیصی در نظر گرفته شود. این گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

علائم مشخص و شدیدی شامل موزائیک زرد سه تا چهارهفته بعد از زمان مایه‌زنی با جدایه استرالیایی TLCV نشان می‌دهد. هم‌چنین بنانج و *همکاران* گزارش کرده‌اند که جدایه ایرانی TYLCV در این گیاه علائم موزائیک ایجاد می‌نماید. بنابراین تاتوره می‌تواند به‌عنوان یک میزبان افتراقی که گونه‌های TLCV-Ir و TYLCV-Ir را از هم تشخیص می‌دهد عمل نماید. هر دو ویروس از مزارع گوجه‌فرنگی ایرانشهر در استان سیستان و بلوچستان جدا و گزارش شده‌اند (Behjatnia *et al.* 2004, Banaej *et al.* 1996).

توتون معمولی واریته Turkish نیز یک میزبان فاقد علائم TLCV-Ir است در حالی‌که جدایه استرالیایی TLCV در این گیاه علائمی شامل کوچک و مجتمع شدن برگ‌های انتهایی بوته به‌همراه بدشکلی و زردی برگ‌ها ایجاد می‌نماید (Saeed *et al.* 2005).

بررسی توانایی *Bemisia tabaci* در انتقال TLCV-Ir

توانایی سفید بالک توتون (*B. tabaci*) در انتقال TLCV-Ir در گروه‌های یک، دو، سه و ۱۰ تایی آزمایش شد. منبع ویروس یک گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با همسانه عفونت‌زای TLCV-Ir با علائم تیپیک بیماری بود و از این نظر اطمینان وجود داشت که این گیاه تنها به این ویروس آلوده است و ویروس یا عوامل بیماری‌زای دیگری در آن وجود ندارد. آنالیز دی.ان.ای استخراج شده از برگ گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با سفید بالک‌ها که از گیاه منبع ویروس تغذیه کرده بودند با روش هیبریداسیون نقطه‌ای یک ماه بعد از زمان مایه‌زنی وجود ویروس را در هیچ‌کدام از گیاهان تلقیح شده نشان نداد. اما وقتی همین گیاهان دو ماه بعد از زمان مایه‌زنی با روش هیبریداسیون نقطه‌ای بررسی شدند توانائی *B. tabaci* در انتقال TLCV-Ir به اثبات رسید. انتقال TLCV-Ir به گوجه‌فرنگی توسط یک عدد سفید بالک بازای هر گیاه به‌دست آمد. اما راندمان انتقال برای این تیمار و هم‌چنین انتقال توسط دو عدد سفید بالک بازای هر گیاه صددرصد نبود. راندمان انتقال وقتی دسته‌های سه تایی و ده تایی سفید بالک بازای هر گیاه به‌کار برده شد به ۱۰۰% رسید (شکل ۸ و جدول ۳). در مقایسه میانگین گیاهچه‌های آلوده گوجه‌فرنگی به TLCV-Ir پس از مایه‌زنی با همسانه عفونت‌زای این ویروس با استفاده از روش agroinoculation تنها ۵۴% بود (جدول ۲) اما باید توجه داشت که دی ان ای ویروس در این گیاهان ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی قابل شناسایی بود ولی در گیاهان مایه‌زنی شده با سفید بالک تا ۳۰ روز هم قابل شناسایی نبود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی $P812^{V}$ و $P1540^{C}$ وجود دی ان ای ویروس در گیاهان مایه‌زنی شده با گروه‌های یک، دو، سه و ۱۰ تایی سفید بالک را ۷۵ روز بعد از زمان مایه‌زنی به اثبات رساند. منتهی باند دی ان ای تکثیر شده از گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با یک عدد سفید بالک بسیار ضعیف‌تر از باند دی ان ای تکثیر شده از گیاهان مایه‌زنی شده با دو، سه و ۱۰ عدد سفید بالک بودند (شکل ۹).

این آزمایش‌ها نشان داند که *B. tabaci* یک ناقل کارا و مؤثر در انتقال TLCV-Ir است و یک عدد سفید بالک هم می‌تواند ویروس را به گیاه گوجه‌فرنگی انتقال دهد و هر چه تعداد سفید بالک بازای هر گیاه بیشتر باشد شانس آلوده شدن گیاه گوجه‌فرنگی به TLCV-Ir بیشتر خواهد بود به‌طوری‌که وقتی بازای هر گیاه ۱۰ عدد سفید بالک به‌کار رود آلودگی به ۱۰۰% می‌رسد. انتقال جدایه مصری TYLVC نیز توسط یک عدد سفید بالک بازای هر گیاه حاصل شده است (Mehta *et al.* 1994). هم‌چنین گزارش شده که انتقال جدایه اسرائیلی TYLCV با ۱۵ عدد سفید بالک بازای هر گیاه و انتقال Tomato chino del virus با ۲۰ عدد سفید بالک به‌ازای هر گیاه به صد در صد رسیده است. اما راندمان انتقال جدایه مصری TYLCV وقتی ۲۰ سفید بالک بازای هر گیاه به‌کار برده شد ۹۷% بوده است (Mehta *et al.* 1994, Cohen & Nitzang 1966, Brown & Nelson 1988). در

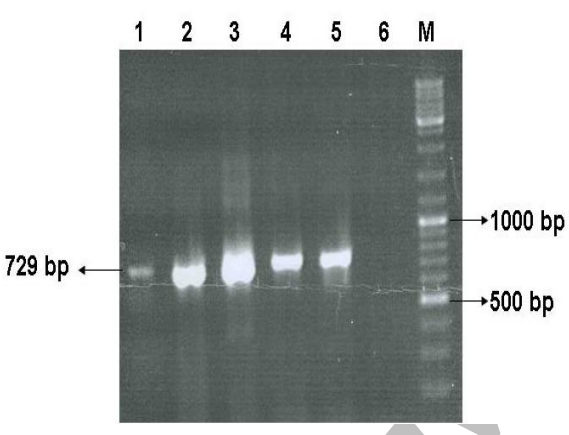
Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳. راندمان انتقال TLCV-Ir به‌وسیله *Bemisia tabaci* بعد از ۷۲ ساعت تغذیه گیرش از گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس و ۷۲ ساعت تغذیه دهش به گیاهان گوجه‌فرنگی سالم. گیاهچه‌ها دو ماه بعد از مایه‌زنی به‌وسیله روش هیبریداسیون نقطه‌ای آنالیز گردیدند (شکل ۸)

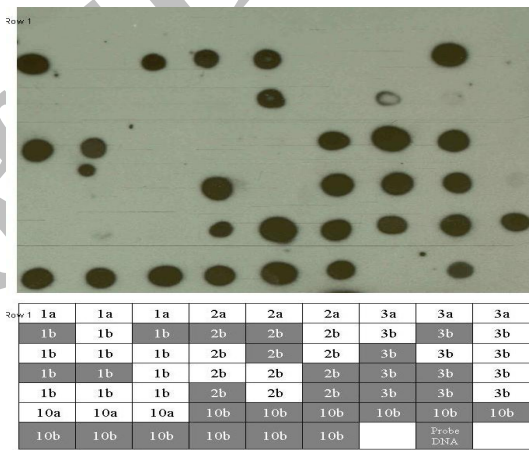
Table 3. Transmission rate of TLCV-Ir by *Bemisia tabaci* after an acquisition–access period of 72 hours on infected tomato plants and an inoculation-access of 72 hours on healthy tomato plants as a function of the number of insects per plant. Plants assayed by dot blot hybridization two months post-inoculation (Fig. 10)

تعداد سفید بالک بازای هر گیاه No. insects/plant	تعداد گیاهچه‌های آلوده به گیاهچه‌های مایه‌زنی شده No. of plants infected/No. of plants tested	میانگین گیاهچه‌های آلوده (%) Average infection rate (%)
1	4/12	33
2	6/12	50
3	6/12	50
10	12/12	100



شکل۹. تکثیر قطعه ۷۲۹ جفت بازی ژنوم TLCV-Ir از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با یک عدد سفید بالک (راهک ۱)، دو عدد سفید بالک (راهک ۲)، سه عدد سفید بالک (راهک ۳) و ده عدد سفید بالک (راهک‌های ٤ و ٥). در راهک ۶ از دی ان ای استخراج شده از گیاه گوجه‌فرنگی سالم در PCR به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. استخراج دی ان ای ۷۵ روز بعد از زمان مایه‌زنی صورت گرفت. M=marker.

Fig. 9. Amplification of a TLCV-Ir 729 bp fragment from tomato plants inoculated with one (lane 1), two (lane 2), three (lane 3) and ten (lanes 4 and 5) viruliferous whiteflies. DNA extract of healthy tomato plant was used as negative control in PCR (lane 6). DNA extraction: 75 days after inoculation. M=marker.



شکل۸. شناسایی دی ان ای TLCV-Ir در عصاره گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با سفید بالک به‌وسیله روش هیبریداسیون نقطه ای، یک ماه (a) و دوماه (b) بعد اززمان مایه‌زنی. در این آزمایش ازیک شناسگر (probe) طراحی شده بر مبنای ژنوم تمام طول TLCV-Ir استفاده شد. رنگ نارنجی و رنگ سفید در خانه‌های جدول زیر بلات به ترتیب نشان دهنده واکنش مثبت و منفی دی ان ای استخراج شده از گیاهچه‌ها با شناسگر TLCV-Ir در لکه‌های معادل در بلات بالا است. اعداد ۱، ۲، ۳ و ۱۰ تعداد سفید بالک به‌کار برده شده برای مایه‌زنی به ازای هر گیاه را نشان می‌دهند.

Fig. 8. Detection of TLCV-Ir DNA in extracts of tomato plants inoculated with one (1), two (2), three (3) and ten (10) whiteflies by dot blot hybridization assay one month (a) and two months (b) post-inoculation. The blot was hybridized with a 32P-labeled full-length TLCV-Ir probe. Gray and white colors in the cells of the table below the blot indicate positive and negative reactions of the plant DNAs with the TLCV-Ir probe, respectively.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات فوق‌الذکر نوع بیوتیپ سفید بالک مشخص نگردیده است اما در یک تحقیق جدید Jiu و *همکاران* (2006) گزارش کرده‌اند که انتقال جدایه چینی TYLCV توسط یک عدد سفید بالک از یک بیوتیپ بومی و بیوتیپ B این حشره حاصل شده است و وقتی تعداد سفید بالک‌های بیوتیپ B به پنج و بیوتیپ بومی به ۱۰ عدد حشره بالغ بازای هر گیاه رسید انتقال صد درصدی حاصل شد. هم‌چنین این مطالعه نشان داد که راندمان انتقال هر دو بیوتیپ در انتقال جمینی ویروس پیچیدگی شاخه توتون (tobacco curly shoot virus) به‌مراتب کمتر از TYLCV است به‌طوری‌که یک عدد حشره بالغ بازای هر گیاه نتوانست این ویروس را انتقال دهد و وقتی تعداد حشرات هر دو بیوتیپ به پنج یا ۱۰ عدد بازای هر گیاه رسید راندمان انتقال تنها به ۱۰ تا ۲۰درصد رسید. در این مطالعه بیوتیپ *B. tabaci* مشخص نگردید اگرچه مطالعات منتشر نشده بهجت نیا و *همکاران* که براساس الگوی آر ان ای ریبوزومی (ribosomal RNA pattern) انجام شده نشان داده است که مگس‌های سفید جمع‌آوری شده از مزارع شهرستان فسا همگی بیوتیپ B بوده‌اند. مطالعات تکمیلی شامل شناسایی بیوتیپ‌های *B. tabaci* در مناطق مختلف شیوع بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی و تعیین ومقایسه راندمان انتقال ویروس توسط انها کمک شایانی در شناخت اپیدمیولوژی بیماری و بررسی روش‌های کنترل آن دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق بر اساس طرح شماره C۳۴۶ - ۱۷۸۰۲ – AG – ۸۵ دانشگاه شیراز انجام گرفته است. نگارندگان لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز تشکر نمایند. بخشی از این تحقیقات به کمک مالی قطب علمی ویروس‌شناسی و شاخه ایرانی تواس (TWAS) انجام گرفته است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (11-13) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir