آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۷۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۲

انتقال و بیان ژن پروتئین پوششی سویه نکروتیک ویروس Y سیب زمینی در گیاه *Nicotiana tabacum* cv. Samsun *

Assessment of virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Samsun lines against three Iranian isolates of potato virus Y

رضا پوررحیم[۱]، علی آهون‌منش[۲]، هاله هاشمی[۳]، سیروس زینلی[٤]

۱ـ گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

۲ـ گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳ـ مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران.

٤- بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.

(تاریخ دریافت : خرداد۸۱ ، تاریخ پذیرش : فروردین ۸۲)

چکیده

با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی، ژن پروتئین پوششی سویه نکروتیک ویروس Y سیب زمینی همسانه سازی گردید و با استفاده از پیشبر 35S CaMV موجود در پلاسمید pCaMV و بکمک حامل ژنی pBin19 و روش Agroinoculation، به گیاهان توتون رقم Samsun منتقل گردید. نتایج حاصله از واکنش زنجیره ای پلیمراز روی ۳۱ لاین مقاوم به کانامایسین، نشان داد که ۲۹ لاین دارای تراژن الحاقی در ژنوم خود بودند. همچنین رونوشت برداری برگردان و سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR)، وجود رونوشت آر.ان.ای از تراژن را در لاینهای تراریخت به استثنای پنج لاین، مشخص نمود. بنظر میرسد در این پنج لاین، تراژن پس از الحاق به ژنوم گیاه، خاموش شده باشد. بررسی تعداد نسخه های الحاقی تراژن به ژنوم

* این مقاله براساس نتایج پایان نامه دوره دکتری نگارنده اول ارایه گردیده است.

لاینهای تراریخت، نشان داد که چهار لاین از پنج لاین، دارای بیش از یک نسخه از تراژن در ژنوم خود بودند. در گیاهان تراریختی که به منظور ایجاد مقاومت مهندسی شده بوجود می‌آیند، مطالعه نحوه بیان تراژن و عوامل موثر در آن، میتواند اطلاعات پایه ای مفیدی را جهت شناسایی مکانیزم مقاومت فراهم نماید.

مقدمه

خانواده *Potyviridae* بزرگترین و یکی از مهمترین گروههای ویروسی بیماریزای گیاهی است (Van Regenmortel *et al.*, 2000). بررسیهای متعددی جهت تهیه گیاهان تراریخت مقاوم به این ویروسها بر اساس استراتژی مقاومت مشتق شده از عامل بیمارگر (Pathogen Drived Rresistance, PDR) انجام شده است (Lindbo *et al.*, 1993). در این مورد، بیشتر بررسیها روی ژن پروتئین پوششی این ویروسها بوده است (Gonsalves and slightom., 1993). در میان اعضای خانواده *Potyviridae* ویروس Y سیب زمینی (عضو تیپ جنس *Potyvirus*) از اهمیت زیادی برخوردار بوده و یکی از مخربترین عوامل بیماریزای ویروسی در توتون، سیب زمینی و فلفل محسوب میگردد، بطوریکه در برخی موارد میزان کاهش محصول، ۸۰ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (Shew and Lucas, 1991; Hooker, 1990). به منظور ایجاد مقاومت مهندسی شده در مقابل این ویروس، تاکنون بیان ژن پروتئین پوششی PVY در گیاهان توتون رقم SR1 و Xanthi و نیز در ارقام سیب زمینی Russet Burbank و Russet Norkotah مورد بررسی قرارگرفته است (Farinelli and Malone 1993; Farinelli *et al.* 1992; Kollar *et al.* 1993; Lawson *et al.* 1990; Smith *et al.* 1995; Stark *et al.* 1989; Van der Vluget *et al.* 1992). نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان فوق، جهت ایجاد مقاومت، بیان تراژن در سطح پروتئین ضرورتی نداشته و بیان آن در سطح رونوشت آر.ان.ای کافی می‌باشد.

معمولا نتایج حاصل از انتقال و الحاق ژن ویروس به ژنوم گیاه، قابل پیش بینی نبوده و گاهی دور از انتظار میباشد. نوع پیش‌بر، محل الحاق تراژن بر روی کروموزوم گیاه، ترادفهای پیش‌رو، نوع گیاه و تغییرات ایجاد شده پس از رونوشت برداری روی آر.ان.ای در هسته و سیتوپلاسم، در بیان تراژن ویروسی در سلول تاثیر دارند. خاموشی تراژن در گیاهان تراریخت،

از جمله موارد دیگری است که موجب بروز نتایج غیر قابل پیش بینی میگردد. گیاهان تراژنی که دارای بیش از یک نسخه از ژن الحاقی به ژنوم خود باشند، به پدیده خاموشی متکی بر همانندی تراژن (Homology Ddependent Gene Silencing) بیشتر حساس می‌باشند(Wilde *et al.*, 2000). در این حالت، علیرغم حضور ژن الحاقی در گیاه، واکنش مقاومتی مشاهده نخواهد شد. همچنین در مورد پوتی ویروسها مشخص شده است که گونه گیاه، در نحوه بیان تراژن و مکانیزم مقاومت، تاثیر دارد. بعنوان مثال، در گیاهان توتون تراژن دارای ژن پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی خربزه درختی (Papaya Ringspot Virus)، مقاومت، ناشی از بیان تراژن در سطح پروتئین میباشد، در حالیکه در گیاهان خربزه درختی تراژن با همین ژن الحاقی، مقاومت ناشی از بیان ژن در سطح آر.ان.ای میباشد(Fitch *et al.*, 1992). از اینرو در گیاهان تراژنی که به منظور ایجاد مقاومت مهندسی شده بوجود می‌آیند، مطالعه نحوه بیان ژن الحاقی و عوامل موثر در آن می‌تواند اطلاعات پایه‌ای مفیدی را جهت شناسایی مکانیزم مقاومت فراهم نماید.

در این تحقیق، بکمک طراحی آغازگر، ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک ویروس Y سیب زمینی به نحوی همسانه سازی گردید که فاقد کدون شروع (AUG) جهت آغاز ترجمه باشد. بوسیله این تراژن، گیاهان توتون رقم *Nicotiana tabacum* cv. Samsun تراریخت گردیده و بیان ژن الحاقی در سطح آر.ان.ای و نیز تعداد نسخه های الحاقی آن در ژنوم لاینهای حاصله، مورد بررسی و بحث قرارگرفته است. نتایج حاصله نشان داد که از ۳۱ لاین بدست آمده، در پنج لاین، ژن پس از الحاق به ژنوم احتمالا خاموش شده است. همچنین در هیچیک از لاینهای تراژن، پروتئین پوششی یا محصول پروتئینی مشابه، ناشی از ترجمه تراژن قابل تشخیص نبود. از این نتایج می‌توان در مطالعات بررسی مقاومت استفاده نمود.

روش بررسی

۱- همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی

در این تحقیق، از همسانه ژنوم ویروس Y سیب زمینی تهیه شده از Collection American Type Culture (ATCC) به شمارهٔ ATCC-٤٥١٢٦ استفاده شد. این همسانه، در برگیرندهٔ نیمهٔ ´۳ ژنوم PVY شامل نوکلئوتید های ۵۸۱۵ تا ۹۷۰٤ از ژنوم نژاد نکروتیک PVY

بوده (Robaglia *et al.*, 1989) و در پلاسمید pSK و باکتری *E. coli* سویهٔ JM109 همسانه سازی شده بود. پلاسمید pSK حاوی همسانه مورد نظر، به روش فروپاشی قلیائی (alkalin lysis) استخراج گردید (Sambrook *et al.*, 1989). جهت همسانه سازی ترادف مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی (PVY-CP)، از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) استفاده گردید. ژنوم ویروس Y سیب زمینی متشکل از ۹۷۰۳ نوکلئوتید می باشد که ترادف مربوط به ژن پروتئین پوششی آن شامل نوکلئوتیدهای ۸۵۷۳ تا ۹۳۷۳ است. با استفاده از نرم افزار Oligo دو آغازگر اختصاصی برای دو انتهای ´۵ و ´۳ ناحیهٔ کدکنندهٔ PYV-CP طراحی گردید. آغازگر اول (Da1) از نوکلئوتید ۸۵۷۳ به طول ۳۰ نوکلئوتید با ترادف 5' - cac ggatcc gca aat gac aca att gat gca - 3' و آغازگر دوم (Da2) از نوکلئوتید ۹۳۸۳ بطول ۳۳ نوکلئوتید با ترادف 5'- gac ggatcc tca cat gtt ctt gac tcc aag tag-3' طراحی شدند (شکل ۱). ژن PYV-CP فاقد جایگاه ویژه برای آنزیم برشی *Bam* HI می باشد و با توجه به اینکه در مراحل بعدی کار نیاز بود تا دو انتهای ´۵ و ´۳ ژن PYV-CP توسط آنزیم برشی *Bam* HI برش یابد، لذا ترادف ویژه مربوط به این آنزیم برشی، در طراحی این آغازگرها در نظر گرفته شد. ترکیب واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل آغازگر ۱ و ۲ هر کدام یک میکرولیتراز غلظت ۲۰ پیکومول در هر میکرولیتر، آنزیم Taq DNA polymerase ۰/۵ میکرولیتر، پلاسمید حاوی همسانه دو میکرولیتر، بافر PCR10X پنج میکرولیتر، محلول $MgCl_2$ 25mM ۳ میکرولیتر، محلول 10m M NTPmix یک میکرولیتر و ddH2O ۳۶/۵ میکرولیتر بود. تمامی آنزیمها و محلولهای بکاررفته در PCR از شرکت Roche آلمان تهیه شده بود. برنامهٔ به کار رفته شامل پنج دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ چرخه (سیکل) شامل یک دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد، دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و یک دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد بود که در پایان منتهی به یک دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد شد. پس از پایان واکنش PCR که در دستگاه ترموسایکلر مدل LKB USA انجام شد، حدود ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR، در ژل آگاروز ۰/۸ درصد در بافر TBE (شامل Tris-borate ۰/۰٤۵مولار و EDTA ۰/۰۰۱مولار، pH برابر ۸)، حاوی اتیدیوم بروماید بمیزان ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر به روش افقی در ۸۰ ولت ثابت به مدت حدود ۳۰ دقیقه الکتروفورز

گردید. همچنین در ژل آگاروز، بعنوان نشانگر (marker)، از پلاسمید pUC18 برش یافته توسط آنزیم برشی *Taq* که تولید قطعات ۱٤٤٤ ، ۷۳٦ ، ٤۷٦ و ۳۰ جفت بازی را بدنبال داشت، استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، وجود قطعهٔ ۸۲۲ bp مربوط به ژن PVY-CP در ژل آگارز، به کمک نور ماوراء بنفش توسط دستگاه (LKB) UV مورد بررسی قرار گرفت. برای جدا سازی قطعهٔ ۸۲۲ bp از ژل آگاروز، از کیت Agarose Gel DNA Extraction ساخت شرکت Roche (آلمان) و طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (بر اساس مکانیزم اتصال به ماتریکس سیلیکا) استفاده گردید. بمنظور حصول اطمینان از این که قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی حاصله از PCR، بصورت اختصاصی از تکثیر ناحیه ژن PVY-CP حاصل شده و شامل قطعه غیراختصاصی دیگری نیست، با توجه به ترادف های تعیین شده ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک ویروس Y سیب زمینی، از آنزیمهای برشی *Avi II*، *Bsm I*، *Sfu I* و *Tru 9I* (تهیه شده از Roche آلمان) بطور جداگانه جهت برش قطعه فوق الذکر استفاده شد (Sambrook *et al.*, 1989). محصول هضم آنزیمی در ژل آگارز الکتروفورز گردیده و نقوش باندهای حاصله با اندازه قطعات مورد انتظار بر اساس ترادف گزارش شده برای ژن PVY-CP مورد بررسی و مقایسه قرارگرفت. پس از اطمینان از اختصاصی بودن محصول واکنش PCR، قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی حاصل از این واکنش و نیز پلاسمیدpSK (Stratgene, USA) بطور جداگانه با آنزیم برشی *Bam* HI مورد برش قرارگرفتند، تا انتهاهای چسبنده برای آن ها ایجاد شود (Sambrook *et al.*, 1989). در مرحله بعد این قطعه و پلاسمید pSK توسط تیمار با آنزیم T4 DNA Ligase به یکدیگر متصل شدند. محصول واکنش Ligation، به روش شوک حرارتی، به سلولهای مستعد (competent) باکتری *E. coli* سویه XLI Blue منتقل گردید (Sambrook *et al.*1989).