دانشکده کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان نامه

برای دریافت درجه دکتری کارشناسی ارشد **در رشته بیماری شناسی گیاهی**

عنوان

بیان ژن پروتئین حرکتی جدایه ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو در باکتری *Escherichia coli*

استاد راهنما

دکتر نعمت سخندان بشیر

استادان مشاور

دکتر محمدسعید حجازی **دکتر رضا خاک ور**

پژوهشگر

سوسن جعفریان اصل

بهمن 1388 شماره پایان نامه 111

فهرست مطالب

عنوان
صفحه

مقدمه.....1

فصل اول: بررسی منابع

1-1- تاریخچه شناسایی ویروس برگ بادبزنی مو.....3
1-2- منشاء بیماری.....4
1-3- بیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو.....5
1-3-1- اپیدمیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو.....5
1-3-2- دامنه میزبانی.....5
1-3-3- روش های انتقال ویروس برگ بادبزنی مو.....6
1-3-4- علایم بیماری.....7
1-3-4-1- علایم بیماری بر روی میزبان های طبیعی مو.....7
1-3-4-2- علایم بر روی گیاهان محک.....9
1-4- مشخصات ویروس برگ بادبزنی مو.....9
1-4-1- رده بندی.....9
1-4-2- ویژگی های فیزیکوشیمیایی و بیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو.....10
1-4-3- ساختار ژنومی و فراورده های پروتئینی آن.....10
1-4-4- آر ان ای ماهواره ای (Satellite RNA).....13
1-4-5- حرکت سلول به سلولی ویروس برگ بادبزنی مو.....14
1-5- کنترل ویروس برگ بادبزنی مو.....15
1-6- بیان ژنهای مختلف ویروس برگ بادبزنی مو در گیاه.....17
1-7- بیان ژنهای مختلف ویروس برگ بادبزنی مو در باکتری.....19
1-8- فناوری دی ان ای نوترکیب و پروتئین های نوترکیب.....20

1-9- همسانه سازی (کلون) 20
1-10- حامل های همسانه سازی ژن 21
1-11- سیستم های بیان کننده مورد استفاده در تولید پروتئین نوترکیب 22
1-11-1- سیستم بیان کننده *E. coli* 23
1-12- حامل های بیان ژن 23
1-13- سیستم های بیان کننده pET 24
1-14- ترانسفورماسیون 29

فصل دوم: مواد و روشها

2-1- منبع ویروسی 30
2-2- استخراج پلاسمید از کلون Kh4 30
2-3- انتخاب حامل بیان و سویه باکتریایی 32
2-4- تکثیر حامل بیان pET-21a(+) 33
2-4-1- تهیه سلول مستعد 33
2-4-2- ترانسفورماسیون سلول های مستعد باکتری 34
2-4-2-1- غربال و انتخاب کلونی های ترانسفورم شده 35
2-5- استخراج حامل بیان pET-21a(+) 35
2-6- الکتروفورز پلاسمید های استخراج شده 36
2-6-1- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز 37
2-7- ایجاد انتهاهای چسبنده در پلاسمیدهای استخراج شده 38
2-8- استخراج قطعات مورد نظر از ژل آگارز 40
2-9- اتصال ژن پروتئین حرکتی GFLV به حامل بیان 42
2-10- میزبان باکتریایی 43
2-11- تهیه سلول مستعد و ترانسفورماسیون میزبان بیان ژن 43
2-11-1- غربال و انتخاب کلونی های واجد دی ان ای نوترکیب 43
2-12- خالص سازی و تک کلون کردن کلونی های ترانسفورم شده 44
2-13- استخراج پلاسمیدهای نوترکیب 44

2-14- برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب 45
2-15- القاء کلونی های نوترکیب برای تولید پروتئین 46
2-16- استخراج پروتئین از باکتری 46
2-17- الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات 47
2-18- رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژل 49

فصل سوم: نتیجه گیری و بحث

3-1- بررسی وجود ژن پروتئین حرکتی در پلاسمید pTZ57R/T.....50
3-2- نتایج حاصل از استخراج پلاسمید بیان و برش با آنزیم های محدودگر 52
3-3- بررسی استخراج قطعات ژنومی مورد نظر از ژل آگارز 53
3-4- نتایج اتصال ژن پروتئین حرکتی GFLV به حامل بیان pET21-a 55
3-5- بهینه‌سازی ترانسفورماسیون محصول اتصال GFLVMP و pET-21a 57
3-6- بررسی بیان ژن پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو در باکتری *E.coli* سویه Rosseta با استفاده از SDS-PAGE 57
بحث.....60
دستاوردها 68
پیشنهادات 69
فهرست منابع 70
ضمیمه.....82

نام خانوادگی : جعفریان اصل **نام** : سوسن

عنـــوان پایـــان نامـــه : بیـــان ژن پـــروتئین حرکتـــی جدایـــه ایرانـــی ویـــروس بـــرگ بـــادبزنی مـــو در باکتری *Escherichia coli*

استاد راهنما : دکتر نعمت سخندان بشیر

استادان مشاور : دکتر محمدسعید حجازی و دکتر رضا خاک ور

مقطع تحصیلی : کارشناسی ارشد **رشته** : گیاهپزشکی **گرایش** : بیماری شناسی گیاهی

دانشگاه : تبریز **دانشکده** : کشاورزی **تاریخ فارغ التحصیلی** : 88/11/17 **تعداد صفحه** : 87

کلید واژه‌ها : بیان ژن، ویروس برگ بادبزنی مو، پـروتئین حرکتـی، گیـاه تراریختـه، آنتـی بـادی نوترکیـب، باکتری *E. coli*

چکیده

ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) *Grapevine Fan Leaf Virus* از خانواده *Comoviridae*، یکی از مخـرب ترین بیماری های مو در سراسر جهان می باشد. پیکره این ویروس دوذره ای، جورقطر و بـه قطـر 30 نـانومتر بوده و در طبیعت توسط نماتد *Xiphinema index* منتقل می شود. این بیماری باعـث زوال پـیش رونـده مـو می گردد به طوریکه منجر به کاهش راندمان محصول تا بیش از 80% می شود. با توجه به محدودیت روشـهای کنترل رایج این بیماری در تاکستانها، تولیدگیاهان تراریخته مقاوم به ویروس ابتـدا از طریـق بیـان ایـن ژن در باکتری و نهایتا بیـان آن در گیـاه از طریـق مهندسـی ژنتیـک ، از اهـداف انجـام تحقیـق حاضـر بـود. برخـی استرین های GFLV قادر به آلوده کردن گیاهانی نظیر *Cucumis sativus* نمی باشند که این امر می توانـد بـه دلیل عدم بیان ژن پروتئین حرکتی در گیاه باشد. این تحقیق می تواند در مطالعات مربوط به مقاومـت میزبـانی نقش احتمالی این پروتئین را مشخص کند. هدف اصـلی در انجـام تحقیـق حاضـر بررسـی بیـان ژن پـروتئین حرکتی در باکتری *Escherichia coli* Rosetta بود تا با تولید آن، امکان تولید آنتی بادی نوترکیب در برابر آن فراهم گردد. به منظور تولید پروتئین حرکتی نوترکیب، بخشی از آر ان ای دوم ویروس که پـروتئین حرکتـی را رمز می کند، قبلا به کمک آغازگرهای اختصاصی از روی cDNA تکثیر، همسانه سـازی و تعیـین تـوالی شـده است. در این تحقیق از کلونی باکتریایی واجد pTZ57GFLVMP، پلاسمید به روش لیز آلکالینی اسـتخراج و بعد از برش توسط آنزیم های *Bam*HI و *Sac*I، قطعه مورد نظر به حامل بیان pET-21a(+) بـرش داده شـده توسط آنزیم های *Bam*HI و *Sac*I، اتصال داده شد. پس از بیـان پـروتئین حرکتـی GFLV در *E. coli*، وزن مولکولی پروتئین نوترکیب استخراج شده در SDS-PAGE بررسی شد. وزن مولکولی این پـروتئین در حـدود 38 کیلودالتون بود که منهای تعداد اسیدآمینه های افزوده شده توسط حامل با انـدازه پـروتئین حرکتـی GFLV مطابقت داشت.

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*) یکی از محصولات مهم کشاورزی بوده که از دیر باز مورد تغذیه بشر قرار گرفته است. بیشتر گیاه شناسان معتقدند که مبدا کشت انگور در آسیای صغیر در حد فاصل دریای سیاه و دریای خزر می باشد و از این منطقه به تمام نقاط دنیا گسترش یافته است و امروزه اراضی وسیعی از قاره های آسیا، اروپا و آمریکا و حتی قسمت هایی از آفریقا به کشت انگور اختصاص دارد. از آنجا که سطح زیر کشت و میزان تولید انگور نسبت به سایر محصولات باغی بسیار چشمگیر بوده و به صور مختلف از جمله خوراکی، رزین، شیره و نیز صنایع داروسازی و تخمیری در بازارهای داخلی و خارجی مصرف دارد. لذا به لحاظ اقتصادی یکی از معدود محصولاتی است که می تواند به عنوان یکی از اقلام صادراتی غیر نفتی محسوب شود. کشور ما از نظر سطح زیر کشت هشتمین و از لحاظ میزان تولید سالانه، هفتمین کشور جهان می باشد (امیرقاسمی، 1381).

مو نیز مانند سایر درختان میوه علی رغم مواظبت های زراعی از ابتلا به انواع بیماری ها از جمله بیماری های ویروسی مصون نبوده و این عوارض سالیانه باعث وارد آمدن خسارت فراوانی به تاکستان های کشور می شود. آگاهی از این عوارض، شناسایی، مبارزه صحیح و توجه به آنها کمک موثری در بالا رفتن میزان تولید و بهبود کیفیت و از همه مهمتر جلوگیری از ضایعات میوه قبل از برداشت خواهد شد (امیرقاسمی، 1381).

بیماری برگ باد بزنی مو یکی از مخرب ترین بیماری های مو در سراسر جهان بوده و عامل ویروسی آن (*Grapevine fan leaf virus*) باعث زوال پیش رونده مو می شود. این ویروس راندمان محصول را تا بیش از 80 % کاهش داده و باعث پایین آمدن کیفیت محصول و تقلیل عمر باردهی در تاکستان ها می شود (Martelli and Savino, 1991; Andret-Link *et al*., 2004; Demangeat *et al*., 2004). بنابراین کنترل ویروس حائز اهمیت می باشد. یکی از اهداف انجام تحقیق حاضر فراهم کردن زمینه طراحی و تولید گیاهان تراریخته با استفاده از پدیده انتقال ژن (ژن پروتئین حرکتی ویروس) (Martinelli *et al*., 2002; Valat *et al*., 2006)، در آینده می باشد که بتواند در مقابل تمام جدایه های ایرانی GFLV از خود مقاومت نشان دهد.

از سوی دیگر با توجه به مشکلاتی که در رابطه با خالص سازی ویروس هایی مثل GFLV وجود دارد محققان را بر این واداشت که از روش های دیگری همچون بیان ژنهای ویروسی (ژنهای پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی) در باکتری استفاده کرده و از پروتئین نوترکیب تولید شده، در تهیه آنتی بادی بر علیه آنها در ردیابی ذرات ویروسی استفاده نمایند. بنابراین از دیگر اهداف انجام تحقیق حاضر بررسی بیان ژن پروتئین حرکتی در سیستم باکتریایی می باشد تا با

تولید آن، امکان تولید آنتی بادی نوترکیب در برابر آن در آینده فراهم گـردد (Ritzenthaler *et al.*, 1995a).

عدم آلوده شـدن گیاهـانی نظیـر *Cucumis sativus* توسـط برخـی اسـترین هـای GFLV (Hewitt *et al.*, 1970) می تواند به دلیل عدم بیان ژن پروتئین حرکتی در گیاه باشـد. بنـابراین بـا بیان ژن پروتئین حرکتی GFLV در باکتری، زمینـه بـرای بیـان ایـن ژن در چنـین گیاهـان و نهایتـا بررسی امکان به وجود آمدن آلودگی در آنها در آینده فراهم می گـردد تـا در مطالعـات مربـوط بـه مقاومت میزبانی نقش احتمالی این پروتئین تعیـین گـردد (Malyshenkov *et al.*, 1982; Belin *et al.*, 1999).

1- بررسی منابع

1-1- تاریخچه شناسایی ویروس برگ بادبزنی مو

ویروس برگ باد بزنی مو به عنوان یکی از 58 ویروس آلوده کننده مو، شایع ترین ویروس مو در اکثر نقاط دنیا می باشد (Reustle, *et al.*, 2004). این بیماری قدیمی ترین بیماری ویروسی شناخته شده در انگور های گونه *Vitis vinifera* می باشد (Fuchs *et al.*, 1989; Hamman *et al.*, 1998). عامل این بیماری [*Grapevine fan Leaf virus* (GFLV)] از مهمترین ویروس های مو می باشد که می تواند تا بیش از 80% خسارت بزند (Bovey *et al.*, 1990; Andret-Link *et al.*, 2004). باز شدگی سینوس دمبرگ و نزدیک شدن رگبرگ های اصلی در اثر ابتلای مو به این ویروس، ظاهری شبیه به بادبزن ایجاد می کند و به همین دلیل این بیماری را برگ بادبزنی می گویند (Pearson and Goheen, 1988).

بیش از 160 سال پیش بیماری برگ بادبزنی مو توصیف شد. استرین های این ویروس شامل برگ بادبزنی[1] مو، موزائیک زردی[2] (Hewitt, 1950) و رگ نواری[3] (Goheen and Hewitt, 1962) می باشند. اولین مشاهدات آزمایشگاهی که نشان داد بیماری برگ باد بزنی مو از خاک تاکستان های آلوده ناشی می شود، توسط Petri (1918) به دست آمد. سپس Vuittenz (1970) نشان داد که تدخین خاک با مواد شیمیایی مختلف قبل از کاشت، می تواند در کنترل بیماری برگ بادبزنی موثر باشد.

---

[1]- Fanleaf
[2]- Yellow mosaic
[3]- Vein banding

در نهایت نماتد اکتوپارازیت خاکزی *Xiphinema index* به عنوان ناقل ویروس برگ بادبزنی مو شناخته شد (Hewitt *et al.*, 1958). در سال 1960 مایه زنی شیره گیاهی آلوده بهGFLV منجر به انتقال موفقیت آمیز این ویروس به گیاه *Chenopodium amaranticolor* شد (Cadman *et al.*, 1960).

1-2- منشاء بیماری

این بیماری در سطح جهان تقریبا در تمام مناطقی که انگور و پایه های هیبرید آن کشت می گردند وجود دارد و از آسیا، آفریقا، اروپا، نیوزیلند، استرالیای جنوبی، آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی گزارش شده است. ولی خاستگاه آن را ایران می دانند (Izadpanah *et al.*, 2003; Bashir *et al.*, 2007b) و تصور می شود که عامل بیماری از طریق قلمه های آلوده به سایر نقاط جهان انتقال یافته باشد (Hewitt *et al.*, 1970). بیماری برگ بادبزنی مو ابتدا توسط Rathay (1883) از اتریش بر روی *Vitis vinifera* گزارش شد (Raski *et al.*, 1983). در ایران اولین بار توسط پرویزی (1368) و بر اساس علائم مطالعات گلخانه ای گزارش شد. وجود این ویروس به همراه چندین ویروس دیگر در 10 استان کشور به اثبات رسیده است (Rakhshanderoo *et al.*, 2005). آلودگی تاکستانهای استان های شمال غرب کشور به GFLV نیز در سالهای اخیر به اثبات رسیده است (Bashir *et al.*, 2007b).

1-3- بیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو

1-3-1- اپیدمیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو

ویروس GFL توسط نماتد *Xiphinema index* از تاک های آلـوده بـه تـاک هـای سـالم در سطح مزرعه منتقل می شود (Raski *et al.*, 1983). در نتیجه آلودگی بـه GFLV در تاکـستانها بـه صورت لکه ای مشاهده می شود. این نماتد می تواند در خاک تاکستان ها بقا یافته و این ویروس را برای سالهای زیاد حتی بدون وجود گیاه میزبان، نگهـداری و حفـظ کنـد (Demangeat *et al.*, 2005). نماتد ناقل، با تغذیه از نوک ریشه های تاک های آلوده و اخذ ویروس در مدت زمان کمتر از 5 دقیقه، قادر است ویروس را به تاک های سالم منتقل کند (Belin *et al.*, 2001). ویروس برگ بادبزنی مو از طریق مواد تکثیری آلوده، پیوندزنی و قلمه های ریشه دار به مناطق دیگر گسترش می یابد. خاک آلوده موجود بر روی گیاهان یا قلمه های ریشه دار، موثرترین روش انتقال نماتـد ناقـل این ویروس به مناطق دیگر می باشد. مواد تکثیری آلوده به ویژه در ارقـام متحمـل *Vitis vinifera* نقش مهمی در گسترش GFLV در فواصل جغرافیایی دور دارد (Raski *et al.*, 1983).

1-3-2- دامنه میزبانی

اخیرا GFLV از چند علف هرز شامل مرغ، علف هفت بندو تمشک جداسازی شـده اسـت (زکی عقل و همکاران، 1382) اما میزبان طبیعی این ویـروس بـه دلیـل اختـصاصیت ناقـل، شـامل گونه های جنس *Vitis* و هیبریدهای درون گونه ای آن می باشد. میزبان هـای گلخانـه ای GFLV، نسبتا

متنـوع بـوده و حـدود 35 گونـه متعلـق بـه 6 خـانواده *Amarantaceae*، *Chenopodiaceae*، *Cucurbitaceae*، *Legominoseae*، *Fabaceae* و *Solanaceae* مـی باشـند (Hewitt *et al.*, 1970).

1-3-3- روش های انتقال ویروس برگ بادبزنی مو

عمده ترین روش انتقال ویروس برگ بادبزنی مو به ویژه بـه منـاطق دور دسـت، از طریـق مواد تکثیری آلوده و در انتقال در ابعاد مکانی محدود، توسط نماتد ناقل می باشد (Hewitt *et al.*, 1995). نماتد *Xiphinema index* متعلق به خانواده *Longidoridae* و راسته *Dorylaimida* مـی باشد (Brown *et al.*, 1995). این نماتد خاکزی، اکتو پارازیت اجباری و تنها ناقل طبیعـی GFLV در طبیعت می باشد (Hunt, 1993) که هیچ ویروس دیگـری غیـر از GFLV را منتقـل نمـی کنـد (Raski *et al.*, 1983; Wyss, 2000). این نماتد می تواند GFLV را توسط هر دو مرحله نابـالغ و بالغ کسب و منتقل کند ولی GFLV با تخم نماتد منتقل نمـی شـود (Taylor and Raski, 1964; McFarlane *et al.*, 2002).

در رابطه با انتقال GFLV در سطح مزرعه از طریق نماتد ناقل، مکانیـسم هـای مولکـولی دقیقا مشخص نشده اند (Belin *et al.*, 2001). مشخصه قابل انتقال بودن ویروس با نماتـد توسـط توالی های قرار گرفته در منطقه رمزکننده پروتئین پوششی و پـروتئین حرکتـی ژنـوم ویـروس رمـز می شود (Link *et al.*, 2004). به طوریکه محققان پی برده اند که تعداد 513 اسـیدآمینه از انتهـای کربوکسیلی پلی پروتئین رمز شده توسط آر ان ای 2 در انتقال اختـصاصی ایـن ویـروس بـا نماتـد

Xiphinema index نقش دارد که 9 اسیدآمینه آن مربوط به پروتئین حرکتی و 504 اسیدآمینه مربوط

به انتهای آمینی پروتئین پوششی می باشد (Andret-Link *et al.*, 2004). انتقال بذری این ویروس بسیار محدود و تنها هنگامی است که ویروس به اندوسپرم بذر راه یافته باشد. انتقال مکانیکی این ویروس از طریق مایه زنی عصاره گیاه آلوده به گیاه محک امکان پذیر است (اشکان، 1374).

میزبان های تشخیصی[4] این ویروس شامل گونه های *Chenopodium amaranticolor*، *Chenopodium quinoa*، *Gomphorena globosa*، *Nicotiana bentamiana*، *Nicotiana clevelandii*، *Phaseolus vulgaris*، *Cucumis sativus* و *Petunia hybrida* می باشند. میزبان های تکثیری[5] نیز شامل گونه های *Chenopodium amaranticolor*، *Chenopodium quinoa*، *Nicotiana bentamiana*، *Nicotiana clevelandii* می باشند (Hewitt *et al.*, 1970).

میزبان محکی که علایم موضعی خوبی نشان دهد شناخته نشده است ولی از *Chenopodium quinoa* و *Nicotiana bentamiana* می توان به عنوان گیاه محک نیز استفاده کرد (Hewitt *et al.*, 1970).

1-3-4- علایم بیماری

1-3-4-1- علایم بیماری بر روی میزبان های طبیعی مو

این ویروس منجر به ایجاد علایم متنوعی روی مو می شود که نوع و شدت آن بسته به شدت بیماریزایی جدایه ویروسی، حساسیت واریته مو و عوامل محیطی متغیر است (Martelli,

[4]- Diagnostic
[5]- Propagative

1993). علایم این بیماری بر روی اندام های مختلف مو به طور کامل توصیف شده اند (Raski *et al.*, 1983). بر اساس گزارش Martelli and Savino (1988) بیماری برگ بادبزنی مو دارای 3 گروه علایم می باشد.

اولین گروه علایم، گروه ناهنجاری های عفونی[6] می باشد که در این حالت برگها نامتقارن، چین و چروکدار[7] و در دندانه های آنها حالت نوک تیزی شدید و گاهی اوقات پیسک زردی[8] نیز به همراه این علایم دیده می شود. ساقه ها تغییر شکل داده و گره های مضاعف به همراه کتابی شدن ساقه و همچنین کوتاه شدن طول میانگره ها را نشان می دهد. تعداد خوشه ها و نیز حبه ها کاهش می یابد. این علایم از اوایل بهار با خنک شدن هوا شروع شده و در طول فصل رویشی نیز قابل مشاهده می باشد.

دومین گروه از علایم، موزائیک زردی[9] نامیده می شود. در این گروه رنگ برگها به زرد روشن که می تواند به صورت لکه ای، خطی یا حلقوی باشد، تغییر یافته و ممکن است روی همه اندامهای هوایی ظاهر شود.

سومین گروه از علایم، رگ نواری[10] نامیده می شود. در این گروه خال های زرد رنگ از رگبرگ اصلی شروع شده به تدریج به هم پیوسته و در نهایت رگبرگ ها به رنگ زرد در می آیند (Bovey *et al.*, 1980).

ویروس برگ بادبزنی مو علاوه بر ایجاد علایم قابل مشاهده در سطح بیرونی گیاه میزبان، باعث ایجاد تغییرات سیتوپاتولوژیک نیز می شود. تغییرات به وجود آمده در غشای شبکه

---

[6]- Infectiuos malformation
[7]- Puckering
[8]- Yellow motteling
[9]- Yellow mosaic
[10]- Vein banding

اندوپلاسمی سلول میزبان منجر به تشکیل محل های خاصی در اطراف هسته سلول می شود که ثابت

شده است که محل تکثیر ویروس می باشد (Ritzenthaler *et al.*, 2002). همچنین در سلول گیاهان آلوده به ویژه در میانگره های پائینی شاخه های چوبی، رشته های درون سلولی یا ترابکولها[11] به صورت شعاعی از فضای بین سلولهای اپیدرمی، پارانشیمی، آبکش و چوبی عبور می کنند که می توانند در تشخیص بیماری مفید واقع شوند (Bovey *et al.*, 1980).

1-3-4-2- علایم بر روی گیاهان محک

در شرایط بهینه (سایه و دمای 18°C) با مایه زنی GFLV بر روی گیاهان محک مناسب، زخم های موضعی کلروتیک بر روی برگها تشکیل می شود. آلودگی در گیاه فراگیر شده و علایم در برگ های آلوده به صورت رگبرگ روشنی، پیسک و گاهی تغییرشکل برگ ظاهر می شود. گیاه *Cucumis sativus* مایه زنی شده با GFLV لکه های موضعی کلروتیک در برگها نشان می دهد. بعضی استرین ها هیچ علایمی در این گیاه ایجاد نمی کند (Hewitt, 1970).

1-4- مشخصات ویروس برگ بادبزنی مو

1-4-1- رده بندی

[11]- Trabeculae

ویروس برگ بادبزنی مو متعلق به زیرگروه A از جنس *Nepovirus* است که به همراه جنس های *Comovirus* و *Fabavirus* در خانواده *Comoviridae* جای دارد (Mayo and Robinson., 1996).

1-4-2- ویژگی های فیزیکوشیمیایی و بیولوژی ویروس برگ بادبزنی مو

دمای غیر فعال شدن این ویروس (TIP)[12] 60-65°C، مدت زمان بقا در شرایط آزمایشگاهی (LIV)[13] 15-30 روز در 20°C و آخرین رقتی که ویروس می تواند قدرت آلوده کنندگی داشته باشد (DEP)[14] رقت 10^{-3} تا 10^{-4} می باشد (Hewitt *et al.*, 1970).

3 جزء رسوب کننده در پرپاراسیون خالص شده وجود دارد. ضریب رسوب سریعترین جزء رسوب کننده که جزء پایینی است 120S (B)، جزء میانی 86S (M) و جزء بالایی 50S (T) می باشد. ویریون ها در جزء B شامل 42% اسیدنوکلئیک و 58% پروتئین، در جزء M شامل 30% اسیدنوکلئیک و 70% پروتئین و در جزء T شامل 100% پروتئین می باشند.

1-4-3- ساختار ژنومی و فراورده های پروتئینی آن

پیکره ویروس GFL ایزومتریک با قطر حدود 30 نانومتر و زاویه دار می باشد (Roger and Austin., 1988). ژنوم این ویروس از دو نوع آر ان ای تک رشته سنس مثبت تشکیل شده که هر دو آر ان ای ژنومی مونوسیسترونیک بوده و دارای VPg در انتهای 5′ (Pinck *et al.*, 1988) و دم poly(A) در انتهای 3′ (Serghini *et al.*, 1990; Ritzenthaler *et al.*, 1991) خود می باشند

[12]- Temperature Inactivation
[13]- Longevity In Vitro
[14]- Dilution End Point

(Wetzel *et al.*, 2001). آر ان ای 1 بـا وزن مولکـولی $2/4\times10^6$ و آر ان ای 2 بـا وزن مولکـولی $1/4\times10^6$، مـی باشـد (Quasquarelli *et al.*, 1976). هـر دو آر ان ای 1 و آر ان ای 2 نـژاد F13 ویروس GFL به طور کامل تعیین توالی شده انـد (Ritzenthaler *et al.*, 1991; Serghini *et al.*, 1990).

آر ان ای 1، 7342 نوکلئوتیدی و شـامل یـک ORF[15]، 6885 نوکلئوتیـدی (Ritzenthaler *et al.*, 1991) و آر ان ای 2، 6885 نوکلئوتیدی با یک ORF 3330 نوکلئوتیدی (Serghini *et al.*, 1990) می باشد. هر کدام از آر ان ای ها یک پلی پروتئین رمز می کنند که بعدا به پروتئین هـای کـوچکتر شکسته می شوند (Andret-Link *et al.*, 2004). نپوویروس هـا از اسـتراتژی بیـان پلـی پـروتئین استفاده می کنند که این امر آنها را از ویروس های جانوری و ویروس های گیاهی با ژنوم آر ان ای سنس مثبت متمایز می کند (Margis *et al.*, 1993).

پلی پروتیئن رمز شده توسط آر ان ای 1 (P1) با جرم مولکولی 252 کیلودالتون نهایتـا بـه 3 نوع پروتئین شامل پروتئین متصل به NTP[16]، پروتئیناز ویروس و آر ان ای پلیمراز شکسته می شود (Margis *et al.*, 1993). مطالعات بر روی آر ان ای 1 نشان داده است که این رشته توانایی تکثیـر مستقل در پروتوپلاست را دارد. بنابراین قادر به رمز کردن اطلاعات لازم برای همانندسـازی خـود می باشد. همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که پلی پروتئین رمز شده توسط آر ان ای 1 توانایی شکستن پروتئین 122 کیلودالتونی تولید شده توسـط آر ان ای 2 را بـه دو پـروتئین 68 و 58 کیلودالتونی دارد. پس می توان استنباط کرد کـه ایـن آر ان ای دارای فعالیـت پروتئـازی اسـت (Ritzenthaler *et al.*, 1991). P1 متشکل از 2284 اسید آمینه می باشـد. در نهایـت 5 پـروتئین از آر ان ای 1 شامل 1A، 1B، $1C^{VPg}$، $1D^{Pro}$ و $1E^{Pol}$ رمز می شود.

---

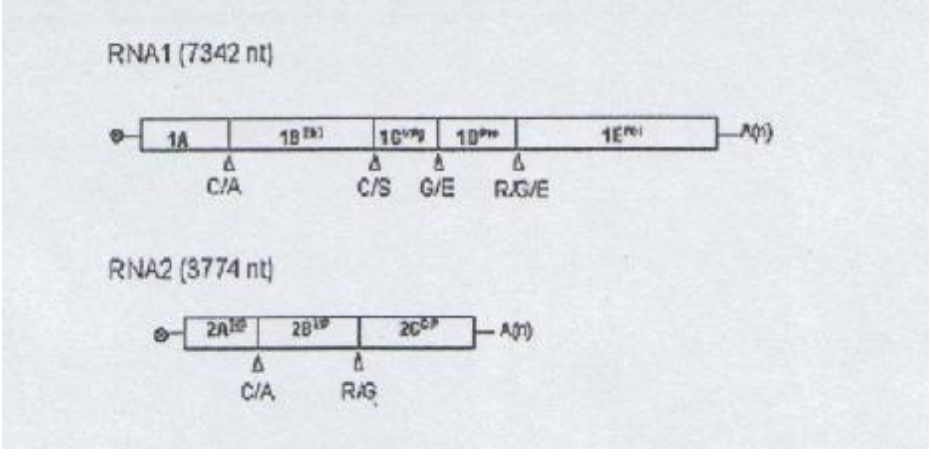
[15]- Open Reading Frame
[16]- NTP- binding protein

آر ان ای 2، پلی پروتئین P2 را با وزن مولکولی 122 کیلو دالتون رمز می کند. P2 به وسیله پروتئاز رمز شده توسط آر ان ای 1 به 3 پروتئین $2A^{HP}$، $2B^{MP}$ و $2C^{CP}$ شکسته می شود (شکل 1-1).

پروتئین $2A^{HP}$ با وزن مولکولی 28 کیلودالتون برای تکثیر آر ان ای 2 ضروری است (Gaire *et al.*, 1999).

پروتئین میانی یا $2B^{MP}$ با جرم مولکولی 38 کیلودالتون توسط فعالیت پروتئازی پروتئین کد شده توسط آر ان ای 1 از پلی پروتئین P2 جدا می شود. این پروتئین در تشکیل لوله هایی در پلاسمودسماتا و حرکت سلول به سلول ویروس که در سیستمیک شدن بیماری در گیاه موثر است، نقش دارد (Belin *et al.*, 1999).

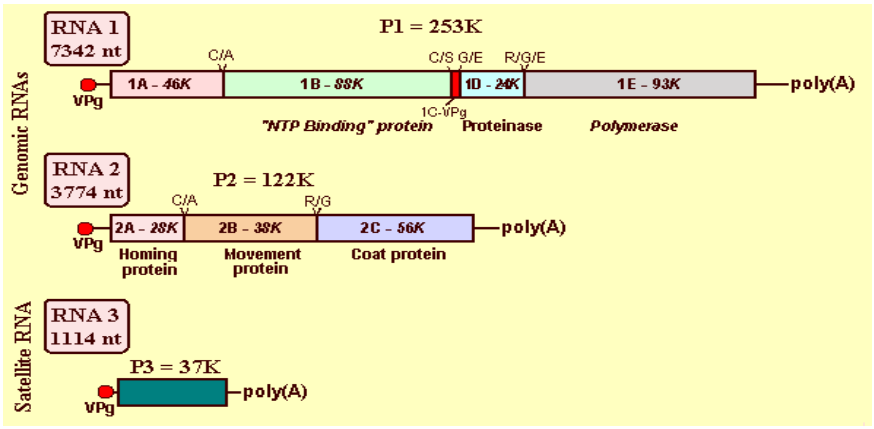
پروتئین $2C^{CP}$ دارای جرم مولکولی 55/6 کیلودالتون تشکیل دهنده پروتئین پوششی ویروس است. این پروتئین نیز با فعالیت پروتئولیتیک از پروتئین P2 جدا می شود (Margis *et al.*, 1993).



شکل 1-1- ساختار ژنتیکی ویروس برگ بادبزنی مو (Andret-Link et al.,. 2004)

1-4-4- آر ان ای ماهواره ای (Satellite RNA)

جدایه فرانسوی ویروس GFL، F13، علاوه از RNA های ژنومی دارای RNA سومی به نام RNA ماهواره ای می باشد. که همانند RNA های ژنومی دارای VPg در انتهای ´5 و دم poly(A) در انتهای ´3 خود می باشد (Hans et *al.*, 1992). مطالعات نشان داده اند که نژاد GFLV-F13 نسبت به سایر جدایه های این ویروس علایم شدیدتری بر روی *Chenopodium quinoa* ایجاد می نماید. آنها با بررسی ژنوم نژاد F13 این ویروس متوجه حضور آر ان ای سومی شدند که همان آر ان ای ماهواره ای بود (Pinck *et al.*, 1988). ماهواره نژاد F13 نیز تعیین توالی شده است (Fuchs *et al.*, 1989). این آر ان ای دارای 1114 نوکلئوتید با یک ORF، 1026 نوکلئوتیدی می باشد (شکل 1-2).



شکل 1-2- تصویر شماتیک قطعات آر ان ای های 1، 2 و 3 ویروس برگ بادبزنی مو (ICTV, 2002)

1-4-5- حرکت سلول به سلولی ویروس برگ بادبزنی مو

پروتئین 2B که پروتئین حرکتی ویروس می باشد تجمعی از ساختارهای لوله ای است که از دیواره سلول عبور کرده و در پلاسمودسماتای تغییر یافته سلول های آلوده به GFLV قابل مشاهده هستند (Belin *et al.*, 2001; Andret-Link *et al.*, 2004). ژن MP در صورت عدم تشکیل ساختارهای لوله ای شکل، که از عوامل اصلی شروع حرکت سلول به سلولی و نهایتا گسترش آلودگی می باشد، نمی تواند ذرات ویروسی را منتقل کند. این امر با تغییراتی که در ناحیه C انتهایی ژن پروتئین حرکتی GFLV انجام گرفته به اثبات رسیده است (Belin *et al.*, 1999).

تکثیر ویروس برگ بادبزنی مو احتمالا در فضاهای اطراف هسته جایی که تمام پروتئین های تکثیری انباشته شده انـد، اتفـاق مـی افتـد (Ritzenthaler, *et al.*, 2002).از آنجـا ذرات ویـروس مجبورند که مسیر خود را به اطراف سلول و احتمالا به پلاسمودسماتا از طریـق مـسیری کـه بـرای تهاجم به سلول سالم کناری استفاده می کنند، پیدا کنند.

شناسایی پروتئین 2B به عنوان پروتئین حرکتی، موفقیت قابل توجهی در مطالعـه مکانیـسم انتقـال GFLV بوده اسـت (Ritzenthaler, *et al.*, 1995a,b). پـروتئین حرکتـی و پوشـشی هـر دو بـرای حرکت ویروس لازم هستند اما برای تکثیر ویـروس لازم نیـستند. کـه ایـن موضـوع بـا اسـتفاده از موتانت های دارای حذف شدگی در RNA-2 و سـازه هـای ترکیبـی GFLV RNA-2 و ویـروس موزائیک آرابیس به اثبات رسیده است (Belin *et al.*, 1999; Gaire *et al.*, 1999).

1-5- کنترل ویروس برگ بادبزنی مو

GFLV یک ویروس بسیار متغیر می باشد، بررسی های مختلفی به منظور سـنجش تغییـرات در جدایه های مختلف این ویروس مخصوصا در سطح ژن پروتئین حرکتی انجام گرفته اسـت (دلپـسند، 1387; Bashir and Hajizadeh, 2007 ;Bashir *et al.*, 2007a). از آنجـایی کـه میزبـان طبیعی ویروس GFL تنها محدود به گونه های جنس *Vitis* می باشد، استفاده از مواد تکثیری عاری از ویروس از استراتژی های موثر می باشد.