چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

همسانه سازي و تعيين توالي ژن پروتئين پوششي جدايه ايراني ويروس پيچيدگي برگ چغندرقند BCTV(*Beet curly top virus*)

الهام حسيني ابهري[1]، [*] جهانگير حيدرنژاد[1]، حسين معصومي[1]، اكبر حسيني پور[1]، سيدمنصور ميرتاج الديني[2]**
1- بخش گياهپزشكي دانشكده كشاورزي دانشگاه شهيد باهنر كرمان
2- بخش زيست شناسي دانشكده علوم دانشگاه شهيد باهنر كرمان

چكيده:
BCTV يكي از ويروسهاي مخرب چغندرقند در بسياري از نقاط ايران است. به منظور تعيين جايگاه تكاملي جدايه BCTV استان كرمان در ميان جدايه هاي اين ويروس در دنيا، ژن پروتئين پوششي (Coat Protein) CP همسانه سازي و تعيين توالي گرديد. بدين منظور، ابتدا DNA ويروس از نمونه هاي برگي چغندرقند كه توسط زنجره ناقل (*Circulifer haematoceps*) آلوده شده بودند، استخراج و ژن CP با استفاده از آغازگرهاي BCTV-F و BCTV-R در دستگاه PCR تكثير گرديد. همسانه سازي طي مراحل ligation، transformation و انتخاب كلني هاي حاوي پلاسميد نوتركيب انجام گرفت. بعد از تعيين توالي ژن پروتئين پوششي BCTV، جهت تعيين جايگاه تكاملي ويروس در ميان جدايه هاي مختلف دنيا توسط نرم افزار DNAMAN، درخت فيلوژنتيكي رسم شد. نتايج بدست آمده نشان مي‌دهد كه جدايه ايراني BCTV برخلاف گزارشات قبلي با مقادير بالاي Bootstrap (100%) از تمام جدايه هاي اين ويروس روي چغندرقند و ساير گياهان زراعي در دنيا متمايز بوده و در يك گروه تكاملي جداگانه قرار مي گيرد.
لغات كليدي: ويروس پيچيدگي برگ چغندر، همسانه سازي، درخت فيلوژنتيكي، PCR، آنزيمهاي برشي

Cloning and sequencing of coat protein (CP) gene of the Iranian isloate of *Beet curly top virus* (BCTV)

E. Hosseini Abhari[1*], J. Heydarnejad[1], H. Massumi[1], A. Hosseini Pour[1], M. Mirtadzadini[2]**

1- Plant Protection Department, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Biology Department, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

BCTV is a destructive disease of beet in many regions of Iran. An Iranian isolate of BCTV was collected in Kerman province and studied in order to determine taxonomic position of the virus among of different BCTV strains in the world. Beet tissue infected by the viroliferous leafhopper was ground and BCTV DNA extracted. BCTV CP gene was amplified using BCTV-F, BCTV-R primers in PCR. The amplified product was inserted into pTZ57R/T vector plasmid followed by transformation of *Escherichia coli* DH5α . Recombinant plasmid was then extracted and sequenced. Phylogenetic tree Constructed by DNAMAN software using the Neighbor-joining method showed that the Iranian isolate of BCTV is different from all BCTV strains in different field crops in the world with a strong bootstrap value (100%) and was classified in a distinct clade.

مقدمه:
ويروس BCTV متعلق به خانواده *Geminiviridae* و جنس *Curtovirus* مي باشد. ويروسهاي اين خانواده از لحاظ اقتصادي، كاهش قابل ملاحظه‌اي در محصولات زراعي مهم دولپه‌اي و تك لپه اي ايجاد مي كنند. اين ويروسها در دو ويژگي مهم، مشترك مي باشند: 1- شكل پيكره هاي ويروس دوقلو بوده و قطر هر پيكره منفرد 18 نانومتر مي باشد 2- طبيعت ماده ژنتيكي آنها شامل يك يا دو مولكول DNA تك رشته‌اي (ssDNA) به اندازه 2/5تا 3 كيلو باز بسته به گروهي كه متعلق به آن هستند، مي باشند. ويروس BCTV داراي ژنوم تك قسمتي بوده و توسط زنجره بطور پايا منتقل مي شود (Bennett, 1971 و Gutierrez, 1999 & 2004 و Briddon, 1989 & Padidam, 1990). در ميان اعضاي جنس *Curtovirus* توالي ژن CP نشان دهنده ارتباط تكاملي اين ويروسهاست (Padidam, 1995). ويروسهاي اين جنس كه در گياهان مختلف توليد بيماري مي كنند از نظر توالي ژن پروتئين پوششي با هم شباهت دارند در اين ميان بر اساس گزارش (Briddon, 1998) يك جدايه ايراني BCTV از نظر توالي ژن CP، پروتئين Rep و C_4 ORF شباهت بسيار زيادي (sequence similarity=%98/3) با نژاد CFH ويروس دارد. در اين تحقيق توالي ژن CP يك جدايه ايراني از استان كرمان تعيين و با تواليهاي مشابه از ساير نقاط دنيا و از گياهان زراعي مختلف مقايسه گرديده است (شكل 2).

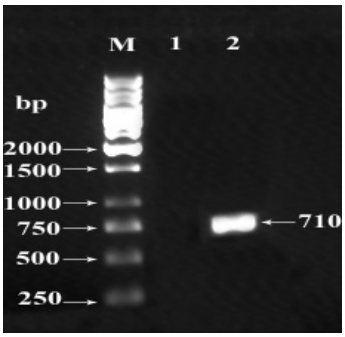
مواد و روشها:
ابتدا DNA ويروس از نمونه هاي برگي چغندرقندهاي آلوده كه بطور طبيعي با زنجره ناقل *C. haematoceps* آلوده شده بودند توسط كيت استخراج گرديد و ژن پوشش پروتئيني آن با استفاده از آغازگرهاي BCTV-F و BCTV-R تكثير شدند. سپس ژن پروتئين پوششي BCTV بعنوان insert در درون ناقل pTZ57R/T (Ins T/A clone PCR Product Cloning Kit) قرار داده شد. عمل transformation با استفاده از سلولهاي مستعد *Escherichia coli* نژاد DH5α و پلاسميد نوتركيب حاوي ژن CP صورت گرفت. بعد از كشت باكتري روي محيط كشت LB (Luria Broth)، پراگنه هاي سفيد انتخاب و با استفاده از PCR پراگنه هاي حاوي پلاسميد نوتركيب شناسايي شدند. از پراگنه هاي فوق، پلاسميد با استفاده از كيت (Plasmid Isolation Kit High Pure) استخراج و به منظور تأييد دقيق تر همسانه سازي، عمل هضم آنزيمي (digestion) انجام شد. باقيمانده پلاسميد استخراج شده براي تعيين توالي insert مورد استفاده قرار گرفت. بعد از تعيين توالي، جدايه ايراني باساير جداشده هاي موجود در بانك جهاني ژن مورد مقايسه قرار گرفت و درخت تكاملي ترسيم گرديد.

نتايج:

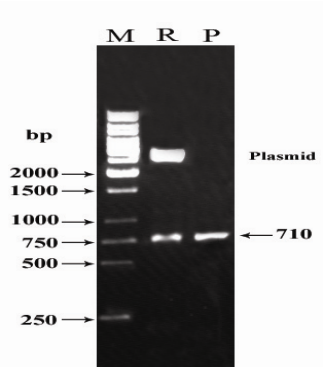
الكتروفورز محصول PCR منجر به تشكيل يك باند 710 bp روي ژل آگاروز 1 درصد گرديد (شكل 1). اين قطعه DNA طبق انتظار مستقلاً از پراگنه هاى سفيد ترانسفورم شده نيز در طى واكنش هاى زنجيرهاى پلى مراز تكثير شد. هضم آنزيمي پلاسميدهاي نوتركيب با استفاده از آنزيم هاي *Eco* R1 و *Pst* 1 نيز نتايج فوق را تأييد نمود (شكل 2). اين باند درست روبه روي باند نمونه مثبت (PCR Product) كه جهت كنترل گذاشته شده بود، قرار گرفت. توالي ژن CP همسانه سازي شده با توالي CP جدايه هاي ويروس در دنيا مورد مقايسه قرار گرفت و جايگاه تكاملي جدايه ايراني توسط نرم افزار DNAMAN (Lynnon Biosoft)، تعيين گرديد (شكل 2).

بحث:

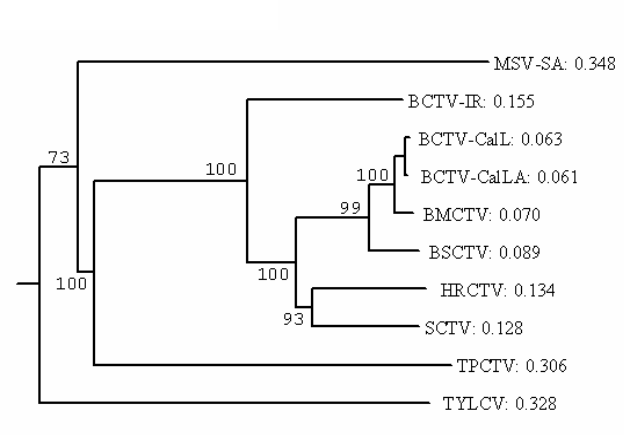
نتايج حاصل از رسم درخت فيلوژنتيكي با مقادير Bootstrap بالا (100 درصد) نشان مي دهد كه جدايه ايراني BCTV از منطقه كرمان از ساير جدايه هاي مختلف اين ويروس در دنيا متمايز مي باشد و در يك گروه تكاملي جداگانه قرار مي گيرد (شكل 2). جدايه ايراني BCTV بيشترين شباهت (Homology) را با*Beet sever curly top virus* به ميزان 73/6 درصد و كمترين شباهت را با *Horseradish curly top virus* به ميزان 69/7 درصد دارد. اين نتيجه با نتايج Briddon و همكاران در سال 1998 در مورد جدايه ايراني اين ويروس تفاوت آشكار دارد. در تحقيق Briddon و همكاران، جدايه ايراني BCTV پس از مقايسه توالي CP، پروتئين Rep (C_1 ORF) و (C_4 ORF) در يك گروه مشترك با نژاد CFH آمريكا پي بود (sequence similarity=%98/3) قرار داده است. در حاليكه در اِين بررسى جدايه ايراني BCTV در گروهي كاملاً مجزا از ساير نژادهاي ويروس در دنيا قرار مي گيرد.



شكل (1): الكتروفورز افقي DNA تكثير شده ويروس توسط PCR. M نشانگر DNA (1 kb DNA ladder, Fermentas)، شماره 1 نمونه سالم چغندرقند و شماره 2 نمونه آلوده مي باشد.



شكل (2): الكتروفورز پلاسميد نوتركيب بعد از هضم آنزيمي با استفاده از آنزيمهاي*Eco*R1 و*Pst*1 . M ماركر، R پلاسميد نوتركيب و P فراورده PCR يا همان شاهد مثبت مي باشد.



شكل (2): درخت فيلوژنتيكي رسم شده با استفاده از توالي ژن CP جدايه ايراني (كرمان) BCTV و ساير نژادهاي موجود در بانك جهاني ژن. توالي CP ويروسهاي (*Maize streak virus*, MSV)، (*Tomato pseudo curly top virus*, TPCTV)، (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) به عنوان outgroup انتخاب گرديده است.

منابع:

1- Bennett, C. W. (1971). The curly top disease of sugar beet and other plants. The American Phytopathological Society Monograph No. 7.
2- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., and Markham, P. G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. Virology 177: 84-94.
3- Briddon, R. w., stenger, D. C., Bedford, I. D., Stanley, J., Izadpanah, K., and Markham, P. G. (1998). Comparison of a beet curly top virus isolate originating from the old world with those from the New world. European Journal of Plant Pathology 104: 77-84.
4- Briddon, R. W., watts, J., Markham, P. G., and Stanley, J. (1989). The coat protein of Beet curly top virus is essential for infectivity. Virology 172: 628-633.
5- DNAMAN Version 4.02 Lynnon Biosoft. 1994-98.
6- Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. Cellular and Molecular life sciences 56: 313-329.
7- Gutierrez, C., Ramirez-parra, E., Castellano, M. M., Sanz-Burgos, A.P., Luque, A., and Missich, R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. Veterinary Microbiology 98: 111-119.
8- Padidam, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. Journal of General Virology 76: 249-263.