

نقش آنزیم های ضد اکسیداتیو توتون در مقاومت گیاه در برابر آلودگی سیستمیک ویروس Y سیب زمینی (PVY)

فرشاد رخشنده رو^{۱*}، بهروز شاهسون بهبودی^۲، حمیدرضا زمانی زاده^۱

^۱ گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات - آدرس الکترونیکی: rakshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

(دریافت: ۸۷/۷/۷؛ پذیرش: ۸۸/۱/۳۱)

چکیده

آنزیم های RNA پلیمرز وابسته به RNA سلول (RDRs) [RNA Dependent RNA Polymerase] از عناصر اصلی تشکیل دهنده چرخه خاموشی ژن پس از رونویسی در سلول یوکاریوت ها محسوب می شوند. نتایج پژوهش های گذشته نشان داده است که اسید سالیسیلیک با افزایش بیان ژن RDR1 موجب ایجاد مقاومت در برابر آلودگی های ویروسی در گیاهان از طریق تحریک فرایند خاموشی ژن می شود. در این بررسی جهت مطالعه نقش ژن RDR1 در مقاومت در برابر آلودگی سیستمیک ویروس Y سیب زمینی (PVY) از لاین های توتون تراریخت (*N. tabacum* cv Samsun NN) استفاده شد که بیان ژن RDR1 در آن ها با استفاده از فرایند خاموشی ژن با درجات متفاوتی در مقایسه با توتون تیپ وحشی کاهش داده شده بود. برای پی بردن به اثر کاهش بیان ژن RDR1 در میزان حساسیت لاین های توتون مورد بررسی میزان تغییرات کمی و کیفی آنزیم های دخیل در مقاومت گیاهان در برابر بیمارگرها شامل پراکسیداز (POX) و نیز پلی فنل اکسیداز (PPO) به صورت کمی و کیفی مورد سنجش قرار گرفت. میزان بیان ژن های RDR1 و نیز پروتئین پوششی ویروس PVY⁰ در لاین های تراریخت با استفاده از آزمون Semi-quantitative RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد با کاهش میزان بیان ژن RDR1 غلظت پروتئین پوششی ویروس PVY در لاین های تراریخت افزایش می یابد. محتوی درون بافتی آنزیم PPO در توتون تیپ غیر تراریخت در مقایسه با لاین های توتون تراریخت با بیان کم ژن RDR1 تا یک ماه پس از تلقیح با ویروس افزایش نشان داد. همزمان با افزایش حساسیت در لاین های توتون افزایش در فعالیت اختصاصی آنزیم POX نیز مشاهده شد. نتایج این بررسی علاوه بر اثبات نقش ژن RDR1 گیاه توتون در مقاومت به آلودگی سیستمیک ویروس PVY⁰ تغییرات آنزیمی مرتبط با دفاع گیاه توتون در هنگام بروز یک آلودگی سیستمیک ویروسی را نیز نشان می دهد.

واژه های کلیدی: خاموشی ژن، آنزیم های ضد اکسیداتیو، حساسیت، RDR1، ویروس Y سیب زمینی.

مقدمه

موجود در میزبان مشابه باشند می توانند موجب تحریک فرایند خاموشی ژن پس از نسخه برداری (PTGS) در سیتوپلاسم سلول های جانداران یوکاریوت شوند (Fire et al. 1998; Baulcomb 2004). نقش آنزیم های تکثیر کننده mRNA های درون سلولی (RNA Dependent RNA Polymerase) که به صورت خلاصه RDR نوشته می شود در تکثیر ژنوم ویروس های گیاهی سال ها پیش شناخته شد (Astier-Manificier & Cornuet 1971). اکنون مشخص شده است که آنزیم های RDR به تعداد ۶ عدد در گیاهان وجود دارند و وظیفه تکثیر mRNA سیتوپلاسمی را در سلول بر عهده دارند (Wassenegger & Karczal 2006). آنزیم (RDR1) با تقویت سیگنال خاموشی از طریق تکثیر RNA دو رشته ای هدف در مکانیسم خاموشی ژن نقش مهمی را بر عهده دارد (Lyer et al. 2003). نتایج

خاموشی ژن (Gene Silencing) فرایندی است که یوکاریوت ها از آن به منظور تنظیم بیان ژن های خود در جهت تمایز، رشد و نمو و نیز حذف اثرات منفی ژن های پارازیت خارجی استفاده می نمایند (Wassenegger & Karczal 2006). خاموشی ژن می تواند در دو سطح اتفاق بیافتد. ۱- در سطح نسخه برداری در هسته سلول (TGS) [Transcriptional gene silencing] و ۲- پس از نسخه برداری در سیتوپلاسم (PTGS) [Post transcriptional gene silencing] (Makarova et al. 2006). تمام فرم های طبیعی RNA دو رشته ای (dsRNA) شامل ترانسپوزان ها، mRNA های کوچک دارای توالی های تکراری معکوس حاصل از بیان قطعات DNA تراریخت در گیاهان و نیز ژنوم ویروس ها که در قسمتی از توالی ژنومی خود با یکی از ژن های

نسبتاً کم ژن RDR1) در مقایسه با توتون غیر تراریخت (*N. tabacum* cv Samsun NN) استفاده شد. لازم به ذکر می باشد توتون های تراریخت مورد بررسی در این تحقیق قبلاً توسط دکتر Takeshita عضو هیئت علمی دانشگاه Kyushu ژاپن در قالب پروژه فوق دکتری ایشان در مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند طراحی و ساخته شده بودند. توتون های تراریخت مورد بررسی از این ویژگی برخوردار بودند که همگی مربوط به نسل سوم (T3) توتون سامسون بودند و برای خاموش نمودن ژن RDR1 در آن ها پلاسمید بیان کننده ژن RDR1 توتون (*N. tabacum* cv Xanthi) به درون سیتوپلاسم سلول آن ها وارد شده بود. پلاسمید های مذکور پس از بیان شدن در سلول، RNA دو رشته ای مربوط به ژن RDR1 را تولید می نمودند. حضور فرم RNA دو رشته ای با توالی مشابه با ژن RDR1 سلول تراریخت شده موجب شده بود تا سیگنال خاموشی در سلول ارسال گردد و ژن RDR1 سلول های توتون تراریخت شده مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و خرد شود. لاین های با بیان بسیار کم ژن RDR1 دارای تعداد کمی های زیاد پلاسمید و لاین های با بیان نسبتاً کم ژن RDR1 دارای تعداد کم از کپی های پلاسمید بیان شونده در درون سلول های خود بودند.

ب) *Semi-Quantitative RT-PCR*: از تکنیک Sq-RT-PCR مطابق روش (Marone et al. 2001) جهت بررسی میزان بیان ژن RDR1 و نیز ژن مربوط به پروتئین پوششی (CP) ویروس PVY⁰ استفاده شد. جهت بررسی میزان بیان ژن RDR1 در این آزمون از ژن کنترل درونی (β -tubulin) استفاده شد. هدف از انجام این آزمون اطمینان از کیفیت لاین های مورد ارزیابی در بیان ژن RDR1 در مقایسه با شاهد و نیز بررسی غلظت ویروس در لاین های مورد نظر بود. آزمون های مولکولی در ۴ تکرار انجام شدند. برای انجام آزمون RNA Sq-RT-PCR، total RNA بافت برگ با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت Qiagene (U.S.A) و نیز معرف TRI شرکت Sigma استخراج شد و پس از تیمار با معرف Dnase I (RNase-Free) (DNase جهت حذف آلودگی DNA برای انجام آزمون Multiplex-RT-PCR) جهت استفاده قرار گرفت. در آزمون Multiplex-RT-PCR استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس M-MLV ساخت شرکت (Promega U.S.A) از روی RNA استخراج شده cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بیان ژن های RDR1 و پروتئین پوششی ویروس CP-PVY⁰ توسط آزمون PCR مورد ارزیابی قرار گرفت (جداول ۱ و ۲). برای بررسی میزان بیان ژن ها، تولیدات PCR پس از سیکل های ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ واکنش PCR جمع آوری شده و در ظروف ۹۸ خانه پلاستیکی PCR-Tube تا زمان انجام الکتروفورز نگاهداری شدند. تولیدات حاصل از همسانه سازی ژن ها بر

پژوهش های محققین اثبات نموده است که در مسیر مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) در گیاهان با تولید سالیسیلیک اسید بیان ژن RDR1 افزایش یافته و از طریق فعال سازی فرایند خاموشی ژن گیاهان نسبت به آلودگی های ویروسی از خود مقاومت نشان می دهند (Diaz-Vivancos et al. 2006; Yang et al. 2004; Yu et al. 2001; Lu et al. 2003; Xie et al. 2003). در این تحقیق برای بررسی نقش ژن RDR1 در مقاومت در برابر آلودگی ویروس PVY⁰ از لاین های تراریختی استفاده شد که بیان ژن RDR1 در آن ها با استفاده از فرایند خاموشی ژن با درجات متفاوتی نسبت به توتون تیپ وحشی غیر تراریخت کاسته شده بود و انتظار می رفت تا در مقایسه با توتون تیپ وحشی از حساسیت های متفاوتی نسبت به آلودگی ویروس (PVY⁰) برخوردار باشند. آنزیم های پراکسیداز (POX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) اکسید و ردوکتازهایی هستند که در هنگام بروز آلودگی های بیوتروفیک ویروسی از طرفی موجب جمع آوری رادیکال های آزاد اکسیژنی تولید شده در اثر انفجار اکسیژنی از سلول می شوند و از طرف دیگر با اکسیداسیون های متفاوت در دفاع گیاهان در برابر آلودگی های ویروسی نقش دارند. با این وجود برخی از گزارش ها اشاره به نقش مثبت این آنزیم در دفاع گیاهان در برابر آلودگی های ویروسی دارند (Milavec et al. 2008). و برخی دیگر نیز اشاره دارند که افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان موجب افزایش حساسیت آن ها نسبت به آلودگی های ویروسی می شود (Candela et al. 1994; Kozłowska et al. 2001). برای بررسی میزان مقاومت و یا حساسیت احتمالی حاصل از کاهش بیان ژن RDR1 در لاین های مورد بررسی، میزان تغییرات آنزیم های کلیدی دخیل در مقاومت گیاهان در برابر آلودگی های ویروسی شامل پراکسیداز (POX) و نیز پلی فنل اکسیداز (PPO) به صورت کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق می تواند به شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژنتیکی دخیل در مقاومت گیاهان در برابر آلودگی عوامل ویروسی کمک نماید.

مواد و روش ها

الف) منابع ویروسی و گیاهی: در این بررسی از نژاد O ویروس Y سیب زمینی (*Potato virus Y strain O* (PVY⁰)) جهت ایجاد آلودگی سیستمیک در توتون استفاده شد. برای این منظور از جدایه های همسانه سازی شده موجود در بانک ژن مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (Scottish Crop Research Institute) استفاده شد. از بافر حاوی ژنوم ویروس PVY⁰ برای تلقیح مکانیکی توتون های تراریخت و غیر تراریخت مورد بررسی استفاده شد. همچنین برای بررسی نقش ژن RDR1 گیاه توتون در مقاومت در برابر ویروس Y سیب زمینی از ۲ لاین مختلف توتون تراریخت (*N. tabacum* cv Samsun NN) با نام های R-5-1-1 (با بیان بسیار کم ژن RDR1) و R-14-1-1 (با بیان

جدول ۱- فهرست آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی. آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo 6 (Molecular biology Insights, Inc, U.S.A) برای اولین بار برای این آزمون طراحی شدند.

نام ژن	جهت توسعه	توالی	اندازه تولیدات
RDRI	Forward Primer	CAGGCTAGCTCCATCGCGAC	430bp
	Reverse Primer	CATACTAGTGGTCATAAACACA	
β -tubulin	Forward Primer	CTTGCACTGGTACACAGG	300bp
	Reverse Primer	CACTCTCCAGCATTCATCC	
Actin	Forward Primer	GATCTTGCTGGTCGTGATC	435bp
	Reverse Primer	GCTGCTGGGAGCAAGAGC	
cMyb	Forward Primer	CATTCCTAAAGTACCAAGAAG	330bp
	Reverse Primer	GGACTGGTGGTACCTGTGC	
Potato virus Y Coat Protein	Forward Primer	ATGCCAACTGTGATGAAT	200bp
	Reverse Primer	ACTCGGCCGAAGGTGACGCATTCT	

جدول ۲- برنامه دمایی و حجم واکنش گره‌های مورد نیاز برای همسانه سازی قطعات ژنی مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جدول ۱.

واکنش گره‌ها	برای یک نمونه	شرایط دمایی واکنش PCR
Go Taq Flexi 10X Buffer	۵µl	۹۵ °C ۳ دقیقه
(10mM) 4 dNTP Mix	۰/۶µl	۹۴ °C ۱ دقیقه
Forward Primer (10µM)	۱µl	۵۴ °C ۳۰ ثانیه
Reverse Primer (10µM)	۱µl	۷۲ °C ۴۰ ثانیه
Go Taq Flexi DNA Polymerase	۰/۱۲۵µl	۷۲ °C ۱۰ دقیقه
MgCl ₂	۱/۷µl	
DNA (Sample)	۱µl	
Water	۱۴/۵۷۵µl	
حجم نهائی	۲۵µl	

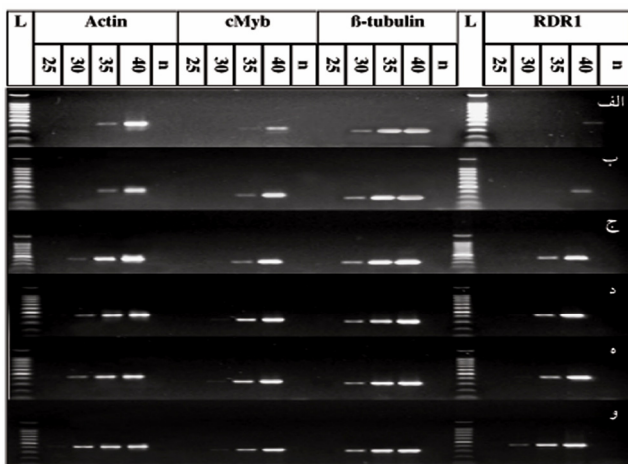
استفاده شد. میزان اکسیداسیون فنل در طول موج ۴۷۰ نانومتر تا ۴۰ ثانیه پس از اضافه شدن سوبسترا یادداشت برداری شد. به منظور بررسی میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) از سوبسترای Pyrogallol استفاده شد (Singh et al. 1999). جذب آنزیم پلی فنل اکسیداز در طول موج ۳۳۴ نانومتر در درجه حرارت ۴۰°C تا مدت ۵ دقیقه پس از اضافه شدن سوبسترا یادداشت برداری شد.

د) ارزیابی کیفی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز: به منظور ارزیابی تغییرات کیفی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از الکتروفورز عمودی بر روی ژل پلی آکریل آمید غیر دناتوره استفاده شد. برای آنزیم پراکسیداز از استاندارد (Horse Radish peroxidase Type XII Sigma EC 1.11.1.7) و برای آنزیم پلی فنل اکسیداز از استاندارد (Tyrosinase EC 1.14.18.1 Sigma) با وزن‌های مولکولی ۴۴kDa برای پراکسیداز و ۱۱۹ kDa برای پلی فنل اکسیداز استفاده شد. برای آشکار شدن باندهای ایزوآنزیمی پراکسیداز از سوبسترای Guaiacol و برای پلی فنل اکسیداز از سوبسترای L-DOPA استفاده

روی ژل آگاروز ۲٪ مطابق روش (Sambrook & Russell 2001) با ولتاژ ۱۲۰ V به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد.

ج) سنجش کمی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز: اندازه گیری میزان تغییرات کمی آنزیم‌های (POX) و (PPO) در بافت برگ توتون‌های تراریخت و غیر تراریخت با استفاده از روش (Bestwick et al. 1999) در دو تکرار و در دو زمان ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح ویروس انجام پذیرفت. برای این منظور میزان غلظت پروتئین تام در واحد وزن خشک برگ توتون با استفاده از روش برادفورد محاسبه شد و افزایش میزان غلظت هر کدام از آنزیم‌های مورد بررسی بر مبنای کسری از جذب اختصاصی هر کدام از آنزیم‌ها در دقیقه بر میزان ماکرو گرم پروتئین تام برای هر لاین در نظر گرفته شد. تمام آزمون‌های طیف سنجی جهت بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در حجم نهائی ۱CC و در دمای ۲۵ °C با لامپ UV/Visible و دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-3100 spectrophotometer) انجام پذیرفت. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از سوبسترای Guaiacol

تلقیح ویروس PVY در لاین توتون تراریخت R-5-1-1 بیشتر از لاین R-14-1-1 بود و همچنین لاین R-14-1-1 نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز را بیشتر از توتون غیر تراریخت نشان داد (شکل ۴). در مجموع در تمام توتون های مورد بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز پس از تلقیح ویروس افزایش یافت و این افزایش در طول زمان نیز دیده شد (شکل ۵). قبل از سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) سیستم سنجش آنزیمی بهینه شد. برای این منظور از عصاره توتون تراریخت و غیر تراریخت استفاده شد. در این آزمون از سوبستراهای متفاوت در pH های متفاوت استفاده شد و سوبسترای Pyrogallol در pH= ۷/۴ و دمای ۴۰°C بهترین فعالیت کنشی آنزیم را نشان داد. فعالیت اختصاصی آنزیم برای ۱ دقیقه ابتدائی به صورت خطی بود و با پیشرفت فرایند واکنش آنزیم و سوبسترا شیب منحنی کمتر گردید. نتایج نشان داد که فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز در لاین R-14-1-1 (ژن RDR1) در این لاین به میزان کمتر از توتون غیر تراریخت بیان می شد) و نیز در توتون غیر تراریخت طبیعی



شکل ۱- نتایج آزمون Sq-RT-PCR برای بررسی میزان بیان ژن RDR1 در لاین های توتون تراریخت و غیر تراریخت مورد ارزیابی. برای این آزمون از کنترل های درونی (House keeping gene) های Actin، cMyb و β -tubulin استفاده شد. الف) توتون تراریخت لاین R-5-1-1 تلقیح نشده سالم، ب) توتون تراریخت لاین R-5-1-1 تلقیح شده یک هفته پس از تلقیح با ویروس PVY^o، ج) توتون تراریخت لاین R-14-1-1 تلقیح نشده سالم، د) توتون تراریخت لاین R-14-1-1 تلقیح شده یک هفته پس از تلقیح با ویروس PVY^o، ه) توتون غیر تراریخت تلقیح نشده و توتون غیر تراریخت تلقیح شده با ویروس PVY^o، یک هفته پس از تلقیح ویروس. اندازه تولیدات حاصل از همسانه سازی ژن های مذکور بر روی ژل آگارز ۲٪ مطابق اندازه های اشاره شده در (جدول ۱) برای هر ژن بود. از مارکر وزن مولکولی DNA ۱۰۰ جفت باز تهیه شده از شرکت Promega استفاده شد. اعداد به ترتیب بیانگر چرخه ای از واکنش PCR می باشد که تولیدات آن جمع آوری شده است. n: بیانگر کنترل منفی می باشد. در کنترل منفی به جای نمونه از آب در مخلوط واکنش PCR استفاده شد.

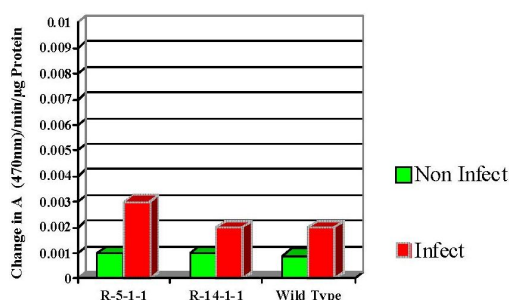
شد. این ارزیابی مطابق با روش (Mohammadi & Kazemi 2002) در دو تکرار و در دو زمان ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح ویروس انجام پذیرفت.

نتایج

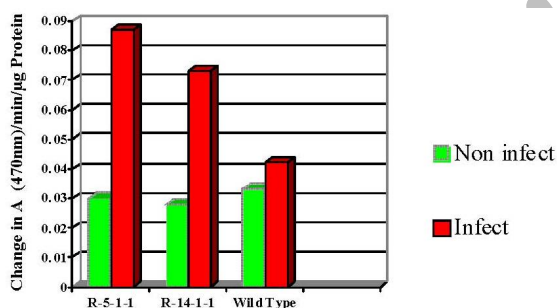
الف) بررسی بیان ژن های RDR1 و پروتئین پوششی ویروس PVY^o در توتون های مورد ارزیابی: نتایج این آزمون نشان داد میزان بیان ژن RDR1 پس از آلودگی به ویروس PVY^o در توتون های غیر تراریخت افزایش پیدا کرده است. همچنین این افزایش پس از آلودگی تمام لاین های تراریخت به ویروس PVY^o نیز مشاهده شد. نتایج این آزمون نشان داد بیان ژن RDR1 در لاین R-5-1-1 در حالت های سالم و آلوده کمتر از توتون تیپ وحشی غیر تراریخت بوده است. همچنین مشخص شد بیان ژن RDR1 در توتون لاین R-14-1-1 بیشتر از لاین R-5-1-1 می باشد ولی با این وجود بیان ژن RDR1 در این لاین از توتون تیپ وحشی کمتر بود (شکل ۱). همچنین مشخص شد بیان ژن RDR1 پس از تلقیح ویروس در تمام توتون های مورد ارزیابی افزایش یافته است. نتایج آزمون Sq-RT-PCR نشان داد میزان غلظت پروتئین پوششی ویروس PVY^o در هر دو لاین تراریخت با بیان کم ژن RDR1 در مقایسه با توتون غیر تراریخت بیشتر می باشد. اگرچه لاین R-5-1-1 که ژن RDR1 آن بیشتر خاموش شده بود و در نتیجه بیان کمتر این ژن را در مقایسه با سایر توتون های مورد ارزیابی داشت تکثیر ویروس PVY^o را در خود بیشتر حمایت نمود و نسبت به آلودگی ویروس PVY^o حساسیت بیشتری را نشان داد (شکل ۲).

ب) سنجش کمی آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز: قبل از ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز سیستم سنجش آنزیمی بهینه شد. برای این منظور از عصاره توتون تراریخت و غیر تراریخت استفاده شد. فعالیت کنشی آنزیم برای ۳۰ ثانیه ابتدائی به صورت خطی بود و با پیشرفت فرایند واکنش آنزیم و سوبسترا شیب منحنی کم تر گردید. عمل اکسیداسیون Guaiacol به کوئینون در طیف های جذبی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و بهترین جذب در ۴۷۵ nm و دمای ۲۵°C به دست آمد. منحنی جذب در این طیف تنها یک تک پیک داشت. افزایش میزان Guaiacol موجب افزایش میزان اکسیداسیون آن شد. سنجش کمی آنزیم پراکسیداز برای توتون تراریخت (R-5-1-1) با بیان خیلی کم ژن RDR1 نشان داد میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز تا ۱۵ روز پس از تلقیح ویروس PVY^o بیشتر از توتون تیپ وحشی آلوده شده است (شکل ۳). اما تا یک ماه پس از تلقیح ویروس در لاین های تراریخت و غیر تراریخت مورد بررسی میزان فعالیت اختصاصی آنزیم مذکور افزایش پیدا کرد (شکل ۴). میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز تا یک ماه پس از

آمده است که می‌توانند به صورت پس از ترجمه ای بوجود آمده باشند. بررسی کیفی آنزیم پلی فنل اکسیداز نمونه های توتون مورد ارزیابی، ۳ باند ایزو پلی فنل اکسیدازی اسیدیک (آنیونیک) و ۲ باند ایزو آنزیمی کاتیونیک (بازی) با وزن مولکولی ۱۰۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون را در عصاره برگ نمونه های توتون مورد بررسی مشخص ساخت. در نمونه های تراریخت در مقایسه با توتون غیر تراریخت تیپ وحشی میزان شدت باندهای ایزو پلی فنل اکسیدازی (PPO) پس از تلقیح با ویروس PVY^o کاهش پیدا کرد (شکل ۱۰). همچنین ایزو آنزیم های پلی فنل اکسیداز از لحاظ کیفی تغییرات چندانی را در توتون تیپ وحشی پس از آلودگی به ویروس PVY^o نشان ندادند (شکل ۱۰).



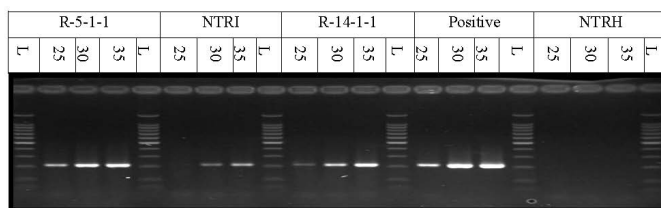
شکل ۳- فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در لاین های تراریخت خاموش شده در ژن RDR1 و نیز توتون غیر تراریخت (*N. tabaccum* cv Samsun NN) ، ۱۵ روز پس از تلقیح با ویروس PVY^o .



شکل ۴- فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در لاین های تراریخت خاموش شده در ژن RDR1 و نیز توتون غیر تراریخت (*N. tabaccum* cv Samsun NN) ، ۳۰ روز پس از تلقیح با ویروس PVY^o .

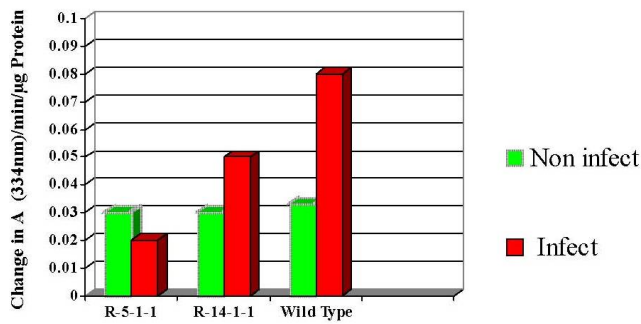
بحث

نتایج آزمون Sq-RT-PCR پروتئین پوششی ویروس PVY^o و نیز ژن RDR1 توتون های مورد بررسی حکایت از آن داشت که لاین های تراریخت دارای بیان کمتر ژن RDR1 در مقایسه با توتون غیر تراریخت از حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی ویروس PVY^o برخوردار می باشند. در این مورد مشاهده شد لاین R-5-1-1 که دارای بیان بسیار کم ژن RDR1 می باشد غلظت بیشتری از پروتئین پوششی ویروس PVY^o را در مقایسه با توتون های غیر تراریخت در خود تکثیر

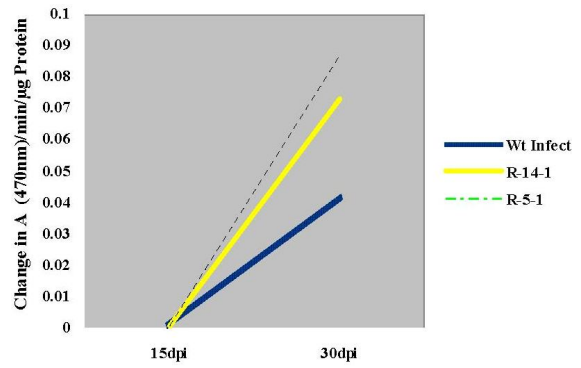


شکل ۲- نتایج آزمون Sq-RT-PCR برای بررسی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس PVY^o در لاین های مورد ارزیابی. در این آزمون میزان بیان ژن CP- (PVY^o) مورد بررسی قرار گرفت. محصول همسانه سازی شده پروتئین پوششی ویروس PVY^o باند ۲۰۰ جفت بازی را در ژل تشکیل داد. برای کنترل مثبت از ژن پروتئین پوششی همسانه سازی شده ویروس PVY^o استفاده شد که دارای غلظت ۷۰ ng/µl بود. حروف اختصاری بکار رفته در توضیحات شکل: اعداد به ترتیب بیانگر چرخه ای از واکنش PCR می باشد که تولیدات آن جمع آوری شده است. Positive: نمونه DNA مربوط به پروتئین پوششی ویروس PVY^o با غلظت 70ng/µ که از قبل کلن شده و در بانک ژن مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند موجود بود و به عنوان کنترل مثبت برای این آزمون انتخاب شد، NTRH: توتون غیر تراریخت آلوده نشده و سالم، NTRI: توتون غیر تراریخت تیپ وحشی آلوده شده به ویروس، L: نردبان وزن مولکولی DNA با دقت ۱۰۰ جفت باز تهیه شده از شرکت Promega آمریکا.

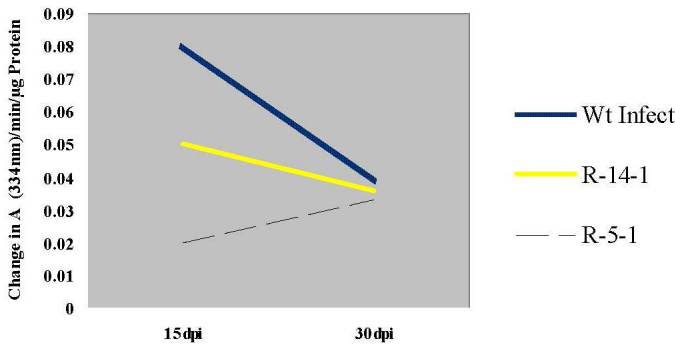
تا دو هفته پس از تلقیح با ویروس PVY^o افزایش پیدا کرده است (شکل ۶). در توتون تراریخت لاین R-5-1-1 (ژن RDR1 در این لاین به میزان کمتری در مقایسه با لاین R-14-1-1 و نیز توتون غیر تراریخت بیان می شد) میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز پس از تلقیح ویروس کاهش نشان داد. با وجود آنکه میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز در تمام نمونه های توتون مورد بررسی چه تراریخت و چه غیر تراریخت تا یک ماه پس از تلقیح ویروس PVY^o افزایش نشان می داد ولی در مجموع میزان فعالیت اختصاصی آنزیم در این زمان نسبت به دو هفته گذشته کاهش داشت (اشکال ۷ و ۸). نتایج حاصل از بررسی تغییرات کیفی آنزیم پراکسیداز مشخص ساخت که تمام لاین های مورد ارزیابی و نیز توتون غیر تراریخت پس از آلودگی به ویروس PVY^o قابلیت بیان باندهای ایزو پراکسیدازی ۳۵-۴۴ کیلودالتون را دارند. در لاین R-5-1-1 فعالیت ایزو پراکسیداز بیشتری نسبت به لاین R-14-1-1 و نیز توتون غیر تراریخت پس از آلودگی به ویروس PVY^o مشاهده شد (شکل ۹). در مجموع در نمونه لاین R-5-1-1 دو ایزوپراکسیداز کاتیونیک Cathionic (بازی) با حرکت یکسان در ژل متراکم کننده (Stacking gel) و ۳ ایزو پراکسیداز آنیونیک Anionic (اسیدی) با حرکت متفاوت در ژل جدا کننده (Resolving gel) مشاهده شد. در مقایسه طرح باندهای ایزوپراکسیدازی لاین حساس R-5-1-1 غیر آلوده با حالت آلوده همین لاین و نیز آلوده توتون غیر تراریخت به نظر می رسد که ایزوفرم های جدید اسیدی آنیونیک پراکسیداز در این لاین پس از آلودگی بوجود



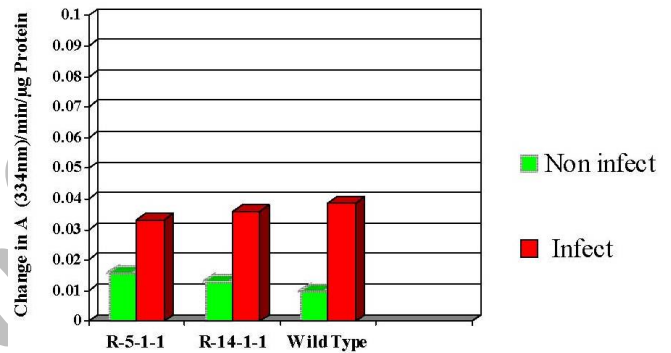
شکل ۶- فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در لاین های تراریخت خاموش شده در ژن RDR1 و نیز توتون غیر تراریخت (N. tabaccum cv Samsun NN ، ۱۵ روز پس از تلقیح با ویروس PVY° .



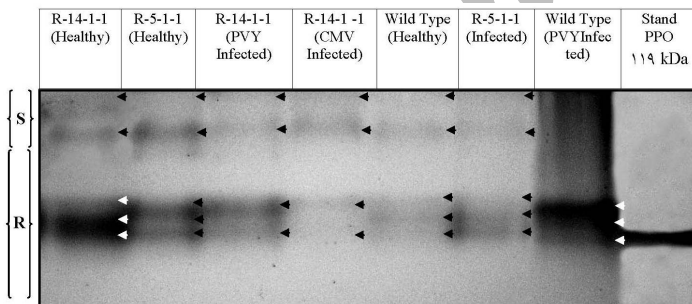
شکل ۵- تغییر در فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در توتون های مورد ارزیابی در زمان ۳۰ روز پس از تلقیح با ویروس PVY° .



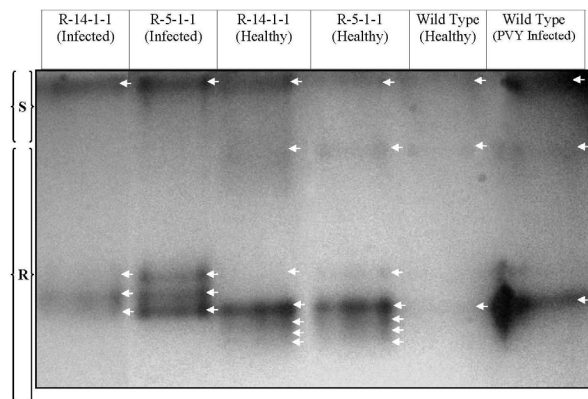
شکل ۸- تغییر در فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز در توتون های مورد ارزیابی در زمان ۳۰ روز پس از تلقیح با ویروس PVY° .



شکل ۷- فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در لاین های تراریخت خاموش شده در ژن RDR1 و نیز توتون غیر تراریخت (N. tabaccum cv Samsun NN)، ۳۰ روز پس از تلقیح با ویروس PVY° .



شکل ۱۰- بررسی طرح ایزو پلی فنل اکسیدازی نمونه های مورد بررسی. در این تصویر (I) آلوده به ویروس ، (H) Healthy غیر آلوده. Stacking = S. قسمت متراکم کننده ژل پلی آکریل آماید (۸٪). R = Resolving قسمت جدا کننده ژل پلی آکریل آماید (۱۲٪). برای این ژل از Standard marker Standard Tyrosinase = ۱۱۹ kDa استفاده شد. تمامی توتون های مورد ارزیابی باندهای ایزوپولی فنل اکسیدازی ۱۲۰ - ۱۰۰ کیلودالتون را تشکیل دادند.



شکل ۹- بررسی طرح ایزو پراکسیدازی نمونه های مورد بررسی. در این شکل (I) آلوده به ویروس ، (H) Healthy غیر آلوده. S = Stacking قسمت متراکم کننده ژل پلی آکریل آماید (۸٪). R = Resolving قسمت جدا کننده ژل پلی آکریل آماید (۱۲٪). تمامی توتون های مورد ارزیابی باندهای ایزوپراکسیدازی ۴۴-۳۵ کیلودالتون را تشکیل دادند. برای این ژل از استاندارد پراکسیداز (Horseradish peroxidase (Type III, Sigma) نیز در کنار نمونه ها استفاده شد که تشکیل ۱ باند با وزن مولکولی ۴۴ کیلو دالتون را داده است.

می نماید. این نتایج نشان می دهد که بیان بیشتر ژن RDR1 احتمالاً توانسته است موجب کنترل بیشتر آلودگی سیستمیک ویروس PVY⁰ در گیاه توتون (*N. tabaccum* cv Samsun NN) شود. با وجود آنکه در گذشته ۳ مقاله در مورد نقش ژن RDR1 در افزایش توان مقاومت گیاهان توتون و آراییدوپسیس نسبت به آلودگی های ویروسی وجود داشت ولی هیچکدام این نقش را برای یک آلودگی سیستمیک ویروسی و نیز آلودگی ویروس PVY⁰ مورد بررسی قرار نداده بودند (Xie *et al.* 2004; Yu *et al.* 2003; Yang *et al.* 2001). نتایج حاصل از آنزیم سنجی این تحقیق موجب شناخت ارتباط بین فعالیت آنزیم RDR1 و بیان آنزیم های POX و PPO در جهت تنظیم پاسخ های بیوشیمیائی مختلف به آلودگی سیستمیک ویروس PVY⁰ شد. با توجه به آنکه از میان چندین سوبسترای آزمایش شده برای آنزیم پراکسیداز، سوبسترای Guaiacol بیشترین گرایش را برای واکنش با آنزیم پراکسیداز توتون های مورد بررسی نشان داد لذا نوع پراکسیداز تولید شده در هنگام آلودگی ویروس PVY⁰ از نوع III تشخیص داده شد. در توتون تا کنون حداقل ۱۲ آیزوزایم برای پراکسیداز شناخته شده است که در ۳ زیر گروه آنیونیک، آنیونیک متوسط و کاتیونیک قرار گرفته اند. هر گروه از این آیزوزایم ها تصور می شود که عملکرد های متفاوتی را در دیواره سلولی گیاه بر عهده دارند (Lagrimini 1987). آیزوزایم های آنیونیک (pI 3.5 - 4.0) با فراکسیون دیواره سلولی همراه می باشند و دارای فعالیت زیادی جهت پلیمریزاسیون Cinnamyl alcohol در شرایط مصنوعی می باشند. آن ها در لیگنینی شدن و ایجاد اتصالات تقاطعی دیواره و ادغام شدن زیر واحدهای مونومریک Feruloylated Polysaccharid و ضخیم نمودن دیواره سلولی گیاه دخیل هستند (Lampert 1986; Aist & Gold 1987; Brisson *et al.* 1994). احتمال دارد در توتون های تراریخت با بیان کم ژن RDR1 به دلیل حساسیت بالا و تکثیر زیاد ویروس تنش بیولوژیکی شدیدی اتفاق افتاده باشد و در توتون های مذکور جهت جلوگیری از حرکت سلول به سلول ویروس از طریق منافذ پلاسمودسماتا (با بستن منافذ از طریق افزایش قطر دیواره) و نیز جبران صدمات فیزیکی وارد شده به دیواره سلولی در اثر تکثیر ویروس، سطح فعالیت ایزوپراکسیدازهای آنیونیک در مقایسه با توتون تیپ وحشی افزایش پیدا کرده باشد. نتایج این تحقیق، گزارش های گذشته را نیز اثبات می نماید که ابراز داشته بودند سطح فعالیت اختصاصی ایزو پراکسیدازها در توتون حساس *N. tabaccum* cv Samsun NN پس از آلودگی به سایر ویروس ها افزایش پیدا می کند (Schnabelrauch *et al.* 1996; Brownleader *et al.* 1975; Bierecka & Catalamo 1995; *al.* 1995). نتایج تغییرات آنزیمی در این تحقیق نشان داد در هنگام آلودگی توتون غیر تراریخت به ویروس (PVY⁰) آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) بیشترین افزایش فعالیت را دارد. این افزایش برای لاین حساس R-14-1-1 به میزان کمتر از توتون غیر تراریخت ولی به میزان بیشتر از لاین بسیار حساس R-5-1-1 صورت پذیرفت. بر مبنی نتایج بررسی های گذشته افزایش فعالیت این آنزیم مرتبط با افزایش میزان مقاومت گیاهان به آلودگی های ویروسی می باشد (Goodman *et al.* 1986; Diaz *et al.* 2006; Leina *et al.* 1996). همچنین می تواند به عنوان اکسیداز پایانه در هنگام افزایش تنفس در زنجیره فسفریلاسیون اکسیداتیو در غشاء میتوکندری قرار گیرد و موجب انتقال انرژی به مولکول های هیدروژن و در نهایت تولید آب گردد و از این طریق موجب افزایش جذب اکسیژن و فعال شدن چرخه اکسیداسیون Pantose phosphate گردد (Mayer 1987; Sommer *et al.* 1994). افزایش فعالیت اختصاصی آنزیم PPO می تواند به دلیل افزایش تنفس در توتون های مقاومتر با بیان بیشتر ژن RDR1 باشد. از آنجائی که افزایش تنفس می تواند تامین کننده انرژی لازم برای واکنش های دفاعی در توتون باشد و نیز تولید رادیکال های آزاد اکسیژنی در جهت کنترل پاتوژن ها نیز از این طریق صورت می پذیرد لذا می توان آن را به عنوان یک شاخص مقاومتی در پاسخ های میزبان به آلودگی ویروسی به حساب آورد. در مجموع نتایج حاصل از مطالعات آنزیمی و مولکولی این بررسی اثبات می نماید که ژن RDR1 در افزایش میزان مقاومت گیاهان در هنگام واکنش های سازگار به آلودگی های ویروسی علاوه بر پاسخ های ناسازگار احتمالاً می تواند موثر می باشد. اگرچه در آلودگی های سازگار فاکتورهای دفاعی بیان می شوند ولی بیان آنها در زمانی بعد از آلودگی ویروسی اتفاق می افتد و لذا جهت کنترل آلودگی ویروسی کارآمد نیستند. نتایج این بررسی نشان می دهد بیان آنزیم های دخیل در دفاع میزبان در برابر آلودگی های ویروسی با گذشت زمان افزایش پیدا می کنند و شاید این امر بتواند توجیه نماید چرا گیاهان با افزایش سن نسبت به برخی از بیماری های ویروسی مقاوم می شوند.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای پروفیسور Peter Palukaitis محقق مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (SCRI) که منابع گیاهی و ویروسی را در اختیار این تحقیق قرار دادند صمیمانه تشکر و قدر دانی می شود.

www.SID.ir

منابع:

- Aist J.R., Gold R.E. 1987: Prevention of fungal ingress: the role of papillae and calcium. *In* S Nishimura, CP Vance, N Doke, eds, Molecular Determinants of Plant Disease. Japan Scientific Societies Press. Tokyo.p 47-59. 293pp.
- Astier-Manificier S., Cornuet P. 1971: RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage. *Biochim. Biophys. Acta* . **232**: 484-493 .
- Baulcombe D.C. 2004. RNA Silencing In Plants. *Nature* **431**: 356-363.
- Bestwick C.S., Brown I.R., Mansfield W.1999: Localized changes in Peroxidase Activity Accompany Hydrogen Peroxidase Generation during the development of Nonhost Hypersensitive Resistance in Lettuce . *Plant Physiol.* **118**: 1067-1078 .
- Bierecka H., Catalfamo J. 1975: Cell Wall and Protoplast Isoperoxidases in Tobacco Plants in Relation to Mechanical Injury and Infection with Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiol.* **55**: 611-619.
- Brisson L.F., Tenhaken R., Lamb C.J. 1994: Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712.
- Brownleader M. D., Ahmed N., Trevan M., Chaplin M.F., Dey P.M. 1995: Purification and partial characterization of tomato extension peroxidase. *Plant Physiol* **109**: 1115-1123.
- Candela M.E., Muñoz R., Alcázar M.D., Espín A. 1994: Isoperoxidase involvement in the resistance of *Capsicum annuum* to infection by cucumber mosaic virus. *Plant Physiology* **143**: 213-7.
- Diaz-Vivancos P., Rubio1 M., Mesonero1 V., Periago P.M., Ros-Barcelo A., Martinez-Gomez P., Hernandez, J.A. 2006: The apoplastic antioxidant system in Prunus: response to long-term plum pox virus infection. *J. Exp. Botany.* **57**: 3813-3824.
- Fire A *et al.* 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* *Nature.* **391**: 806-811 .
- Goodman R.N., Kiraly Z., Wood K.R. 1986: The Biochemistry and Physiology of Plant Disease, University of Missouri Press, USA, p. 433.
- Kozłowska M, Fryder K, Wolko B. 2001; Peroxidase involvement in the defence response of red raspberry to *Didymella applanata*. *Acta Physiologiae Plantarum* **23**: 303-310.
- Lagrimini L.M., Burkhart W., Moyer M., Rothstein S. 1987: Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 7542-7546.
- Lamport D.T.A. 1986: In Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, eds. Greppin, H., Penel, C. & Gaspar, T. (Univ. of Geneva Press, Geneva),p 199-208, 490 pp.
- Leina M.J., Tan T.K., Wong.S.M. 1996: Resistance of *Hibiscus esculentus* L. and *Vigna sinensis* (L.) Endl. to *Pseudocercospora* and plant peroxidase activity in relation to infection. *Ann. Appl. Biol.* **129**: 197-206.
- Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcombe D.C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants . *Methods.* **30**: 296-303 .
- Lyer L.M., Koonin E.V., Arvind L. 2003: Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases . *BMC Structural Biology.* **3**: 1-23 .
- Makarova K., Grishin N., Shabalina S., Wolf Y., Koonin E. 2006: A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action". *Biol Direct.* **1**: 7-15.
- Marone M., Mozzetti S., Ritis D., Pierelli L., Scambia G. 2001: Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online.* **3**: 19-25.
- Milavec M., Gruden K., Ravnikar M., Kova M. 2008: Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by *Potato virus Y^{NTN}*. *Plant Pathology.* **57**: 861-869.
- Mohammadi M., Kazemi H. 2002. Change in Peroxidase and Polyphenol Oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science.* **162**: 491-498.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular Cloning, A laboratory Manual. CGL Press. 3rd Ed. Cold Spring. New York. 2279pp.
- Schnabelrauch L.S., Kieliszewski M., Upham B.L., Alizedeh H., Lamport D.T.A. 1996: Isolation of pI 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr- Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**: 477-489.
- Singh N., Singh R., Kaur K., Singh H. 1999: Studies on Physico-Chemical Properties and Polyphenoloxidase activity in seeds from Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus*) Varieties grow in India. *Food Chemistry.* **66**: 241-247.
- Wassengger M., Krczal G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science.* **11**: 142-151.
- Xie Z., Fan B., Chen C., Chen Z. 2001: An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 6516-6521 .
- Yang, S., Carter S.A., Cole A.B. Ning-Hui Cheng C., Nelson S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 6297-630.
- Yu D., Fan B., Macfarlane S.A., Chen Z. 2003: Analysis of the Involvement of an Inducible *Arabidopsis* RNA-Dependent RNA Polymerase in Antiviral Defense .*MPMI.* **16**: 206-216.