هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران، پژوهشگاه نیرو
The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep. 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran

بررسی تأثیر آلودگی‌های ویروسی همزمان بر مقاومت گیاهان چغندرقند تراریخت بیان کننده ژن ScFV بر علیه پروتئین پوششی ویروس رگبرگ‌زرد نکروتیک چغندرقند

*حمیده مردانی مهرآباد[۲و۱]، فرشته مشیری[۵و۱]، مریم خوش‌نامی[۲]، محمدعلی ملبوبی[۱]، علیرضا گل‌نراقی[۳]، پیمان نوروزی[۴]
[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، بلوار پژوهش، اتوبان کرج، تهران؛ [۲]گروه بیماری شناسی گیاهی، [۳]گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران؛ [۴]مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج؛ [۵]گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه فردوسی مشهد
h_mardanimehrabad@yahoo.com

چکیده

بیماری ویروسی ریزومانیا که عامل آن ویروس رگبرگ‌زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV[1]) می‌باشد، موجب خسارات شدیدی از طریق کاهش عملکرد محصول می‌گردد. در تحقیق پیش رو، پایداری مقاومت به ویروس BNYVV در گیاهان چغندرقند تراریخت حامل ژن رمزکننده پلنتی‌بادی تک‌زنجیره (ScFV) بر علیه پروتئین پوششی (CP 21) پاتوتیپ A این ویروس نسبت به جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندرقند (BSCTV-Ir[2]) مورد بررسی قرار گرفت. همسانه‌های گیاهان 512-T_1:A_3-7، 514-T_1:A_3-7 و 506-T_1:A_3-7 و همسانه‌های گیاه 558-T_1:SF-5,6 به ترتیب متعلق به نتاج لاین‌های تراریخت A_3 و SF با ویروس‌های BNYVV و BSCTV هر یک به طور جداگانه و نیز با هر دو ویروس به طور همزمان جهت بررسی تأثیر برهمکنش‌های ویروسی بر مقاومت، چالش داده شدند. تأیید آلودگی گیاهان چالش داده شده با ویروس BSCTV، از طریق مشاهده علائم ظاهری و آزمون PCR انجام گرفت. جهت سنجش غلظت ویروس BNYVV و استقرار قارچ *Polymyxa betae* Keskin (ناقل ویروس BNYVV) در ریشه گیاهان تلقیح شده با این ویروس، از آزمون الایزا و رنگ‌آمیزی اسپورهای استراحتی استفاده گردید. نتایج نشان داد که آلودگی همزمان گیاهان به دو ویروس BNYVV و BSCTV مقاومت گیاهان تراریخت حامل ژن ScFV و مقاوم به ویروس BNYVV را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. به علاوه، میزان حساسیت نتاج لاین‌های تراریخت A_3 و SF به ویروس BSCTV مشابه تیپ وحشی ارزیابی گردید. این مطالعه نشان‌دهنده اختصاصیت و پایداری مقاومت به ویروس BNYVV در گیاهان چغندرقند تراریخت بیان کننده ژن ScFV می‌باشد.

کلمات کلیدی: چغندرقند، BNYVV، BSCTV، پلنتی‌بادی، چالش ویروسی

[1] *Beet necrotic yellow vein virus*
[2] Iranian isolate of *Beet severe curly top virus*

مقدمه

گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) به عنوان یکی از منابع عمده تأمین شکر در جهان و ایران محسوب می‌شود. بیماری ویروسی ریشه‌ریشی یا ریزومانیا از جمله مهم‌ترین بیماری‌هایی است که خسارات اقتصادی شدیدی را از طریق کاهش عملکرد و نیز کاهش میزان عیار قند به این محصول وارد می‌سازد. عامل این بیماری، ویروس رگبرگ‌زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV)، عضو تیپ جنس *Benyvirus*، می‌باشد که توسط ناقل قارچی *Polymyxa betae* Keskin از شاخه Plasmodiophoromycota انتشار می‌یابد. از آن‌جایی که این قارچ با تشکیل اسپورهای استراحتی می‌تواند ویروس را بیش از ۱۵ سال در خاک حفظ نماید، بنابراین روش مؤثر کنترل این بیماری، به‌کارگیری ارقام مقاوم است (Abe and Tamada, 1986؛ Rush et al., 2006). در ایران نیز شیوع گسترده این بیماری در اکثر مناطق چغندرقندکاری کشور نشان داده شده است (Farzadfar et al., 2007). یکی از امیدبخش‌ترین راهبردها برای کنترل بیماری‌های ویروسی، فناوری مهندسی آنتی بادی‌های نوترکیب و بیان آنتی‌بادی در گیاهان است (Goldbach et al., 2003). این راهبرد در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به صورت موفقیت‌آمیز جهت ایجاد گیاهان چغندرقند مقاوم به شایع‌ترین پاتوتیپ عامل بیماری ویروسی ریزومانیا (پاتوتیپ A) در کشور (Farzadfar et al., 2005) مورد استفاده قرار گرفته است (Pajoum-Shariaty, 2005). بیماری پیچیدگی بوته یا کرلی‌تاپ نیز یکی دیگر از بیماری‌های مهم اقتصادی چغندرقند است که توسط ویروس (BCTV[3]) متعلق به جنس *Curtovirus* ایجاد شده (Stenger, 1997) و دارای شیوع گسترده‌ای در مزارع چغندرقند کشور می‌باشد (Farzadfar et al., 2006). با توجه به احتمال شکسته شدن مقاومت به ویروس هدف در آلودگی‌های ویروسی هم زمان، ارزیابی چالش‌های زیستی این گیاهان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این تحقیق، مقاومت گیاهان تراریخت حامل ژن ScFV (تهیه شده در برابر پروتئین پوششی مربوط به پاتوتیپ A ویروس BNYVV) در آلودگی هم‌زمان به دو ویروس BNYVV و جدایه ایرانی ویروس BSCTV (BSCTV-Ir؛ Bolok-Yazdi et al., 2008) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، به معرفی لاین‌های مقاوم و با قابلیت رهاسازی در سطح تجاری کمک خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، همسانه‌های گیاهان 7-T_1:A_3-512، 7-T_1:A_3-514 و 7-T_1:A_3-506 (نتاج لاین تراریخت A_3) و همسانه‌های گیاه 558-T_1:SF-5,6 (نتاج لاین تراریخت SF) مورد استفاده قرار گرفتند. جهت بررسی میزان مقاومت در نسل T_1 لاین‌های تراریخت، همسانه‌های دارای ژنوتیپ یکسان با استفاده از روش کشت بافت تکثیر گردیدند. برای انجام چالش زیستی با ویروس BNYVV و BSCTV-Ir هر یک به تنهایی و نیز در حضور هم‌زمان این دو ویروس، از گیاهان در مرحله ۶ تا ۸ برگی استفاده گردید. تمامی مراحل چالش ویروسی در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و در گلخانه ایزوله انجام گرفت و به همراه گیاهان لاین‌های تراریخت، تعدادی گیاه غیر تراریخت حساس به بیماری ریزومانیا (wild type-WT) و رقم تجاری مقاوم به این بیماری (Dorothea)، به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت در خاک آلوده کاشته شدند. در این آزمون، برای تلقیح گیاهان با ویروس BNYVV، مخلوط خاک سبک با خاک آلوده مزارع استان فارس (۱:۱) به کار گرفته شد. همچنین به منظور تلقیح گیاهان با ویروس BSCTV-Ir، از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حاوی سازه pBin1.7BSCTV-Ir به روش مایه‌کوبی با اگروباکتریوم (Agroinoculation) از طریق تزریق به سطح زیرین برگ‌های جوان استفاده شد. پس از گذشت ۳۰ تا ۳۵ روز از زمان تلقیح گیاهان با ویروس BSCTV-Ir، علائم تیپیک بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند بررسی گردید. آلودگی ویروسی در این گیاهان، با آزمون پی‌سی‌آر به کمک آغازگرهای اختصاصی ویروس BSCTV-Ir (مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی) بررسی شد. پس ازگذشت ۶۰ روز، از زمان تلقیح گیاهان با ویروس BNYVV، از ریشه این گیاهان نمونه‌هایی تهیه و در آزمون الایزا (DAS-ELISA) به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس BNYVV

[3] *Beet curly top virus*

(Bioreba، سوئیس) مورد بررسی قرار گرفت. هر پلیت الایزا شامل دو تکرار از هر یک از عصاره‌های مربوط به ریشه گیاهان تلقیح شده و سه تکرار از عصاره ریشه گیاه غیر تراریخت تیپ وحشی (WT) (چالش نشده با ویروس و رویش یافته در شرایط ایزوله) بود. حد آستانه (cut off) معینی به عنوان معیار سنجش آلودگی، بر مبنای میانگین جذب نوری مربوط به عصاره گیاه غیرتراریخت غیرآلوده در طول موج ۴۰۵ نانومتر با فرمول $\bar{X}_H + 3SD$ محاسبه شد. گیاهانی که میانگین جذب نوری مربوط به عصاره آن‌ها بیشتر از عدد معیار بود، به عنوان حساس و در مواردی که این میزان از عدد معیار کمتر بود، به‌عنوان مقاوم شناخته شدند. برای اطمینان از آلودگی ریشه‌ها به ویروس عامل بیماری ریزومانیا، ریشه گیاهانی که نتیجه الایزای آن‌ها منفی بود، رنگ آمیزی شدند.

نتایج و بحث

داده‌های جدول ۱ نشان دهنده نتایج آزمون‌های الایزا، رنگ‌آمیزی اسپورهای استراحتی قارچ ناقل ویروسBNYVV، پی‌سی‌آر و بررسی علائم ظاهری بر روی همسانه‌های گیاهان T_1:A_3-7-512، T_1:A_3-7-514 و T_1:A_3-7-506 (نتاج لاین تراریخت A_3) و همسانه‌های گیاه T_1:SF-5,6-558 (نتاج لاین تراریخت SF)، چالش داده شده با ویروس BNYVV و BSCTV-Ir هر یک به طور جداگانه و نیز با هر دو ویروس به طور هم‌زمان می‌باشد. در هر دو لاین تراریخت A_3 و SF، نتیجه آزمون الایزا بیانگر مقاومت گیاهان چالش شده با ویروس BNYVV به تنهایی و نیز در حضور هم‌زمان با ویروس BSCTV-Ir است. اسپورهای استراحتی قارچ ناقل عامل بیماری ریزومانیا نیز در ریشه همسانه‌های چالش شده با ویروس BNYVV به تنهایی و نیز در حضور هم‌زمان با ویروس BSCTV-Ir مشاهده گردید. وجود قارچ در ریشه گیاه میزبان، آلودگی گیاه در طول مدت چالش را تأیید می‌کند. همچنین علائم تیپیک بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند شامل پیچیدگی شدید برگ‌ها و تورم زگیل مانند بر روی رگبرگ‌ها در برگ‌های جوان گیاهان چالش شده با ویروس BSCTV-Ir به تنهایی و در حضور هم‌زمان با ویروس BNYVV در هر دو لاین تراریخت A_3 و SF مشاهده گردید. در آزمون پی‌سی‌آر به کمک آغازگرهای اختصاصی ویروس BSCTV-Ir، باند مورد نظر به طول ۷۶۱ جفت‌باز در گیاهان چالش شده با ویروس BSCTV-Ir به تنهایی و در حضور هم‌زمان با ویروس BNYVV تکثیر گردید که مؤید آلودگی تمام گیاهان این دو لاین به این ویروس بود. نتایج نشان‌دهنده عدم تغییر در میزان حساسیت لاین‌های تراریخت A_3 و SF به ویروس BSCTV-Ir می‌باشد. بر این اساس ، تغییری در سطح مقاومت این گیاهان پس از آلودگی به ویروس BSCTV-Ir ایجاد نگردید. این حالت، احتمالاً ناشی از فقدان رابطه سرولوژیک بین این دو ویروس است. به عبارت دیگر، تنها زمانی که از یک پلنتی‌بادی وسیع الطیف استفاده گردد، سطوحی از مقاومت در برابر ویروس‌های غیر هدف مورد انتظار خواهد بود (Xiao et al. 2000). این نتایج نشان دهنده اختصاصیت و پایداری مقاومت این گیاهان به ویروس BNYVV در آلودگی هم‌زمان با ویروس BSCTV-Ir می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای در اختیار قرار دادن امکانات، و از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران برای فراهم نمودن زمینه این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع و مراجع مورد استفاده

Abe, H. Tamada, T. 1986. Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Plomyxa betae* Keskin. *Annual Phytopathological Society of Japan* 52: 235-247.

Bolok Yazdi, H.R., Heydarnejad, J., Massumi, H., 2008. Genome characterization and genetic diversity of *Beet curly top Iran virus*: a *geminivirus* with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36: 539-545.

Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A. R., and Ahoonmanesh, A. 2005. First report of *Beet virus Q* on sugar beet in Iran. *Plant Disease* 89:1359.

Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R. and Ahoonmanesh, A., 2006. Distribution and incidence of some aphid and leafhopper transmitted viruses infecting sugar beets in Iran. *Plant Disease* 90: 252-258.

Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R. and Ahoonmanesh, A., 2007. Surveys of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil-borne virus*, *Beet virus Q* and *Polymyxa betae* in sugar beet fields in Iran. *Journal of Plant Pathology* 89: 277-281.

Goldbach Rob, Bucher Etiene, Prins Marcel., 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus research* 92: 207-212.

Pajoum Shariaty,N., Malboobi, M. A., Arababi, M., Lohrasebi, T., Zamani K. 2005. Transfer of single-chain antibody fragment (ScFv) specific for *Beet necrotic yellow vein virus* coat protein to sugar beet. 4th National Biotechnology Congress, 15-17 Aug., Kerman, Iran.

Rush, C.M., Liu, H.Y., Lewellen, R.T. and Acosta-Leal, R., 2006. The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Phytopathology* 90: 4-15.

Stenger, D. C. and McMahon, C. L. 1997. Genotypic diversity of *Beet curly top virus* populations in the western United States. *Phytopathology* 87:737-744.

Xiao, X.W., Chu, P.W.G., Frenkel, M.J., Tabe, L.M., Shukla, D.D., Hanna, P.J., and Ward, C.W. 2000. Antibody-mediated improved resistance to ClYVV and PVY infections in transgenic tobacco plants expressing a single-chain variable region antibody. *Molecullar Breeding* 6: 421–431.

جدول ۱- خلاصه نتایج چالش گیاهان لاین‌های تراریخت A3 و SF و غیر تراریخت Dorothea و WT با ویروس‌های BSCTV-Ir وBNYVV

نام لاین[1]	نتاج	تیمار	تکرار	BNYVV				BSCTV-Ir				
				مشاهده اسپور	ELIZA حساس	مقاوم	وضعیت احتمالی	علائم ظاهری[3]	PCR مثبت	PCR منفی	وضعیت احتمالی
T_1: A_3-7	514	-	۳	-	-	-	-	-	۰	۳	-
		BNYVV only	۳	مثبت	۰	۳	مقاوم	-	-	-	-
		BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	+	۳	۰	حساس
		BNYVV & BSCTV-Ir	۳	مثبت	۰	۳	مقاوم	+	۳	۰	حساس
T_1: A_3-7	512	-	۳	-	-	-	-	-	۰	۳	-
		BNYVV only	۳	مثبت	۰	۳	مقاوم	-	-	-	-
		BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	+	۳	۰	حساس
		BNYVV & BSCTV-Ir	۳	مثبت	۱	۲	مقاوم	+	۳	۰	حساس
T_1: A_3-7	506	-	۳	-	-	-	-	-	۰	۳	-
		BNYVV only	۳	مثبت	۱	۲	مقاوم	-	-	-	-
		BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	+	۳	۰	حساس
		BNYVV & BSCTV-Ir	۳	مثبت	۰	۳	مقاوم	+	۳	۰	حساس
T_1: SF-5,6	558	-	۳	-	-	-	-	-	۰	۳	-
		BNYVV only	۳	مثبت	۱	۲	مقاوم	-	-	-	-
		BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	++	۳	۰	حساس
		BNYVV & BSCTV-Ir	۳	مثبت	۰	۳	مقاوم	++	۳	۰	حساس

WT	-	۳	-	-	-	-	-	-	۰	۳	-
	BNYVV only	۶	[۲]N.D.	۶	۰	حساس	-	-	-	-	-
	BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	+++	۳	۰	حساس	
	BNYVV & BSCTV-Ir	۷	N.D.	۵	۲	حساس	+++	۳	۰	حساس	
Dorothea	-	۳	-	-	-	-	-	۰	۳	-	
	BNYVV only	۶	N.D.	۰	۶	مقاوم	-	-	-	-	-
	BSCTV-Ir only	۳	-	-	-	-	+++	۳	۰	حساس	
	BNYVV & BSCTV-Ir	۷	N.D.	۱	۶	مقاوم	+++	۳	۰	حساس	

۱- نام لاین نشان دهنده نام والد اصلی تراریخت که از آن همسانه‌ها ایجاد گردیده است. ۲- N.D. تعیین نشده.

۳- منظور از علائم بیماری مشاهده پیچیدگی برگ بوده است که بنا بر شدت آن از علامت یک تا سه + استفاده شده است.

7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep. 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran
هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران، پژوهشگاه نیرو

The effect of co-viral infections on the resistance of transgenic sugar beet plants expressing ScFV-encoding gene against *Beet necrotic yellow vein virus* coat protein

*Mardani Mehrabad H.[1,2], Moshiri F.[1,5], Khoshnami M.[2], Malboobi M. A.[1], Golnaraghi A. R.[3], Norouzi P.[4]

[1]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. [2]Department of Plant Pathology; [3]Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran 14515-775, Iran. [4]Sugar Beet Seed Institute, Karaj, Iran. [5]Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Natural Resources, Ferdowsi University of Mashhad
h_mardanimehrabad@yahoo.com

Rhizomania disease of sugar beet, caused by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), is responsible for severe yield losses. In the present work, the stability of BNYVV-resistance in transgenic sugar beet plants, carrying the encoding single-chain monoclonal antibody gene (ScFV) against coat protein (CP 21) of BNYVV pathotype A, to the Iranian isolate of *Beet severe curly top virus* (BSCTV-Ir) was studied. Cloned plants of 514-T_1:A_3-7, 512-T_1:A_3-7 and 506-T_1:A_3-7, and 558-T_1:SF-5,6, the progenies of transgenic lines of A_3 and SF, respectively, were challenged by BNYVV singly, BSCTV singly, and by both viruses to investigate on the effects of virus-virus interactions on the resistance. To confirm BSCTV infection of the plants, symptoms observation and PCR assays were used. Establishments of *Polymyxa betae* Keskin (vector of BNYVV), and concentration of BNYVV in BNYVV-inoculated roots were tested by the resting spores staining method and ELISA technique. The results indicated no-changes in the level of BNYVV-resistance in transgenic plants, carrying the ScFV gene, co-infected with both viruses. Moreover, the susceptibility of the transgenic plants infected with BSCTV was similar to that of wild type plants. This study reveals the specificity and stability of resistance to BNYVV in the transgenic sugar beets expressing ScFV-encoding gene.

Key words: Sugar beet, BNYVV, BSCTV, plantibody, viral challenge.