

## 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<sup>۱</sup>، علی آهونمنش<sup>۲</sup>، هاله هاشمی<sup>۳</sup>، سیروس زینلی<sup>۴</sup>

- گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

- مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران.

- بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، استیتو پاستور ایران.

(تاریخ دریافت: خرداد ۸۱، 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 کاناامایسین، نشان داد که ۲۹ لاین دارای تراژن الحقی 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 ترازیخت به استثنای پنج لاین، مشخص نمود. بنظر میرسد در این پنج لاین، تراژن پس از الحقی به ژنوم گیاه، خاموش شده باشد. بررسی تعداد نسخه های الحقی تراژن به ژنوم

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

لاینهای تاریخت، نشان داد که چهار لاین از پنج لاین، دارای بیش از یک نسخه از تراژن در ژنوم خود بودند. در گیاهان تاریختی 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 تاریخت مقاوم به این ویروسها بر اساس استراتژی مقاومت مشتق شده از عامل بیمارگر (Pathogen) (Lindbo *et al.*, 1993) انجام شده است (Driven Resistance, PDR). 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، بطوريکه 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 1 Russet Norkotah و Russet Burbank و Xanthi و نیز در ارقام سیب زمینی Farinelli and Malone 1993; Farinelli *et al.* 1992; Kollar *et al.* 1993; Lawson 1992 قرار گرفته است (Farinelli *et al.* 1990; Smith *et al.* 1995; Stark *et al.* 1989; Van der Vlugt *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.

معمولًا نتایج حاصل از انتقال و الحاق ژن ویروس به ژنوم گیاه، قابل پیش‌بینی 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 تاریخت،

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) (Wilde *et al.*, 2000) بیشتر حساس میباشند. 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، بكمک طراحی آغازگر، ژن پروتئین پوششی نزاد نکروتیک ویروس ۷ سیب زمینی به نحوی همسانه سازی گردید که قادر کدون شروع (AUG) جهت آغاز ترجمه باشد. بوسیله این تراژن، گیاهان توتون رقم Nicotiana tabacum cv. Samsun تاریخت گردیده و بیان ژن الحاقی در سطح آر.ان.ای و نیز تعداد نسخه های الحاقی آن در ژنوم لاینهای حاصله، در 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 احتمالاً 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

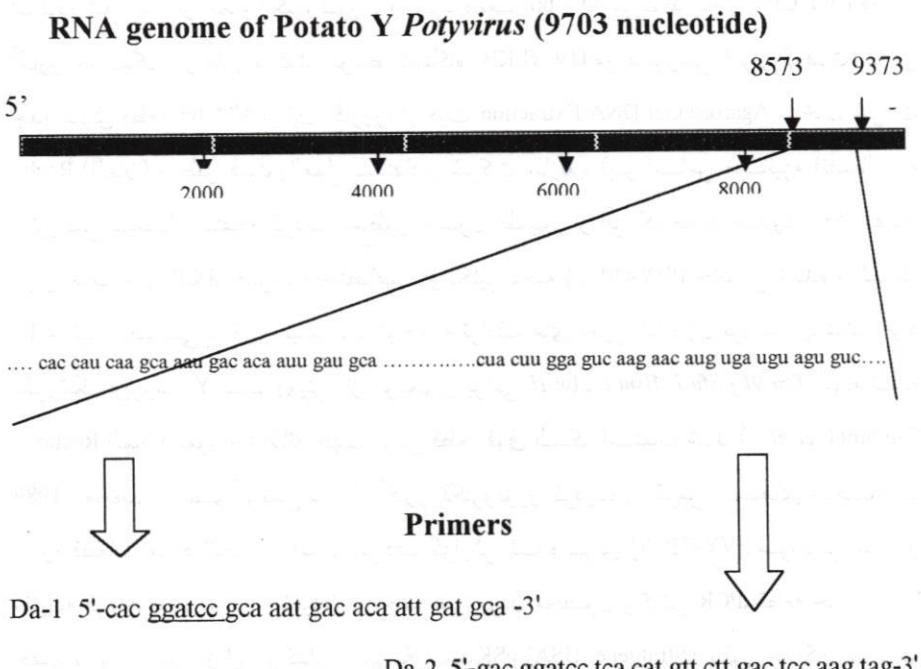
#### ۱- همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ویروس ۷ سیب زمینی

در این تحقیق، از همسانه ژنوم ویروس ۷ سیب زمینی تهیه شده از Collection ATCC-۴۵۱۲۶ (ATCC) به شماره American Type Culture برگیرنده نیمه ۳ ژنوم PVY شامل نوکلئوتید های ۵۸۱۵ تا ۹۷۰۴ از ژنوم نزاد نکروتیک PVY

بوده (Robaglia *et al.*, 1989) و در پلاسمید pSK و باکتری *E. coli* 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 مشکل از ۹۷۰۳ نوکلوتید می‌باشد که ترادف مربوط به ژن پروتئین پوششی آن شامل نوکلوتیدهای ۸۵۷۳ تا ۹۳۷۳ است. با استفاده از نرم افزار Oligo دو آغازگر اختصاصی برای دو انتهای ۵' و ۳' ناحیه کدکننده PYV-CP طراحی گردید. آغازگر اول (Da1) از نوکلوتید ۸۵۷۳ به طول ۳۰ نوکلوتید با ترادف ۳'-cac ggatcc gca aat gac aca att gat gca - ۳' باشد و آغازگر دوم (Da2) از نوکلوتید ۹۳۸۳ به طول ۲۳ نوکلوتید با ترادف ۳'-gac ggatcc tca cat gtt ctt gac tcc aag توسط tag-3' طراحی شدند (شکل ۱). ژن PYV-CP فاقد جایگاه ویژه برای آنزیم برشی *Bam* HI می‌باشد و با توجه به اینکه در مراحل بعدی کار نیاز بود تا دو انتهای ۵' و ۳' 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 زنجیره‌ای پلیمراز شامل آغازگر ۱ و ۲ هر کدام یک میکرولیتر از غلظت ۲۰ پیکومول در هر میکرولیتر، آنزیم ۰/۵ Taq DNA polymerase میکرولیتر، پلاسمید حاوی همسانه دو میکرولیتر، بافر PCR10X پنج میکرولیتر، محلول ۳۶/۵ ddH<sub>2</sub>O ۲۵mM MgCl<sub>2</sub> ۳ میکرولیتر، محلول ۱۰m M NTPmix ۱۰m M Roche آلمان تهیه شده میکرولیتر بود. تمامی آنزیمهای و محلولهای بکاررفته در PCR از شرکت Roche آلمان تهیه شده بود. برنامه به کار رفته شامل پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ چرخه (سیکل) شامل یک دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد، دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و یک دقیقه در ۹۴ 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 Tris-EDTA ۰/۰۴۵ مولار و ۰/۰۰۱ مولار 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 بر شی یافته توسط آنزیم بر شی *Taq* که تولید قطعات ۱۴۴۴، ۷۳۶، ۴۷۶ و ۳۰ جفت بازی را بدنبال داشت، استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، وجود قطعه ۸۲۲ bp مربوط به ژن PVY-CP در ژل آگاروز، به کمک نور ماوراء بنفس توسط دستگاه (LKB) UV مورد بررسی قرار گرفت. برای جدا سازی قطعه 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 بر شی *Tru9I*, *SfuI*, *BsmI*, *AviII* و *TehI* (تھیه شده از Roche آلمان) بطور جداگانه جهت بر شی قطعه فوق الذکر استفاده شد (Sambrook *et al.*, 1989). محصول هضم آنزیمی در ژل آگاروز الکتروفورز گردیده و نقوش باندهای حاصله با اندازه قطعات مورد انتظار بر اساس ترادف گزارش شده برای ژن PVY-CP مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. پس از اطمینان از اختصاصی بودن محصول واکنش PCR، قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی حاصل از این واکنش و نیز پلاسمید pSK (Stratgene, USA) بطور جداگانه با آنزیم بر شی *BamIII* مورد بر شی قرار گرفتند، تا انتهای 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) بакتری *E. coli* سویه Blue XLI منتقل گردید (Sambrook *et al.* 1989).

نحوه ایجاد پریمرها برای ترازدیدن ویروس پاتو یو پتوویروس

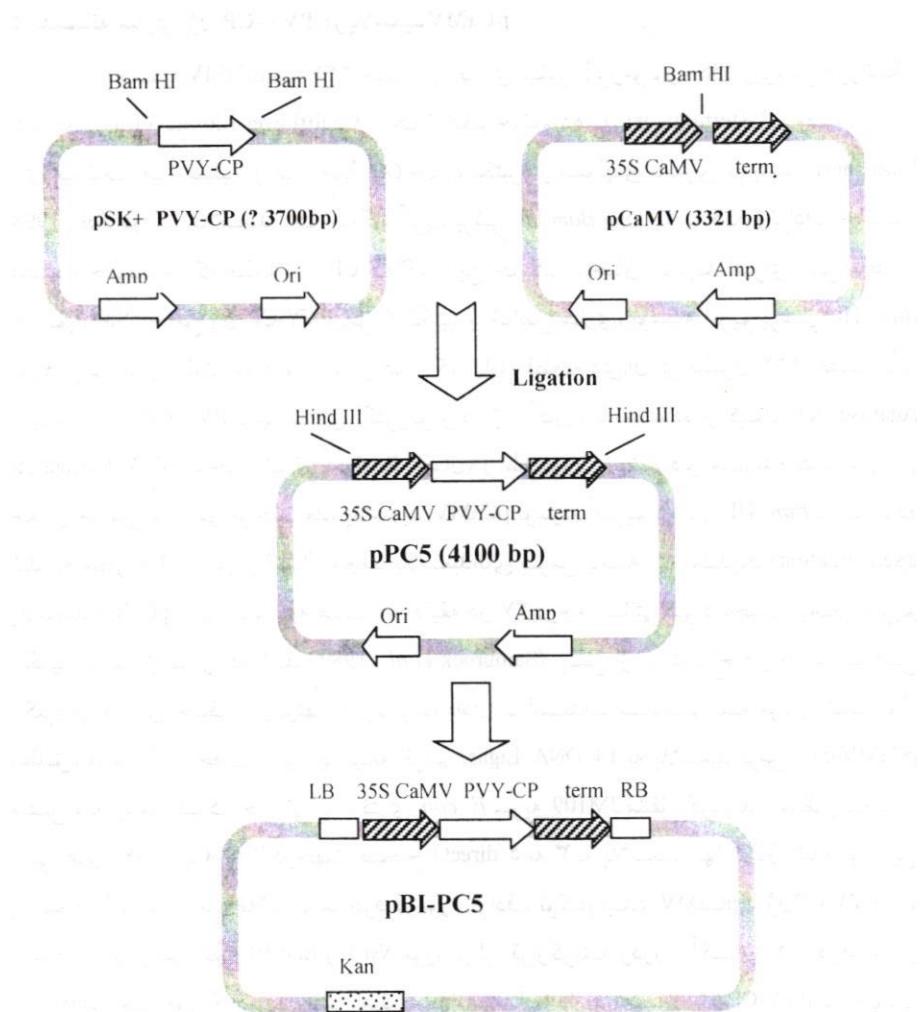


شکل ۱: نمودار ژنوم ویروس Y سبب زمبی ناحیه شامل رمز کننده پروتئین پوششی این ویروس (نوکلئوتیدهای ۸۵۷۳ تا ۹۳۷۳) از ترازدید. ترازدید مربوط به ابتداء و انتهای این ناحیه و آغازگرهای طراحی شده، در شکل مشخص شده است. ترازدهایی که زیرشان خط کشیده شده، ناحیه برش BamHII میباشد که در ترازدید اصلی مربوط به ژنوم ویروس وجود نداشته و جهت تسهیل در همسانه سازی در نظر گرفته شده است.

Fig 1: Genome of PVY including coat protein coding region. The sequences of designed primers are shown. Introduced Bam HII sites are underlined.

## ۲- همسانه سازی ژن PVY-CP در پلاسمید pCaMV

پلاسمید pCaMV با ۳۳۲۱ جفت باز، دارای پیشبر (پروموتور) ۳۵S و یروس موزائیک کلم گل (Cauliflower Mosaic Virus)، یک ترادرف خاتمه دهنده (terminator)، ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و نیز ناحیه *Ori* جهت تکثیر در سلولهای باکتری می‌باشد (Hashemi et al., 1998). در این پلاسمید یک جایگاه آنزیم برشی *Bam* HI میان پیشبر ۳۵S و ترادرف خاتمه دهنده وجود دارد که قطعه ژن PVY-CP در این جایگاه الحق گردید. برای این منظور پلاسمید pSK حامل ژن PVY-CP پس از تکثیر و خالص سازی، بوسیله آنزیم برشی *Bam* HI مورد برش قرار گرفت. محصول این واکنش که شامل قطعه دی‌ان‌ای بطول ۸۲۲ جفت باز مربوط به ژن PVY-CP بود، پس از الکتروفورز در ژل آگاروز، با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction ساخت شرکت Roche (آلمان) و طبق روش پیشنهادی سازنده کیت، از ژل جدا و خالص شد. در مرحله بعد، پلاسمید pCaMV بوسیله آنزیم برشی *Bam* HI برش داده شد. به منظور جلوگیری از اتصال مجدد پلاسمیدهای برش یافته به یکدیگر (self ligation) پلاسمید pCaMV برش یافته، به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد تحت تیمار آنزیم آلkalin فسفاتاز قرارداده شد (Sambrook et al., 1989). پس از استخراج دی‌ان‌ای با فن وکلروفورم برای حذف پروتئینها و رسوب دادن با استات سدیم سه مولارواتانول مطلق، قطعه ۸۲۲ جفت بازی، بوسیله آنزیم T4 DNA Ligase به پلاسمید برش یافته pCaMV متصل و به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه JM109 منتقل گردید. بمنظور انتخاب کلني هايي که ژن PVY-CP درجهت صحيح (direct) به ۳ به پلاسمید آنها الحق شده بود، اين پلاسميدها با توجه به اطلاعات موجود درمورد ترادرف نوكليوتيدی pCaMV و ژن PVY-CP با استفاده از دو آنزيم برشی *Eco* RI و *Nsi* I مورد برش قرار گرفته و در ژل آگاروز ۰/۸ درصد در بافر TBE، الکتروفورز گردیدند. کلني هايي که پلاسميد آنها داراي همسانه ژن PVY-CP درجهت صحيح به ۳ در سمت پیشبر و ۳ در سمت ترادرف خاتمه دهنده بودند، توليد قطعات حدود ۳۸۰۰ و ۲۸۰۰ جفت بازی و کلني هائي که پلاسميد آنها داراي همسانه ژن PVY-CP درجهت معکوس ۳ به ۵ بودند، توليد قطعات حدود ۱۰۰۰ و ۳۱۰۰ جفت بازی نمودند. کلني شماره ۵ که پلاسميد آن داراي همسانه PVY-CP درجهت صحيح بود، برای ادامه کار انتخاب شد. اين پلاسمید بنام pPC5 نامیده شد (شکل ۲).



شکل ۲: مراحل شماتیک همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ویروس Y سبب زمینی در حاملین پلاسمیدی

Fig 2 : Schematic diagram of cloning of coat protein gene of potato virus Y in plasmid vectors.

### ۳- انتقال کاست بیانی به داخل ناقل pBin19

جهت انتقال ژن PVY-CP به گیاه از روش انتقال توسط آگروباکتریوم استفاده شد (Bevan, 1984). برای این منظور کاست بیانی حامل ژن PVY-CP در پلاسمید pBin19 که یک ناقل دوتائی (binary) میباشد، همسانه سازی شد (Frisch et al., 1995). پلاسمید pCaMV حاوی همسانه PVY-CP در ناحیه قبل از شروع پروموتور 35S و نیز در ناحیه بعد از ترا福德 خاتمه دهنده دارای جایگاه آنزیم برشی Hind III بود. ابتدا این پلاسمید با آنزیم Hind III برش داده شده و سپس در ژل آگاراز ۰/۸ درصد در بافر TBE در ۸۰ ولت ثابت بمدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. قطعه حدود ۱۴۰۰ جفت بازی برش یافته، مانند قبل از ژل آگاروز استخراج و خالص سازی گردید. پلاسمید pBin19 در ناحیه T-DNA خود دارای یک جایگاه آنزیم برشی Hind III میباشد (Frisch et al., 1995). این پلاسمید با آنزیم برشی T4 DNA ligase، قطعه ۱۴۶۶ جفت بازی برش یافته از pCaMV، به پلاسمید pBin19 متصل گردید. پلاسمید نوترکیب حاصله بنام pBI-PC5 نامیده شد (شکل ۲). محصول واکنش الحق، به روش شوک حرارتی به سلولهای E. coli سویه JM109 انتقال داده شده و این باکتری ها ابتدا در محیط LB بدون آنتی بیوتیک بمدت یک ساعت و سپس در محیط کشت LB آگاردار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. تک کلنی های باکتری رشد نموده، بطور جداگانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت شده و پلاسمید آنها استخراج گردید. در مرحله بعد پلاسمیدهای pBI-PC5 به سلولهای باکتری Agrobacterium tumefaciens نژاد LBA 4404 (Gibco BRL, USA) انتقال داده شد. برای این کار از روش triparental mating استفاده گردید (Rogers et al., 1986). سلولهای ترانسکانجوگانت حاصله در محیط کشت LB حاوی کانامایسین (۸۰ میکرو گرم در میلی لیتر) و استرپтомایسین (۶۰ میکرو گرم در میلی لیتر) کشت و انتخاب شدند. سلولهای آگروباکتریوم LBA4404 نوترکیب حاوی پلاسمید pBI-PC5 از نظر داشتن تراژن PVY-CP، مجدداً به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز و بررسی پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. جزئیات و مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و بررسی

محصول آن، مطابق مراحل شرح داده شده در بالا بود. محصول واکنش PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز و استخراج از آن، جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش PCR بطور جداگانه توسط آنزیمهای برشی *AviII*, *Bsm I*, *Hae III*, *Sfu I*, *Tru 9I* مورد برش قرار گرفته و طول قطعات حاصله از طریق الکتروفورز در ژل آگارز بررسی گردید. کلندی های اگروباکتریومی که حاوی ژن PVY-CP بودند، جهت ادامه کار انتخاب شدند.

#### ۴- انتقال ژن PVY-CP به گیاه *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

جهت انتقال ژن PVY-CP به گیاه *Nicotiana tabacum* cv. Samsun از روش قطعه برگی (leaf disk) استفاده شد (Horsch *et al.*, 1985). ابتدا بذور گیاهان توتون *N. tabacum* cv. Samsun پس از تیمار با محلول پنج درصد هیپوکلریت سدیم تجاری و شستشو در آب مقطر استریل، در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS تهیه شده به روش Gamboury & Shyluk (1981)، تحت شرایط نور ۱۴۰۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت روشنائی و دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتیگراد، کشت داده شد. به وسیله تیغ استریل از برگ این گیاهان (در شرایط استریل)، قطعاتی به ابعاد حدود  $1 \times 1$  سانتی‌متر تهیه شد. باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA 4404 حاوی پلاسمید pBI-PC5 به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت بدون آنتی بیوتیک رشد داده شده و بمدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه میانگیریز شد. رسوب سلولهای حاصله در حجمی معادل حجم اولیه از محیط کشت MS مایع (Torres, 1998) سوسپانسیون شدند. قطعات برگی بمدت ۲-۳ دقیقه در این سوسپانسیون باکتری قرار داده شده و سپس به محیط کشت M(I) که شامل نمکهای پایه میانی محیط MS به همراه  $27/85$  میلی‌گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $37/25$  میلی‌گرم  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $8$  میلی‌گرم Thiamine,  $27/85$  میلی‌گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $100$  میلی‌گرم Myo-inositol,  $4$  گرم باکتوآگار و  $20$  گرم سوکروز در هر لیتر با pH برابر  $5/7$  بود، منتقل و در ۲۸ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (Hashemi *et al.*, 1998). سپس قطعات برگی به محیط M(II) که شامل محیط M(I) باضافه آنتی بیوتیکهای کانامایسین به میزان  $100$  و کاربینسیلین به میزان  $400$  میکروگرم در میلی لیتر و تنظیم کننده های رشدی بنزیل آمینپورین به میزان یک میلی‌گرم و اسید نفتالین استیک به مقدار  $0/1$  میلی‌گرم در میلی لیتر بود، انتقال داده شدند (Hashemi *et al.*, 1998).

پتريهای حاوی قطعات برگی تا ظاهرشدن جوانه ها، در شرایط شدت نور ۱۴۵۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت روشنائی، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد و دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتيگراد نگهداری گردیدند. جوانه های تازه رشد کرده از قطعات برگ جدا شده و جهت ريشه دار شدن به محیط M(III) متنقل گردیدند. محیط M(II) شامل محیط M(III) ولی بدون تنظیم کننده رشدی بود. هر يك از لاین های گیاهان تاریخت، با نام TCP1 و TCP2 و ... مشخص شده و بروش قلمه ساقه حداقل به تعداد شش گیاه تکثیر گردید. از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun *N. tabacum* cv. Samsun گیاه تراژن و از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun تراژن با حامل pBin19 فاقد تراژن PVY-CP، عنوان شاهد تراژن فاقد ژن الحقی استفاده شد.

#### ۵- بررسی گیاهان تراژن

۱- بررسی وجود ژن PVY-CP در لاین های گیاهان تراژن با استفاده از روش PCR  
لاین های گیاهان تراژن، از نظر وجود ژن PVY-CP در ژنوم گیاه، با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا دی.ان.ای بافت برگ، با استفاده از کیت Plant DNA Isolation و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده کیت (Roche, Germany) استخراج گردیده و مراحل PCR و الکتروفورز همانند قبل در مورد آن انجام گرفت. به عنوان شاهد مثبت از پلاسمید pBI-PC5 استفاده گردید. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن واکنش PCR، قطعه ۸۰۰ جفت بازی حاصله از الکتروفورز، از ژل جدا و خالص سازی شده و بطور جداگانه بوسیله آنزیمهای بررشی *AviII*, *Bsm I*, *Hae III*, *Sfu I*, *Tru 9I* تیمار و در ژل آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردیده و باندهای حاصله مورد بررسی قرار گرفت (Sambrook *et al.*, 1989).

۲- بررسی وجود آر.ان.ای رونوشت برداری شده از ژن PVY-CP در لاین های گیاهان تراژن  
بمنظور بررسی بیان ژن PVY-CP در سطح آر.ان.ای، آر.ان.ای کل هر يك از گیاهان تراژن، استخراج و به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای استخراج آر.ان.ای کل گیاه، از کیت High Pure RNA Isolation (Roche, Germany) و طبق روش

پیشنهادی شرکت سازنده استفاده گردید. بمنظور حذف بقاوی‌ای دی.ان.ای از آر.ان.ای استخراجی از گیاهان، آموده بدست آمده با آنزیم RNase-free DNase (Roche, Germany) تیمار شد. واکنش RT-PCR در دو مرحله انجام گردید. برای ساختن رشته اول دی.ان.ای، ابتدا به هر یک از میکروتیوب‌های نیم میلی لیتری، ۵ تا  $10^{-10}$  میکروگرم (حدود دو میکرولیتر) از آر.ان.ای استخراجی، یک میکرولیتر از آغازگر Da2 و شش میکرولیتر از آب دو بار تقطیر تیمار شده با DEPC اضافه شده و میکروتیوبها پس از ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتیگراد، بلا فاصله به روی یخ انقال یافتند. سپس دو میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، دو میکرولیتر  $MgCl_2$  ۲۵ mM دو میکرولیتر ۰.۱ M DTT، دو میکرولیتر ۱۰mM dNTP mix و یک میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاژ برگردان (Gibco BRL-USA) Superscript II مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس بلا فاصله به روی یخ منتقل شدند. جهت حذف آر.ان.ای، یک میکرولیتر از آنزیم RNase H به هر میکروتیوب اضافه و بمدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اینکه رشته اول cDNA بروش فوق ساخته شد، جهت انجام مرحله دوم واکنش، به هر میکروتیوب چهار میکرولیتر از cDNA حاصله از واکنش اول، یک میکرو لیتر از هر یک از آغازگرهای Da1 و Da2، نیم میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase ( $0.5\text{uni}/\mu\text{l}$ )، پنج میکرولیتر از بافر ۱۰X PCR سه میکرولیتر از  $MgCl_2$  ۲۵ mM دNTP mix ۱۰mM و ۰.۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد. بعنوان شاهد و جهت کنترل عدم وجود دی.ان.ای در آر.ان.ای استخراجی، بخشی از این آر.ان.ای، بدون قرار گرفتن در مرحله اول (RT)، مستقیماً در واکنش دوم وارد شدند. پس از قرار دادن میکروتیوبها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorff, Germany)، واکنش زنجیره ای پلیمراز با برنامه پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد و سپس ۳۰ چرخه شامل یک دقیقه در ۵۰ درجه، دو دقیقه در ۷۲ درجه و یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد انجام گردید. پس از اتمام واکنش، بمنظور بررسی محصولات PCR همانند مراحل قبل الکتروفوروز در ژل آگارز انجام گردید.

۳-۵- بررسی بیان پروتئین از ژن PVY-CP در لاینهای گیاهان تراژن گیاهان تراژن از نظر بیان ژن PVY-CP در سطح پروتئین، با استفاده از دو روش TAS-ELISA و وسترن بلاط مورد بررسی قرار گرفتند.

#### ۱-۳-۵- روش (Triple Antibody Sandwich-ELISA) TAS-ELISA

برای این منظور، از IgG چندهمسانه ای (پلی کلتال) PVY و G تک همسانه ای (مونوکلتال) اختصاصی نژاد نکروتیک PVY (DSMZ آلمان)، طبق روش توصیف شده توسط De Avila *et al.*, (1990) استفاده شد. نتیجه واکنش بوسیله اندازه گیری میزان جذب نور توسط هر یک از چاهکها در طول موج ۴۰۵ نانومتر، با دستگاه Multiscan ELISA-reader (فلاند) سنجیده شد. بمنظور داشتن تخمینی از دقت آزمون، در هر بشقابک الایزا، سری غلطهای متواالی از سوسپانسیون خالص نژاد نکروتیک ویروس ۷ سیب زمینی به چاهکها اضافه گردیده و میزان جذب نور چاهک مربوط به هر غلط مشخص شد.

#### ۲-۳-۵- روش وسترن بلاط (Western-blot)

جهت استخراج پروتئین از روش الکتروفورز عمودی درژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد (Laemmli, 1970). ژل مورد استفاده از دو قسمت ژل پایینی یا جدا کننده (separating gel) با غلظت ۱۰ درصد و ژل فوقانی یا متراکم کننده (stacking gel)، با غلظت ۴ درصد تشکیل شده بود. بافر الکترود شامل ۳ گرم تریس، ۱۴/۴ گرم گلایسین و یک گرم SDS در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر، با pH برابر ۸/۳ بود. ۰/۰۰۲ میکرولیتر از آمده پروتئینی مربوط به هر لاین، با سه میکرولیتر بافر Loading ( محلول درصد بروموفنول بلو حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در آب مقطر) مخلوط و به هر چاهک B-galactosidase اضافه گردید. پروتئین های استاندارد مورد استفاده myosin (205 kDa) (116 kDa), egg albumin (45 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), phosphorylase B (97 kDa), kDa) و carbonic anhydrase (29 kDa) بودند. از آمده های پروتئینی حداقل دو تکرار در دو نیمه ژل

قرارداده شد، بنحوی که هر نیمه ژل تکرار نیمه دیگر آن باشد. الکتروفوروز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت و شدت جریان متغیر به مدت چهار ساعت انجام گردید. ژل از صفحات شیشه جدا و دو نیمة آن از هم بریده شد. یک نیمه آن به روش Weber and Osborn (1969) و با محلول ۱٪ درصد کوماسی بلو در محلول متانول - آب - اسیداستیک به ترتیب با نسبت ۱:۵:۵ به مدت یک شب رنگ آمیزی شد. برای محاسبه وزن مولکولی، فاصله باندهای پروتئینی از کف چاهک مزبور تعیین و خط رگرسیون بین لگاریتم وزن مولکولی پروتئینهای استاندارد و میزان حرکت آنها ترسیم شد. نیم دیگر ژل به منظور بررسی وجود باندهای مربوط به پروتئین پوششی ویروس، درآزمون western-blot مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون با استفاده از دستگاه Gel-Eluter Hoefer ساخت شرکت Hoefer و به روش پیشنهادی شرکت سازنده (electro-blot) (Hoefer Scientific Instruments, USA) انجام گردید.

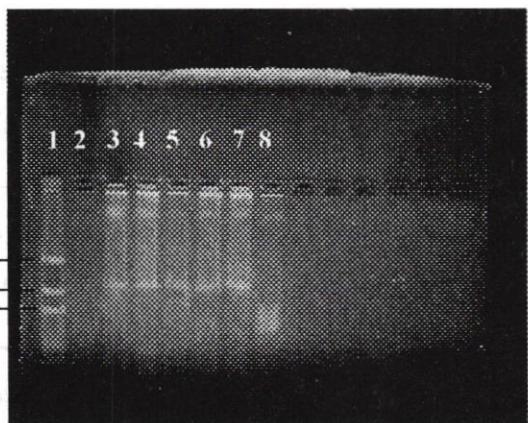
۴-۵- تعیین تعداد کانونهای ژن العاقفی در هر یک از لاین‌های ترازن در ناحیه T-DNA مربوط به حامل pBI-PC5 و ژن PVY-CP بسیار نزدیک به ژن نومایسین فسفوترانسферاز II (NPT II) قرار گرفته و این دو ژن به یکدیگر پیوسته (linked) می‌باشند. از این‌رو توارث این دو ژن از یک الگو پیروی می‌کند. بر این اساس به منظور تعیین تعداد مکان‌های ژنی NPT II در هر یک از لاین‌های ترازن حاصله، بذور نسل اول تهیه شده و ۳۰۰ عدد از آن‌ها در تشکهای حاوی محیط کشت هوگلندر آگاردار، حاوی ۱۵۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک کانامایسین در هر میلی‌لیتر کشت گردید (Sudarsono *et al.*, 1995). چهار هفته بعد از جوانه‌زنی بذور، فنوتیپ گیاهچه‌های جوان حاصله از نظر زرد یا سبز شدن (به ترتیب معادل حساسیت و مقاومت به کانامایسین) مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از محاسبه نسبت تفکیک دو صفت مقاومت یا حساسیت به کانامایسین، تعداد مکان‌های ژنی NPT II فعال موجود در هر یک از لاین‌های ترازن تخمین زده شد.

## نتیجه و بحث

### ۱- همسانه سازی ژن PVY-CP در حاملین pCaMV و pBin19

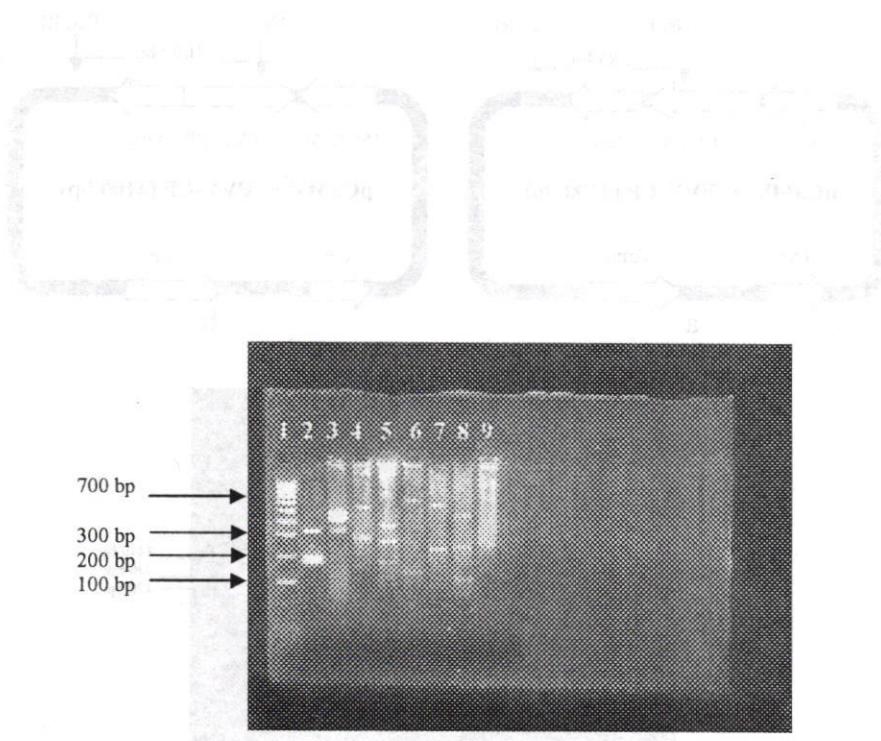
در این بررسی، به منظور همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ویروس Y سبب زمینی از روش PCR استفاده گردید. پس از انجام واکنش PCR یک باند با اندازه تقریبی ۸۰۰ جفت باز در ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۳)، که با اندازه قطعه ژن PVY-CP مطابقت داشت. نتایج حاصله از هضم آنزیمی این قطعه با آنزیم‌های برشی *Tru 9I*, *Sfu I*, *Hae III*, *Bsm I*, *Avi II* در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد. بر اساس این نتایج، آنزیم *Avi II* موجب تولید دو قطعه بطول حدود ۵۲۰ و ۲۸۰ جفت باز، آنزیم *Bsm I* موجب تولید سه قطعه بطول حدود ۱۷۰، ۲۸۰ و ۳۷۰ جفت باز، آنزیم *Hae III* موجب تولید دو قطعه به طول حدود ۱۳۰ و ۶۶۰ جفت باز، آنزیم *Sfu I* موجب تولید دو قطعه به طول حدود ۲۴۰ و ۵۶۰ جفت باز و آنزیم *Tru 9I* موجب تولید سه قطعه به طول حدود ۱۰۰، ۲۴۰ و ۴۵۰ جفت باز گردید. این حالت با ترادف‌های گزارش شده در مورد ژن پروتئین پوششی نزاد نکروتیک PVY مطابقت دارد (Robaglia *et al.*, 1989).

پلاسمید pCaMV نوترکیب که ژن PVY-CP در آن بطور کامل و در جهت صحیح<sup>۵</sup> به<sup>۳</sup> الحاق شده بود (پلاسمیدهای pPC5)، پس از برش با دو آنزیم برشی *Eco RI* و *Nsi I* تولید قطعات حدود ۳۰۰ و ۳۸۰۰ جفت بازی (ستونهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۱ و ۱۲ در شکل ۵) نموده و کلندی‌هایی که این ژن در جهت معکوس (۳ به ۵) به پلاسمید pCaMV آنها اتصال یافته بود، تولید قطعات حدود ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی (ستونهای ۳ و ۵ در شکل ۵) نمودند. کلندی شماره ۵ (ستون ۶، شکل ۵) برای ادامه کارها انتخاب گردید. به منظور اطمینان از حضور ژن PVY-CP در سلول‌های اگروباکتریوم نوترکیب LBA 4404 حاوی پلاسمید-*pBI*-*PC5* از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. نتیجه این واکنش در شکل ۶ مشاهده می‌شود. محصول این واکنش، یک قطعه دی.ان.ای بطول حدود ۸۰۰ جفت باز بود که بررسی‌های تکمیلی بعمل آمده با استفاده از آنزیم‌های برشی *Tru 9I*, *Sfu I*, *Hae III*, *Bsm I*, *Avi II* به روی آن، تایید کننده مطابقت آن با ژن PVY-CP بود. کلندی شماره AG-PVY-14 که دارای ژن PVY-CP بود، جهت ترازن نمودن بافت گیاهی انتخاب گردید.



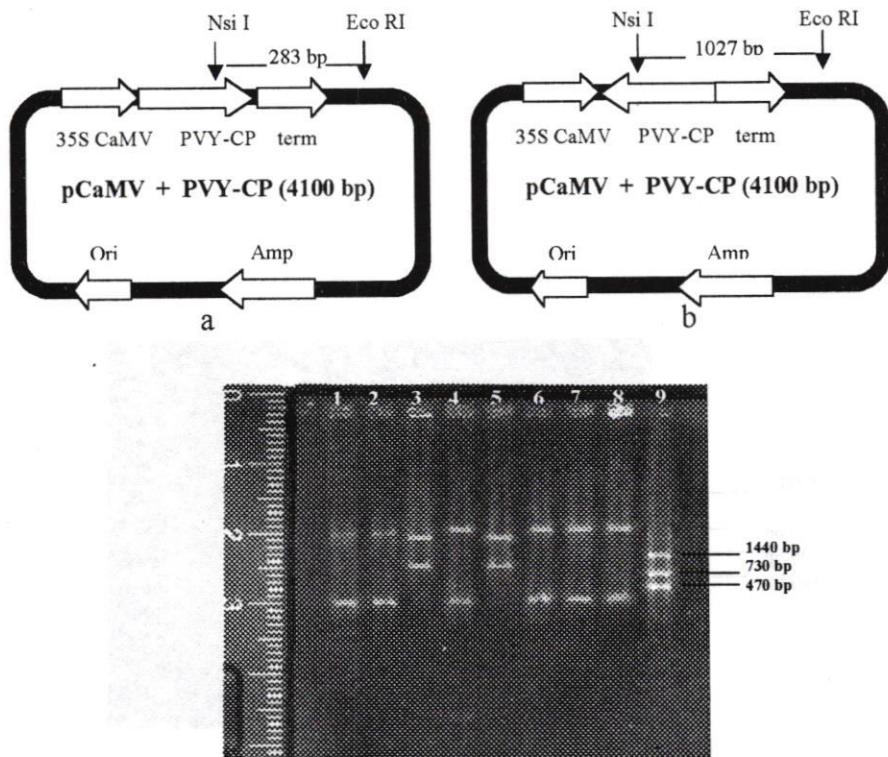
شکل ۳: نتایج حاصله از الکتروفورز نمونه های مربوط به واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در ژل آگاروز. پس از انجام واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ژن PVY-CP. ستون ۱: مارکر وزن ملکولی شامل پلاسمید pUC18 برش یافته توسط آنزیم برشی *Taq* که تولید قطعات ۱۴۴۴، ۷۳۶ و ۴۷۶ bp جفت نوکلوتیدی نموده است . ستونهای ۳ تا ۷ : قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی مربوط به ژن - PVY- CP که بكمك واکنش PCR تکثیر یافته است. ستون ۸: شاهد منفی (فاقد DNA الگو)

Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of PVY-CP amplification. Column 1: Molecular weight marker contains pUC18 digested with *TaqI*, which produced 1444, 736, 476, 30 bp fragments. Columns 3-7 : Amplified 800bp fragment of PVY-CP region. Column 8: Negative control (without template DNA)



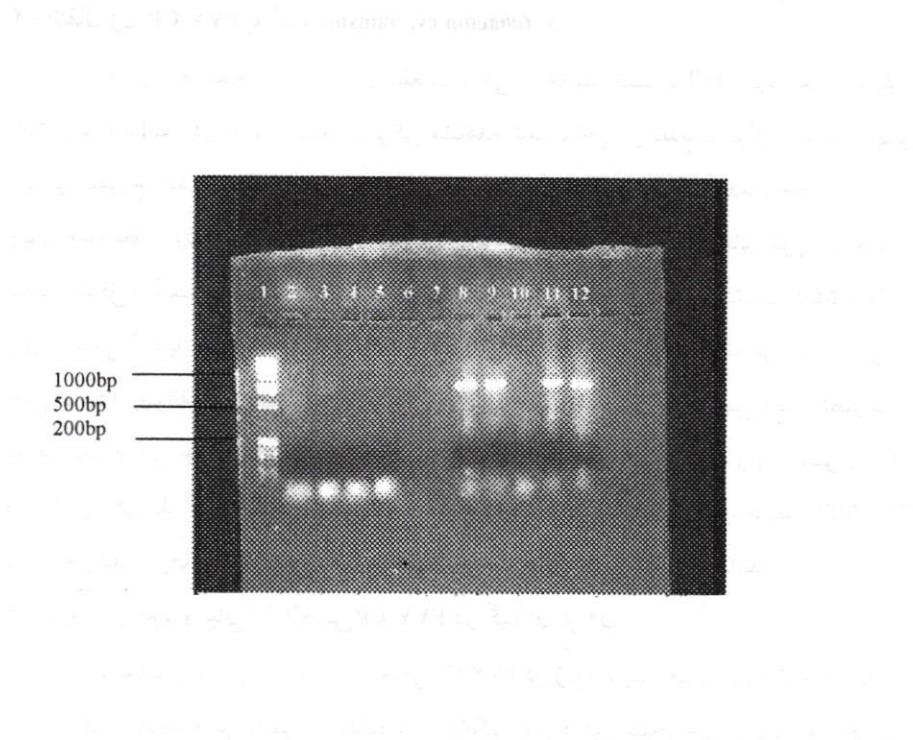
شکل ۴ : نتایج حاصله از هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با آنزیمهای برشی Avi II, BsmI, Hae III, Sfu I, Tru 9I. ستون های ۱ : مارکر وزن ملکولی ، ۴ : برش با AviII منجر به تولید دو قطعه ۲۸۰ و ۵۲۰ جفت نوکلئوتیدی، ۵: برش با Bsm I موجب تولید سه قطعه ۱۷۰ ، ۲۸۰ و ۳۷۰ : جفت نوکلئوتیدی، ۶ : برش با Hea III منجر به تولید دو قطعه ۱۳۰ و ۶۶۰ جفت نوکلئوتیدی، ۷ : برش با SfuI موجب تولید دو قطعه ۲۴۰ و ۵۶۰ جفت بازی و ۸: برش با 9I Tru موجب تولید سه قطعه ۱۰۰ ، ۲۴۰ و ۴۵۰ جفت بازی گردید.

Fig 4. Restriction map of PCR product (PVY-CP). Digestion by Avi II, Bsm I, Hea III, Sfu I, Tru 9I. 1 : Molecular weight marker, 4: Digestion with Avi II produced 280 and 520 bp bands, 5 : Digestion with BsmI Produced 170, 280 and 370 bp, 6: Digestion with HeaIII produced 130 and 660 bp, 7: Digestion with Sfu I produced 240 and 560 bp and 8 : Digestion with Tru 9I produced 100, 240 and 450 bp fragments.



شکل ۵ : نقشه تحدید دو کاست بیانی الحاق شده با پلاسمید PVY-CP در PVY-CP (a : pCaMV در جهت صحیح (Direct) ۵ به ۳) (b) الحاق ژن PVY-CP در جهت ۳ به ۵ (c) نتایج حاصله از الکتروفورز ژل آگارز مربوط به بررسی صحیح بودن وضعیت الحاق قطعه ژن PVY-CP به پلاسمید pCaMV ستونهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۸: پلاسمیدهای نوترکیب pCaMV حاوی قطعه الحاق ژن PVY-CP که پس از برش با آنزیمهای برشی EcoRI و NsiI تولید قطعات ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت نوکلئوتیدی نموده و وضعیت الحاقی ژن PVY-CP در این پلاسمیدها در جهت غیر صحیح ۳ به ۵ میباشد. ستون ۹: مارکر وزن ملکولی شامل پلاسمید pCU18 برش یافته توسط آنزیم برشی Tap که تولید قطعات ۱۴۴۴، ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت بازی نموده است.

Fig 5. Restriction map of two insertion patterns of PVY-CP to pCaMV. (a) Insertion is in direct position (5 to 3), (b) : Insertion is indirect (3 to 5), (c) Restriction analysis of direct or indirect insertions of PVY-CP in pCaMV; Columns 1, 2, 4, 6, 7, 8, 11, 12: Recombinant pCaMVs which after digestion with EcoRI and NsiI produced 200 and 3800 bp fragments (insertion is in direct position); Columns 3 and 5 : recombinant pCaMVs which after digestion with EcoRI and NsiI produced 1000 and 3000 bp fragments (insertion is in indirect position); Column 9 : Molecular weight marker contains pUC18 digested with TaqI, which produced 1444, 736 and 476 bp fragments



شکل ۶- نتیجه حاصله از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز روی پلاسمیدهای pBI-PC5 استخراجی از کلندی های نوترکیب آگروباکتریوم، بمنظور تایید وجود قطعه الحاقی PVY- CP در آنها. ستونهای : ۱: مارکر وزن ملکولی ، ۲ تا ۵ : شاهد منقی شامل حامل pBIN19 فاقد قطعه الحاقی. ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲: پلاسمیدهای pBI-PC5 استخراجی از کلندی های نوترکیب آگروباکتریوم و حاوی قطعه الحاقی PVY-CP که تولید محصول ۸۰۰ جفت بازی را نموده است.

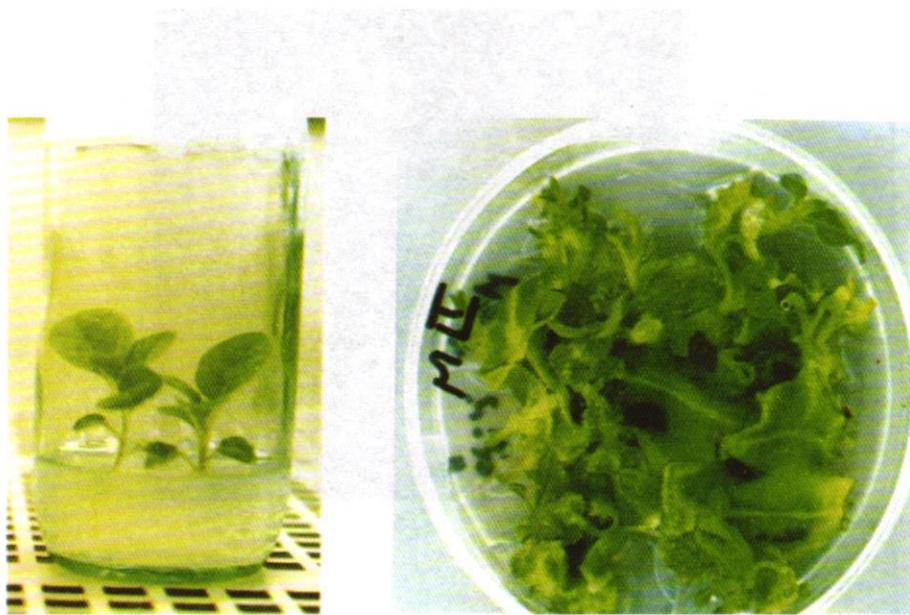
Fig 6. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products of pBI-PC5 for confirmation of PVY-CP insertion to it. Lanes: 1: DNA marker, 2-5 : Negative control (pBIN19 without insertion) 8, 9, 11, 12: Four pBI-PC5 which extracted from recombinant Agrobacterium colonies and produced 800 bp products.

## ۲- انتقال ژن PVY-CP به گیاه *N. tabacum* cv. Samsun

حدود دو هفته پس از انتقال قطعات برگی به محیط کشت MIII توده های سفید بافت پینه (callus) در حاشیه قطعات برگی مشاهده شد. نواحی از قطعات برگی که سلولهای آنها ترانسفورم نشده بودند، از حاشیه شروع به زرد شدن نموده و خشک شدند. حدود سه تا چهار هفته بعد، روی توده های بافت پینه در حاشیه قطعات برگی، جوانه های کوچکی ظاهر شدند (شکل ۷، الف). در انتخاب و برش جوانه ها جهت انتقال به محیط کشت MIII (ریشه زایی)، سعی گردید تا از جوانه های رشد نموده از یک نقطه، فقط یک جوانه انتخاب شود و حتی الامکان جوانه های انتخابی از یکدیگر دارای فاصله باشند. بر این اساس قابل انتظار بود که هر یک از این جوانه ها، حاصل یک پدیده مستقل ترانسفورماتیون بوده و به عنوان یک لاین تراژن در نظر گرفته شود (شکل ۷، ب). از حدود ۴۰ لاین انتقالی به محیط (MIII)، ۳۱ لاین که رشد و وضعیت مناسبی داشتند، جهت بررسی های بعدی انتخاب شدند.

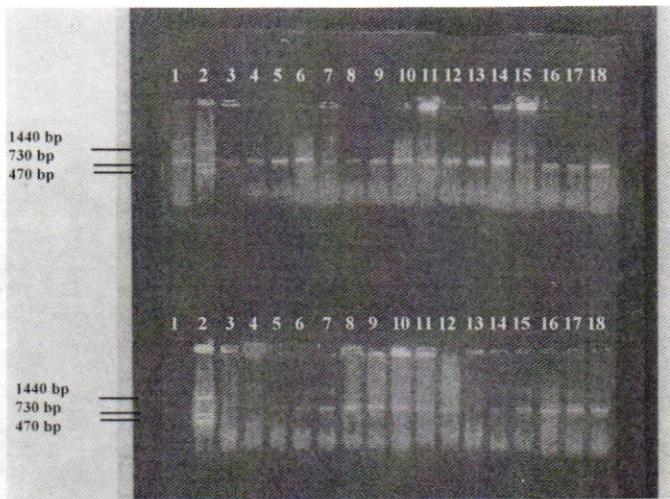
## ۳- بررسی وجود و بیان ژن الحاقی PVY-CP در گیاهان تراژن

به منظور بررسی وجود ژن الحاقی PVY-CP در ژنوم لاین های تراژن حاصله، از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد. میانگین دی.ان.ای استخراجی از لاین ها، حدود ۴۸ میکروگرم به ازای هر گرم بافت برگی تازه بود. حدود ۰/۶ میکروگرم از دی.ان.ای استخراجی از هر لاین و گیاه شاهد، جهت واکنش زنجیره ای پلیمراز بکار رفت. نتایج حاصله از آزمون PCR بر روی دی.ان.ای استخراج شده از گیاهان تراژن در شکل ۸ مشاهده میگردد. از ۳۱ لاین تراژن مورد بررسی، به غیر از دو لاین TCP-11 و TCP-18، در بقیه لاین ها و نیز در شاهد مثبت، باندی به اندازه تقریبی ۸۰۰ جفت باز مشاهده گردید که نشان دهنده وجود ژن PVY-CP در ژنوم این گیاهان بود. در ستون های مربوط به دی.ان.ای استخراجی از شاهد غیرتراژن (با علامت اختصاری WT) و شاهد تراژن با حامل pBin19 فاقد ژن الحاقی (با علامت اختصاری TCP)، هیچ باندی مشاهده نشد. هضم آنزیمی قطعه ۸۰۰ جفت بازی به وسیله آنزیم های برشی *Sfu I*, *Hae III*, *Bsm I*, *Avi II* و *Tru 9I* نشان دهنده مطابقت این قطعه با ترادف ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک ویروس ۷ سیب زمینی بود.



شکل -7 (I) جوانه های کوچک ظاهر شده در حاشیه قطعات برگی. (II) گیاهچه های تراریخت ریشه دار شده در محیط ریشه زایی

Fig 7. (I) Emerging of young shoots around the leaf disks. (II) Rooted transformed plants in rooting medium



شکل ۸: الکتروفورز محصولات آزمون PCR بر روی DNA استخراجی از ۳۱ لاین گیاه تراژن. ردیف بالا، ستونهای ۱: شاهد مثبت، ۲: مارکر وزن ملکولی، ۳ الی ۸۱: لاینهای تراژن برتریت شماره ۱۰، ۱۴، ۱۲، ۲۱، ۴، ۱۵، ۲۶، ۱۳، ۱۲، ۲۷، ۳۰، ۲۴، ۳۰، ۲۲، ۲۴، ۷، ۳۱ و ۲۶.

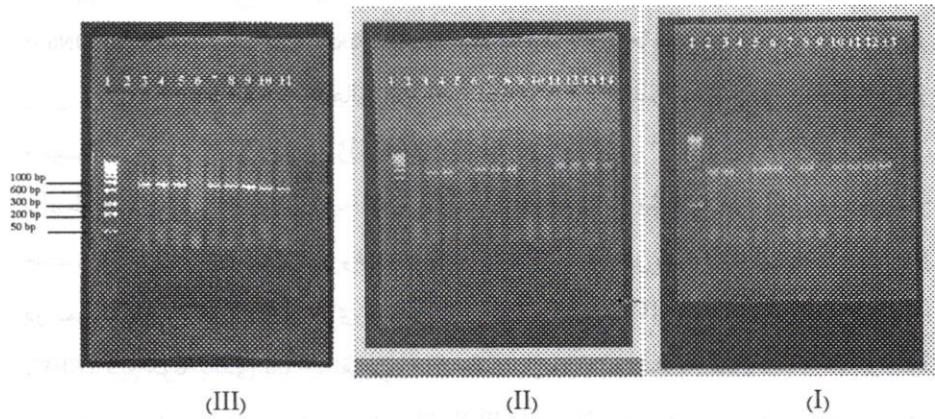
ردیف پایین، ستونهای ۱: خالی، ۲: مارکر وزن ملکولی، ۳: شاهد منفی (شامل گیاه تراژن با pBIN19 فاقد ژن الحقیقی)، ۴ و ۱۳: برتریت لاینهای ۱۱ و ۱۸ که تولید هیچ باندی نکرده اند، ۵ تا ۱۲ و ۱۴ تا ۱۸: برتریت مربوط به لاینهای تراژن شماره های ۱۹، ۲۸، ۹، ۳، ۲۳، ۱۷، ۲۸، ۱۹، ۲۰، ۸، ۱، ۲۳، ۳، ۹، ۲۸، ۱۹، ۲۰، ۵، ۲۹، ۵، ۲۹، ۱۶ و ۲۵ و ۲۵.

Fig 8. Electrophoresis of PCR products of extracted DNA from 31 transgenic lines. Up: Lanes 1: Positive control, 2: DNA marker, 3-18: Transgenic lines No. 10, 14, 6, 21, 2, 15, 4, 12, 13, 27, 30, 24, 22, 7, 31 and 26 respectively. Down: Lanes 1: Empty 2: DNA marker, 3: Negative control , 4 & 13: Transgenic lines No. 11 and 18, 5-12 and 14-18: Transgenic lines No. 19, 28, 9, 3, 17, 23, 1, 8, 20, 5, 29, 16 and 25 respectively.

متوسط میزان آر.ان.ای کلی استخراجی از بافت گیاه با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation (شرکت Roche، آلمان)، حدود ۲۵ میکروگرم به ازای هر  $0/3$  گرم بافت برگی بود. جهت حذف هرنوع بقایای احتمالی دی.ان.ای در نمونه‌های آر.ان.ای استخراجی، از آنریم RNase-free DNase (شرکت Roche، آلمان) استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون RT-PCR بر روی آر.ان.ای استخراجی از گیاهان تراژن در شکل ۹ ارائه شده است. پس از الکتروفوروز محصولات واکنش RT-PCR در ژل آگارز، به غیر از دو لاین TCP11 و TCP18، در ستون مربوط به سایر لاین‌ها یک باند به اندازه تقریبی  $800$  جفت باز مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور مولکول‌های آر.ان.ای رونوشت برداری شده از ژن الحاقی PVY-CP در این لاین‌ها بود. در نمونه‌های مربوط به لاین‌های شماره TCP $3$ ، TCP $11$ ، TCP $14$ ، TCP $18$ ، TCP $19$ ، TCP $26$  هیچگونه باندی باندازه تقریبی  $800$  جفت باز مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم وجود آر.ان.ای رونوشت برداری شده از تراژن PVY-CP در این لاین‌ها بود. در ستون مربوط به شاهد عدم آلدگی به دی.ان.ای نیز هیچگونه باندی با اندازه  $800$  جفت باز مشاهده نشد که نشان‌می‌دهد نمونه‌های آر.ان.ای استخراجی هیچگونه آلدگی به دی.ان.ای گیاهی نداشته‌اند. لاین‌های گیاهان تراژن، از نظر تولید و حضور پروتئین PVY-CP در آنها، با استفاده از روش سرولوژیک TAS-ELISA و وسترن بلاط مورد بررسی قرارگرفتند. بر اساس نتایج حاصله، واکنش مثبتی دال بر تولید و وجود پروتئین پوششی PVY در این لاین‌ها مشاهده نگردید. دقت تشخیصی روش TAS-ELISA و وسترن بلاط بکاررفته در این بررسی به ترتیب برابر با حدود  $20$  و یک نانوگرم ویروس خالص در هر  $100$  میکرولیتر عصاره گیاهی بود.

نتایج حاصله از تعیین تعداد مکان‌های ژنی II NPT که معادل مکان‌های ژنی PVY-CP بود، در جدول یک ارائه شده است. لاین TCP3 دارای  $4$  کانون ژنی، لاین‌های TCP14 و TCP22 دارای  $3$  کانون ژنی، لاین‌های TCP4، TCP6، TCP7، TCP10، TCP26، TCP29 و TCP30 دارای دو کانون ژنی و بقیه لاین‌ها دارای یک کانون ژنی بودند. دو لاین TCP11 و TCP18 فاقد تراژن بودند.

برای این ارزشیابی، آزمون RT-PCR بر روی RNA استخراجی از ۳۱ لاین گیاه تراژن اجرا شد.



شکل ۹- الکتروفورز محصولات آزمون RT-PCR بر روی RNA استخراجی از ۳۱ لاین گیاه تراژن

(I)ستونهای ۱ : مارکر وزن ملکولی، ۲ تا ۶ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵

۷ : شاهد منفی، ۸ تا ۱۲ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۶ تا ۱۰ ، ۱۳ : شاهد مثبت

(II)ستونهای ۱ : مارکر وزن ملکولی، ۲،۱۳ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۱۱ تا ۲۲

۱۴ : شاهد مثبت.

(III)ستونهای ۱ : مارکر وزن ملکولی ، ۲ : خالی، ۱۱-۳ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۲۳ تا ۳۱

Fig 9. Electrophoresis of RT-PCR products which amplified from the RNA extractions of 31 transformed lines.

(I): Lines (1): Molecular weight marker, (2 to 6) : Transgenic lines Nos. 1, 2, 3, 4, 5 respectively. (7) : Negative control, (8 to 12) : Transgenic lines Nos. 6 to 10, (13) : Positive control.

(II): Lines (1) : Molecular weight marker, (2 to 13): Transgenic lines Nos. 11 to 22, (14): Positive control.

(III): Lines (1): Molecular weight marker, (2): Empty, (3 to 11): Transgenic lines Nos. 23 to 31.

نتایج حاصله از تاثیر آنزیمهای برشی *Tru 9I* و *Sfu I*، *Hae III*، *Bsm I*، *Avi II* و *RVY-CP* همسانه سازی شده، با ترادف تعیین شده در مورد سویه نکروتیک PVY مطابقت داشت (Robaglia *et al.*, 1989). در این تحقیق گیاهان توتون رقم Samsun بوسیله ژن PVY-CP در ۲۹ لاین از ۳۱ لاین توتون مقاوم به کانامایسین مورد تایید قرار گرفت. دو لاین TCP18 و ژن الحاقی PVY-CP بوده و رشد آنها در محیط کشت آنتی بیوتیک احتمالاً نوعی فرار از آنتی بیوتیک بوده است.

جهت بررسی تولید رونوشت‌های آر.ان.ای از تراژن PVY-CP آر.ان.ای کل گیاه استخراج و از طریق آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که تعداد ۲۳ لاین از ۲۹ لاین دارای تراژن PVY-CP، دارای آر.ان.ای رونوشت برداری شده از ژن PVY-CP بودند، در حالیکه در ۵ لاین دیگر وجود رونوشت آر.ان.ای مربوط به ژن PVY-CP قابل تشخیص نبود. این احتمال وجود دارد که در این لاینهای ژن الحاقی پس از انتقال به گیاه، خاموش شده باشد. مطالعات متعددی در زمینه عوامل موثر در خاموش شدن ژنهای الحاقی در گیاهان تراژن انجام شده است (Matzke *et al.*, 1997، Matzke *et al.*, 1989). خاموشی ژن الحاقی در دو حالت رونوشت برداری (transcriptional) و پس از رونوشت برداری (-post-) (Matzke and Matzke, 1995، Matzke *et al.*, 1989) می‌تواند رخ دهد. بر این اساس، در گیاهان تراژن با یک ژن الحاقی معین، سطوح متفاوتی از بیان ژن در سطح آر.ان.ای و پروتئین مشاهده می‌گردد. مکانیسم‌های متعددی در بروز خاموشی ژن الحاقی دخالت دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به متیله شدن، تغییرات ساختمان کروماتین (تشکیل هتروکروماتین)، تعدد نسخه‌های ژن الحاقی به ژنوم و محل الحاق ژن در ژنوم گیاه اشاره نمود (Meyer, 1995). آنچه در این مکانیسم‌ها مهم است، تداخل عمل DNA-DNA با RNA-RNA یا RNA-DNA می‌باشد. مشخص شده که گیاهان قادر به شناسائی دی.ان.ای خارجی بوده و می‌توانند آنرا متیله نمایند (Bestor and Coxon 1993). گرچه مکانیزم دقیق این شناسائی معلوم نیست ولی احتمال دارد یکی از معیارهای شناسائی، تفاوت موجود در ترکیب (مثلاً درصد GC) دی.ان.ای خارجی باشد. مشخص شده است که در برخی موارد، ممکن است بیش از یک

نسخه از تراژن در ژنوم گیاه الحق گردد. در این حالت احتمال تشکیل جفت‌های دی.ان.ای-دی.ان.ای بین نسخه‌های تکراری افزایش یافته و جفت‌های تشکیل شده بعنوان یک علامت (signal) جهت مตیله شدن ترادف‌های تکراری عمل می‌نمایند (Assad *et al.*, 1993). متیله شدن از عوامل مهم خاموشی ژن هم در مرحله رونوشت برداری و هم در مرحله پس از رونوشت برداری می‌باشد (Meyer, 1995). در خاموشی در مرحله رونوشت برداری، متیله شدن در ناحیه پیش‌بر تراژن و در خاموشی در مرحله پس از رونوشت برداری، متیله شدن در ناحیه ترادف رمز کننده آن رخ می‌دهد (Ingelbrecht *et al.*, 1994; Matzke *et al.*, 1989).

به منظور بررسی بیان تراژن PVY-CP در سطح پروتئین، از آزمون‌های TAS-ELISA و وسترن‌بلاط به کمک آنتی‌بادی تک همسانه‌ای استفاده شد. با توجه به اینکه تراژن PVY-CP بکار رفته در این بررسی فاقد رمز شروع بود، همانگونه که انتظار می‌رفت، در هیچیک از لاین‌های تراژن وجود پروتئین پوششی PVY قابل تشخیص نبود. بر اساس نتایج حاصله از شاهدها، دقیق آزمون‌های وسترن‌بلاط و TAS-ELISA در تشخیص پروتئین پوششی ویروس ۷ سیب زمینی بترتیب در حدود ۱ و ۲۰ نانوگرم ویروس خالص در هر ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی بود.

اطلاع از نحوه بیان ژنهای الحقی در گیاهان تراژن، به درک بیشتر مکانیسم(های) احتمالی دخیل در بروز مقاومت در آنها کمک نموده و در نهایت می‌تواند موجب تسهیل در دستیابی به گیاهان تراژن با سطوح مطلوب مقاومت گردد.

### سپاسگزاری:

این مقاله قسمتی از پایان نامه دوره دکتری نویسنده اول می‌باشد. بخش اعظم هزینه‌های این تحقیق توسط سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی در قالب بورس تحصیلی برای نویسنده اول، تأمین شده است که بدینوسیله از مسئولین این سازمان تشکر می‌گردد. از پرسنل بخش تحقیقات بیوتکنولوژی و بخش تحقیقات بیولوژی مولکولی انسیتوپاستور ایران، بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تهران-اوین

و دفتر ارز سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی نهایت تشکر بعمل می آید. همچنین از زحمات آقای دکتر بهار در مطالعه متن مقاله و ارائه اصلاحات تشکر میگردد.

---

نشانی نگارندگان: دکتر رضا پورحیم، بخش تحقیقات ویروس های گیاهی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، اوین- تهران. دکتر علی آهون‌منش، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان. دکتر هاله هاشمی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران. دکتر سیروس زینلی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، موسسه پاستور ایران، تهران.