ساخت سازه عفونت‌زای جدایه ایرانی ویروس M سیب‌زمینی

فاطمه طبسی‌نژاد[1]، بهروز جعفرپور[2]، محمد زکی‌عقل[2]، حمید روحانی[2]، محسن مهرور[2]

[1]دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[2]گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com

ویروس M سیب‌زمینی (*Potato virus M*) یکی از کارلاویروسهای بیماری زا در سیب‌زمینی است که گسترش جهانی دارد. بمنظور بررسی پاره ای صفات بیولوژیکی و مولکولی عامل بیماری همسانه عفونت زای ویروس ساخته شد. تکثیر طول کامل ژنوم جدایه ایرانی PVM بوسیله دو جفت آغازگر اختصاصی انجام و قطعات حاصل پس از خالص سازی، به روش Fusion PCR به یکدیگر متصل شده و ژنوم کامل PVM همانند سازی شد. ژنوم کامل ویروس پس از تیمار با آنزیمهای برشی *Xba*I و *Bam*HI در ناقل دوگانه pBI 121 تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزائیک گل‌کلم (CaMV) قرار گرفت و سازه حاصل در باکتری *E.coli* سویه *XL Gold* همسانه‌سازی شد. سپس سازه pBI-PVM در سلولهای اگروباکتریوم سویه C5850 همسانه سازی و آزمون بیماریزایی به روش Agroinfilteration در گیاهان گوجه‌فرنگی و توتون انجام شد. ردیابی ویروس در برگهای جوان گیاهان مایه زنی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای پروتئین پوششی PVM انجام شده و قطعه حاصل تعیین ترادف شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آغازگرهای اختصاصی قطعاتی به طول ۴۶۸۴ و ۴۱۰۷ جفت باز از ژنوم PVM را تکثیر کردند. این قطعات دارای ۲۶۸ نوکلئوتید همپوشان در ناحیه بلوک سه ژنی بودند. با اتصال این دو قطعه به یکدیگر ژنوم کامل PVM بطول ۸۵۲۳ جفت باز همانند سازی شد. ۱۶ روز پس از زمان مایه زنی در گیاهان گوجه فرنگی علائم موزائیک و زردی و در توتون علائم پیسک در برگهای جوان ظاهر شد. در آزمون RT-PCR نیز پروتئین پوششی ویروس به طول ۹۱۵ جفت باز تکثیر شد. ظهور علائم و ردیابی ویروس در برگهای سیستمیک گیاهان مایه زنی شده نشاندهنده تکثیر PVM و عفونت‌زایی سازه ساخته شده می باشد. پیشتر نیز برای ویروس *Poplar mosaic virus* از این جنس همسانه عفونت زا تهیه شده است. از این سازه می‌توان در مطالعات ژنتیکی ویروس یا بررسی عکس‌العمل ارقام سیب زمینی استفاده کرد.

Construction of an infectious clone of Iranian isolate of potato virus M

Fatemeh Tabasinejad[1], Behrooz Jafarpour[2], Mohammad Zakiaghl[2], Hamid Rowhani[2], Mohsen Mehrvar[2]

1- Ph.D student in Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

2- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com

Potato virus M is a *Carlavirus* infecting potato worldwide. Full length infectious clone of PVM was constructed to determine some of the biological and molecular feature of the virus. Using two specific primer pairs, full length genome of PVM was amplified in two segments. The fragments were subjected into fusion PCR to construct full length genome of PVM. The DNA fragment was digested using *Xba*I/ *Bam*HI endonucleases, further, ligated at the downstream of the 35s promoter in pBI121 binary vector and transformed into E. coli *XL Gold* cells. The construct was transferred into *A. tumefaciens* strain C5850 cells. Infectivity of construct was assayed by agroinfilteration of the pBI-PVM into the leaves of *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana glutinosa* plants. Specific primer pair of PVM coat protein gene was used to detect the virus in systemic leaves of inoculated plants.Using specific primers two fragments of 4684 and 4107 bp were amplified from PVM genome in the PCR reaction. These fragments had 268 overlapping nucleotides of the triple gene block. Full length of PVM genome was constructed by fusion of these fragments. Mosaic, yellows and mottling symptoms were generated in tomato ant tobacco plant 16 days post inoculation. In RT-PCR, a 915 bp fragment of PVM coat protein was amplified from the inoculated plants. PCR products of expected size and symptoms development in non-inoculated leaves revealed infectivity of the construct and replication of PVM in the agroinfiltrated plants. Previously, infectious clone were constructed for carlaviruses include PVM and *Popular mosaic virus.* The infectious clone will be helpful in genetic analysis of PVM and evaluation of resistance in potato cultivars.