ساخت سازه عفونت‌زا و اثبات بیماری‌زایی ژنوم دو بخشی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی- جدایه ایران *

CONSTRUCTION AND DEMONSTRATION OF INFECTIVITY OF THE INFECTIOUS CLONE OF THE BIPARTITE GENOME OF TOMATO LEAF CURL PALAMPUR VIRUS-IRANIAN ISOLATE

مریم صبوری و جهانگیرحیدرنژاد[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۶)

چکیده

به منظور اثبات بیماری‌زایی و تعیین میزبان‌های آزمایشگاهی جدایه ایرانی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato leaf curl Palampur virus-IR, ToLCPMV-IR)، سازه‌های دوپار به‌طور مستقل برای هر کدام از قطعات ژنومی A و B ویروس، طراحی و داخل ناقل دوگانه pGreen0029 قرار داده شد. هر دو به‌طور جداگانه به همراه پلاسمید کمکی pSoup به سلول‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد C58 منتقل و به چند میزبان آزمایشگاهی مایه‌زنی گردیدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که سازه ساخته شده با راندمان بالائی قادر به ایجاد بیماری در خیار، کدو، گوجه فرنگی و سه گونه توتون است ولی هندوانه توسط آن آلوده نمی‌شود. آلودگی ایجاد شده از طریق سازه عفونت‌زا، توسط سفید بالک (*Bemisia tabaci*) به گیاهچه‌های سالم کدو منتقل شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ضمن اثبات قابلیت بیماری‌زایی ژنوم دو بخشی، مشخص شد که خیار گلخانه‌ای یکی از حساس‌ترین میزبان‌های آزمایشگاهی ToLCPMV-IR است. سازه ساخته شده می‌تواند در مطالعاتی مانند بررسی عکس‌العمل ارقام گیاهان میزبان در برابر ویروس و تعیین وظایف ژن‌ها استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جمینی ویروس، بگوموویروس، ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی، سازه عفونت‌زا، خیار

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

مقدمه

اعضای جنس *Begomovirus* ممکن است دارای ژنوم تک بخشی یا دو بخشی (Bipartite) باشند. بیشتر بگوموویروس‌های دنیای قدیم دارای ژنوم تک بخشی حاوی شش چارچوب خوانش (ORF) هستند درحالی‌که بیشتر بگوموویروس‌های دنیای جدید دارای دو قطعه دی ان اِی حلقوی موسوم به DNA-A و DNA-B هستند که به ترتیب دارای شش و دو چارچوب خوانش می‌باشند (Brown *et al.* 2012). انتقال این ویروس‌ها توسط سفیدبالک [*Bemisia tabaci* (Gennadius)] صورت می‌گیرد (Morales 2011). در ایران یکی از بیماری‌های مهم ناشی از بگوموویروس‌ها، بیماری پیچیدگی برگ گوجه فرنگی است که اولین بار در سال ۱۹۹۶ با استفاده از روش dot-blot hybridization از استان‌های جنوبی گزارش شد (Hajimorad *et al.* 1996). در مطالعات بعدی طول ژنوم کامل چندین گونه و نژاد از ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) تعیین ترادف شد (Bananej *et al.* 2004; Behjatnia *et al.* 2003; Pakniat *et al.* 2010). گزارش‌های فوق همگی مربوط به جدایه‌هایی از ویروس‌های مذکور با ژنوم تک بخشی بودند. اولین بار جدایه ایرانی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCPMV-IR) با ژنوم دو بخشی در سال ۲۰۰۹ از مزارع گوجه فرنگی استان‌های کرمان و هرمزگان (Fazeli *et al.* 2009) و سپس از مزارع و گلخانه‌های کاشت خیار این دو استان گزارش گردید (Heydarnejad *et al.* 2009). تاکنون علاوه بر استان‌های فوق، ToLCPMV از استان‌های خراسان رضوی، یزد، فارس و سیستان و بلوچستان (Heydarnejad *et al.* 2013) و به غیر از ایران از کشورهای هند و پاکستان نیز گزارش شده است (Kumar *et al.* 2009; Ali *et al.* 2010). هم اکنون این ویروس یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گوجه فرنگی، خیار و سایر انواع کدوئیان (غیر از هندوانه) در مناطق جنوبی ایران محسوب می‌شود به‌طوری‌که میزان آلودگی به این ویروس در برخی از گلخانه‌ها و مزارع باز تا ۱۰۰٪ تخمین زده می‌شود (Heydarnejad *et al.* 2009; Heydarnejad *et al.* 2013).

گستردگی دامنه میزبانی، میزان خسارت و مناطق انتشار این ویروس در ایران، مطالعاتِ بیشتری در زمینه یافتن روش‌های کنترل، شناسایی سایر میزبان‌های احتمالی و تعیین نقش آنها در اپیدمی ویروس را طلب می‌کند. ساخت سازه عفونت‌زای ویروس می تواند بسیاری از مطالعات مربوط به آنها را آسان نماید. اخیراً همسانه آلوده کننده جدایه پاکستانی ToLCPMV ساخته شده و در مطالعات نوترکیبی کاذب با برخی از بگوموویروس‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفته است (Malik *et al.* 2011). در این مطالعه با توجه به دو بخشی بودن ژنوم ویروس، ساخت واحدهای دوپار برای هر دو بخش ژنوم، طراحی و ساخته شد. سپس عکس‌العمل گیاهان مختلف در مقابل آنها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه‌های خیار آلوده به ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی که برای ساخت همسانه عفونت‌زا مورد استفاده قرار گرفت، در سال ۱۳۸۸ از گلخانه‌های خیار جیرفت جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم زردی بین رگبرگ‌ها و کمی پیچیدگی برگ‌ها به سمت پایین بودند. نمونه جمع‌آوری شده که برای تکثیر طول کامل قطعه A مورد استفاده قرار گرفت T69P نام‌گذاری شد. به منظور ساختن سازه عفونت زا مربوط به

قطعه B، از نمونه T55P با رس شمار FJ660423 که قبلاً همسانه‌سازی و تعیین ترادف شده بود (Heydarnejad *et al.* 2009) استفاده شد.

استخراج دی اِن اِی کل از نمونه‌ها به روش CTAB و بر اساس روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al.* 1998) انجام شد. برای شناسایی ویروس در نمونه‌های جمع‌آوری شده، از آزمون زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) و آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217-A (TCTGAGGGCGTAAGCCCGTCC)/ToLCPMV-R1709-A (GATTAAAGGCGGCATTCCCAC) که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ جفت باز از بخش ژنومی A هستند؛ و یا از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079-F (TTGGGTCACGTTCCGCGACGAAGA)/ToLCPMV-2054-R (TACGCGCTCACAAACGATGCTGCA) که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۵۰ جفت باز از بخش ژنومی B هستند استفاده شد. طراحی آغازگرها با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی جدایه جیرفت-۲ با رس شمار EU547683 برای قطعه A و همین جدایه با رس شمار EU547681 برای قطعه B انجام شد.

برای تکثیر طول کامل هر دو قطعه ژنوم ویروس در نمونه‌هایی که قبلاً آلودگی آن به ToLCPMV-IR توسط آزمون پی سی آر اثبات شده بود از آنزیم فی دی اِن اِ پلی مراز و کیت Templiphi (Amersham Biosciences, USA) و بر اساس روش *شپرد و همکاران* (Shepherd *et al.* 2008) استفاده گردید. محصولات آر سی اِ (RCA) توسط آنزیم برشی *Pst*I که فقط دارای یک جایگاه برش در هر قطعه ژنوم ToLCPMV-IR می‌باشد بریده شده و درون پلاسمید pGEM®-3Zf(+) قرار داده شدند. پلاسمیدهای استخراج شده برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

به منظور ساخت همسانه عفونت زا، از روش قرار دادن هر دو قطعه ژنوم ToLCPMV-IR به طور مستقل و به صورت نسخه‌های دوپار درون ناقل دوگانه pGreen0029 (Hellens *et al.* 2000) استفاده گردید. برای ساختن سازه‌های مورد نظر، ابتدا پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم برشی *Pst*I بریده شده و از طرف دیگر پلاسمید pGreen0029 نیز با آنزیم برشی فوق بریده شدند. به منظور قرار دادن دو طول ژنوم کامل از هر کدام از قطعات A و B به‌طور مستقل درون ناقل دوگانه، در واکنش Ligation از غلظت شش برابر قطعات ژنومی در مقایسه با ناقل دوگانه (pGreen0029) استفاده گردید. بعد از عمل تراریخت‌زایی سلول‌های باکتری *Escherichia coli* نژاد JM107، پلاسمیدهای نوترکیب pGreen0029 حاوی واحدهای دوپار مشابه برای هر کدام از قطعات ژنومی A و B، به سلول‌های باکتری *A. tumefaciens* نژاد C58 منتقل شدند. برای این منظور، به‌طور همزمان از پلاسمید کمکی pSoup و یکی از سازه‌های ساخته شده مربوط به هر کدام از قطعات A یا B استفاده شد.

به منظور آماده‌سازی مایع مایه‌زنی، دو تا سه روز قبل، کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pSoup و هر کدام از سازه‌های حاوی قطعات A و B روی محیط کشت جامد LB محتوی آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین کشت و در انکوباتور دمای ۲۵-۲۸°C نگهداری شدند. مایه‌زنی گیاهان با مخلوطی از دو سازه یا توسط پلاسمید pGreen به عنوان شاهد منفی (بدون در بر داشتن قطعات ژنومی ویروس) دو مرتبه برای هر گیاهچه و به صورت تزریق ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در مرحله سه برگ اولیه با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتری در دمای ۲۵°C و بر اساس روش

گریمسلی و همکاران (Grimsley *et al.* 1986) صورت گرفت. تزریق اول در ناحیه مرکزی ساقه دقیقا در قسمت طوقه و دومین تزریق در محل انشعاب برگ از ساقه انجام شد. به منظور بررسی توانایی بیماری‌زایی مستقل قطعه ژنومی A، سازه دوپار حاوی قطعه ژنومی A به‌طور منفرد به بوته‌های کدو رقم مراغه نیز مایه‌زنی شد. گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه در دمای ۲۵°C نگهداری شدند و تا هشت هفته بعد از مایه‌زنی جهت مشاهده علائم مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر بررسی علائم، آلودگی و عدم آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده توسط آزمون پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217-A/ToLCPMV-R1709-A برای قطعه A و آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079-F/ToLCPMV-2054-R برای قطعه B مورد ارزیابی قرار گرفت.

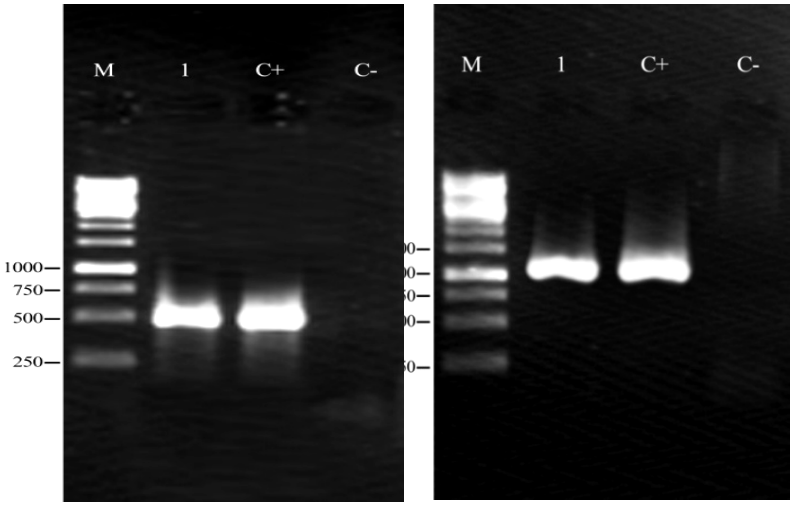
به منظور بررسی قابلیت انتقال آلودگی توسط سفید بالک (*B. tabaci*) از گیاهانی که با روش مایه زنی با سازه‌های عفونت زا آلوده شده بودند به گیاهان سالم، تعدادی سفیدبالک عاری از ویروس در زیر سرپوش به بوته‌های خیار که توسط سازه عفونت‌زا آلوده شده بود، منتقل شدند. بعد از دو هفته، پنج گیاهچه کدوی سالم در مرحله سه برگی به زیر محفظه توری اضافه شد. بعد از هشت هفته قابلیت انتقال آلودگی توسط سفیدبالک از گیاهان آلوده به گیاهان سالم کدو با مشاهده علائم مشخص ToLCPMV-IR و آزمون زنجیره‌ای پلی مراز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

آزمون آر سی اِ به منظور تکثیر قطعات کامل ژنوم ویروس و متعاقب آن برش این محصولات با آنزیم برشی *Pst*I، منجر به به‌دست آمدن یک قطعه به اندازه تقریبی سه کیلو باز برای نمونه T69P در ژل آگاروز گردید. همسانه‌سازی و تعیین ترادف این قطعات نشان داد که طول قطعات A و B (برای نمونه‌های T69P و T55P) به‌ترتیب ۲۷۵۶ و ۲۷۲۵ نوکلئوتید می‌باشد. رس شمار ترادف‌های به‌دست آمده در بانک جهانی ژن (GenBank) به ترتیب برای قطعات ژنومی A و B برابر JQ825226 و FJ660423 ثبت شده است.

نتایج حاصل از قرار دادن دو طول ژنومی کامل از هر کدام از قطعات A و B داخل ناقل دوگانه pGreen و متعاقب آن تجزیه و تحلیل قطعات به‌دست آمده در ژل آگاروز در اثر برش پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های برشی مختلف نشان داد که برخی از پرگنه‌های باکتری *E. coli* حاوی سازه‌های مورد نظر هستند. سازه‌های ساخته شده به‌طور مجزا و به همراه پلاسمید pSoup به باکتری *A. tumefaciens* انتقال داده شدند.

از ده روز بعد از مایه‌زنی گیاهان مختلف توسط مخلوطی از دو سازه به همراه پلاسمید pSoup، علائم در بسیاری از گیاهان میزبان ظاهر شد. در حالی‌که گیاهان خیار که با پلاسمید pGreen بدون در بر داشتن قطعات ژنومی ToLCPMV-IR (به عنوان شاهد منفی) مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند. آزمون زنجیره‌ای پلی مراز نیز آلودگی گیاهان گروه اول را با تکثیر قطعات ۵۰۰ و/یا ۱۰۵۰ جفت بازی به ترتیب برای قطعات ژنومی A و B تأیید نمود (شکل ۱). در همین آزمون، از گیاهانی که با پلاسمید pGreen (به‌عنوان شاهد منفی) مایه‌زنی شده بودند هیچ قطعه‌ای تکثیر نگردید. بر این اساس، سازه عفونت‌زای ToLCPMV-IR با راندمان بالائی (به استثنای هندوانه) قادر به ایجاد آلودگی در گیاهان میزبان بود. راندمان آلودگی در خیار رقم هیبرید

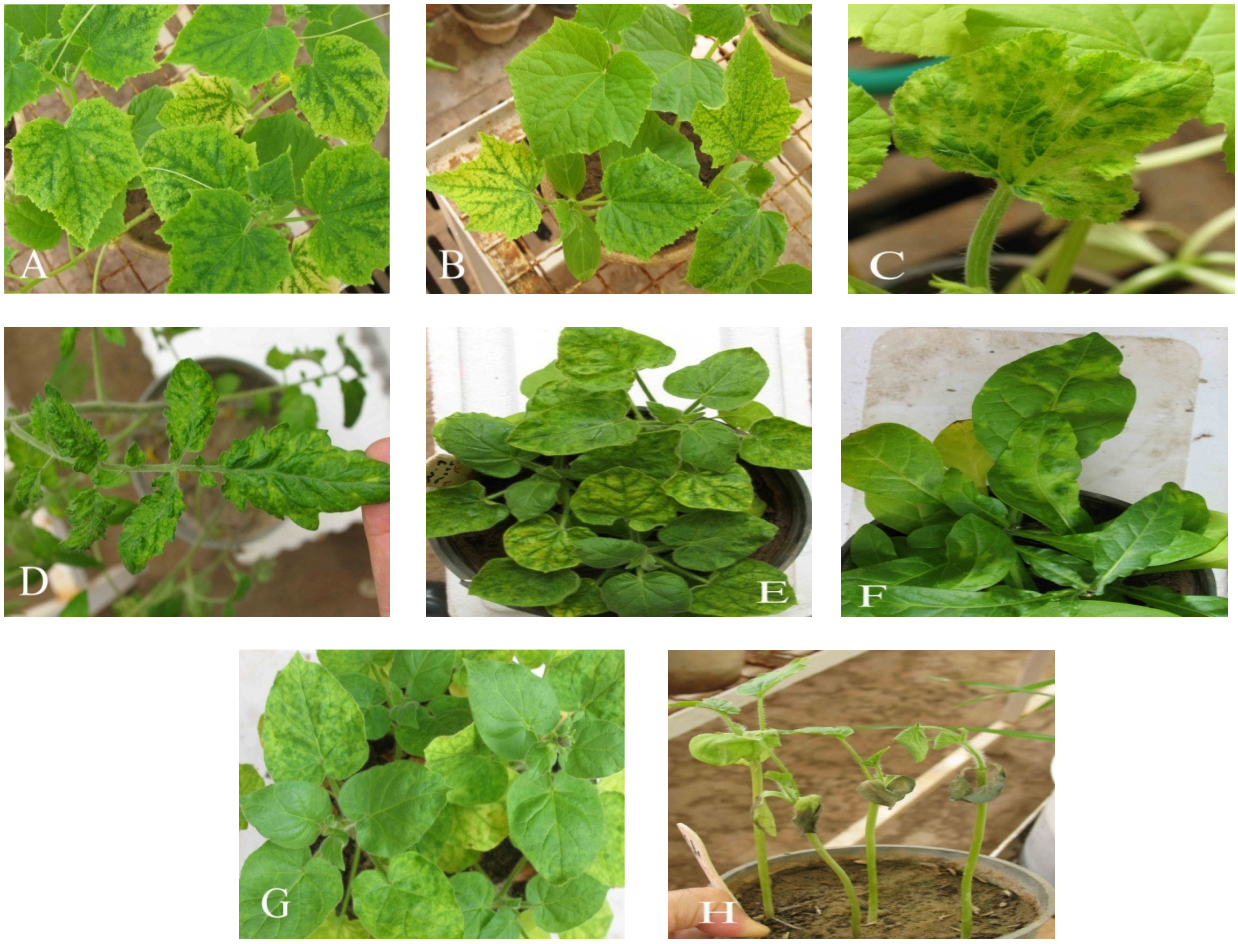


شکل ۱. الگوی الکتروفورزی محصولات پی سی آر تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217-A/ToLCPMV-R1709-A (سمت چپ) و آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079-F/ToLCPMV-2054-R (سمت راست) در ژل آگاروز ۱٪ به منظور شناسائی به ترتیب قطعات ژنومی A و B جدیه ایرانی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCPMV-IR). خیار آلوده شده توسط همسانه عفونت‌زا (1)، خیار آلوده به ToLCPMV-IR به‌عنوان شاهد مثبت (+C)، خیار سالم به عنوان شاهد منفی (-C)، نشانگر مولکولی (M).

Fig. 1. Electrophoretic patterns of amplified PCR products of Iranian isolate of Tomato leaf curl Palampur virus (ToLCPMV-IR) on 1% agarose gel using ToLCPMV-F1217-A/ToLCPMV-R1709-A (left) and ToLCPMV-1079-F/ToLCPMV-2054-R (right) specific primer pairs for identification of A and B genomic components of the virus, respectively. 1, infected cucumber by infectious clone; C+, ToLCPMV-IR infected cucumber as the positive control; C-, healthy cucumber as the negative control; M, molecular marker.

اکستریم برابر ۹۴٪ (۳۲/۳۴)، کدو رقم مراغه ۷۶٪ (۱۶/۲۱)، گوجه فرنگی رقم کوئین ۶۰٪ (۶/۱۰)، توتون گونه‌های *N. glutinosa* (۱۴/۱۴) و *N. clevelendii* (۱۱/۱۱) برابر ۱۰۰٪، توتون گونه *N. debneyii* (۵/۸) برابر ۶۲/۵٪ و هندوانه رقم Crimson sweet برابر صفر درصد (۰/۱۴) محاسبه شد. علائم ایجاد شده در بوته‌های خیار که توسط سازه عفونت‌زای ToLCPMV-IR مایه‌زنی شده بودند شامل زردی فاصله بین رگبرگ‌ها و کمی پیچیدگی برگ‌ها به سمت پایین (شکل‌های ۲A و ۲B) شبیه به علائم همین ویروس در شرایط طبیعی بود. علائم ناشی از مایه‌زنی در کدو شامل موزائیک، کوچک شدن اندازه برگ‌ها و کاهش رشد بوته (شکل ۲C) و در گوجه فرنگی لکه‌های زرد، ریز برگی و کمی پیچیدگی برگ‌ها به سمت پایین (شکل ۲D) بود که به‌ترتیب ۱۰ و ۳۰ روز بعد از مایه زنی ظاهر گردیدند.

در هر سه رقم توتون شامل *N. glutinosa*، *N. clevelendii* و *N. debneyii* که توسط سازه ToLCPMV-IR مایه‌زنی شده بودند موزائیک خفیف شامل لکه‌های سبز تیره در زمینه سبز کم رنگ و زردی ۳۰-۲۳ روز بعد از مایه‌زنی ظاهر گردید (شکل‌های ۲E، ۲F و ۲G). مایه‌زنی گیاه هندوانه با سازه ToLCPMV-IR، چند روز بعد از عمل مایه‌زنی، منجر به نکروز شدید، پژمردگی و سپس مرگ تعدادی از بوته‌ها گردید



شکل ۲. علائم گیاهان مایه‌زنی شده با سازه عفونت‌زای ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی شامل زردی فاصله رگبرگ‌ها در بوته‌های خیارِ گلخانه‌ای رقم هیبرید اکستریم (A و B)، موزائیک، زردی و کوچک شدن برگ در کدو رقم مراغه (C)، لکه‌های سبزرد، ریز برگی و پیچیدگی برگ‌ها به سمت پایین در گوجه‌فرنگی رقم Queen (D)، لکه‌های سبزرد در گونه‌های توتون (E) *Nicotiana glutinosa*، (F) *N. debneyii* و (G) *N. clevelendii* و نکروز برگ‌ها در هندوانه رقم Crimson sweet (H).

Fig. 2. ToLCPMV agroinoculated plants showing vein banding and yellowing on cucumber variety Extreme hybrid (A and B), mosaic, yellowing and reduced size leaf on squash variety Maragheh (C), chlorotic spots, fine leaf and leaf curling toward down on tomato variety Queen (D), chlorotic spots on three tobacco species, *Nicotiana glutinosa*, *N. debneyii* and *N. clevelendii* (E, F and G, respectively) and leaf necrosis reaction on watermelon variety Crimson sweet (H).

(شکل ۲H). در بوته‌های باقیمانده نیز بعد از نکروز شدید برگ‌های مایه‌زنی شده، گیاه تولید برگ‌های جدید و بدون علائمی کرد که ویروس در آنها ردیابی نشد.

در این تحقیق لزوم وجود قطعه ژنومی B جهت ایجاد آلودگی سیستمیک توسط ToLCPMV-IR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ علائمی در بوته‌های کدو که تنها توسط سازه حاوی قطعه ژنومی A مایه‌زنی شده بودند مشاهده نگردید. اما بعد از ۲۰ روز، وجود قطعه A در برگ‌های مایه‌زنی شده توسط آزمون پی سی آر ردیابی شد، در حالی‌که این قطعه در برگ‌های جوان انتهایی ردیابی نشد. بر این اساس به دلیل وجود ژن پروتئین حرکتی ویروس روی قطعه ژنومی B، قطعه

ژنومی A به تنهایی قادر به ایجاد آلودگی سیستمیک نبوده ولی تکثیر شده و در ناحیه مایه‌زنی شده باقی می‌ماند. آزمایش مشابهی نیز روی ویروس نیودهلی پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV)، که یک بگوموویروس با ژنوم دو بخشی است، نشان داده شد که وجود قطعه B برای ایجاد آلودگی سیستمیک توسط ویروس الزامی است (Saeed *et al.* 2007).

نتایج حاصل از بررسی قابلیت انتقال آلودگی توسط سفیدبالک، از گیاهانی که توسط مایه‌زنی با سازه عفونت زا آلوده شده بودند نشان داد که بعد از دو هفته از شروع تغذیه سفیدبالک از گیاهچه‌های سالم کدو، تمامی این گیاهان (۵/۵) که مورد تغذیه ناقل قرار گرفته بودند علائم مشخص ToLCPMV-IR شامل موزائیک، کوچک شدن اندازه برگ‌ها و کاهش رشد بوته نشان دادند. آلوده بودن گیاهان فوق، توسط آزمون زنجیره‌ای پلی مراز نیز تأیید شد. بر اساس این نتایج، روشِ آلودگی گیاهان میزبان از طریق سازه عفونت‌زا، اثری روی قابلیت انتقال ویروس توسط ناقل (سفیدبالک) ندارد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (138-137) متن انگلیسی مراجعه شود.