

القای مقاومت به ویروس موزائیک خیار با استفاده از سازه سنجاق سری ژن 2b*

INDUCTION OF RESISTANCE TO CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV) USING HAIRPIN CONSTRUCT OF 2B GENE

سودابه کاوسی پور^{۱*}، علی نیازی^۱، کرامت‌اله ایزدپناه^۲، علی‌رضا افشاریفر^۲ و محسن یاسایی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۳۰)

چکیده

اغلب ویروس‌های گیاهی و جانوری با رمزگذاری پروتئین‌های مهارکننده خاموشی ژن پس از ترانوئسی از خود محافظت می‌کنند. استفاده از مقاومت به واسطه RNA یکی از روش‌های مؤثر مهندسی ژنتیک در ایجاد مقاومت به ویروس‌ها محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر امکان القای مقاومت نسبت به ویروس موزائیک خیار (CMV) با استفاده از ترادفی از چارچوب خوانش ژن 2b این ویروس که پروتئین سرکوب‌کننده خاموشی ژن را رمزگذاری می‌کند بررسی شد. بدین منظور یک سازه سنجاق سری واجد اینترون (S2) با استفاده از ترادفی از ژن مورد اشاره ساخته شد. هم‌چنین از سازه فاقد ترادف ویروس (S1) نیز به عنوان شاهد استفاده شد. ابتدا سازه‌ها در حامل PHANIBALL ساخته و سپس به حامل بیان گیاهی pART27 منتقل شدند. از سویه GV3101 آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) برای تولید توتون تراریخت استفاده شد. تعداد ۴۰ گیاه تراریخت واجد سازه S2 باززایی و به خاک منتقل شدند و سپس به منظور ارزیابی مقاومت آنها نسبت به CMV، با این ویروس مایه‌زنی شدند. نتایج آزمون الیزا و نیز علایم ظاهری گیاهان نشان داد که به ترتیب ۳۳ و ۳۰ درصد از گیاهان تراریخت نسبت به ویروس مقاوم بوده و یا در بروز علایم و آلودگی تأخیر داشتند.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک خیار، خاموشی ژن پس از ترانوئسی، سرکوب‌کننده خاموشی ژن، مقاومت، گیاهان تراریخت، سازه

سنجاق سری

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazi@shirazu.ac.ir

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شیراز

۲. به ترتیب استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳. استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

مقدمه

به CMV برای دستیابی به درجاتی از مقاومت در توتون استفاده شده است (Cuozzo *et al.* 1988, Jacqumond *et al.* 2001). هم‌چنین که گیاهان کدوی تراریخت واجد این ژن نیز مقاومت خوبی را در مزرعه نشان داده‌اند (Tricoli *et al.* 1995). علاوه بر این گیاهان تراریخت گوجه‌فرنگی و خیار مقاوم به CMV با استفاده از این روش تولید شده‌اند (Gielen *et al.* 1996, Saito *et al.* 1991). استفاده از ژن رپلیکاز ویروس (Hellwald and Palukaitis *et al.* 1995) و نیز آر ان ای ستلایت (sat-RNA) نمونه‌های دیگر مقاومت مشتق از بیمارگر هستند (McGarvey *et al.* 1990). مقاومت به وسیله رپلیکاز علیه CMV نیز ایجاد شده است. جهت ایجاد مقاومت به واسطه ژن رپلیکاز از ژن کامل، قطعه‌ای از ژن و یا ژن جهش یافته آن استفاده شده است. این نوع مقاومت گستردگی خیلی کمتری نسبت به مقاومت به واسطه CP دارد. هر چند مقاومت به واسطه ژن رپلیکاز سخت است اما کارایی بالایی داشته است. هم‌چنین گیاهان تنباکو تراریختی که نسخه‌هایی از CMV sat-RNA را بیان می‌کردند، پس از مایه‌زنی با CMV، علایم ضعیف‌تری را نشان می‌دادند (Dasgupta *et al.* 2003).

از رهیافت خاموشی ژن پس از ترانویسی (post transcriptional gene silencing, PTGS) نیز برای ایجاد مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است (Lennfors *et al.* 2006). سازه‌های مختلف به منظور افزایش کارایی این سازوکار و ایجاد مقاومت مؤثر معرفی شده‌اند که سازه‌های سنجاق سری دارای اینترون (intron hair pin-loop, ihp-loop) از عملکرد مناسبی برخوردار بوده است (Smith *et al.* 2000). ژن 2b ویروس موزائیک خیار (CMV 2b) با دخالت در پیام خاموشی باعث سرکوبی خاموشی ژن به صورت مستقیم

براساس گزارش سازمان خواربار جهانی (FAO STAT, 2006)، ایران با سطح زیر کشت ۲۶۰ هزار هکتار و عملکردی معادل چهار میلیون و هفتصد و هشتاد هزار تن، رتبه سوم تولید کدوئیان را در جهان دارا می‌باشد. ویروس موزائیک خیار (CMV) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های خانواده کدوئیان است که از نظر اقتصادی حائز اهمیت بسیار بوده، بزرگ‌ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس‌های گیاهی داراست (Palukaitis *et al.* 1992, Palukaitis *et al.* 2003). گیاهان آلوده به این ویروس ممکن است بسیار ضعیف شده و به کلی نابود شوند. در این گیاهان نه تنها میزان تولید کاهش می‌یابد بلکه از کیفیت محصول نیز کاسته می‌شود. تعداد اندکی از ژن‌های مقاومت به ویروس موزائیک خیار از جمله RT4-4, At-eIF4E1, RCY1, At-eIF4G شناسایی شده‌اند (Seo *et al.* 2006 Takahashi *et al.* 2001, Yoshii *et al.* 2004).

گسترش وسیع ویروس موزائیک خیار، دامنه میزبانی وسیع آن (Francki *et al.* 1979)، محدودیت در تعداد ژن‌های مقاومت و نیز عدم کارایی روش‌های سنتی اصلاح نباتات (Watterson 1993)، منجر به انجام مطالعاتی به منظور ایجاد مقاومت نسبت به این ویروس از طریق مهندسی ژنتیک و مقاومت مشتق از بیمارگر (Pathogen Derived Resistance, PDR) گردیده است. این راهبرد براساس استفاده از ژن‌ها یا ترادف‌هایی با منشأ ویروس و انتقال آنها به گیاه میزبان می‌باشد (Fulton 1986). در PDR از نواحی مختلف ژنوم ویروس مانند ترادف رمز کننده پروتئین پوششی (coat protein mediated resistance, CPMR) استفاده شده است. از این روش برای ایجاد مقاومت نسبت

تحقیق حاضر امکان ایجاد مقاومت به ویروس موزائیک خیار به کمک ترادف چارچوب 2b، سطوح مقاومت توتون نسبت به ویروس مزبور که توسط سازه سنجاچ سری دارای اینترون القاء شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

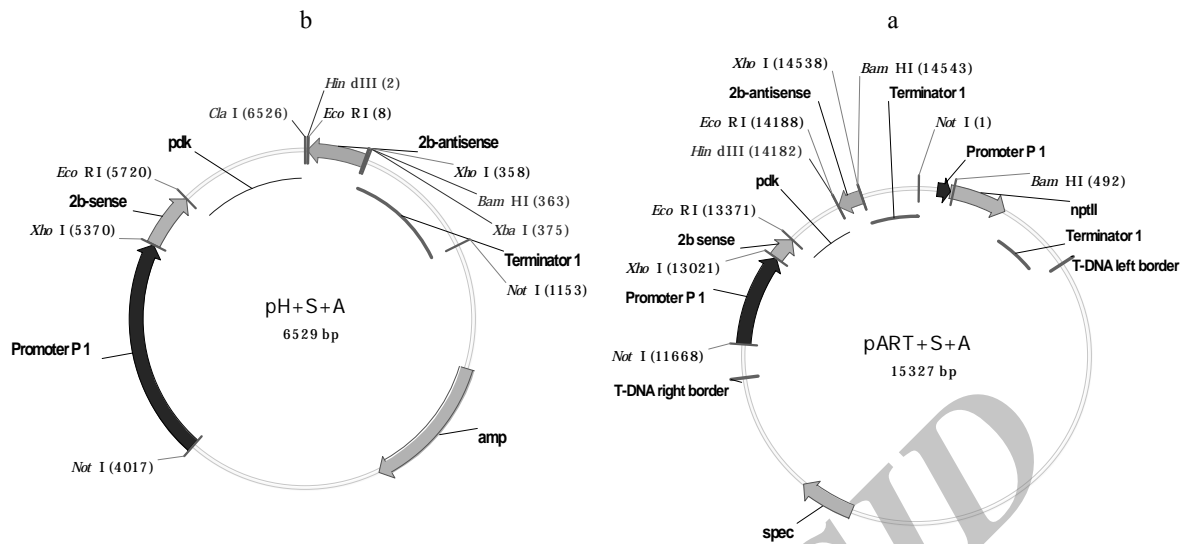
روش بررسی

ساخت سازه

در این تحقیق دو سازه S1 (سازه شاهد بدون ورود ترادفی از ویروس) و سازه S2 (سازه سنجاچ سری ژن 2b) طراحی و ساخته شد. از ناقل‌های pHANNIBAL و pART27 به ترتیب با رس شماره‌های AJ311872 (در سامانه NCBI) و AJ31187 (در سامانه EMBL) (شکل ۱) استفاده شد. از این دو ناقل به ترتیب برای همسانه‌سازی قطعات سنس و آنتی سنس در دو طرف اینترون و تراریخت‌سازی توتون توسط آگروباکتریوم استفاده شد. ناقل pHANNIBAL دارای پیش بر CaMV35S و خاتمه‌دهنده OCS می‌باشد. ناقل pART27 یک ناقل دوگانه است که دارای نواحی مرزی چپ و راست به منظور انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به سلول گیاهی می‌باشد. جهت ساخت سازه سنجاچ سری، ابتدا جفت آغازگر CMV53F/61R که دارای دنباله‌هایی با جایگاه برشی خاص جهت ورود قطعات سنس و آنتی سنس به ناقل PHANNIBALL بودند، براساس ترادف ژن CMV 2b (رس شمار AY512659 در پایگاه NCBI) و با استفاده از نرم‌افزار 9 vector NTI طراحی شدند (جدول ۱، شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طی برنامه‌ای شامل ۳ دقیقه و اسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه دمایی ۹۴، ۵۴ و ۷۲ درجه سلسیوس هر یک به مدت یک دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲

می‌شود. عدم فعالیت این پیام با کاهش قابل توجه متیله شدن دی ان ای تراریخت همراه خواهد بود. پیام‌های خاموشی سیتوپلاسمی که متیله شدن دی ان ای را در هسته هدایت می‌کنند نقاط کلیدی هدف این ژن می‌باشند. همچنین این ژن از گسترش درون سلولی خاموشی ژن جلوگیری می‌کند (Guo and Ding 2002). CMV 2b می‌تواند با دخالت در مسیر سالیسیلیک اسید، مهارکننده مقاومت به ویروس باشد. سالیسیلیک اسید مقاومت به ویروس را با مکانیسم مداخله آر ان ای (RNA interference, RNAi) که به وسیله CMV 2b مورد هدف قرار می‌گیرد ایجاد می‌کند (Ji and Ding 2001). بر این اساس مقاومت ایجاد شده (به واسطه خاموشی ژن) نسبت به ویروس وای سیبزمینی (PVY) در پی آلودگی به CMV شکسته شده است (Mitter et al. 2003). ترادف ژن 2b یک پروتئین هسته‌ای را که برای بیماری‌زایی و مهار PTGS ضروری می‌باشد را رمز گردانی می‌نماید.

این پروتئین دارای یک سیگنال هسته‌ای غنی از آرژنین می‌باشد (یک لیزین به همراه ۵ آرژنین KRRRRRR) که احتمالاً PTGS را در هسته سلول مهار می‌کند. توانایی مهارکنندگی 2b به حضور سیگنال هسته‌ای (nuclear localization signal, NLS) وابسته است (Lucy et al. 2000). ناحیه غنی از آرژنین در نزدیکی NLS برای اتصال به آر ان ای دو لا (dsRNA) مهم می‌باشد (Mayers et al. 2000). پروتئین 2b بیان شده در *E. coli* به آر ان ای های کوچک (siRNA) متصل نمی‌شود اما با اتصال به AGO1 (Argonaute) خاموشی را مهار می‌کند (Zhang et al. 2006). این در حالی است که گزارشی مبنی بر مهار خاموشی با هدف قرار دادن siRNA توسط 2b در دست است (Goto et al. 2007). در



شکل ۱. a: ساختار ناقل *pHANNIBAL+S+A* جایگاه برشی آنزیم‌های *BamHI*, *XhoI*, *EcoRI* و *HindIII* (جهت ورود قطعات سنس و آنتی سنس) و *NotI* (جهت خروج سازه از این ناقل و الحاق در *pART27*)، پیش بر 35S و ویروس موزائیک کلم گل و خاتمه‌دهنده OCS و نیز اینترون *pdk* نشان داده شده است. b: ساختار ناقل دوگانه *pART27+S+A*. جایگاه برش آنزیم *NotI*، مرز چپ و راست و پیش بر نشان داده شده است. ژن *2b* به صورت سنس و آنتی سنس در دو طرف اینترون، پیش بر و خاتمه‌دهنده مشخص شده است.

Fig. 1. a: Schematic map of *pHANNIBAL+S+A*. Restriction sites of *BamHI*, *XhoI*, *EcoRI* and *HindIII* (for sense and antisense insertions) and *NotI* (for cassette excision from this vector and ligation into *pART27*), 35S promoter of CaMV, OCS terminator and *pdk* intron are shown. **b:** structure of binary *pART+S+A* vector. Restriction site of *NotI*, left and right borders and promoter are shown.

جدول ۱. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primers used in this research

نام آغازگر	آنزیم‌های برشی	دمای اتصال	ترادف آغازگر
Primer name	Restriction enzyme	T _a (°C)	Primer sequence (5'→3')
CMV53F	<i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>	60	<u>AGGATCCTCGAGG</u> TTTTGTATATCTGAGTTC CGGGT
CMV61R	<i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i>	60	CA <u>AGCTTGAATTCAT</u> CAGCTAGCAAACGAC CCTTCGGCCCA
F1NPT	-	55	AGA TCC CGT GGG CGA AGA ACT CCAGC
R1NPT	-	55	GG ATC GTT TCG CAT GAT TGA ACA AGA TGG

Underlined nucleotides show restriction sites

T_a: Annealing temperature

تحت نام pH+S+A در شکل ۱ نشان داده شده است. وجود قطعات سنس و آنتی سنس با استفاده از هضم آنزیمی با *EcoRI* و یا *XhoI* تأیید شد. به این ترتیب ژن 2b به صورت سنس و آنتی سنس در دو طرف ایترون قرار داده شد. در مرحله بعد، سازه فوق با استفاده از آنزیم *NotI* جداسازی و در جایگاه آنزیمی *NotI* موجود در ناقل pART27 همسانه سازی شد. همسانه فوق به نام pART+S+A در شکل ۱ نشان داده شده است. صحت این همسانه استفاده از آزمون های PCR و هضم آنزیمی با آنزیم برشی *NotI* تأیید شد. سازه pARTS1 به عنوان شاهد در این تحقیق طراحی شد. این سازه که واجد هیچ ترادف ویروسی نبود با برش ناقل pHANNIBAL با استفاده از آنزیم *NotI* و الحاق قطعه خارج شده در ناقل pART27 خطی شده با آنزیم فوق به دست آمد. سازه های ساخته شده با استفاده از روش یخ و ذوب در اگروباکتریوم مستعد (سویه GV3101) همسانه سازی شد (Sambrook and Russel 2001). حضور همسانه های مورد نظر در اگروباکتریوم با استفاده از PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های مناسب تأیید شد. همسانه یاد شده در -۷۰ درجه سلسیوس و به منظور تراریخت سازی نگهداری شد.

مواد گیاهی

بذرهای توتون رقم Xanthi به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (۳۰۰ μL هیپوکلریت سدیم ۵٪، ۶ μL تریتون ایکس ۱۰۰ و ۷۰۰ μL آب مقطر) غوطه ور و سپس پنج بار با آب مقطر شسته شدند. بذرها به صورت فاصله دار بر روی محیط MS (Murashige and Skoog 1962) با نصف غلظت قرار داده و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ الی ۲۸ درجه سانتی گراد در گلخانه نگهداری

درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. با انجام این واکنش و با استفاده از قالب CMV، قطعه ای به طول ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد.

محصول واکنش با استفاده از کیت همسانه سازی (InsTAclone PCR Cloning kit, Fermentas) در ناقل pTZ57R همسانه سازی و سپس به *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد. باکتری های حامل این همسانه در محیط جامد LB حاوی ۵۰ mg/L آمپی سیلین و در حضور IPTG و X-gal انتخاب شدند. به منظور اطمینان از وجود قطعه مورد نظر از روش colony PCR استفاده شد. وجود قطعه مورد نظر پس از استخراج پلاسمید و با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم های *XhoI* و *EcoRI* تأیید شد. این همسانه pTZ2b نامیده و در دمای -۷۰ نگهداری شد. برای ساخت سازه سنجاک سری ابتدا همسانه pTZ2b و pHANNIBAL با استفاده از جفت آنزیم *EcoRI* و *XhoI* هضم شدند. محصول هضم همسانه pTZ2b (قطعه ۴۰۰ جفت بازی) با استفاده از کیت استخراج از ژل (Qiagen) خالص سازی گردید و سپس با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (Metabion) به حامل خطی شده pHANNIBAL متصل شد. این همسانه به *E. coli* سویه DH5α منتقل و pH+S نامیده شد. باکتری حامل همسانه در محیط حاوی آمپی سیلین به میزان ۵۰ mg/L انتخاب شد. وجود قطعه سنس با استفاده از PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های *EcoRI* و *XhoI* تأیید شد.

به منظور الحاق قطعه آنتی سنس ژن 2b ابتدا همسانه pTZ2b با آنزیم *BamHI* و *HindIII* هضم و محصول هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۱٪ تفکیک و اندازه قطعات با نشانگر DNA تأیید شد. قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ژل استخراج و به حامل pH+S که با همین دو آنزیم خطی شده بود الحاق شد. این همسانه

شده و رشد نوساقه‌ها به ۳-۴ سانتی‌متر رسید انتقال به محیط کشت حاوی کانامایسین 100 mg/L و سفوتاکسیم 200 mg/L صورت پذیرفت. نوساقه‌های رشدیافته به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. این محیط با پایه MS حاوی هورمون (indole-3-butyric acid) IBA با غلظت mg/L ۲ به همراه آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم بود. گیاهچه‌های ریشه دار به گلدان‌های حاوی ترکیبی از ماسه، پرلیت، پیت و ورمیکولیت به نسبت‌های ۴۰٪، ۴۰٪، ۵٪ و ۱۵٪ منتقل شدند. پس از آبیاری مناسب با نصف غلظت MS، گلدان‌ها با پلاستیک پوشانده و در شرایط گلخانه‌ای قرار داده شدند. طی ۷ الی ۱۴ روز گیاهان در شرایط نور و دمای مناسب گلخانه سازگار شدند.

تأیید تراریختی بوته‌ها

برای تأیید حضور سازه‌ها در گیاهان تراریخت از آزمون PCR با به‌کارگیری جفت آغازگرهای اختصاصی CMV53F/61R و نیز F1NPT/R1NPT (به منظور تأیید حضور ژن NPTII در سازه) (جدول ۱) استفاده شد. سازه pARTS1 به عنوان شاهد در این تحقیق طراحی شد. این سازه که واجد هیچ ترادف ویروسی نبود با برش ناقل pHANNIBAL با استفاده از آنزیم *NotI* و الحاق قطعه خارج شده در ناقل pART27 خطی شده با آنزیم فوق به‌دست آمد. آزمون PCR با استفاده از ۱۰۰-۵۰ نانو گرم دی‌ان‌ای ژنومی استخراج شده از بوته‌های تراریخت و طبق برنامه‌ای که قبلاً شرح داده شد، انجام گردید. استخراج DNA براساس روش ساچی معروف و همکاران (Saghai-Marooft et al. 1984) انجام شد.

آلوده‌سازی گیاهان به ویروس

در این تحقیق از زادمایه CMV موجود در مرکز تحقیقات

شدند. نمونه برگ‌های سترون از گیاهان رشد یافته از این بذور تهیه شد.

تراریخت‌سازی توتون

اگروباکتریوم نوترکیب GV3101 حاوی سازه‌های مورد نظر در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک ریغامپیسین و اسپکتینومایسین در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و 150 rpm به مدت یک شب کشت شدند. ریز نمونه‌های برگ‌های سترون شده توتون به مدت ۱۰ دقیقه در مایه اگروباکتریوم $(OD_{600}=1)$ فرو برده و سپس روی کاغذ صافی آب اضافی آنها گرفته شد. ریز نمونه‌ها به محیط MS جامد حاوی هورمون‌های BAP (6-benzyl amino purine) با غلظت 2 mg/L و (1-naphthalene acetic acid) با غلظت 1 mg/L به گونه‌ای که سطح فوقانی برگ‌های بریده شده روی محیط کشت قرار گیرد، منتقل و نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سلسیوس در اتاقک رشد قرار داده شدند. در ۴۸ ساعت بعد از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها روی محیط گزینشگر حاوی غلظت‌های 50 mg/L کانامایسین و 200 mg/L سفوتاکسیم منتقل شدند (در صورت مشاهده آلودگی به اگروباکتریوم ریز نمونه‌ها در محلول 500 mg/L سفوتاکسیم شستشو داده شدند و دوباره روی محیط گزینشگر منتقل شدند). ریز نمونه‌ها در شرایط نوری مناسب (حداقل ۱۰۰۰ لوکس)، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا پدیدار شدن جوانه نگهداری شدند. ریز نمونه‌ها پس از جوانه‌زایی و رشد، هر ۷-۸ روز یکبار به محیط کشت تازه منتقل شدند. در مرحله ۴-۶ برگ‌های جوانه‌ها، انتقال آنها به محیط MS حاوی کانامایسین 75 mg/L و سفوتاکسیم 200 mg/L انجام شد. پس از این که جوانه‌ها دارای تعداد برگ بیشتری

آزمون زیست‌سنجی

پس از مایه‌زنی ۴۰ گیاه بازاریابی شده با زادمایه CMV، ضمن بررسی علائم، نمونه‌برداری از گیاهان به منظور انجام آزمون الیزا جهت تعیین آلودگی به CMV انجام پذیرفت. نتایج این آزمون به همراه وضعیت آلودگی در جدول ۲ ارائه شده است. علائم بیماری در گیاهان تراریخت شده با سازه S1 و نیز گیاهان غیرتراریخت حدود ۱۰ روز پس از آلوده شدن به ویروس قابل مشاهده بود (شکل ۵ و جدول ۲). گیاهان تراریخت شده با سازه S2 سه نوع واکنش متفاوت در برابر ویروس را نشان دادند (شکل ۵). در نوع اول علائم بیماری ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی قابل مشاهده بود. این آلودگی با آزمون الیزا نیز به تأیید رسید. در نوع دوم، گیاهان بعد از گذشت ۳۰ تا ۴۰ روز از مایه‌زنی علائم بیماری را با تأخیر نشان دادند (شکل ۵). در نوع سوم، گیاهان هیچ علائمی را نشان نداده، آزمون الیزا نیز عدم آلودگی به ویروس را تأیید نمود. آزمون PCR برای هر سه گروه گیاه تراریخت برای حضور ترادف‌های 2b و NPTII مثبت بود. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود، براساس علائم‌شناسی ۳۳ درصد گیاهان تراریخت مقاوم به ویروس (هیچ‌گونه علائمی را نشان ندادند) و ۳۰ درصد علائم آلودگی را همراه با تأخیر و در آخرین مراحل رشد بروز دادند (علائم خفیف بیماری ۳۰ تا ۴۰ روز پس از تلقیح نشان دادند).

موفقیت در تولید گیاهان مقاوم به CMV به وسیله CP در توتون اولین بار در سال ۱۹۸۸ گزارش شده است (CuoZZO *et al.*, 1988). به‌طور کلی به‌دست آمدن نتایج متفاوت در رابطه با گیاهان تراریخت جهت ایجاد مقاومت نشان‌دهنده پیچیده بودن واکنش بین گیاه و ویروس می‌باشد (Jacqumond *et al.* 2001). با استفاده از سازه حاوی CP در چندین مورد گیاهان مقاوم با موفقیت تولید

ویروس‌شناسی گیاهی پس از تأیید با آزمون الیزا استفاده شد. سه برابر وزن برگ‌های توتون آلوده به ویروس CMV (جدایه کفترک شیراز) در بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH۷، عصاره‌گیری شد و عصاره بر روی بوته‌های توتون تراریخت در مرحله ۴ برگ مایه‌زنی گردید. گیاهان در دو نوبت به فاصله ۱۵ روز با ویروس مایه‌زنی شدند. به منظور اندازه‌گیری غلظت ویروس از الیزای غیرمستقیم (Indirect-ELISA) با آنتی‌بادی‌های تهیه شده در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی مطابق روش کانورس و مارتین (Converse and Martin 1990) استفاده شد.

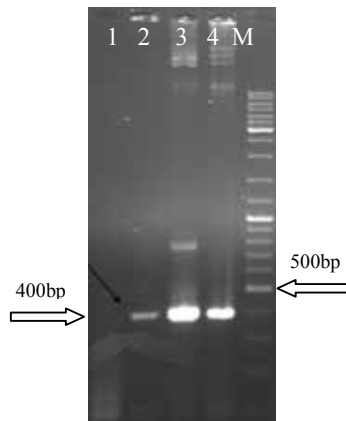
نتایج و بحث

صحت سازه سنجاج سری با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر CMV 53F/61R با ساخت قطعه مورد نظر (۴۰۰ جفت باز) (شکل ۲) و هضم آنزیمی توسط ترکیب آنزیمی موجود بر روی سازه‌ها (شکل ۳) به تأیید رسید.

آزمون تعیین تراریختی بوته‌ها

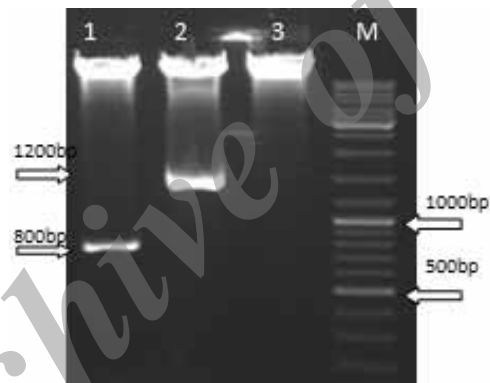
واکنش زنجیره‌ای پلی مرز

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از دی ان ای گیاهان تراریخت با سازه S2، قطعاتی با اندازه‌های ۴۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز را به ترتیب برای جفت آغازگرهای CMV53F/CMV61R و F1NPT/R1NPT تکثیر نمود. این درحالی است که این قطعه‌ها در گیاهان غیر تراریخت تکثیر نشدند در بعضی از این لاین‌ها یک قطعه ۸۰۰ جفت بازی نیز به علت ساختار سنجاج سری سازه تکثیر شد (شکل ۴). تکثیر قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی در گیاهان تراریخت شده با سازه S1 حاکی از تراریختی این گیاهان با این سازه بود.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز کلونی‌های دارای سازه pART+S+A حاوی قطعات سنس و آنتی سنس). راهک ۱، شاهد منفی، راهک‌های ۲ تا ۴ کلونی حاوی قطعات سنس و آنتی سنس و راهک ۵ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 2. Electrophoresis pattern of colony PCR of pART+S+A. Lane 1, negative control; lanes 2-4, colonies containing sense and antisense fragments and lane 5, 100 bp DNA ladder

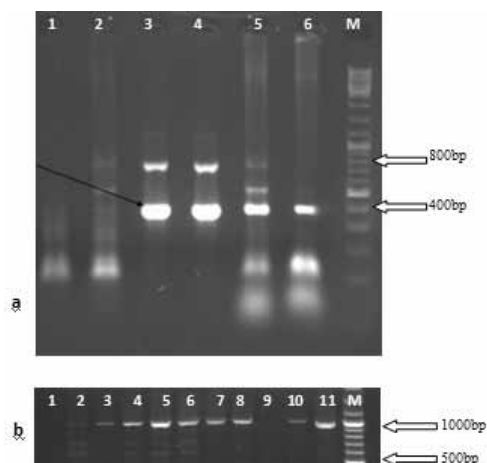


شکل ۳. نقوش الکتروفورزی حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pART+S+A با آنزیم‌های که محل اثر آنها بر روی سازه موجود است. راهک ۱، ناقل هضم شده با آنزیم *EcoRI*، راهک ۲، ناقل هضم شده با آنزیم *XhoI*، راهک ۳، ناقل هضم نشده و راهک ۴ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 3. Electrophoresis pattern of digested pART+S+A construct using appropriate restriction enzymes. Lane 1, digested construct using *EcoRI*; lane 2, digested construct using *XhoI*; lane 3, undigested construct and lane 4, 100 bp DNA ladder

ژن CP در توتون به علت عملکرد ضعیف ادامه پیدا نکرد. از سوی دیگر با استفاده از سازه سنس ژن CP، لاین‌هایی از توتون به وجود آمدند که هیچ‌گونه آلودگی را در شرایط اتافک رشد نشان ندادند. با این حال انتقال همین سازه به گوجه‌فرنگی هیچ نوع مقاومتی را ایجاد نکرد. گیاهان

شده‌اند. هم‌چنین کدو تراریخت مقاوم به CMV، با استفاده از CP ایجاد و در مزرعه مورد آزمون قرار گرفته است (Tricoli *et al.* 1995). هم‌چنین توتون، گوجه‌فرنگی و خیار مقاوم به CMV با این روش تولید شده‌اند (Gielen *et al.* 1996). بیان مترادف آنتی سنس



شکل ۴. نقوش الکتروفورزی محصول PCR برای تأیید تراریختی گیاهان. a: تعیین حضور قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ژن 2b با استفاده از آغازگرهای CMV53F/CMV61R. راهک ۱ گیاه تراریخت با سازه S1 (کنترل منفی)، راهک‌های ۲ تا ۶ گیاه تراریخت شده با سازه S2، راهک ۷ نشانگر مولکولی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت بازی DNA. b: نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای FINPT/R1NPT جهت تأیید تراریختی گیاهان های ۲ و راهک‌های ۳ تا ۸ برای گیاهان تراریخت شده با سازه S2، راهک ۹ برای گیاه غیرتراریخت و راهک‌های ۱۰ مربوط به گیاه تراریخت شده با سازه S1 می‌باشد.

Fig. 4. Electrophoresis pattern of PCR products to confirm plant transformation. a: Amplification of 400 bp of 2b gene using CMV53F/CMV61R primer pairs. Lanes 1 and 2 for non transformed plant, lanes 3-6 for S2 construct transformants, lane 7, DNA 1Kb ladder. b: Amplification of 1000 bp of NPTII gene using FINPT/R1NPT. Lanes 1-7, for S2 transformants; lane 8, for non transformed plant; and lanes 9 and 10 for S1 transformants.

جدول ۲. واکنش گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نسبت به CMV براساس علائم، آزمون PCR و آزمون الیزا

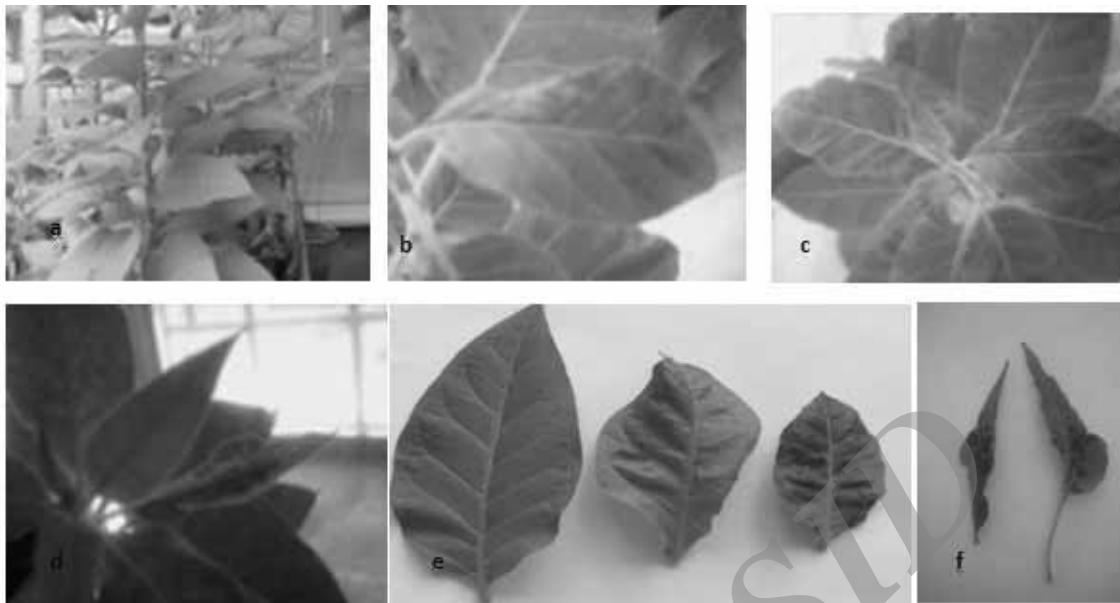
Table 2. Response of transgenic and nontransgenic plants to CMV based on symptomatology, PCR and ELISA assays. Mean of healthy plants absorbance at 405 nm was equal to 0.25 in ELISA.

Type of lines	Infected/Total	Response to CMV according to symptoms	Mean of ELISA value	Established symptoms (days after inoculation)	Transformation tests	
					PCR using NPTII primers	PCR using specific primers
S2	12/40 (30%)	Delay•	0.80	30-40	+	+
	13/40 (33%)	Resistant*	0.24	No symptom	+	+
	15/40 (37%)	Susceptible°	0.99	9-11	+	+
S1	5/5	Susceptible	1.18	9-11	+	-
Untransformed	1/1	Susceptible	1.20	9-11	-	-

*: plants didn't show any symptom

•: plants showed delayed symptoms, 30-40 days after inoculation

°: plants showed obvious leaf mottling, 9-11 days after inoculation



شکل ۵. واکنش گیاهان تراریخت با دو سازه S1 و S2 و غیرتراریخت به ویروس موزائیک خیار. a: گیاهان مقاوم تراریخت شده با سازه S2، b: گیاه تراریخت با سازه S2 که در بروز علائم تأخیر دارد، c: گیاه تراریخت حساس (با سازه S2)، d: گیاه حساس غیرتراریخت. e: از چپ به راست برگ گیاه تراریخت مقاوم، برگ گیاه تراریخت دارای تأخیر و برگ گیاه تراریخت حساس و f: برگ گیاه تراریخت شده با سازه S1

Fig. 6. Response of wild type and transformed tobacco plants to CMV. a: resistant S2 transformed plants; b: delayed transform plant, c: susceptible transformed plant, d: susceptible wild type plant, e: left to right, leave of resistant transformed plant by S2 construct, delayed and susceptible plants and f: leave of transformed plant by S1 construct

علیه CMV در سطوح بالا بوده است. نتایج نشان می‌دهد که سازه‌های سنجاق سری (hpRNA) می‌توانند مقاومت در سطح بالایی را ایجاد نمایند (Welsey *et al.* 2001). سازه IR از پروتئین پوششی ویروس نیز مقاومت را در سطح بالا نشان داده است.

سطوح مقاومت با میزان و سطح siRNA نسبت مستقیم داشته است. به طوری که سطوح siRNA که با افزایش دما به ۲۵ تا ۳۲ درجه سلسیوس افزایش می‌یافت با سطوح افزایش یافته مقاومت همراه بوده است. از سازه سنجاق سری حاوی اینترون برای ایجاد مقاومت علیه CMV استفاده شده است. هدف سازه‌های طراحی شده آر ان ای ویروس موزائیک خیار و یا ترادف CP این ویروس

گوجه‌فرنگی تراریخت با دو ژن CP متعلق به زیر گروه‌های ۱ و ۲ ویروس موزائیک خیار مقاومت بالایی را نشان دادند (Kaniewski *et al.* 1998). از سازوکار PTGS در گیاهان متفاوت برای ایجاد مقاومت به انواعی از ویروس‌ها با موفقیت استفاده شده است (Lennefors *et al.* 2006). سازه‌های مختلف به منظور افزایش کارایی سازوکار خاموشی و در نتیجه ایجاد مقاومت بررسی شده است. در این بین سازه‌های سنجاق سری دارای اینترون از عملکرد خوبی برخوردار هستند (Smith *et al.* 2000). کاربرد ترادف‌های تکرار معکوس (Inverted Repeat, IR) منشأ گرفته از دو قطعه ژنومی ویروس به عنوان روشی به منظور دستیابی به مقاومت بر

سلول گیاهی تجمع یافته، منجر به اشباع شدن RISC و تضعیف اثر ضد ویروسی CMV می‌شوند (Duan et al. 2008). مشاهده نتایج متفاوت در لاین‌های گیاهی تراریخت شده با سازه S2 را می‌توان به چندین دلیل نسبت داد. مقاومت در لاین‌های مقاوم را می‌توان به سطوح احتمالی بالاتر siRNA در مقایسه با گیاهان تراریخت غیرمقاوم نسبت داد. آنچه مسلم است مقدار siRNA ایجاد شده قبل از تلقیح گیاه با ویروس نقش مهمی را در ایجاد مقاومت خواهد داشت. پژوهشگران نشان داده‌اند که لاین‌های گیاهی که قبل از آلودگی به ویروس دارای سطح بالاتری از siRNA بودند، مقاومت بالاتری را در مقابل ویروس نشان دادند و همچنین تولید siRNA با تولید نسخه‌های آر آن ای تراریخت همبستگی ندارد. به نظر می‌رسد که احتمالاً در گیاهان مقاوم siRNA تولیدی راندمان بیشتری نسبت به گیاهان غیرمقاوم دارد. تأیید قطعی این نتایج نیازمند بررسی siRNA در هر لاین گیاهی تراریخت است.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند از آقای دکتر مینگ بو وانگ از مؤسسه تحقیقات CSIRO استرالیا به خاطر در اختیار گذاشتن ناقلین پلاسمیدی و آقای مهندس صادق صادقی و سرکار خانم مهندس آزاده داوودی به دلیل همکاری در تکثیر زادمایه ویروس و نیز ارزیابی مقاومت تشکر نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (65-67) متن انگلیسی مراجعه شود.

بوده است. هفتاد و پنج درصد گیاهان تراریخت شده با سازه IR به طول ۱۵۳۴ نوکلئوتید از ترادف آر. آن. ای دو CMV مقاومت بالایی را نسبت به این ویروس نشان دادند. همچنین سی درصد از گیاهان تراریخت شده با سازه IR با استفاده از آر آن ای دو این ویروس با طول ۴۹۰ نوکلئوتید نیز مقاومت را نشان دادند (Chen et al. 2004).

پیش از این از ترادف ژن مهارکننده HC-Pro و P69 به ترتیب جهت ایجاد مقاومت مؤثر نسبت به *Turnip yellow* و *TuMV Turnip mosaic virus* استفاده شده است. در این پژوهش از miRNA مصنوعی برای خاموش کردن هر دو مهارکننده HC-Pro و P69 استفاده شده است. مقاومت به TuMV و TYMV به ترتیب در ۲۴ و ۱۰۰ درصد بوته‌ها مشاهده القای مقاومت کامل علیه TuMV را می‌توان به تک بخشی بودن ژنوم TuMV نسبت داد (Niu et al. 2006). کیوو و همکاران (Qu et al. 2007) از

ژن 2b جهت ساخت *(shsR2b) short hairpin small RNA* استفاده کردند. این پژوهشگران واکنش گیاهان تراریخت شده را نسبت به ویروس در ۴ گروه طبقه‌بندی نمودند. بر این اساس ۱۴ درصد از گیاهان مقاوم، ۱۱/۶۳ درصد بهبود یافته (Recovered) و ۲۳/۲ درصد علایم را با تأخیر نشان دادند (گیاهان تا ۱۵ روز بعد از تلقیح علایمی را نداشته اما ۶۰ روز بعد از تلقیح علایم را نشان دادند). با توجه به چند بخشی بودن ژنوم CMV، به نظر می‌رسد که آر آن ای‌های یک و سه ژنوم CMV به خوبی آر آن ای زیر ژنومی شماره چهار هدف خاموشی ژن قرار نمی‌گیرند. در نتیجه siRNA منشأ گرفته از RNA غیر هدف به سرعت در