

آفات و بیماریهای گیاهی  
جلد ۶۵، شماره ۱، شهریور ۱۳۷۶

## مقایسه سرولوژیکی و الکتروفورتیکی دو جدایه خفیف و شدید ویروس موزائیک خیار (GMV) از گیاه گوجه فرنگی

Studies on Biological, Serological and Molecular Charecterstics of Isolated of  
Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV) causing shoes-string and mild mosaic of  
tomato plants in Iran.

یزدان فضلعلی، علی آهون منش، محمدرضا حاجی مراد و علیرضا کریمی  
دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و  
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده

دو جدایه ویروس موزائیک خیار (GMV) با علایم موزائیک خفیف در گوجه فرنگی (CMV-L1) و نیز نخی شدن برگهای گوجه فرنگی (CMV-LN) از لحاظ سرولوژیکی و وزن مولکولی واحدهای پروتئین پوششی و اسیدهای نوکلئیک مورد مقایسه قرار گرفتند. در آزمون سرولوژیکی نشت دو طرفه در آگارز پیکره‌های ثابت نشده جدایه CMV-LN نسبت به CMV-LI در مقابل آنتی سرم CMV-FNy ایجاد مهمیزک نمود در حالیکه در مقابل آنتی سرم CMV-S (گروه سرولوژیکی ۲) چنین واکنشی مشاهده نگردید. در بررسی‌های الکتروفورتیکی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید، وزن مولکولی جدایه‌های CMV-LN و CMV-LI به ترتیب ۲۳۲۰۰ و ۲۵۰۰۰ دالتون تعیین گردید ولی هیچگونه تفاوتی از لحاظ شکل پیکره‌ها، وزن مولکولی، و تعداد اسیدهای ریبونوکلئیک دو جدایه وجود نداشت. با توجه به عدم وجود اسید ریبونوکلئیک وابسته در دو جدایه تفاوت در خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و وزن مولکولی واحدهای پروتئین پوششی دو جدایه را باید در اسید ریبونوکلئیک‌های ژنومی آنها جستجو کرد.

مقدمه

ویروس موزائیک خیار (CMV) با دامنه میزبانی وسیع یکی از ویروسهای گیاهی شناخته شده است که در اکثر نقاط جهان یافت میشود و تاکنون بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاهی میزبان برای آن شناسایی شده است (Palukaitis *et al.*, 1992); (Edwardson and christie, 1986). در دهه اخیر این ویروس موجب اپیدمی‌های خطرناکی در روی گوجه فرنگی و سایر گیاهان زراعی گردیده است (Palukaitis *et al.*, 1992). علایم معمول CMV در گوجه فرنگی از موزائیک خفیف تا شدید و از باریک شدن مختصر تا نخی شدن کامل (Shoe-string) برگها است (Francki *et al.*, 1979; Smith, 1972; Gibbs and Harrison, 1970).

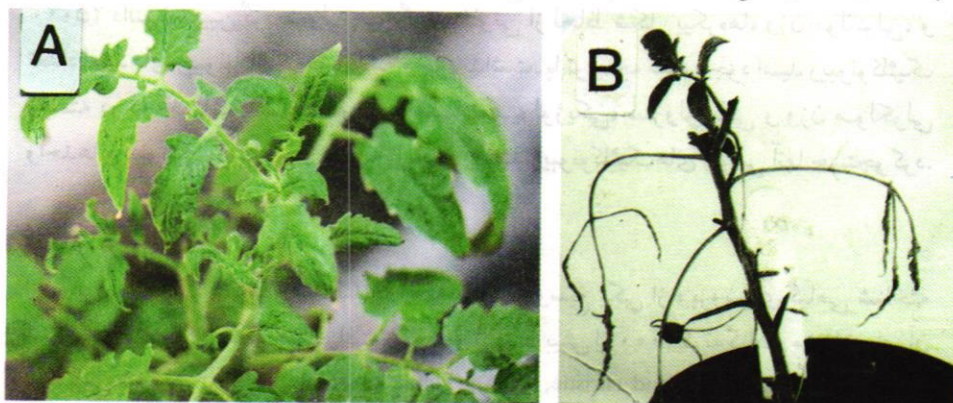
نژادهای بیولوژیکی متعددی برای ویروس موزائیک خیار شناسائی شده است (۱۳۴۸)، رحیمیان ۱۹۷۵، الهی نیا و هایلی ۱۳۶۳، علوی ۱۳۷۳ (Kaper & waterwoth, 1981). جدایه‌های CMV به سه گروه سرولوژیکی TORS، DTL و CO تفکیک شده‌اند (Devergne & Cardin, 1973). اما با نقشه برداری از پتیده‌های پروتئین پوششی (Edwards & Gonsalves, 1983) و هیبرید نمودن اسید نوکلئیک از نژادهای مورد مطالعه به دو گروه عمده تفکیک گردیدند (Owens & palukitis, 1986).

از آنجا که CMV ایمنی زای ضعیفی است، با استفاده از گلو تارالدئید (Francki & Hatta, 1980) میتوان ایمنی زائی (Immuogenicity) آن را افزایش داد.

با توجه به اینکه نژادهای مسبب علائم خفیف در مطالعات حفاظت تقاطعی (Cross-protection) ویروسی موزائیک خیار مورد استفاده هستند (Dodds, 1982) و از طرفی چون در مطالعات اخیر، ادغام نمودن ژن مولد پروتئین پوششی ویروس با ژنوم گیاه میزبان مقاومت مناسبی را در برابر ویروس ایجاد نموده است (Beachy et al., 1990) بنابراین مقایسه دو نژاد خفیف و شدید CMV از جنبه های گوناگون مفید خواهد بود.

#### روش بررسی

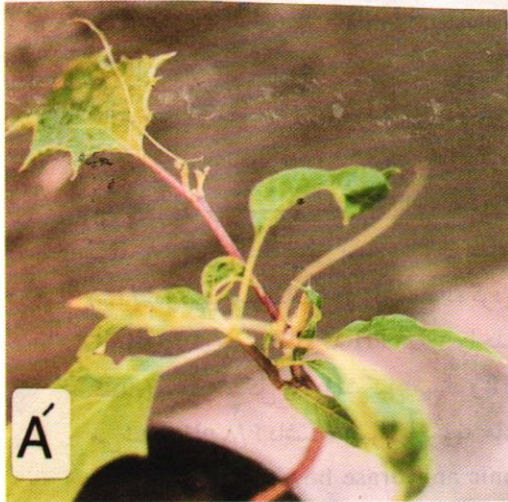
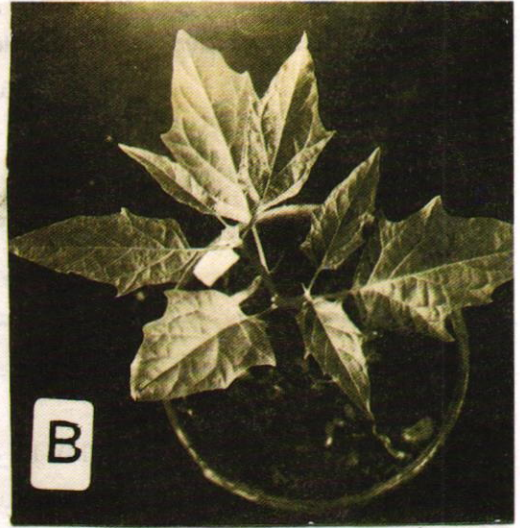
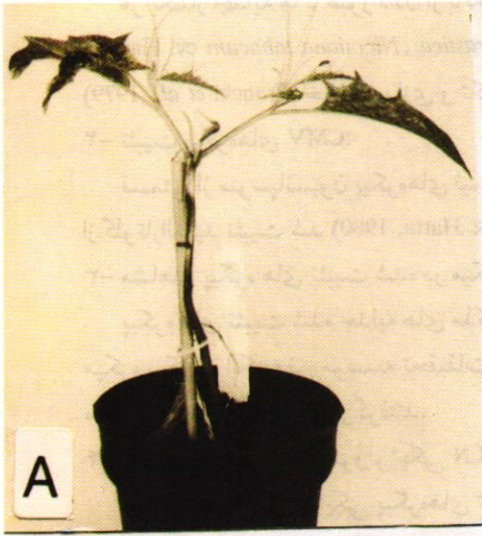
۱- منابع و آماده سازی ویروس (فضلعلی و همکاران، ۱۳۷۵) دو جدایه ویروس موزائیک خیار از میان تعدادی از جدایه های CMV جدا شده از گوجه فرنگی که یکی (CMV-LI) در گیاه گوجه فرنگی موزائیک خفیف و دیگری (CMV-LN) در همان گیاه نخعی شدن شدید برگها را باعث میشدند (شکل ۱-۱) انتخاب و در این تحقیق به کار گرفته شدند.



شکل ۱-۱: واکنش سیستمیک گیاه *Lycopersicon esculentum* CV. Red cloud نسبت به  
A: CMV-LI و B: CMV-LN

Fig. 1.1- Systemic reaction of *Lycopersicon esculentum* CV. Red cloud to A: CMV-LI  
B: CMV-LN





شکل ۱-۲: واکنش گیاه *Datura stramonium* در شرایط محیطی مختلف نسبت به خالص شده بیولوژیکی

A, A': CMV-LN

B, B': CMV-LI

Fig. 1.2. The reaction to biological purified of A, A': CMV-LN and B, B': CMV-LI of *Datura stramonium* under different environmental conditions

هر یک از جدایه ها با عبور دادن از باقلا و ماش از لحاظ بیولوژیکی خالص و سپس در ارقام *N. tabacum* cv. white burley و *N. rustica*، *Nicotiana tabacum* cv. Havana مطابق روش (Francki *et al.*, 1979) خالص سازی و تکثیر گردیدند.

۲- تثبیت پیکره های CMV:

قسمتی از سوسپانسیون پیکره های نیمه خالص دو جدایه مذکور بطور جداگانه و با استفاده از گلو تارالدئید تثبیت شد (Francki & Hatta, 1980) و بقیه بدون تیمار نگهداری گردید.

۳- مشاهده پیکره های تثبیت شده در میکروسکوپ الکترونی:

پیکره های تثبیت شده جدایه های مذکور با استفاده از اسات اورانیل رنگ آمیزی منفی و در میکروسکوپ الکترونی موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی با بزرگنمایی های مختلف مورد مشاهده و مقایسه قرار گرفتند.

۴- مقایسه خصوصیات سرولوژیکی CMV-LI و CMV-LN:

خصوصیات سرولوژیکی پیکره های تثبیت شده (Fixed) و تثبیت نشده (Native) دو جدایه CMV-LI و CMV-LN با استفاده از روش سرولوژیکی نشت دو طرفه در آگار (Van Regenmortel, 1982) در روی ژل آگارز در برابر آنتی سرمهای مربوط به CMV-FNY (سروتیپ یک)، (Owens & Palukaitis, 1988) CMV-S (سروتیپ دو)، (Pizzolla *et al.*, 1979) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

۵- بررسی و مقایسه وزن مولکولی پروتئین پوششی دو جدایه CMV-LI و CMV-LN:

برای این منظور از روش الکتروفورز کردن پروتئین بر روی ژلهای صفحه ای پلی اکریل آمید طبق روش عملی (Laemeli, 1970) استفاده شد. در این روش از یک سیستم بافیری تریس-گلايسین به عنوان بافر الکترودها و از یک سیستم بافیری تریس SDS (سدیم دودسیل سولفات) در ژل استفاده گردید.

ژلهای مورد استفاده که PH آنها ۲ واحد با یکدیگر تفاوت داشت یکی ژل زیرین (ژل جدا کننده) بود که  $\frac{3}{4}$  کل ژل را تشکیل میداد و PH آن  $\frac{8}{8}$  بود و دیگری ژل بالایی که  $\frac{1}{4}$  ژل را شامل می شد و PH  $\frac{6}{8}$  داشت، همراه با نمونه های ویروس از پروتئینهای استاندارد:

Bovine plasma albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase bovin rabbit myosin, B-galactosidase, phosphorylase B

به ترتیب با وزن مولکولی تقریبی ۲۹، ۴۵، ۶۶، ۹۷/۴، ۱۱۶، ۲۰۵ کیلو دالتون جهت مقایسه و محاسبه وزن مولکولی واحدهای پروتئین پوششی دو ویروس استفاده شد.

۶- جداسازی و ارزیابی اسید ریبونوکلیتیک ها:

این آزمون طبق روش ارائه شده توسط (Peden & symons, 1973) برای بررسی و مقایسه اسیدریبونوکلیتیک های ژنومی و غیرژنومی دو جدایه CMV-LI و CMV-LN و تحت شرایط استریل استفاده گردید. الکتروفورز نمونه ها در دستگاه الکتروفورز افقی در ژل آگارز به غلظت



۱/۵ درصد انجام گرفت. پس از الکتروفورز نمونه‌ها، ژل مورد استفاده با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با کمک دستگاه UV. Trasilluminator وضعیت حرکت اسید ریبونوکلیتیک‌های تفکیک شده بررسی و مقایسه گردید.

### بحث و نتیجه

۱- بررسی خصوصیات بیولوژیکی جدایه‌های مورد مطالعه: با توجه به بررسی و مقایسه جدایه‌های مورد مطالعه بر روی گیاهان محک در شرایط محیطی و فصول مختلف (فصلی و همکاران ۱۳۷۵) خفیف‌ترین علائم مربوط به جدا شده (CMV-LI) و شدیدترین علائم نخی شدن کامل برگهای گوجه فرنگی مربوط به جدایه (CMV-LN) بود که شکل‌های (۱-۱) و (۱-۲) مویده آن هستند.

۲- خالص سازی، تثبیت پیکره‌ها و الکترون میکروسکوپ: همانطور که در شکل ۱-۲ و ۲-۲ نیز مشاهده میشود خالص بودن پیکره‌ها از هر گونه پیکره ویروسی دیگر نشان دهنده مطلوب بودن روش خالص سازی بیولوژیکی و روش خالص سازی آزمایشگاهی است و همینطور این شکلها نشان می‌دهد که پیکره‌های هر دو جدایه تفاوت قابل توجهی در شکل و اندازه پیکره ندارند.

### ۳- نتایج مقایسه خصوصیات سرولوژیکی:

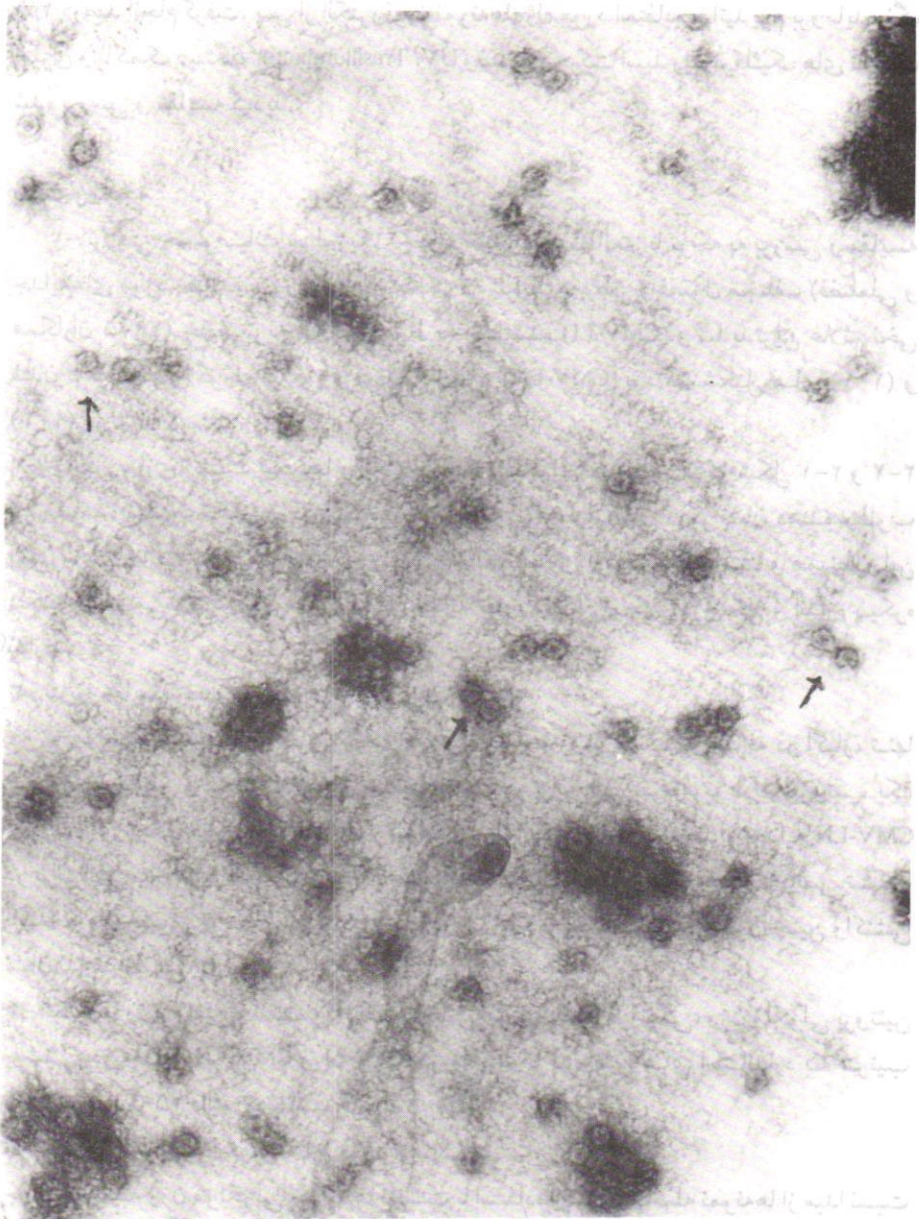
در مقایسه خصوصیات سرولوژیکی دو جدایه به روش نشت دو طرفه در آگار، تنها پیکره‌های خالص و تثبیت نشده دو جدایه، آن هم در برابر آنتی سرم مربوط به سروتیپ یک ویروس موزائیک خیار (CMV-FNy) از لحاظ سرولوژیکی متفاوت بودند و جدایه CMV-LN در برابر آنتی سرم مربوط به سروتیپ ۱ مهمیزک تشکیل داد. ولی پیکره‌های خالص تثبیت نشده و هم چنین پیکره‌های تثبیت شده هر دو جدایه در برابر دو آنتی سرم فوق چنین واکنشی نشان ندادند (شکل ۳).

۴- الکتروفورز پروتئین و اسید نوکلئیک: براساس نقوش الکتروفورتیکی، وزن ملکولی پروتئین پوششی دو جدایه CMV-LI و CMV-LN در مقایسه با پروتئین‌های استاندارد به ترتیب ۲۳۲۰۰ و ۲۵۰۰۰ دالتون محاسبه گردید.

محاسبه وزن مولکولی نمونه‌های مورد آزمایش:

جهت محاسبه وزن مولکولی جدایه‌ها نخست با استفاده از نسبت فاصله نمونه‌ها از مبدا نسبت به فاصله بروموفنول آبی از مبدا (RF آنها) بدست آمد سپس با استفاده از از لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌های استاندارد و RF ها وزن مولکولی نمونه‌ها محاسبه گردید.

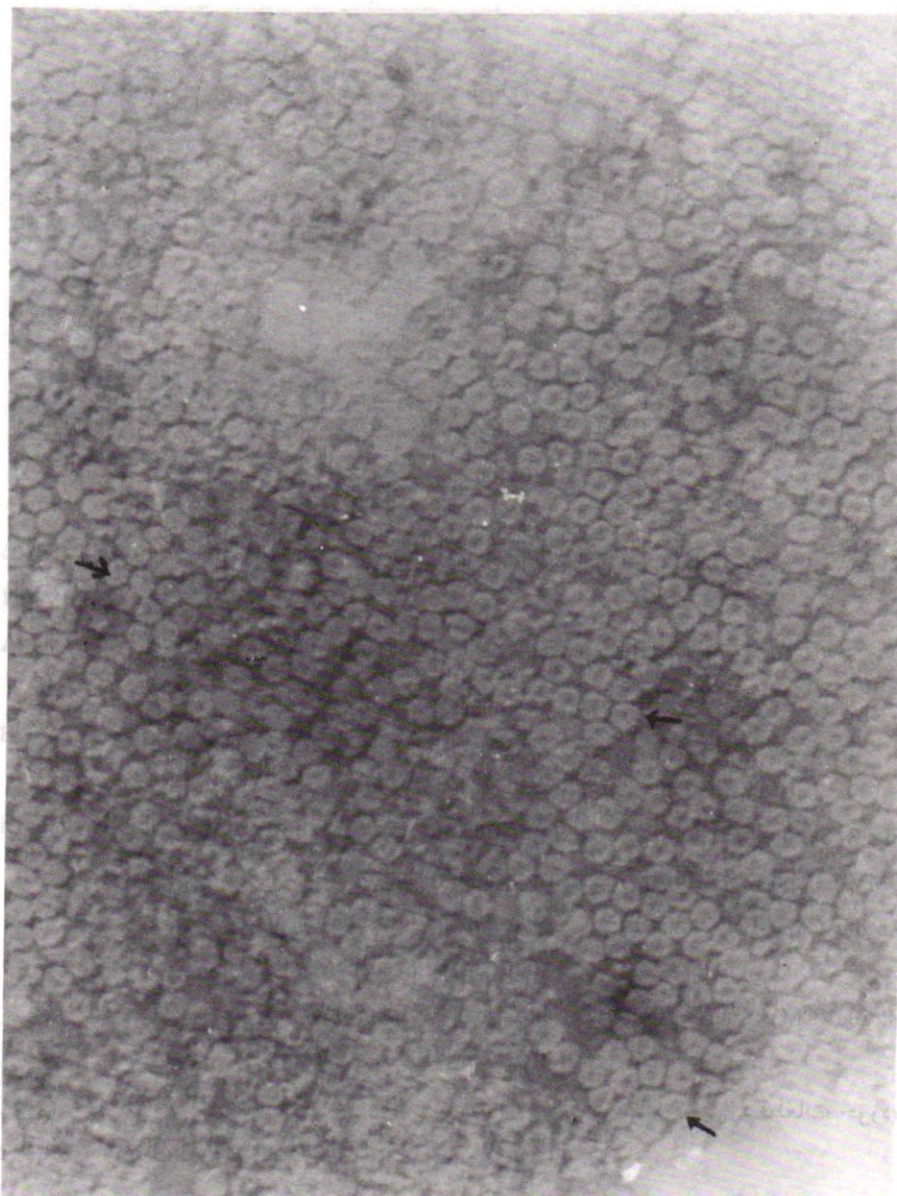
همانطوریکه در شکل ۵ مشاهده میشود تفاوتی در وزن مولکولی و تعداد اسید ریبونوکلیتیک‌های ژنومی مشاهده نگردید و فقط هر دو جدایه حاوی سه نوع اسید نوکلئیک



شکل ۱-۲: پیکره‌های خالص (آزمایشگاهی) و تثبیت شده با گلو تارالدئید CMV-LI در میکروسکوپ الکترونی پس از رنگ آمیزی با استات اورانیل. بزرگنمایی  $2 \times 110000$  میباشد.

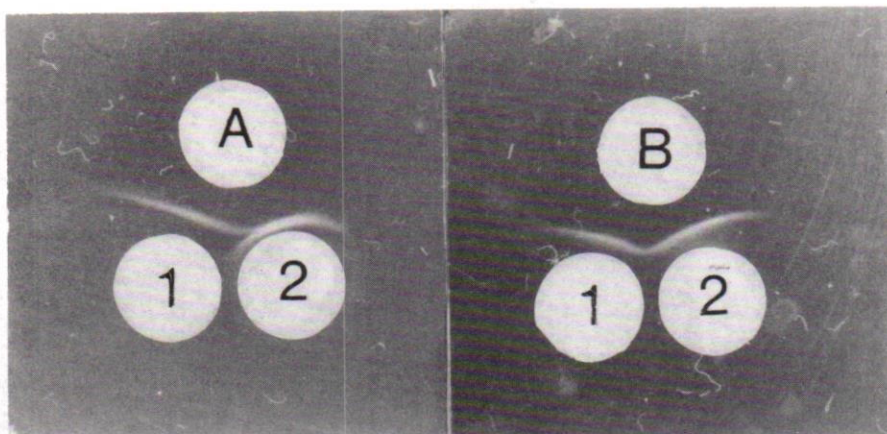
Fig. 1.2- The purified and glutaraldehyde fixed particles of CMV-LN after staining with uranyl acetate ( $2 \times 110000$ )





شکل ۲-۲: پیکره‌های خالص (آزمایشگاهی) و تثبیت شده با گلو تارالدئید CMV-LN در میکروسکوپ الکترونی پس از رنگ آمیزی با استات اورانیل. بزرگنمایی  $2 \times 91000$  میباشد.

Fig. 2.2- The purified and glutaraldehyde fixed particles of CMV-LN after staining with uranyl acetate ( $2 \times 91000$ ).



شکل ۳- مقایسه سرولوژیکی پیکره‌های خالص (آزمایشگاهی) و تثبیت ناشده CMV-LI و CMV-LN به روش نشت دو طرفه در آگار:

- A: ۱۰ میکرولیتر آنتی سرم CMV-FNY ، ۱۰:۱ میکرولیتر سوسپانسیون CMV-LI  
 ۱۰:۲ میکرولیتر سوسپانسیون CMV-LN
- B: ۱۰ میکرولیتر آنتی سرم CMV-S ، ۱۰:۱ میکرولیتر سوسپانسیون CMV-LI  
 ۱۰:۲ میکرولیتر سوسپانسیون CMV-LN

Fig. 3- Serological comparison of purified (Laboratory) and non-purified particles of CMV-LI and CMV-Ln by means of agar diffusion method:

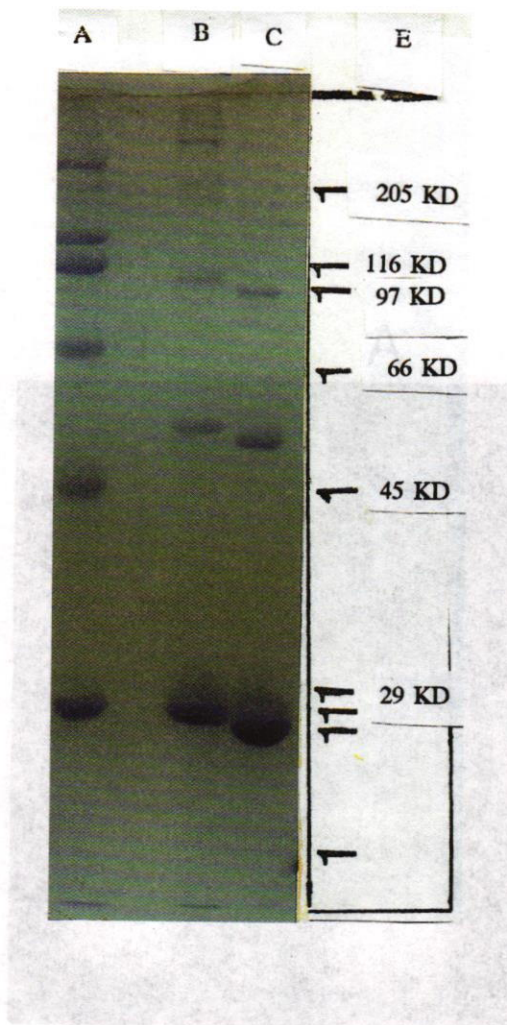
- A: 10 $\mu$ l CMV-FNY antiserum., 1: 10 $\mu$ l CMV-LI suspension  
 2: 10 $\mu$ l CMV-LN suspension
- B: 10 $\mu$ l CMV-S antiserum, 10 $\mu$ l Cmv-LI suspension  
 2: 10 $\mu$ l CMV-LN suspension

ژنومی هستند. باند چهارمی نیز که بطور غیر متمرکز در شکل ۵ مشاهده میشود قطعات خورده و ناقص RNAهای ژنومی می‌باشند.

#### بحث

در مقایسه سرولوژیکی این دو جدایه در روش نشت دو طرفه در آگار، مشاهده شد که دو جدایه CMV-LI و CMV-LN در برابر آنتی سرم مربوط به سروتیپ ۱ (CMV-FNY) تفاوت دارند ولی پس از تثبیت پیکره‌ها این تفاوت مشاهده نگردید. این موضوع نشان می‌دهد که دو جدایه از لحاظ شاخصهای آنتی ژنتیکی (ایپ توپها) متفاوت هستند.

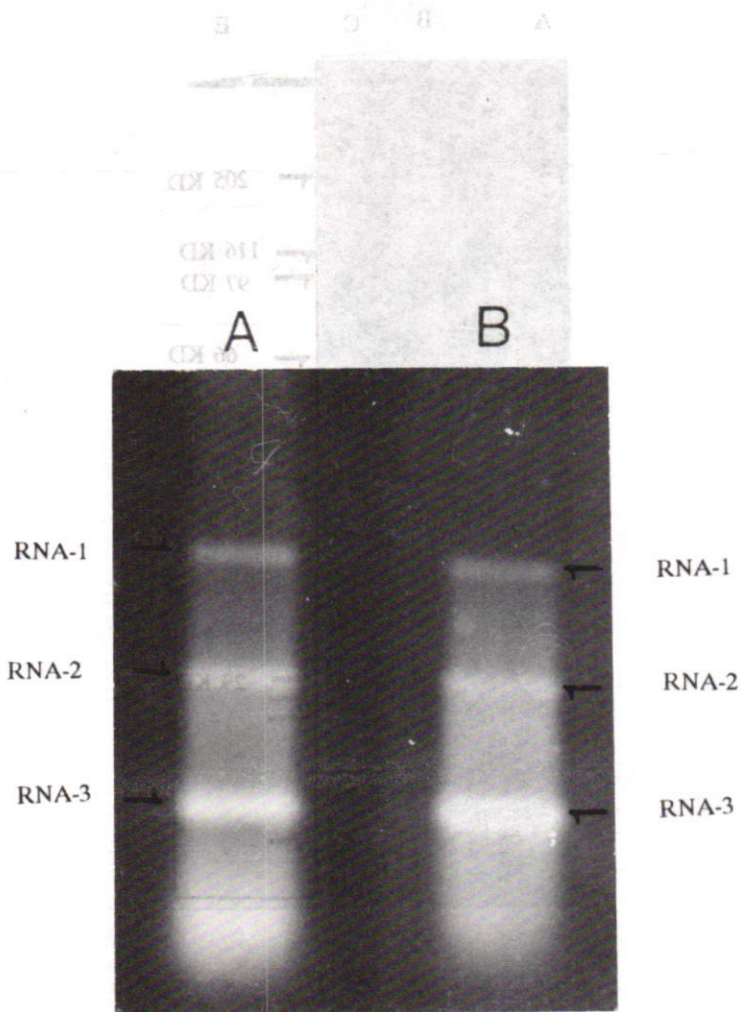




شکل ۴- مقایسه پروتئینهای استاندارد (ستون A) با CMV-LI (ستون B) و CMV-LN (ستون C) از طریق الکتروفورز کردن ۵-۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از آنها بر روی ژل پلی اکرایلامید و رنگ آمیزی با بروموفنول بلو  
E- وزن مولکولی پروتئینهای استاندارد

Fig. 4. Comparison of standard proteins (Column A) with CMV-LI (Coloumn B) and CMV-LN (Coloumn C) via electrophoresis of 5-15 $\mu$ l of their suspension on polyacrylamide before staining with bromophenol blue.

E- Molecular weight of standard proteins.



شکل ۵- مقایسه RNA های ژنومی CMV-LN (ستون A) و CMV-LI (ستون B) توسط الکتروفورز کردن ۱۵-۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از آنها به روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برومید.

Fig. 5- Comparison of CMV-LN (Column A) genomic RNA with that of CMV-LI (Column B) Via electrophoresis of 15-20 $\mu$ l of their suspension on agarose before staining with etidium bromide



در مقایسه پروتئینهای پوششی دو جدایه مشخص گردید که وزن مولکولی واحدهای پروتئین پوششی CMV-LN بیشتر از CMV-LI است بنابراین تفاوت در خصوصیات سرولوژیکی آنها از یک طرف و اختلاف در وزن مولکولی واحدهای پروتئین پوششی از طرف دیگر این موضوع را مطرح می سازد که توالی نوکلئوتیدهای ژن کد کننده پروتئین پوششی آنها متفاوت است و با توجه به رفتار بیولوژیکی متفاوت آنها بر روی گیاهان آزمون بخصوص گوجه فرنگی و داتوره میتوان چنین نتیجه گیری نمود که این تفاوت تحت تاثیر پروتئین پوششی یک یا هر دو جدایه باشد (Owens & palukastis, 1988; Shintaku, 1991; Yie *et al.*, 1992).

در این راستا تحقیقات بعدی بر پایه Pseudorecombination, invitro recombination نشان می دهد که آیا پروتئین پوششی و در نتیجه RNA-4 یک یا هر دو جدایه موثر در رفتار بیولوژیکی آنهاست یا نه (Zitter & Gonsalves, 1991; Quemada *et al.*, 1989).

در الکتروفورز RNA های دو جدایه بر روی ژل آگارز سه نوع RNA (RNA-1, RNA-2, RNA-3) مشخص مشاهده گردید که تفاوتی از لحاظ وزن مولکولی نشان ندادند. بنابراین هیچگونه RNA اضافی بر ژنوم موثر در علایم دو جدایه وجود نداشته است. آنچه که منشاء تفاوت در خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و پروتئین پوششی دو جدایه CMV-LI, CMV-LN بوده، اختلاف در زنجیره های نوکلئوتیدی RNA های ژنومی یا ژنوم فرعی (Subgenome) آنها است (Piazzolla *et al.*, 1979). پس تفاوت این زنجیره ها باید در تحقیقات بر پایه هیبرید کردن اسید نوکلئیک (در RNA های ژنومی و ژنوم فرعی) مورد بررسی قرار گیرد و نوکلئوتیدهای متفاوت مشخص شده و در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به مباحث فوق دو جدایه CMV-LI, CMV-LN که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند میتوانند عوامل با ارزشی جهت انجام تحقیقات بعدی باشند.

از طرف دیگر با توجه به علائم خفیف (MCV-LI) میتوان از آن در مطالعات حفاظت تقاطعی (Cross-Protection) نیز استفاده نمود (Dodds 1982).

---

نشانی نگارندگان: مهندس یزدان فضلعلی، دانشکده کشاورزی تربیت مدرس تهران، دکتر علی آهون منش، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، دکتر محمدرضا حاجی مراد و مهندس علیرضا کریمی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵ تهران.