SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤

مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

رديابي، كلون و تعيين توالي بخشي از ژن پروتئين پوششي جدايه‌هاي ويروس برگ بادبزني مو از شمال‌غرب كشور و تفكيك آنها

۱- محمد حاجي‌زاده*، ۲- نعمت سخندان بشير**

۱-گروه گياهپزشكي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه تبريز، ۴۴۲۲۲۳۲۲۱۸، hajizadeh2003@yahoo.com

۲- گروه گياهپزشكي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه تبريز، ۰۴۱۱۳۳۹۲۰۴۲، sokhandan@tabrizu.ac.ir

چكيده

بيماري برگ بادبزني مو (*Grapevine fanleaf nepovirus*, GFLV)، انتشار جهاني داشته و در تاكستانهاي ايران نيز شيوع دارد. اين ويروس، يكي از عوامل محدود كننده كشت درخت‌چه‌هاي مو در جهان مي‌باشد. رديابي ويروس GFL گامي موثر در جهت كنترل اين ويروس و خسارت ناشي از آن است. اين ويروس، راندمان محصول را ممكن است حتي بيش‌تر از ۸۰% كاهش دهد و باعث پايين آمدن كيفيت محصول و عمر باردهي در تاكستان‌ها شود.

در پژوهش حاضر به منظور رديابي اين ويروس از تاكستانهاي آذربايجان‌غربي و آذربايجان‌شرقي طي بهار و تابستان ۱۳۸۲و ۱۳۸۳ تعداد ۲۲۱ نمونه گياهي از تاكهاي مشكوك به آلودگي با GFLV نمونه‌برداري شدند. آرتي- پي‌سي‌آر(RT-PCR) با آغازگرهاي S2515 و A3300 منجر به تكثير قطعه دي‌آن‌اي (DNA) مورد انتظار به طول حدود ۸۱۰bp از ژن پروتئين پوششي GFLV از ۱۲ نمونه آلوده به اين ويروس شد. اين قطعات به پلاسميد pGEM-T متصل و در باكتري *E. coli* DH5α كلون شدند. باكتري‌هاي ترانسفورم شده با پلاسميد نوتركيب بر روي محيط كشت حاوي آمپي‌سيلين، IPTG و X-Gal انتخاب و غربال شده و پلاسميد حاوي قطعات پي‌سي‌آر(PCR)، از باكتريهاي ترانسفورم شده استخراج گرديدند. پلاسميدهاي استخراج شده با آنزيم *Eco*R1 كه جايگاه آن در دو طرف اويزه‌هاي T پلاسميدpGEM-T قرار دارد برش داده شدند. در برش با آنزيم *Eco*R1، پروفيل‌هاي متفاوتي در بين جدايه‌ها (توليدات پي‌سي‌آر) به دست آمد كه نشانگر وجود تغييرات ژنتيكي در بين آنها بود. به منظور انجام مقايسات دقيق‌تر بين ترادف نوكلئوتيدي اين قسمت از ژن پروتئين پوششي جدايه‌هاي مختلف GFLV و مقايسه اين جدايه‌ها با ساير جدايه‌ها و نژادهاي اين ويروس از مناطق مختلف جهان، تعيين توالي نوكلئوتيدي انجام گرفت. تعداد ۱۲ توالي نوكلئوتيدي، هر كدام به اندازه ۷٦۰ نوكلئوتيد (پس از حذف توالي‌هاي مربوط به آغازگرهاي S2515 و A3300) به پايگاه اطلاعاتي GenBank واگذار شدند.

كلمات كليدي: بيماري برگ بادبزني مو، آرتي- پي‌سي‌آر، پروتئين پوششي، تعيين توالي نوكلئوتيدي.

Detection of *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV) isolates in vineyards of West Azarbaijan, East Azarbaijan by ELISA and RT-PCR and sequencing a part of the coat protein coding region of the GFLV

Grapevine fanleaf nepovirus has a worldwide distribution and in the vineyard of Iran causes economically important damages. Detection of GFLV can be an effective step toward its control and reduce the damage.

In this research, for detection, cloning and sequencing of the virus in vineyards of West Azarbaijan and East Azarbaijan, during spring and autum of 1382 and 83, as among as 221 samples were collected.

PCR with S2515/A3300 primers corresponding to the coat protein coding region of the virus lead to the amplification of an expected 810 base pair DNA fragment from 12 samples. The 810 bp DNA fragments were ligated into pGEM-T easy vector and cloned in *E.coli* DH5a. The transformed cells were selected on Ampicillin, IPTG and X-Gal. The desired cells, then were grown and their pure colonies were prepared by single colony isolation. The plasmid extracted from the cells were restricted by *Eco*R1 whose sites are digested on both sides of the insert DNA in the plasmid vector.

In digestion with *Eco*R1 different profiles were obtained with the isolates (PCR products), indicating genetic variability between the isolates. In order to carry out more precise comparisons in the amplified portion of the coat protein gene of the isolates and comparing these isolates with other isolates and strains the amplified fragments sequenced. As many as 12 nucleotide sequences each with 760 nucleotide in length excluding the primer sequences were submitted to GenBank.

From this study, in brief, the following were concluded:

- Vineyards in the North West region of Iran are commonly infected with GFLV.
- Serologicsl and molecular techniques are optimized for the virus detection this is very important because in order to prepare virus-free cuttings, the stock must be examined with the detection method prior to, prepare the cutting.
- RFLP with *Eco*R1 on the PCR products and subsequently cloning and sequencing the products showed an obvious variation between the virus isolates. This result was an evidence for the long-time presence of GFLV in Iran, which was in turn in agreement with the idea that the North West region of Iran is the origin of grapevine.

Keyword: *Grapevine fanleaf nepovirus,* RT-PCR, pGEM-T easy, transform.

مقدمه

در سال ۱۸۸۳ براي اولين بار ويروس برگ باد بزني مو(*Grapevine fan leaf nepovirus*, GFLV) توسط راتاي از اتريش روي مو (*Vitis vinifera*) گزارش شد (Raski *et al*.,1983). سپس در سال ۱۹۵۸, هويت و همكاران گزارش كردند كه نماتد خنجري *Xiphinema index* ناقل اين ويروس مي‌باشد (Bouquet *et al*., 1981). ژنوم GFLV از دو قطعه آراناي(RNA) تک رشته‌اي با قطبيت مثبت بنامهاي RNA1 و RNA2 تشكيل شده است كه هر دو آراناي(RNA) در انتهاي ´۵ داراي پروتئين متصل به ژنوم (VPg) و در انتهاي ´۳ بصورت پلي‌آدنيني (polyA) هستند (Andert-Link *et al*., 2004). برگ بادبزني مو, يكي از قديمي‌ترين بيماريهاي شناخته شده مو در جهان است. رديابي ويروس عامل و نماتد ناقل آن، *X. index* Thorne & Allen در تاكستانهاي بومي كشورهاي شرق مديترانه و آسياي غربي (ايران و تركيه), تداعي مي‌كند كه اين بيماري از همان اوايل كشت انگور در اين مناطق وجود داشته است (Vuittenz, 1970). عقيده بر اين است كه اين ويروس از ايران باستان منشاء گرفته و به سمت غرب گسترش يافته است (Izadpanah *et al*., 2003).

علي‌رغم كشت وسيع انگور در استانهاي آذربايجان‌غربي و آذربايجان‌شرقي، اطلاعات در باره وجود، ميزان پراكنش، خسارت و تنوع جدايه‌هاي GFLV كافي نبود و نياز به مطالعه در اين باره احساس مي‌شد. اين تحقيق اولين گزارش وجود ويروس برگ بادبزني مو در استان آذربايجان‌شرقي با روش‌هاي سرولوژيكي و مولكولي و همچنين اولين گزارش تعيين توالي نوكلئوتيدي قسمتي از ژن پروتئين پوششي اين ويروس در منطقه شمالغرب كشور مي‌باشد كه اين توالي‌ها به پايگاه اطلاعاتي GeneBanck واگذار و به زودي در دسترس خواهند بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداري‌ها از تاكستانهاي استانهاي آذربايجان غربي، آذربايجان شرقي طي بهار و تابستان سالهاي ۱۳۸۲و ۱۳۸۳ انجام و ۲۲۱ نمونه مشكوك به آلودگي با GFLV به آزمايشگاه ويروس‌شناسي و مهندسي ژنتيك دانشگاه تبريز منتقل شدند. جهت بررسي وجود آلودگي باGFLV در نمونه‌ها، آزمون سرولوژيک الايزا بـه روش مستقيم (DAS-ELISA) در ميكروپليت نوع Lindbro (ساخت ايتاليا) انجام گرفت. نمونه‌هايي كه در الايزا جواب مثبت نشان دادند مورد بررسي با آرتي-پي‌سي‌آر (RT-PCR) قرار گرفتند. به اين منظور, آراناي كل از برگ‌هاي آلوده مو با دو روش فنول و كلروفرم (رسايي, ۱۳۸۲) و Rowhani *et al*. (1993) با اندكي تغييرات است‌خراج و خالص سازي شد. براي ساخت دي‌ناي مكمل(cDNA), از آغازگر ۱۶ نوكلئوتيدي اليگودي اكسي تري فسفات تيميدين [Oligo $d(T)_{16}$] استفاده گرديد.

به منظور تعيين توالي نوكلئوتيدي فراورده‌هاي پي‌سي‌آر(PCR) و انجام مقايسات بين ترادف نوكلئوتيدي ژن پروتئين پوششي ايزوله‌هاي مختلف GFLV و مقايسه آين جدايه‌ها با ساير جدايه‌ها و نژادهاي اين ويروس از مناطق مختلف جهان, قطعات تكثير يافته حاصل از پي‌سي‌آر(PCR) به وكتور pGEM-T easy متصل و در باكتري *Escherichia coli* تكثير يافتند. تهيه سلول‌هاي مستعد و ترانسفورماسيون با روش Chung *et al* (1989) و براي استخراج پلاسميد از روش ليز آلكاليني (Birboin and Doly, 1979) و يا با كيت استخراج پلاسميد كيآژن استفاده شد. باكتريهاي ترانسفورم از طريق كشت در محيط كشت حاوي IPTG و X-Gal ، الكتروفورز پلاسميدها در ژل آگارز و برش با آنزيم‌هاي برشي غربال شدند. تعيين توالي نوكلئوتيدي با روش اتومات در شركت ماكروژن كره‌جنوبي و آناليز داده‌هاي نوكلئوتيدي با نرم‌افزار GeneDoc (Nichjolas and Nicholas, 1997)و ترسيم درخت فيلوژنتيكي آن با نرم‌افزار Treecon انجام شد.

نتايج و بحث

آزمون DAS-ELISA با آنتي‌بادي پلي‌كلونال ويژه GFLV كه بر روي ۱۳۸ نمونه از مجموع ۲۲۱ جمع‌آوري شده انجام گرفت آلودگي با GFLV را در ۳۳ نمونه نشان داد.

در آرتي-پي‌سي‌آر(RT-PCR) قطعه دي‌ناي (DNA)مورد انتظار به طول حدود۸۱۰ جفت باز (شكل۱), از نمونه مثبت (بيوريبا) و بعضي از نمونه‌هايي كه در الايزا واكنش مثبت داده بودند تكثير يافت. در ضمن, در اين آزمون‌ها, هيچ قطعه دي‌ناي (DNA)از شاهد منفي (گياه سالم و بدون علايم) افزايش نيافت كه نمايانگر اختصاصي بودن آغازگرهاي مورد استفاده و قابل اعتماد بودن نتايج آرتي-پي‌سي‌آر(RT-PCR) بود.

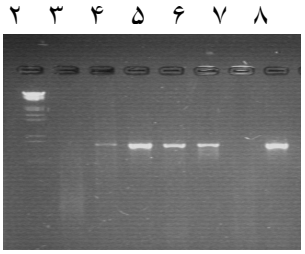
الكتروفورز پلاسميدهاي استخراج شده از باكتريهاي نوتركيب نشان داد كه اندازه قطعه دي‌ناي‌ايمتصل شده به اين پلاسميدها معادل قطعه دي‌ناي(DNA) تكثير شده در پي‌سي‌آر(PCR) است (شكل ۲).

در برش اين پلاسميدها با آنزيم *Eco*RI قطعه دي‌ناي‌اي حدود ۳۰۰۰ جفت باز مربوط به پلاسميد pGEM-T و قطعه دي-اناي(DNA) ۸۱۰ جفت باز مربوط به cDNA ژن پروتئين پوششي ويروس GFL حاصل شدند. براي يكي از جدايه‌ها (Kh7-8) سه قطعه دي‌ناي (DNA) پس از برش با *Eco*R1 توليد شدند كه نشان دهنده وجود محل اثر آنزيم *Eco*R1 در قطعه حاصل از پي‌سي‌آر(PCR) بود(شكل۳).

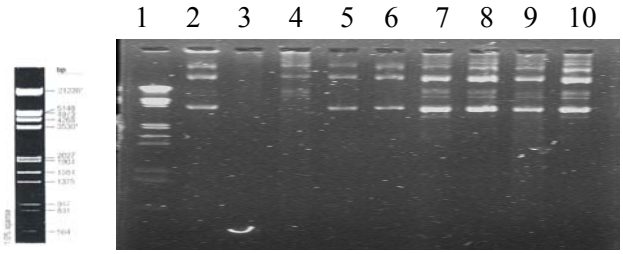
توالي نوكلئوتيدي ۱۲ قطعه دي‌ناي (DNA) حدود bp ۸۱۰ تعيين و براي ثبت در پايگاه اطلاعاتي به GeneBank واگذار گرديدند كه از اول مارس ۲۰۰۶ و يا بعداً قابل دسترس عموم خواهند بود. تجزيه داده‌هاي نوكلئوتيدي شامل زير همچيني (الاينمنت) با نرم‌افزار GeneDoc (Nichjolas and Nicholas, 1997) انجام شد و نشان داد كه قطعه دي‌ان-اي (DNA) مورد انتظار دقيقاً bp ۸۱۰ با آغازگرهاي S2515/A3300 از جدايه‌ها افزايش يافته بودند. زير همچيني توالي‌هاي نوكلئوتيدي براي ۱۲ جدايه و كلون نمايانگر تغييرات ژني قابل ملاحظه در بين آنها و همچنين بين آنها و نژادهاي از قبل شناخته شده GFLV بود. موقعيت جدايه‌هاي ايراني GFLV نسبت به جدايه‌هاي از قبل گزارش شده اين ويروس از ساير نقاط جهان در فيلوژني ترسيم شده در شكل۴ نشان داده شده است.

بين جدايه‌هاي ايراني اين ويروس تنوع قابل ملاحظه‌اي مشاهده شد. پس احتمالاً GFLV از ساليان خيلي دور در اين منطقه بوده و طي آين مدت فرصت كافي براي تكامل و ايجاد تنوع داشته است. با توجه به نتيجه اين تحقيق, مطالعات (Vuittenz., 1970) كه پيشنهاد مي‌كند بيماري برگ بادبزني مو با توجه به رديابي ويروس GFLV و نماتد ناقل آن *X.*

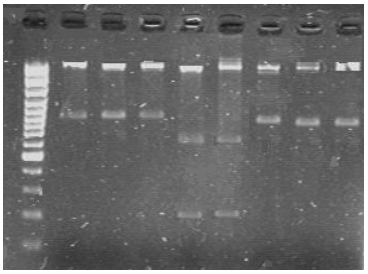
index, از همان اوايل كشت انگور در تاكستانهاي بومي كشورهاي شرق مديترانه و آسياي غربي (ايران و تركيه) وجود داشته است و يا ساير محققين (Izadpanah *et al*., 2003) كه معتقدند اين ويروس از ايران باستان منشاء گرفته و به سمت غرب گسترش يافته است, تقويت مي‌شود.



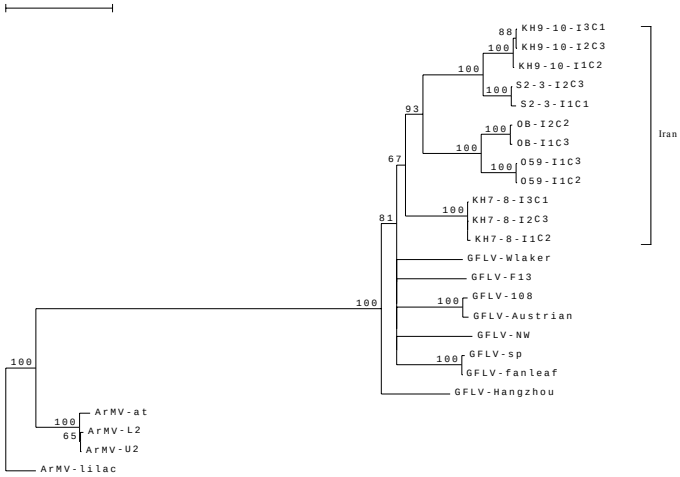
شكل۱- الكتروفورز در ژل اگارز ۱/۲% محصولات RT-PCR.
چاهک۱- Lambda DNA *Hin*dIII+*Eco*RI
چاهک۲- شاهد منفي چاهك ۳-شاهد مثبت
چاهك ۴- نمونه جمع‌آوري شده از ارومیه
چاهك ۵-۸ نمونه‌هاي جمع‌آوري شده از آذربايجان‌شرقي



شكل۲- الكترفورز در ژل اگارز ۱% پلاسميدهاي استخراج شده از كشت كلون‌هاي دارنده pGEM-T حاوي قطعه دي‌ان‌اي افزايش يافته با پي‌سي‌آر از نمونه‌هاي آلوده به ويروس برگ بادبزني مو.



شكل۳- الكتروفورز الكتروفورز در ژل آگارز ۱% قطعات حاصل از برش پلاسميدهاي نوتركيب, استخراج شده از كلوني هاي ترانسفورم شده, با آنزيم *Eco*R1



شكل ۴- فيلوژني جدايه‌هاي ايراني ويروس برگ بادبزني مو (GFLV) بر اساس cDNA منطقه مركزي ژن پروتئين پوششي ويروس در رابطه با نژادهاي از قبل شناخته شده اين ويروس و ويروس موزاييک رشاد اروپايي (ArMV) از نقاط مختلف دنيا.

منابع

- رسائي كلهر, محمد. ۱۳۸۲. رديابي جدايه‌هاي ويروس موزاييک خيار در كدوئيان منطقه باسمنج و شبستر به روش سرولوژيكي و آرتي –پي‌سي‌آر. پايان‌نامه كارشناسي ارشد. دانشكده كشاورزي, دانشگاه تبريز.

- **Andret-Link**, P., Schmitt-Keihinger, C., Demangeat, G., Komar, V., and Fuchs, M. 2004. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320: 12-22.

- **Birboin**, H. C and Doly, J. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*., 7:1513-1523, 1979.

- **Bouguet**, A. 1981. Resistance to grape fanleaf virus in Muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease*, 65: 791-793.

- **Chung**, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceeding of National Academy of Sciene*, 86: 2172-2175.

- **Izadpanah**, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y. P., Daubert, S. D., and Rowhani, A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, 87: 1179-1182.

- **Nicholas**, K. B., Nicholas Jr, H. B. 1997. GeneDoc a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author.

- **Raski**, D. J., Goheen, A. C., Lider, L. A., and Meredith, C. P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, 67:335-340.

- **Rowhani**, A., Chay, C., Golino, D. A., and Falk, W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83: 749-753.

- **Van de Peer**, Y., De Wachter, R. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate amang sites. Comput Applied Biosci. 13: 227-230.

- **Vuittenz**, A. 1970. Fanleaf of grapevine. In: N. W. Frazier (ed.). Virus Disease of small fruits andgrapevine.University of California, Berkeley. pp. 217-228.

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI