مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

تعیین فرمهای تکثیری ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند با کمک کاوشگر رادیواکتیو

امید عینی* ، وحید حسینی
گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، کد پستی ۳۸۷۹۱-۴۵۳۷۱

چکیده: جمینی‌ویروس‌ها از مهمترین ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که پس از ویروس‌های با ژنوم آر ان ا مثبت بیشترین تعداد ویروس‌های گیاهی را شامل می‌شوند. در این تحقیق کاربرد مواد رادیو اکتیو در ردیابی دقیق و همچنین تعیین فرم تکثری ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند ارزیابی شده است. تلقیح همسانه عفونت زای ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند در گیاهان توتون (*Nicotiana amianabenth*) سبب بروز علایم کوتولگی شدید و پیچیدگی برگ به طرف بالا در ۹۰٪ گیاهان تلقیح شد. هیبریداسیون دی ان ا با کمک مواد رادیواکتیو بیانگر وجود فرم‌های تکثیری این ویروس در گیاهان آلوده بود. مقایسه نتایج بلات نقطه ای و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان داد که استفاده از هیبریداسیون دی ان ا در ردیابی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند دقیق تر از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد. . بنابراین هیبریداسیون دی ان ا روشی مطمئن و مناسب در تعیین فرمهای تکثیری و ردیابی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند و سایر دی ان ا ویروسهای گیاهی می باشد.

واژگان کلیدی: جمینی‌ویروس، هیبریداسیون دی ان ا، ساترن بلات، بلات نقطه ای

Omid Eini*, Vahid Hoseini
Address: Dept. Plant Protection, Faculty of agriculture, University of Zanjan

Abstract: Geminiviruses are important plant pathogenic viruses. They are the second largest plant viruses. This study presents the application of radioactive materials for precise detection and characterization of replication forms for Beet curly top Iran virus (BCTIV). Virus inoculation in tobacco (*cotianaNi benthamiana*) plants using an infectious clone produced severe stunting and leaf rolling in 90% of the inoculated plants. DNA hybridization using radioactive materials showed replication forms for this virus in the infected plants. Comparison of dot blot and polymerase chain reaction (PCR) results showed that DNA hybridization is more precise than PCR in detection of BCTIV. Therefore, DNA hybridization is a reliable method for studying replication forms and detection of BCTIV and other plant DNA viruses.

مقدمه

ویروس‌های گیاهی مجموعه‌ای از یک یا چند مولکول اسید نوکلئیک (دی ان ا یا ار ان ا) می‌باشند که معمولا داخل یک پوشش حفاظتی پروتئینی قرار گرفته اند. ویروس‌ها تنها درون سلول‌های میزبان مناسب قادر به تکثیر می‌باشند و همانندسازی آن‌ها کاملا وابسته به سیستم ساخت پروتئین میزبان می‌باشد. ویروس‌های گیاهی پیکره‌های میله‌ای، چند وجهی و یا رشته‌ای دارند .از نظر ژنومی، اکثر ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم از نوع آر ان ای و تعداد قابل توجهی از ویروس‌های مهم دارای ژنوم از نوع دی ان ای می‌باشند (Hull, 2002).

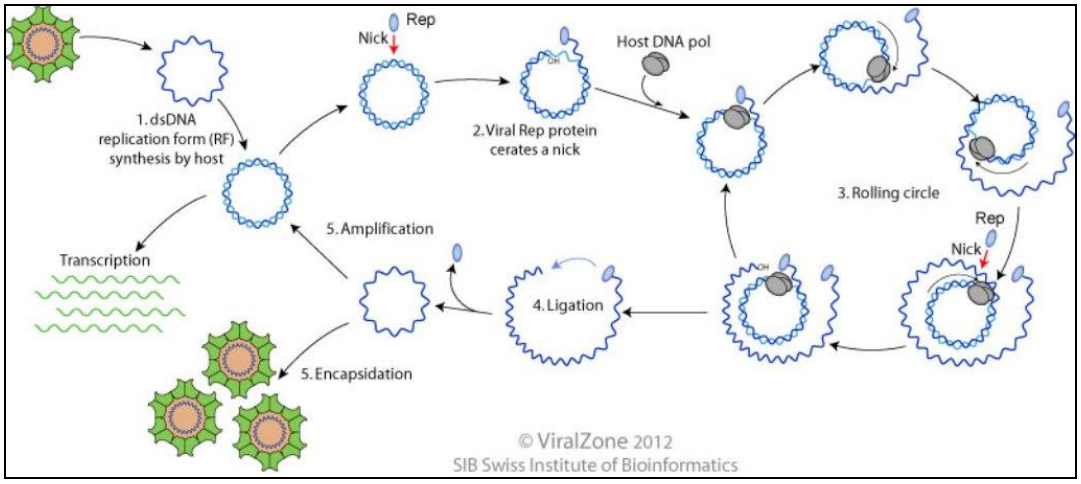
خانواده جمینی‌ویروس‌ها شامل گروه بزرگی از ویروس‌های گیاهی است که دارای ژنوم دی ان ا تک رشته‌ای، حلقوی یک یا

دوبخشی با پیکره‌های ایزومتریک (Isometric particles) دوقلو به ابعاد ۱۸ تا ۳۰ نانومتر می‌باشند. اندازه ژنوم دی ان ا این ویروس‌ها دو و نیم تا سه کیلو دالتون می‌باشد. ویروس‌های با ژنوم دو بخشی دارای دو قطعه با نام DNA-A و DNA-B می‌باشند که در روی هرکدام از قطعات یک سری از ژن‌ها موجود می‌باشند. ژن‌های مسئول در همانندسازی، تنظیم بیان ژن و کپسیده کردن در روی قطعه A و ژن‌های مسئول در حرکات ویروسی و ژن‌های تعیین کننده دامنه میزبانی و نوع علایم در روی قطعه B قرار دارند (Rodríguez-Pardina et al., 2006).

جمینی‌ویروس‌ها دامنه وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کنند و خسارت اقتصادی بالایی در محصولات مهم از قبیل گوجه‌فرنگی، لوبیا، کدو، چغندرقند، توتون و ذرت ایجاد می‌کنند. میزان خسارت این ویروس‌ها بسته به تعداد گیاهان آلوده و سن گیاهان در موقع آلودگی بین ۲۰ تا ۱۰۰ می‌باشد (Morales and Anderson, 2001).

گیاهان آلوده به جمینی‌ویروس‌ها اغلب نشانه‌های پیسک مشخص تا نوعی موزائیک زرد را از خود نشان می‌دهند و برگ-هایشان ممکن است پیچیده و یا بد شکل گردد. وقتی گیاهان جوان آلوده به ویروس شوند بوته‌ها کوتوله شده و کپه‌ای می-مانند. آلودگی گیاهان مسن‌تر منتج به کاهش رشد شاخ و برگ جدید و کاهش تشکیل میوه می‌شود(Hull, 2002) .

همانندسازی جمینی‌ویروس‌ها توسط مکانیسم دایره غلتان (Rolling Circle Replication) شبیه باکتریوفاژهایی مثل M13 و پلاسمیدها می باشد. همانندسازی در هسته سلول‌های آلوده گیاهی رخ می‌دهد. ابتدا دی ان ا تک رشته‌ای حلقوی به دی ان دو رشته‌ای حد واسط یا فرم تکثیری تبدیل می‌شود و سپس مکانیسم دایره غلتان شروع می‌شود که در آن رشته‌ی دی ان ا در یک سایت مشخصی واقع در مبداء همانندسازی توسط پروتئین تکثیری (Replication-associated protein) شکاف داده می‌شود تا همانندسازی شروع شود (Chasan, 1995).



شکل ۱- ۰مکانیسم دایره غلتان و همانند سازی جمینی‌ویروس‌ها

درگیاهان آلوده به جمینی‌ویروس‌ها علاوه بر دی ان ا ژنومی انواع مختلفی دی ان ا کوچکتراز ژنوم نیزحضوردارند که برخی

از ژنوم ویروس مشتق شده ویا دارای توالی‌های متفاوت از ژنوم ویروس هستند. بیشتر این مولکولها برای همانند سازی، پروتئین پوششی وحرکت درگیاه به ویروس اصلی وابسته هستند. دی ان ا های ناقص، دی ان اهای ناقص مداخله گر و دی ان ا ستلایت‌ها از این گروه مولکولها می باشند (Briddon and Stanley, 2006). این مولکول‌های کوچک دی ان ا بر میزان و شدت بیماری ویروسی تاثیر گذارند.

شناسایی فرم‌های تکثیری جمینی‌ویروس‌ها و همچنین مولکول‌های کوچک دی ان ا مرتبط با آن‌ها در مطالعه تکثیر این ویروس‌ها و همچنین بهره‌گیری از این مولکول‌ها در بیوتکنولوژی اهمیت دارد. از روش‌های دقیق و حساس در مطالعه فرم-های تکثیری جمینی‌ویروس‌ها و ردیابی مولکول‌های کوچک دی ان ا مرتبط، استفاده از روش ساترن بلات یا دات بلات می-باشد. در این تحقیق با کمک کاوشگرهای نشان دار شده با مواد رادیواکتیو (^{32}P) فرم‌های تکثیری و همچنین میزان آلودگی گیاه توتون (*Nicotiana benthamina*) به ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

تلقیح گیاهان با همسانه عفونت زای ویروس

در این تحقیق از همسانه عفونت‌زای ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند (*Beet curly top Iran virus*) استفاده شد. همسانه عفونت‌زای ویروس که حاوی قطعه دی ان ا معادل یک و چهار دهم برابر ژنوم ویروس می‌باشد (Eini et al , unpublished) در یک حامل دوتایی وارد گردید. سپس این همسانه به سلولهای باکتری *Agrobacterium tumefacience* سویه GV3101 با روش شوک دمایی منتقل شد. پس از گزینش سلولهای باکتری با کمک آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر)؛ گیاهان توتون با روش اگروواینوکولیشن (Kheyr-Pour et al., 1991) با باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب می‌باشد مایع زنی شدند. علایم بیماری ١٤ تا ٢٨ روز بعد از آلودگی بررسی و از گیاهان دارای علایم پیچیدگی برگ و کوتولگی نمونه برگی جمع آوری گردید.

استخراج دی ان ا ژنومی از برگ گیاه

برای استخراج دی ان ا ژنومی از نمونه های گیاهی از روش روحی بخش و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ تازه یا فریز شده در هاون چینی استریل با کمک ازت مایع پودر گردید. سپس به میزان یک میلی‌لیتر از بافر Gem-CTAB (۱۰۰ میلی مولار تریس-کلریدریک اسید ، ۱۰ میلی مولار EDTA و ۲٪ C-TAB) که قبلا گرم شده (٦٥ درجه سانتی‌گراد) به تیوب حاوی پودر گیاهی اضافه گردید. و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. حدود ۰/۸ حجم تیوب به آن کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی مخلوط شد. پس از سانتریفوژ نمونه ها به فاز رویی ایزوپروپانول سرد اضافه و رسوب دی ان ا تهیه شده با اتانول ۸۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شدند. دی ان ا استخراج

شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای تعیین کیفیت و کمیت دی ان ا های استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل NanoDrop 2000 (شرکت Thermo Scientific) استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (5'-ATGGCGGTTCAAAGTCAGAAG/ 5'-TCAATAGAAATAAGCCCTAC-3') که قطعه ای به طول ۷۵۳ نوکلئوتید را تکثیر می‌کند انجام شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناژن) که حاوی آنزیم Taq پلی مراز، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نوکلئوتیدها و MgCL2 می‌باشد به همراه پنج پیکومولار از هر آغازکر تهیه گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل ASTEC PC-320) با یک چرخه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه به مدت ٤۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه حرارتی ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با الکتروفورز در آگارز بررسی گردید.

آزمایش ساترن بلات (Southern blot)

مقدار پنج میکروگرم دی ان ا از گیاهان آلوده به ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر و همچنین گیاهان سالم با کمک الکتروفورز روی ژل آگارز (۱٪) بر اساس اندازه و شکل از هم تفکیک گردید. سپس قطعات دی ان ا از ژل به یک غشای نیتروسلولزی با کمک خاصیت مویینگی و بافر هیروکسید سدیم (۰,٤ مولار) منتقل گردیدند. قطعات منتقل شده با کمک اشعه ماورای بنفش بر روی این غشا تثبیت شدند. دورگه گیری (Hybridization) دی ان ا با کمک دی ان ا کاوشگر که مکمل ژن پوشش پروتیینی از ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر بوده و با فسفر ۳۲ (^{32}P) نشاندار گردیده بود انجام گرفت. اتصال کاوشگر به قطعات دی ان ا هدف پس از ۲٤ الی ٤۸ ساعت روی فیلم (X-ray) مشاهده گردید.

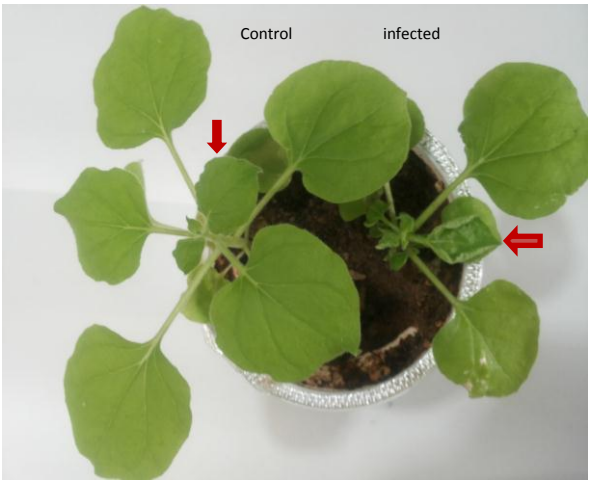
بلات نقطه ای (Dot blot)

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی از برگ‌های جدید گیاهان مورد آزمایش انتخاب و در محلول ۰/٤ مولار هیروکسید سدیم خرد شدند. نمونه‌ها سپس به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ (۱۱۰۰ دور در دقیقه) شدند. از هر نمونه مقدار پنج میکرولیتر روی یک غشای نیتروسلولزی قرار داده شد. جهت حذف بقایای پروتئینی غشای نیتروسلولزی با کلروفرم شستشو داده شد. دورگه گیری دی ان ا با روش بالا صورت گرفت. اتصال کاوشکر به ویروس هدف پس از ۲ الی ۲٤ ساعت روی فیلم (X-ray) مشاهده گردید.

نتایج و بحث

علایم کوتولگی و پیچیدگی برگ به طرف بالا در ۹۰٪ گیاهان تلقیح شده با همسانه عفونت زای ویروس ایرانی پیچیدگی

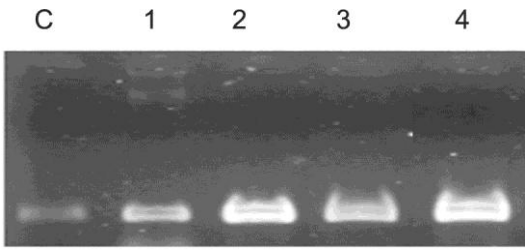
بوته چغندرقند مشاهده گردید (شکل ۲). این علایم در میزبان‌های مختلف این ویروس از جمله توتون گزارش شده است (Soleimani et al., 2013). شدت بروز علایم توسط این ویروس و ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندرقند قابل مقایسه می‌باشد که بیانگر ویرولانس بالای این ویروس در ایجاد بیماری می‌باشد.



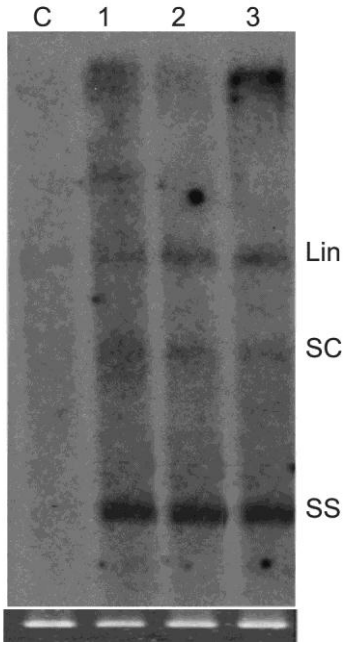
شکل ۲. علایم کوتولگی و پیچیدگی برگ در گیاه توتن آلوده به ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند (سمت راست) در مقایسه با گیاه سالم (سمت چپ)

فرم‌های تکثیری ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند

جمینی ویروس‌ها دارای ژنوم حلقوی از نوع دی ان ا تک رشته‌ای می‌باشند و در میزبان خود به فرم‌های تک رشته، فرا پیچشی و خطی قابل ردیابی هستند (Hull, 2002) . به منظور تایید تکثیر و همچنین مشاهده فرم‌های تکثیری همسانه تهیه شده ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند در میزبان از روش هیبریداسیون دی ان ا استفاده شد. نتایج هیبریداسیون دی ان ا (شکل ٤) نشان داد فرم‌های تک رشته، فرا پیچشی و خطی در نمونه‌های آلوده وجود دارد. فرم تک رشته‌ای بیشترین مقدار دی ان ا را در بر می‌گیرد که بیانگر فرم اصلی ژنوم این ویروس می‌باشد. فرم تک رشته‌ای این ویروس (شکل ٤) و سایر جمینی‌ویروس‌ها بیشترین مقدار دی ان ا ویروسی را به خود اختصاص می‌دهد (Gutierrez, 1999). تعیین فرم‌های تکثیری این ویروس و همچنین سایر جمینی‌ویروس‌ها با روش‌های ردیابی عمومی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز امکان پذیر نیست و نیاز به استفاده از روش ساترن بلات و هیبریداسیون دی ان ا دارد. این روش علاوه بر اختصاصیت بالا به دلیل استفاده از قطعه دی ان ا با اندازه ای بیش از ۱۰۰ نوکلئوتید قادر است مقادیر کم ویروس را نیز ردیابی کند. بنابراین این روش در تعیین مقدار ویروس در گیاه نیز استفاده می‌گردد.



شکل ۳. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پوشش پروتئینی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند. یک نمونه گیاه سالم (C)و چهار نمونه گیاه باعلایم ویروسی (٤-۱) در این ازمایش استفاده گردید.



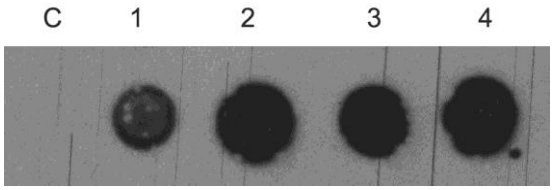
شکل ٤. آزمایش ساترن بلات با کمک دی ان ا کاوشگر نشاندار شده با فسفر (^{32}P) مکمل ژن پوشش پروتیینی از ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند. اتصال کاوشگر به قطعات دی ان ا هدف پس از ٢٤ ساعت روی فیلم (X-ray) مشاهده گردید. نمونه های دی ان ا از گیاه سالم (c) و آلوده به ویروس (۳-۱)انتخاب گردید. فرمهای مختلف دی ان ای ویروس در سمت راست تصویر بیانگر فرم خطی (Lin)، فراپیچشی (SC) و تک رشته ای (SS) ویروس می باشند. مقدار دی ان ا مورد استفاده در پایین شکل نشان داده شده است.

ردیابی دقیق و سریع جمینی‌ویروس‌ها با روش‌های مختلفی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز امکان پذیر می‌باشد. هر چند این روش به دلیل امکان آلودگی دی ان ا در هنگام کار یا اتصال غیر اختصاصی آغازگرها دقت پایین‌تری نسبت به روش‌های دیگر از جمله هیبریداسیون دی ان ا دارد. در این تحقیق از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور ردیابی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند و همچنین مقایسه دقت این روش با روش بلات نقطه ای استفاده گردید. شکل شماره سه نشان می‌دهد یک قطعه دی ان ا با اندازه مشابه به قطعه تکثیر شده ویروسی در نمونه گیاه سالم تکثیر یافته که بیانگر آلودگی احتمالی در حین تهیه دی ان ا یا هنگام انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. در حالیکه نتیجه بلات نقطه ای به درستی عدم وجود ویروس در گیاه سالم را نشان می‌دهد (شکل ٥).

ردیابی نقطه ای به دلیل عدم نیاز به روش‌های معمول و زمان‌بر استخراج دی ان ا و همچنین اختصاصیت بالای ردیابی مورد توجه است. در این تحقیق ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند در ۹۰ ٪ گیاهان تلقیح شده با همسانه عفونت زای این ویروس تکثیر کرده است. درصد بیماری به عواملی از قبیل زمان آلوده سازی گیاه، نوع میزبان و تعامل بین ویروس و میزبان دارد (Hull, 2002). ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد و

تاکنون از گیاهان مختلفی مثل چغندرقند، لوبیا، گوجه فرنگی و لوبیا چشم بلبلی در ایران ردیابی شده است (Kardani et al., 2013) (Soleimani et al., 2013).

شکل ۵. بلات نقطه ای دی ان ا جهت ردیابی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر در گیاه سالم (c) و آلوده (٤-١) به ویروس دو ساعت پس از هیبریداسیون با کمک دی ان ا کاوشگر نشاندار شده با فسفر (^{32}P) مکمل ژن پوشش پروتیینی از ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند.



روش ردیابی نقطه ای در تعیین کمیت جمینی‌ویروس‌ها نیز استفاده شده است (Bian et al., 2007). بنابراین میزان تراکم نقطه ها در شکل پنج بیانگر تکثیر بالاتر ویروس در این گیاهان خواهد بود. اگرچه تعیین کمیت در این روش نیازمند دقت بالا در نمونه‌گیری و استفاده مقدار یکسان دی ان ا می‌باشد.

از مواد رایواکتیو در روش هیبریداسیون برای ردیابی جمینی‌ویروس‌ها به طور وسیعی استفاده شده و با وجود در دسترس بودن نشانگرهای غیر رادیو اکتیو از قبیل دیگ سیستم (Digoxigening system) استفاده از این مواد به دلیل حساسیت بالاتر در دریابی ویروس‌ها خصوصا در مواردی که میزان ویروس در میزبان پایین است اهمیت دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر بهجت نیا (دانشگاه شیراز)برای کمک در تهیه کلون بیمارگر این ویروس، از مهندس قنبری و مهندس خوش نظر برای کمکهای آزمایشگاهی و همچنین از تاتیانا پیووارنکو (دانشگاه آدلاید)برای کمک در هیبریداسیون دی ان ا تقدیر و تشکر می نمایند.

منابع

A. Kheyr-Pour, M. Bendahmane, V. Matzeit, G. P. Accotto, S Crespi, B, Gronenborn, "Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus", Nucleic Acids Research 19, 6763–6769 (1991).
A. Rouhibakhsh, J, Priya, M, Periasamy, Q. M. I. Haq and V. G. Malathi, "An improved DNA isolation method and PCR protocol for efficient detection of multicomponents of *begomovirus* in legumes", Journal of Virological Methods. 147, 37-42 (2008).
B. L. Patil and I. Dasgupta, "Defective interfering DNAs of plant viruses", Critical Reviews in Plant Sciences 25,47–64 (2006).

C. Gutierrez, "Geminivirus DNA replication", Cellular and Molecular Life Sciences. 56, 313-329 (1999).
F. J. Morales and P. K. Anderson, "The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America", Archives of Virology. 146, 415-441 (2001).
P. E. Rodriguez-Pardina, F. M. Zerbini and D. A. Ducasse, "Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina", Fitopatologia Brasileira**,** *31*, 342-348 (2006).
R. Chasan, "Geminiviruses: A Twin Approach to Replication", Plant Cell. 7, 659-661(1995).
R. W. Briddon and J. Stanley, "Sub-viral agents associated with plant-infecting single-stranded DNA viruses", Virology. 344, 198-210 (2006).
R., Hull, Mattews' Plant virology. 4th Ed. Academic Press, London (2002).
S. G. Kardani, J. Heydarnejad, M. Zakiaghl, M. Mehrvar, S Kraberger and A,Varsani, "Diversity of Beet curly top Iran virus isolated from different hosts in Iran", Virus Genes. 46, 571-575 (2013).
R. Soleimani, S. Matic,.H. Taheri, S. A. A. Behjatnia, M.Vecchiati, K. Izadpanah and G. P. Accotto, "The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: satisfying Koch's postulates and determining vector and host range", Annals of Applied Biology. *162*,174-181 (2013).
X. Bian, M. R. Thomas, M. S. Rasheed, M. Saeed, P. Hanson, P. J. D. Barro and M. A. Rezaian, "recessive allele (tgr-1) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement", Phytopathology. 97, 930-937 (2007).