آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۶، شماره‌های ۲ و ۱، ۷۷-۱۳۷۶

بیان ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب زمینی (PVX) در گیاه سیب‌زمینی ترانس ژنیک *

Expression of potato virus X (PVX) coat protein gene in transgenic potato

هاله هاشمی، نوح شهرآئین و نیکلای دامونسکی
بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور تهران و
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده

ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب‌زمینی (PVX) تحت کنترل پروموتور PCaMV35 s و توالی‌های افزایش دهنده در داخل ناقل خاص از گروه binary vector کلون شد و سپس با استفاده از باکتری اگروباکتریوم تومه فاسینس *(Agrobacterium tumefaciens)* به داخل ۲ رقم گیاه سیب زمینی منتقل گردید. پس از رشد و تکثیر گیاهان، گیاهان ترانس ژنی که مقاومت به کانامایسین داشتند در خاک کاشته شدند و پس از یکماه وجود transcript ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب‌زمینی در داخل آنها با روش آزمایش RT-PCR مورد بررسی قرارگرفت و وجود transcript ژن پوشش پروتئینی (CP) در داخل برخی از گیاهان فوق به اثبات رسید. در این مقاله، در مورد خالص سازی RNA ویروسی، چگونگی انتقال به گیاه، نحوه انتقال (Transformation)، کلون کردن و انتقال ژن CP بحث شده است. شایان ذکر است که مطالعات ارزیابی میزان مقاومت گیاهان فوق به ویروس X سیب‌زمینی در دست انجام است.

مقدمه

خساراتی که توسط ویروسهای گیاهی به محصولات زراعی، باغی و یا جنگلی و مرتعی وارد میگردد موجب کاهش تولید در شرایط حاد حمله ویروس میگردد. برای جلوگیری از زیان ویروسهای گیاهی، از روشهایی مانند استفاده از بذور عاری از ویروس، کنترل و مبارزه با حشرات ناقل، استفاده از ارقام اصلاح شده و مقاوم به ویروس و از بین بردن گونه های علف هرز که میزبان ویروس میباشند استفاده میگردد (Hide and Lapwood, 1992). در سالهای اخیر بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک پیشرفت سریع و گسترده ای در اغلب زمینه های علوم

* این تحقیق برگرفته از بخشی از رساله دکتری نویسنده اول مقاله میباشد.

زیستی داشته است. کاربرد گسترده این علوم در زمینه گیاهی، اعم از گیاهان زراعی، باغی، جنگلی، مرتعی و زینتی با اهدافی هم چون ایجاد مقاومت در مقابل آفات و بیماریها، تنشهای محیطی، بهبود کیفیت و غیره نتایج پرباری داشته است. در مورد جلوگیری از خسارات وارده از طرف ویروسهای گیاهی، با بکارگیری روشهای نوین مهندسی ژنتیک پیشرفت قابل توجهی در دستیابی به گیاهان مقاوم به ویروس حاصل گردیده است. در حال حاضر مهمترین روشهای فوق عبارتند از :

۱- انتقال ژن به صورت antisense با هدف اختلال در تکثیر ویروس (Hemenway *et al.*, 1988 Macfarlane and Davis, 1992).

۲- انتقال ژن آنزیم رپلیکاز ویروسی جهت ممانعت از تکثیر ویروسی در سلول میزبان (Adreson *et al.*, 1992).

۳- انتقال ژن satellite RNA با هدف کاهش تعداد ویروس در گیاه میزبان (Harrison *et al.*, 1987; Gerlach, 1987).

۴- انتقال ژن پوشش پروتئینی ویروس به گیاه (Powell and stark, 1989).

از بین روشهای فوق، روش آخر تا بحال از موفقیت زیادی برخوردار بوده است. تاکنون ژن پوشش پروتئینی (CP) تعداد زیادی از ویروسهای گیاهی با هدف مقاوم سازی گیاهان در مقابل خسارات ویروسهای مربوط به تعدادی از گیاهان منتقل گردیده است (Lawson and Kaniewski, 1990). گیاهان دستکاری شده ژنتیکی، درجات مختلفی از مقاومت را نشان داده اند که می توان به دلایلی چون تفاوت در نسخه برداری و میزان آن، جایگاه استقرار ژن و تعداد کپی های ژن خارجی که وارد ژنوم گیاه میشود اشاره نمود (Meyer *et al.*, 1996). با توجه به اهمیت سیب‌زمینی به عنوان یک محصول زراعی مهم، تا بحال کوششهای فراوانی در جهت کاهش میزان خسارات وارده به آن توسط عوامل بیماری‌زای گیاهی به عمل آمده است. از جمله این عوامل میتوان به ویروسها اشاره نمود که هر ساله موجب کاهش درصد قابل توجهی از محصول سیب زمینی در زمینهای زیر کشت آن میشود (Lawson and Kaniewski, 1990; Kaniewski *et al.*, 1990). ویروس X سیب زمینی یکی از عوامل ویروسی در مزارع سیب زمینی است. این ویروس به تنهایی سبب کاهش محصول سیب زمینی بین ۱۰ تا ۲۰ درصد میشود. ولی در آلودگی توام با سایر ویروسها بخصوص ویروس (Y) (PVY) سیب‌زمینی میتواند سبب کاهش قابل توجهی در محصول بین ۸۰ تا ۹۰ درصد شود (Kaniewski *et al.*, 1990).

در تحقیق حاضر هدف در وهله اول استفاده و بکارگیری تعدادی از روشهای جدید مهندسی ژنتیک در راستای ایجاد مقاومت به ویروس X در گیاه سیب‌زمینی میباشد که تابحال این گونه روشها در ایران مورد استفاده قرار نگرفته است. در عین حال امید بر آن است که بتوان با بکارگیری فنون فوق واریته‌های مورد کاشت در ایران را نسبت به این ویروس و سایر ویروسها مقاوم نمود.

این بررسی در ۲ مرحله انجام گرفته است که مرحله کلونینگ آن در بخش بیولوژی مولکولی

انستیتو پاستور ایران و مرحله دوم آن که شامل ارزیابی مقاومت گیاهان فوق به ویروس PVX میباشد با همکاری بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آفات و بیمارهای گیاهی، تهران به انجام رسیده است.

مواد و روشها:

۱- ویروس PVX و خالص سازی RNA ویروسی:

سویه ویروسی مورد استفاده در این بررسی از طرف دکتر Viter (انستیتو پترولیوم و بیوارگانیک کیف اوکراین) اهدا شده بود. برای استخراج RNA ویروسی از فنل، کلروفرم و 1% SDS (سدیم دودسیل سولفات) استفاده شد. تمامی ظروف و وسایل شیشه‌ای مورد استفاده برای جلوگیری از عمل RNase (آنزیم تخریب کننده RNA) قبلا استریل شده و تمامی محلولها نیز توسط محلول ۱٪ ماده شیمیائی دی انیل پیروکربنات (DEPC) تیمار شده بودند (Sambrook *et al.*, 1989).

۲- سنتز رشته مکمل ژن پوشش پروتئنی ویروس X

پس از استخراج RNA ویروسی، DNA مکمل (c DNA) توالی نوکلئوتیدی کد کننده ژن پوشش پروتئینی ویروس X با استفاده از عمل آنزیم Reverse transcriptase (نسخه بردار معکوس) ساخته شد.

۱-۲- طراحی پرایمر

بدین منظور در ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی و همچنین اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی EMBL دو پرایمر برای انتهاهای 3̀ و 5̀ ژن مورد نظر طراحی شدند (AC:M38655) به نحوی که دارای جایگاه ویژه برای آنزیم برش دهنده *BamHI* در دو انتهای 3̀ و 5̀ بودند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای ساخته شده به قرار زیر بود:

Primer upstream: 5̀- CCAT GGATCCTCGAAAGATGTCAGCACCAGCTAGC

Primer downstream: 5̀- TAGGGATCCTTATGGTGGTGGTAGAGTGACAAC

۲-۲- سنتز رشته مکمل DNA ژن پوشش پروتئینی

پس از خالص سازی RNA ویروس با استفاده از کیت First cDNA synthesis شرکت GIBCO BRL اقدام به ساختن رشته فوق از روی RNA ویروسی گردید. به طور خلاصه طبق دستورالعمل کیت ابتدا مخلوطی از RNA (۵-۱ میکروگرم) و پرایمر مربوط به انتهای 3̀ در لوله‌های ۰/۵ میلی لیتر تهیه و حجم آن با آب تیمار شده با DEPC به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. پس از انکوباسیون نمونه به مدت ده دقیقه در ۷۰°C، سپس لوله ها روی یخ منتقل و حداقل به مدت یک دقیقه در این وضعیت نگهداری شد. در مرحله بعد مخلوطی از بافر PCR10X و MgCl2 با غلظت ۲۵ میلی مولار و نوکلئوتیدهای تری فسفات (dNTP) با غلظت ده میلی مولار و DDT با غلظت ۰/۱ مولار تهیه و به هر لوله ۷ میکرولیتر از این مخلوط اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۴۲°C قرار داده شدند. سپس یک میکرولیتر از آنزیم Reverse

transcriptase به هر لوله اضافه و برای مدت ۵۰ دقیقه دیگر در درجه حرارت فوق نگاه داشته شدند. اختتام واکنش با قرار دادن لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۷۰°C انجام و سپس لوله‌ها به روی یخ منتقل شدند.

۳-۲- تکثیر قطعه cDNA تک رشته‌ای

در مرحله بعد به لوله‌های ۰/۵ میلی لیتری به میزان ۰/۵ میکرولیتر از cDNA، یک میکرولیتر از هر دو پرایمر و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و سایر مواد لازم برای انجام واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) اضافه شد و سپس طبق برنامه‌ای که داده شد DNA مورد نظر در طی ۳۰ سیکل به کمک ماشین ترموسایکلر تکثیر گشت.

در نهایت ۱ میکرولیتر از محصول PCR پس از اختتام عمل در ژل آگاروز ۰/۸ درصد حاوی ۵ درصد اتیدیوم بروماید قرار داده شد و پس از الکتروفورز به روش submerg و به کمک نور UV، ژل مورد بررسی قرار گرفت.

۲- کلون کردن DNA توالی نوکلوتیدی ژن پوشش پروتئینی در پلاسمید pSK

پس از مشاهده قطعه DNA مورد نظر در ژل و مقایسه آن با مارکر، محصول PCR با استفاده از فنل کلروفرم و رسوب مجدد DNA با اتانول استخراج و خالص گردید، سپس قطعه فوق با آنزیم *BamHI* مورد برش قرار گرفت تا انتها های چسبنده برای آن ایجاد شود. در عین حال پلاسمید pSK (کمپانی استراتژن امریکا) نیز با آنزیم *BamHI* برش داده شد. به منظور جلوگیری از بهم چسبیدن مجدد دو انتهای پلاسمید فوق انتهاهای آن مورد در مقابل آنزیم الکالین فسفاتاز قرار گرفت. پس از آن توسط آنزیم T4DNA Ligase قطعه مورد نظر و حامل به یکدیگر متصل شدند و حاصل عمل به باکتری *E. coli* سویه XLI Blue منتقل گردید و روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد داده شد. به منظور تائید وجود کلنی‌های باکتری حاوی قطعه فوق، پس از ۲۴ ساعت کلنی ها به طور جداگانه در محیط‌های کشت مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و سپس عمل تخلیص پلاسمید صورت گرفت و با استفاده از نقشه ژنی، پلاسمیدها مورد برش با آنزیم *BamHI* قرار گرفتند که در صورت وجود قطعه مورد نظر، سویه باکتریایی حاوی آن نگاهداری میشد.

۳- تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن CP

پس از کلون قطعه فوق در داخل پلاسمید pSK با استفاده از دستگاه DNA Sequencing شرکت فارماسیا (Pharmacia) و با استفاده از کیت T7 Polymerase همین شرکت و استفاده از ماده رادیو اکتیو $dATP_s35$ با روش دی دوکسی (di deoxy Method) ژن CP مورد بررسی توالی نوکلئوتیدی قرار گرفت (Sanger *et al.*, 1977).

به طور خلاصه با استفاده از پرایمرهای Universal و Reverse مربوط به کیت فوق و استفاده از پلاسمید pSK حاوی قطعه مورد نظر و اضافه کردن نوکلئوتیدهای دی دوکسی چهارگانه به طور مجزا و آنزیم T7 Polymerase به همراه $dATP_s35$ رادیواکتیو در هر لوله، واکنش پلی‌مریزاسیون انجام گرفت. برای اطلاع از چگونگی انجام دقیق روش توصیه میشود به