Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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،

www.SID.ir

Archive of SID

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 ویروسY 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 (شکل۱). 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 آغازگر۱ و۲ هر کدام یک میکرولیتراز غلظت ۲۰ پیکومول در هر میکرولیتر، آنزیم Taq DNA polymerase ۰/۵ میکرولیتر، پلاسمید حاوی همسانه دو میکرولیتر، بافرPCR10X 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 در۵۰ 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

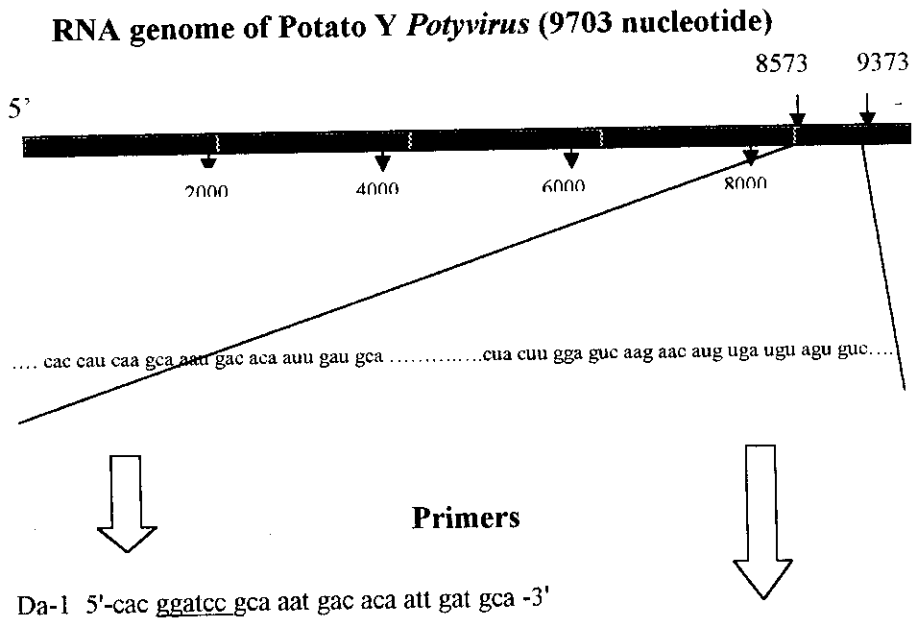
www.SID.ir

Archive of SID

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).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : نمودار ژنوم ویروس Y سیب زمینی شامل ناحیه رمز کننده پروتئین پوششی این ویروس (نوکلئوتیدهای ۸۵۷۳ تا ۹۳۷۳) از ترادف. ترادف مربوط به ابتدا و انتهای این ناحیه و آغازگرهای طراحی شده، در شکل مشخص شده اند. ترادفهایی که زیرشان خط کشیده شده، ناحیه برش BamHI میباشد که در ترادف اصلی مربوط به ژنوم ویروس وجود نداشته و جهت تسهیل در همسانه سازی در نظر گرفته شده اند.

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

www.SID.ir

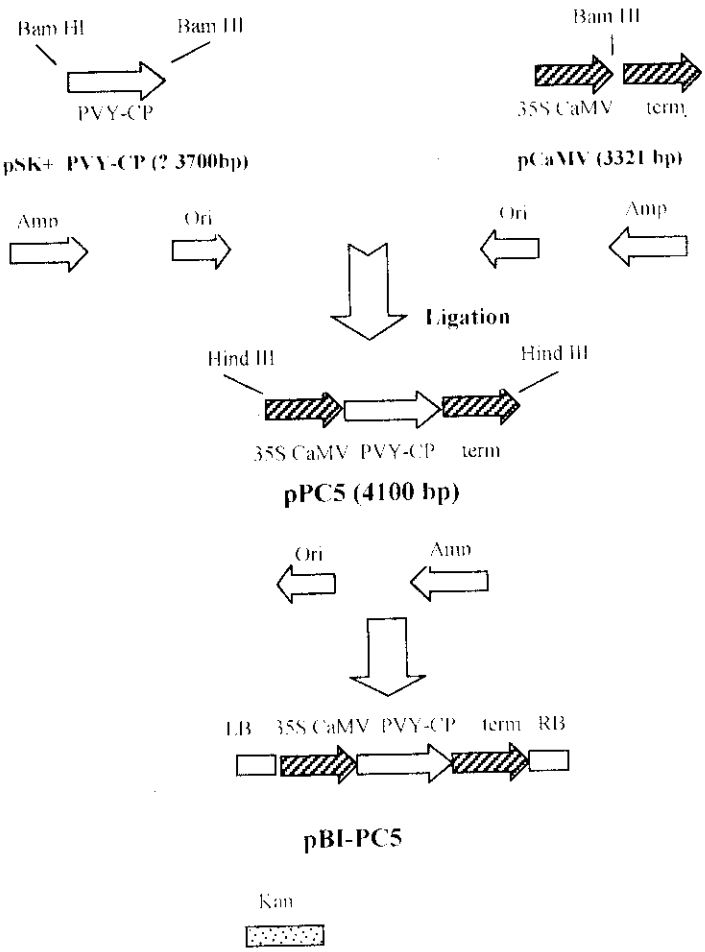
Archive of SID

۲-همسانه سازی ژن PVY-CP درپلاسمیدpCaMV

پلاسمیدpCaMV با ۳۳۲۱ جفت باز، دارای پیشبر (پروموتور) 35S ویروس موزائیک کلم گل (Cauliflower Mosaic Virus)، یک ترادف خاتمه دهنده(terminator)، ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و نیز ناحیهٔ *Ori* جهت تکثیر در سلولهای باکتری می‌باشد(Hashemi *et al.*, 1998). در این پلاسمید یک جایگاه آنزیم برشی *Bam* HI میان پیشبر 35S وترادف خاتمه دهنده وجود دارد که قطعه ژن PVY-CP در این جایگاه الحاق گردید. برای این منظور پلاسمید pSK حامل ژن PVY-CP پس از تکثیر و خالص سازی، بوسیله آنزیم برشی *Bam* HI مورد برش قرارگرفت. محصول این واکنش که شامل قطعه دی.ان.ای بطول ۸۲۲ جفت باز مربوط به ژن PVY-CP بود، پس از الکتروفورز در ژل آگارز، 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 منظورجلوگیری از اتصال مجدد پلاسمیدهای برش یافته به یکدیگر(self ligation)، پلاسمیدpCaMV برش یافته، به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار آنزیم آلکالین فسفاتاز قرارداده شد (Sambrook *et al.*, 1989). پس از استخراج دی.ان.ای با فنل وکلروفورم برای حذف پروتئینها و رسوب دادن با استات سدیم سه مولارواتانول مطلق، قطعهٔ ۸۲۲ جفت بازی، بوسیله آنزیم T4 DNA Ligase به پلاسمید برش یافتهٔpCaMV متصل وبه روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه JM109 منتقل گردید. بمنظورانتخاب کلنی هایی که ژنPVY-CP درجهت صحیح (direct)۵َ به ۳َ به پلاسمید آنها الحاق شده بود، این پلاسمیدها با توجه به اطلاعات موجود درمورد ترادف نوکلئوتیدیpCaMV و ژنPVY-CP، با استفاده ازدوآنزیم برشی *Eco* RI و *Nsi* I مورد برش قرارگرفته ودرژل آگاروز ۰/۸ درصد در بافرTBE، الکتروفورزگردیدند. کلنی هائیکه پلاسمید آنها دارای همسانه ژنPVY-CP در جهت صحیح ۵َ به ۳َ(۵ درسمت پیشبر و۳َ در سمت ترادف خاتمه دهنده) بودند، تولید قطعات حدود۲۸۰و۳۸۰۰ جفت بازی وکلنی هائی که پلاسمید آنها دارای همسانه ژنPVY-CP درجهت معکوس ۳َ به ۵َ بودند، تولید قطعات حدود۱۰۰۰و۳۱۰۰ جفت بازی نمودند. کلنی شماره ۵ که پلاسمید آن دارای همسانه PVY-CP در جهت صحیح بود، برای ادامه کار انتخاب شد. این پلاسمید بنام pPC5 نامیده شد (شکل۲).

www.SID.ir

Archive of SID



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

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

www.SID.ir

Archive of SID

۳- انتقال کاست بیانی به داخل ناقل pBin19

جهت انتقال ژن PVY-CP به گیاه از روش انتقال توسط اگروباکتریوم 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 درناحیه قبل از شروع پروموتور 35S و نیز در ناحیه بعد از ترادف خاتمه دهنده دارای جایگاه آنزیم برشی *Hind* III بود. ابتدا این پلاسمید با آنزیم *Hind* III برش داده شده و سپس در ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE در ۸۰ ولت ثابت بمدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. قطعهٔ حدود ۱٤۰۰ جفت بازی برش یافته، مانند قبل از ژل آگاروز استخراج و خالص سازی گردید. پلاسمید pBin19، در ناحیهٔ T-DNA خود دارای یک جایگاه آنزیم برشی *Hind* III می باشد (Frisch *et al.*, 1995). این پلاسمید با آنزیم برشی *Hind* III مورد برش قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد طی واکنش الحاق و با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase ، قطعهٔ ۱٤٦٦ جفت بازی برش یافته از pCaMV ، به پلاسمید pBin19 متصل گردید. پلاسمید نوترکیب حاصله بنام pBI-PC5 نامیده شد (شکل۲). محصول واکنش الحاق، به روش شوک حرارتی به سلولهای *E. coli* سویهٔ 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 آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. تک کلنی‌های 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 میکروگرم در میلی لیتر) و استرپتومایسین (٦۰ میکروگرم 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 مورد بررسی قرارگرفتند. جزئیات و مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

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 قرارگرفته و طول قطعات حاصله از طریق الکتروفورز در ژل آگارز بررسی گردید. کلنی‌های اگروباکتریومی که حاوی ژن PVY-CP بودند، جهت ادامه کار انتخاب شدند.

٤- 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 ١٤٠٠٠ لوکس و ١٢ساعت روشنائی و دمای ١± ٢٣ درجه سانتیگراد، کشت داده شد. به وسیلهٔ تیغ استریل از برگ این گیاهان (در شرایط استریل)، قطعاتی به ابعاد حدود ١× ١ سانتی‌متر تهیه شد. باکتری *A. tumefaciens* سویهٔ LBA 4404 حاوی پلاسمید pBI-PC5، به مدت ٤٨ ساعت در محیط کشت بدون آنتی بیوتیک رشد داده شده و بمدت ١٠ دقیقه در ٣٠٠٠ دور در دقیقه میانگریز شد. رسوب سلولهای حاصله در حجمی معادل حجم اولیه از محیط کشت MS مایع (Torres, 1998) سوسپانسیون شدند. قطعات برگی بمدت ٣-٢ دقیقه در این سوسپانسیون باکتری قرار داده شده و سپس به محیط کشت M(I) که شامل نمک‌های پایهٔ محیط MS به‌همراه ٢٧/٨٥ میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$، ٣٧/٢٥ میلی‌گرم Na_2-EDTA.$2H_2O$، ٨ میلی‌گرم Thiamine، ٨ میلی‌گرم Adenine، ١٠٠ میلی‌گرم *Myo*-inositol، ٤ گرم باکتوآگار و ٢٠ گرم سوکروز در هر لیتر با pH برابر ٥/٧ بود، منتقل و در ٢٨ درجه سانتیگراد بمدت ٤٨ 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 ١٠٠ و کاربنسیلین به میزان ٤٠٠ میکروگرم در میلی لیتر و تنظیم کننده های رشدی بنزیل آمینوپورین به میزان یک میلیگرم و اسید نفتالین استیک به مقدار ٠/١ میلیگرم در میلی لیتر بود، انتقال داده شدند (Hashemi *et al.*, 1998).

www.SID.ir

Archive of SID

پتریهای حاوی قطعات برگی تا ظاهرشدن جوانه ها، در شرایط شدت نور ۱٤٥۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت روشنائی، رطوبت نسبی ۷۰تا۸۰ درصد و دمای ۱± ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. جوانه های تازه رشد کرده از قطعات برگ جدا شده و جهت ریشه دار شدن به محیط M(III) منتقل گردیدند. محیط M(III) شامل محیط M(II) ولی بدون تنظیم کنندهٔ رشدی بود. هر یک از لاین های گیاهان تراریخت، با نام TCP1 و TCP2 و ... مشخص شده و بروش قلمهٔ ساقه حداقل به تعداد شش گیاه تکثیر گردید. از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun غیرتراژنی که در شرایط مشابهی رشد یافته بود، بعنوان شاهد غیر تراژن و از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun تراژن با حامل pBin19 فاقد تراژن PVY-CP، بعنوان شاهد تراژن فاقد ژن الحاقی استفاده شد.

۵- بررسی گیاهان تراژن

۵-۱- 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 سازندهٔ 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 واکنشPCR، قطعه ۸۰۰ جفت بازی حاصله از الکتروفورز، از ژل جدا و خالص سازی شده و بطور جداگانه بوسیله آنزیمهای برشی *AviII, Bsm I, Hae III, Sfu I, Tru 9I* تیمار و در ژل آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردیده و باندهای حاصله مورد بررسی قرارگرفت (Sambrook *et al.*, 1989).

۵-۲- بررسی وجود آر.ان.ای رونوشت برداری شده از ژن PVY-CP در لاین‌های گیاهان تراژن

بمنظور بررسی بیان ژن PVY-CP در سطح آر.ان.ای، آر.ان.ای کل هر یک 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

www.SID.ir

Archive of SID

پیشنهادی شرکت سازنده استفاده گردید. بمنظور حذف بقایای 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 تا۱۰ میکروگرم (حدود دو میکرولیتر) از آر.ان.ای استخراجی، یک میکرولیتراز 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، بلافاصله به روی یخ انتقال یافتند. سپس دو میکرولیتر بافر 10X PCR، دو میکرولیتر $MgCl_2$ 25 mM، دو میکرولیتر 10mM dNTP mix، دو میکرولیتر 0.1 M DTT و یک میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاز برگردان Superscript II (Gibco BRL-USA) به هریک از میکروتیوب‌ها اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ٦٠ دقیقه در ٤٢ درجه سانتیگراد و۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتیگراد قرارگرفته و سپس بلافاصله 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 (0.5uni/µl)، پنج میکرولیتر از بافر 10X PCR، سه میکرولیتر از $MgCl_2$ 25mM، یک میکرولیتر از 10mM dNTP mix و ۳۳/۵ میکرولیتر آب دوبار 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)، مستقیما در واکنش دوم وارد شدند. پس از قرار دادن میکروتیوبها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorff, Germany)، واکنش زنجیره ای پلیمراز با برنامه پنج دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد و سپس ۳۰ چرخه شامل یک دقیقه در ۵۰ درجه، دو دقیقه در ۷۲ درجه و یک دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد انجام گردید. پس از اتمام واکنش، بمنظور بررسی محصولات PCR، همانند مراحل قبل الکتروفورز در ژل آگارز انجام گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

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 بلات مورد بررسی قرار گرفتند.

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

برای این منظور، ازIgG چندهمسانه ای (پلی کلنال) PVY و IgG تک همسانه‌ای (مونوکلنال) اختصاصی نژاد نکروتیک PVY (DSMZ آلمان)، طبق روش توصیف شده توسط De Avila *et al.*, (1990) استفاده شد. نتیجه واکنش بوسیله اندازه‌گیری میزان جذب نور توسط هر یک از چاهک‌ها در طول موج ٤٠٥ نانومتر، با دستگاه ELISA-reader Multiscan (فنلاند) سنجیده شد. بمنظور داشتن تخمینی از دقت آزمون، در هر پشقابک الایزا، سری غلظت‌های متوالی از سوسپانسیون خالص نژاد نکروتیک ویروس Y سیب زمینی به چاهک‌ها اضافه گردیده و میزان جذب نور چاهک مربوط به هر غلظت مشخص شد.

۲-۳-۵- روش وسترن بلات (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 ٤ درصد تشکیل شده بود. بافر الکترود شامل ۳ گرم تریس، ١٤/٤ گرم گلایسین و یک گرم SDS در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر، با pH برابر ۸/۳ بود. ۲۰ میکرولیتر از آموده پروتئینی مربوط به هر لاین، با سه میکرولیتر بافرLoading (محلول ۰/۰۰۲ درصد برومونفول بلو حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در آب مقطر) مخلوط و به هرچاهک اضافه گردید. پروتئین‌های استاندارد مورداستفاده (myosin (205 kDa، B-galactosidase (116 kDa)، phosphorylase B (97 kDa)، bovine serum albumin (66 kDa)، egg albumin (45 kDa) و carbonic anhydrase (29 kDa) بودند. از آموده‌های پروتئینی حداقل دو تکرار در دو نیمه ژل

www.SID.ir

Archive of SID

قرارداده شد، بنحوی که هر نیمه ژل تکرار نیمه دیگر آن باشد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت و شدت جریان متغییر به مدت چهار ساعت انجام گردید. ژل از صفحات شیشه جدا و دو نیمهٔ آن از هم بریده شد. یک نیمه آن به روش Weber and Osborn (1969) و با محلول ۰/۱درصد کوماسی بلو در محلول متانول ـ آب ـ 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 وخط 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 ساخت شرکت Hoefer و به روش پیشنهادی شرکت سازنده (electro-blot) انجام گردید (Hoefer Scientific Instruments,USA).

٤-٥- تعیین تعداد کانون‌های ژن الحاقی در هر یک از لاین‌های تراژن

در ناحیه T-DNA مربوط به حامل pBI-PC5، ژن PVY-CP بسیار نزدیک به ژن نئومایسین فسفوترانسفرازII (NPT II) قرارگرفته 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 تراژن حاصله، بذور نسل اول تهیه شده و ۳۰۰ عدد از آن‌ها در تشتک‌های حاوی محیط کشت هوگلند آگاردار، حاوی ۱۵۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک کانامایسین در هر میلی‌لیتر کشت‌گردید (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 قرارگرفته 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 تراژن تخمین زده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه و بحث

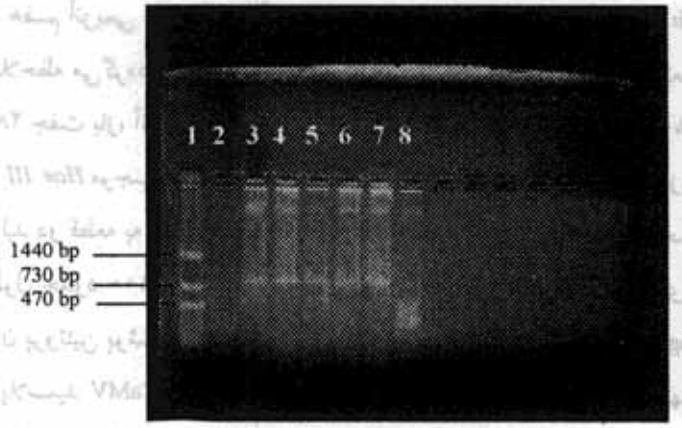
۱-همسانه سازی ژن PVY-CP در حاملین pCaMV و pBin19

در این بررسی، به منظور همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی از روش PCR استفاده گردید. پس از انجام واکنش PCR، یک باند با اندازهٔ تقریبی ۸۰۰ جفت باز در ژل آگارز مشاهده‌گردید (شکل۳)، که با اندازهٔ قطعهٔ ژن PVY-CP مطابقت داشت. نتایج حاصله از هضم آنزیمی این قطعه با آنزیم‌های برشی *Avi II ،Bsm I ،Hae III ،Sfu I* و *Tru 9I* در شکل ٤ 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، ۲۸۰و ۳۷۰ جفت باز، آنزیم *Hae III* موجب تولید دو قطعه به طول حدود ۱۳۰ و ٦٦٠ جفت باز، آنزیم *Sfu I* موجب تولید دو قطعه به طول حدود ۲٤۰ و ٥٦٠ جفت باز و آنزیم *Tru 9I* موجب تولید سه قطعه به طول حدود ۱۰۰، ۲٤۰ و ٤٥۰ جفت باز گردید. این حالت با ترادف‌های گزارش شده در مورد ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک PVY مطابقت دارد (Robaglia *et al.*, 1989).

پلاسمید pCaMV نوترکیب که ژن PVY-CP در آن بطور کامل و در جهت صحیح ٥' به ٣' 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، ٤، ٦، ۷، ۸، ۱۱و ۱۲ درشکل۵) نموده و کلنی‌هایی که این ژن در جهت معکوس (٣' به ٥') به پلاسمید pCaMV آنها اتصال یافته بود، تولید قطعات حدود ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی (ستونهای ۳ و ۵ در شکل۵) نمودند. کلنی شماره ۵ (ستون ٦، 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 استفاده‌شد. نتیجه این واکنش در شکل ٦ 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 *Avi II ،Bsm I ،Hae III ،Sfu I* و *Tru 9I* به روی آن، تایید کننده مطابقت آن با ژن PVY-CP بود. کلنی شماره AG-PVY-14 که دارای ژن PVY-CP بود، جهت تراژن نمودن بافت گیاهی انتخاب گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

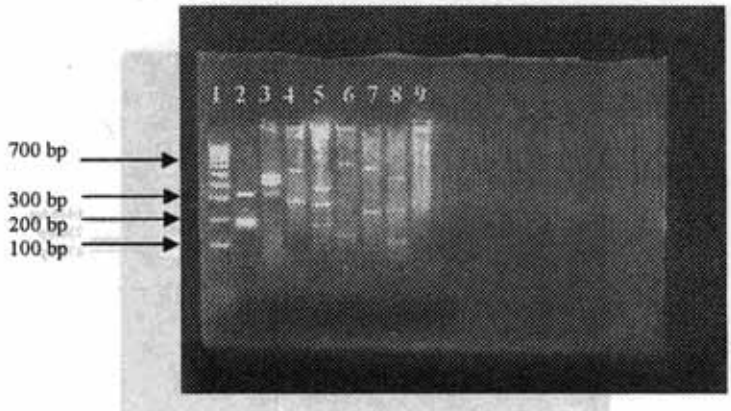


شکل ۳ : نتایج حاصله از الکتروفورز نمونه های مربوط به واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در ژل آگاروز. پس از انجام واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ژن PVY- CP. ستون ۱ : مارکر وزن ملکولی شامل پلاسمید pUC18 برش یافته توسط آنزیم برشی Taq که تولید قطعات ۱۴۴۴، ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت نوکلئوتیدی نموده است . ستونهای ۳ تا ۷ : قطعه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

Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR producs 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)

www.SID.ir

Archive of SID

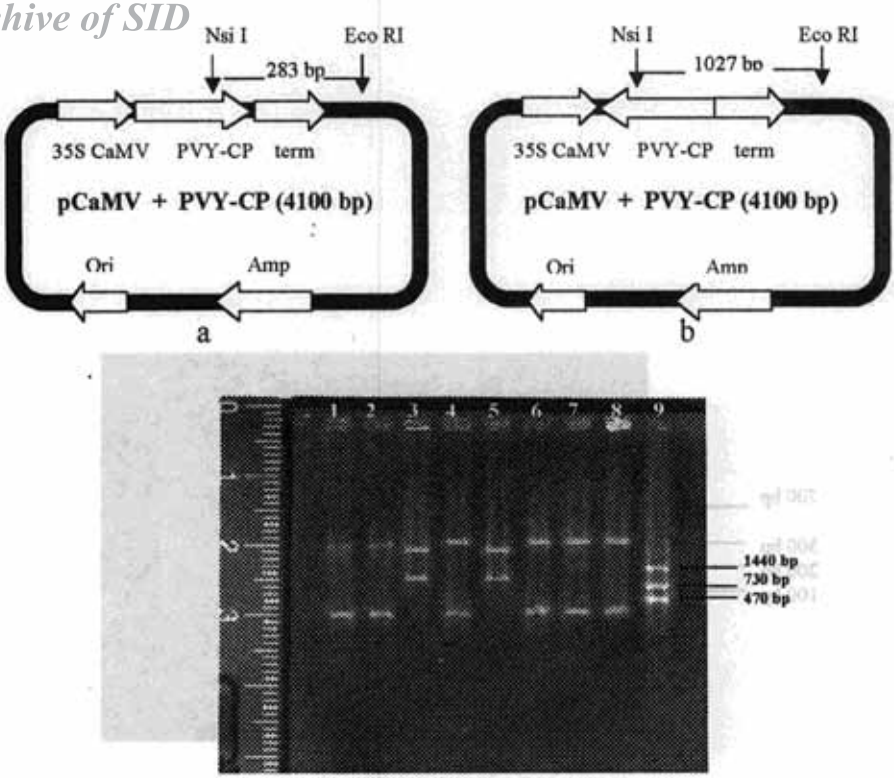


شکل ٤ : نتایج حاصله ازهضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با آنزیمهای برشی Avi II, BsmI, Hae III, Sfu I,Tru 9I ستون های ١ : مارکر وزن ملکولی ، ٤ : برش با AviII منجر به تولید دو قطعه ٢٨٠ و ٥٢٠ جفت نوکلئوتیدی، ٥: برش با Bsm I موجب تولید سه قطعه ١٧٠ ، ٢٨٠ و ٣٧٠ جفت نوکلئوتیدی، ٦ : برش با Hea III منجر به تولید دو قطعه ١٣٠ و ٦٦٠ جفت نوکلئوتیدی، ٧ : برش با SfuI موجب تولید دو قطعه ٢٤٠ و ٥٦٠ جفت بازی و ٨ : برش با Tru 9I موجب تولید سه قطعه ١٠٠ ، ٢٤٠ و ٤٥٠ 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.

www.SID.ir

Archive of SID

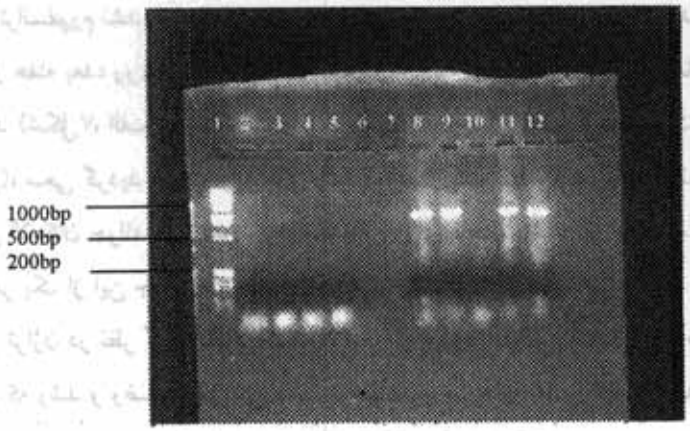


شکل ۵ : نقشه تحدید دو کاست بیانی الحاق شده با پلاسمید pCaMV : a) الحاق ژن PVY-CP در جهت صحیح (Direct) ۵ به ۳ b)الحاق ژن PVY-CP در جهت ۳ به ۵ (Antisense). c) نتایج حاصله از الکتروفورز ژل آگارز مربوط به بررسی صحیح بودن وضعیت الحاق قطعه ژن PVY-CP به پلاسمید pCaMV، ستونهای ۱، ۲، ٤، ٦، ۷، ۸ : پلاسمیدهای نوترکیب 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 دراین 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 ١٤٤٤، ٧٣٦ و ٤٧٦ 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

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦- نتیجه حاصله از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز روی پلاسمیدهای pBI-PC5 استخراجی از کلنی های نوترکیب آگروباکتریوم، بمنظور تایید وجود قطعه الحاقی PVY- CP در آنها. ستونهای : ۱: مارکر وزن ملکولی ، ۲ تا ٥ : شاهد منفی شامل حامل pBIN19 فاقد قطعه الحاقی. ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲: پلاسمیدهای pBI-PC5 استخراجی از کلنی های نوترکیب اگروباکتریوم 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

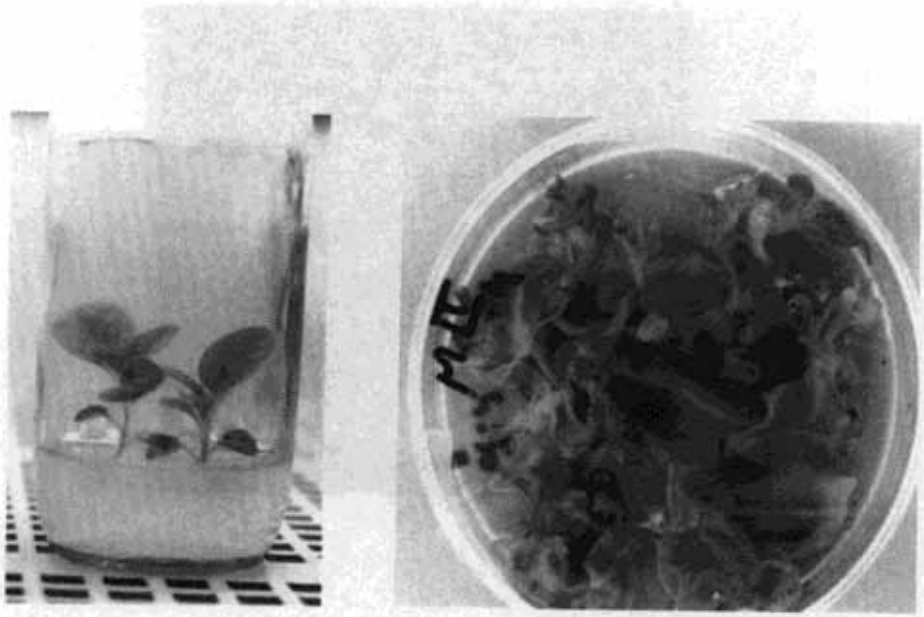
حدود دو هفته پس از انتقال قطعات برگی به محیط کشت MII، توده های سفید بافت پینه (callus) در حاشیه قطعات برگی مشاهده شد. نواحی از قطعات برگی که سلولهای آنها ترانسفورم نشده بودند، از حاشیه شروع به زرد شدن نموده و خشک شدند. حدود سه تا چهار هفته بعد، روی توده های بافت پینه در حاشیه قطعات برگی، جوانه های کوچکی ظاهر شدند (شکل۷، 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 پدیدهٔ مستقل ترانسفورماسیون بوده و به عنوان یک لاین تراژن در نظر گرفته شود (شکل۷، ب). از حدود ٤٠ لاین انتقالی به محیط (MIII)، ۳۱ لاین که رشد و وضعیت مناسبی داشتند، جهت بررسی‌های 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 ٤٨ میکروگرم به ازای هر گرم بافت برگی تازه بود. حدود ۰/٦ میکروگرم از دی.ان.ای استخراجی از هر لاین و گیاه شاهد، جهت واکنش زنجیره‌ای 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 لاین‌ها و نیز در شاهد مثبت، باندی به اندازهٔ تقریبی ۸۰۰ جفت باز مشاهده گردید که نشان‌دهندهٔ وجود ژن PVY-CP در ژنوم این گیاهان بود. در ستون‌های 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 آنزیم‌های برشی *Avi II*، *Bsm I*، *Hae III*، *Sfu I* و *Tru 9I*، نشان‌دهنده مطابقت این قطعه با ترادف ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک ویروس Y سیب زمینی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

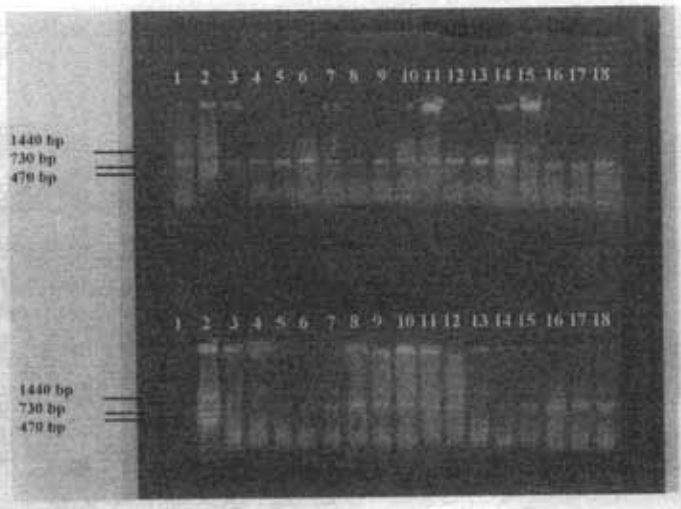


شکل ۷- (I) جوانه های کوچک ظاهر شده در حاشیه قطعات برگی. (II) گیاهچه های تراریخت ریشه دار شده در محیط ریشه زایی

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

www.SID.ir

Archive of SID



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 ۱۸ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۱۰، ۱٤، ٦، ۲۱، ۲، ۱۵، ٤، ۱۲، ۱۳، ۲۷، ۳۰، ۲٤، ۲۲، ۷، ۳۱ و ۲٦.

ردیف پایین، ستونهای ۱ : خالی، ۲: مارکر وزن ملکولی، ۳ : شاهد منفی (شامل گیاه تراژن با pBIN19 فاقد ژن الحاقی)، ٤ و ۱۳ : بترتیب لاینهای ۱۱ و۱۸ که تولید هیچ باندی نکرده اند، ۵ تا ۱۲ و ۱٤ تا ۱۸ : بترتیب مربوط به لاینهای تراژن شماره های ۱۹، ۲۸، ۹، ۳، ۱۷، ۲۳، ۱، ۸، ۲۰، ۵، ۲۹، ۱٦ 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.

www.SID.ir

Archive of SID

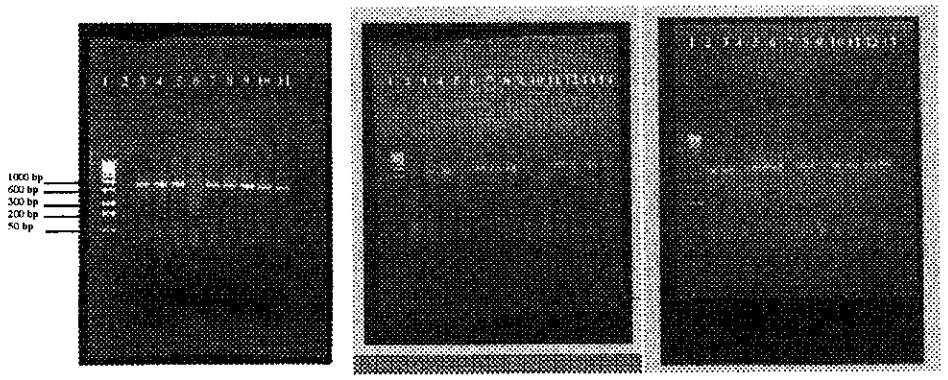
متوسط میزان آر.ان.ای کلی استخراجی از بافت گیاه با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation (شرکت Roche، آلمان)، حدود ۲۵ میکروگرم به ازای هر ۰/۳ گرم بافت برگی بود. جهت حذف هرنوع بقایای احتمالی دی.ان.ای در نمونه‌های آر.ان.ای استخراجی، از آنزیم RNase-free DNase (شرکت Roche، آلمان) استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون RT-PCR بر روی آر.ان.ای استخراجی از گیاهان تراژن در شکل ۹ ارائه شده است. پس از الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR در ژل آگارز، به غیر از دو لاین TCP۱۱ و TCP۱۸، در ستون مربوط به سایر لاین‌ها یک باند به اندازهٔ تقریبی ۸۰۰ جفت باز مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ حضور مولکول‌های آر.ان.ای رونوشت برداری شده از ژن الحاقی PVY-CP در این لاین‌ها بود. در نمونه‌های مربوط به لاین‌های شماره TCP۳، TCPV، TCP۱۱، TCP۱٤، TCP۱۸، TCP۱۹، TCP۲٦ هیچگونه باندی باندازه تقریبی ۸۰۰ 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 آلودگی به دی.ان.ای نیز هیچگونه باندی با اندازه ۸۰۰ جفت باز مشاهده نشد که نشان‌می‌دهد نمونه‌های آر.ان.ای استخراجی هیچگونه آلودگی به دی.ان.ای گیاهی نداشته اند.

لاین‌های گیاهان تراژن، از نظر تولید و حضور پروتئین PVY-CP در آنها، با استفاده از روش سرولوژیک TAS-ELISA و وسترن بلات مورد بررسی قرارگرفتند. بر اساس نتایج حاصله، واکنش مثبتی دال بر تولید و وجود پروتئین پوششی PVY در این لاین ها مشاهده نگردید. دقت تشخیصی روش TAS-ELISA و وسترن بلات بکاررفته در این بررسی به ترتیب برابر با حدود ۲۰ و یک نانوگرم ویروس خالص در هر ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی بود.

نتایج حاصله از تعیین تعداد مکان‌های ژنی NPT II که معادل مکان‌های ژنی PVY-CP بود، در جدول یک ارائه شده است. لاین TCP3 دارای ٤ کانون ژنی، لاین‌های TCP14 و TCP22 دارای ۳ 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.

www.SID.ir

Archive of SID



(III) (II) (I)

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

(I)ستونهای ۱ : مارکر وزن ملکولی، ۲ تا ٦ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥

۷ : شاهد منفی، ۸ تا ۱۲ : لاینهای تراژن بترتیب شماره ٦ تا ۱۰ ، ۱۳ : شاهد مثبت

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

۱٤ : شاهد مثبت.

(III) ستونهای ۱ : مارکر وزن ملکولی ، ۲ : خالی، ۳-۱۱ : 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.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصله از تاثیر آنزیمهای برشی *Avi II*، *Bsm I*، *Hae III*، *Sfu I* و *Tru 9I* بر روی ژن PVY-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 که فاقد رمزه (کدون) شروع بود، ترانسفورم گردیدند. با استفاده از آزمون PCR، وجود ژن الحاقیPVY-CP در ۲۹ لاین از ۳۱ لاین توتون مقاوم به کانامایسین مورد تایید قرارگرفت. دو لاین TCP11 و TCP18 فاقد ژن الحاقی PVY-CP بوده و رشد آنها در محیط کشت آنتی‌بیوتیک احتمالا 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 لاینها 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(Metzlaff *et al.*, 1997 ، Matzke *et al.*, 1989). خاموشی ژن الحاقی در دو حالت رونوشت برداری (transcriptional) و پس از رونوشت برداری (post-transcriptional) می تواند رخ دهد(Matzke and Matzke, 1995 ، Matzke *et al.*, 1989). بر این اساس، در گیاهان تراژن با یک ژن الحاقی معین، سطوح متفاوتی از بیان ژن در سطح آر.ان.ای و پروتئین مشاهده می گردد. 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 یا 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 (مثلا درصد GC) دی.ان.ای خارجی باشد. مشخص شده است که در برخی موارد، ممکن است بیش از یک

www.SID.ir

Archive of SID

نسخه از تراژن در ژنوم گیاه الحاق 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 متیله 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 وسترن‌بلات به کمک آنتی‌بادی تک همسانه‌ای استفاده شد. باتوجه به اینکه تراژن PVY-CP بکار رفته در این بررسی فاقد رمز شروع بود، همانگونه که انتظار می رفت، در هیچیک از لاین‌های تراژن وجود پروتئین پوششی PVY قابل تشخیص نبود. بر اساس نتایج حاصله از شاهدها، دقت آزمون‌های وسترن‌بلات و TAS-ELISA در تشخیص پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی بترتیب در حدود ۱ و ۲۰ نانوگرم ویروس خالص در هر ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی بود.

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

سپاسگزاری:

این مقاله قسمتی از پایان نامه دوره دکتری نوسینده اول می باشد. بخش اعظم هزینه های این تحقیق توسط سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی در قالب بورس تحصیلی برای نویسنده اول، تامین شده است که بدین‌وسیله از مسئولین این سازمان تشکر می گردد. از پرسنل بخش تحقیقات بیوتکنولوژی و بخش تحقیقات بیولوژی مولکولی انستیتوپاستور ایران، بخش تحقیقات ویروس های گیاهی موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تهران-اوین

www.SID.ir

Archive of SID

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

نشانی نگارندگان: دکتر رضا پوررحیم، بخش تحقیقات ویروس های گیاهی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱٤٥٤-۱۹۳۹٥، 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.

www.SID.ir