انتقال و بیان ژن‌های پروتئین پوششی ویروس‌های Y سیب‌زمینی نژاد نکروتیک (PVYN) و ویروس S سیب‌زمینی در سیب‌زمینی رقم آگریا (*Solanum tubersum* var Agria)

Transformation and Experssion of The Coat Protein Genes of *Potato virus* Y and *Potato virus* S Iranian Isolates in *Solanum tubersum* var Agria Lines

احسان انصاری‌دزفولی[۱]، حسین معصومی[۲*] و هاله هاشمی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۰۹

چکیده

در این بررسی پس از نمونه‌برداری از مزارع کشت سیب‌زمینی در شهرستان بردسیر استان کرمان، گیاهان آلوده نسبت به نژاد نکروتیک ویروس Y سیب‌زمینی (PVYN) و ویروس S سیب‌زمینی (PVS) توسط آزمون سرولوژیکی ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA) جداسازی شدند. پس از استخراج RNA کل از گیاهان آزمون، با استفاده از واکنش RT-PCR ژن پروتئین پوششی (CP) این دو ویروس تکثیر و به‌طور جداگانه در پلاسمید PTZ57R/T همسانه‌سازی شدند، پس از توالی‌یابی و اطمینان از مطابقت توالی ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP با توالی‌های این دو ویروس در بانک ژن، این دو ژن در ناقل بیانی pBI121 همسانه‌سازی گردیدند. دو سازه حاصله شامل pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP به دو آگروباکتریوم مجزای GV3850 منتقل و جهت تراژنی دیسک‌های ریزغده مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان ترارژن پس از ریشه‌دار شدن و انتقال به گلدان‌ها، جهت بررسی حضور و بیان ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP توسط واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و آزمون سرولوژیکی الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله از PCR بر روی ۲۰ لاین مقاوم به کانامایسین، نشان داد که به‌ترتیب ۶ و ۴ لاین دارای تراژن‌های الحاقی PVYN-CP و PVS-CP در ژنوم خود می‌باشند. همچنین دو لاین نیز حاوی تراژن‌های الحاقی مربوط به هر دو ویروس بوده‌اند و بیان این ژن‌ها به‌صورت همزمان ولی مجزا صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: گیاهان تراریخت، بیماری‌های ویروسی، گیاه سیب‌زمینی

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۳. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران
*: نویسنده مسوول Email: masoomi@mail.uk.ir

مقدمه

ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* یکی از مخرب‌ترین عوامل بیماریزا در گیاهان توتون، سیب‌زمینی و فلفل می‌باشد که در برخی موارد موجب کاهش ۸۰ تا ۱۰۰ درصد محصول می‌گردد (Shew and Lucas, 1991; Hooker, 1990). این ویروس دارای پیکره میله‌ای خمش‌پذیر (Flexous) به‌طول ۶۸۰ تا ۹۰۰ و عرض ۱۱ تا ۱۳ نانومتر با تقارن مارپیچی می‌باشد (King *et al.*, 2012). ژنوم PVY از یک مولکول RNA تک رشته‌ای مثبت (Positive sense) به‌طول ۹۷۰۳ نوکلئوتید و به وزن $۳/۱\times۱۰^{۶}$ دالتون تشکیل شده است (Makkouk and Gumpf, 1974; Robaglia *et al.*, 1989). این مولکول دارای تنها یک قاب خواندنی باز (Open reading frame-ORF) بزرگ بوده و ترجمه آن منجر به تولید یک پلی‌پپتید به وزن مولکولی kDa ۳۶۸ می‌گردد. این پلی‌پروتئین تحت برش‌های پروتئولیتیکی قرار گرفته که حاصل آن ۹ پروتئین می‌باشد که به‌ترتیب از انتهای N مولکول پلی‌پروتئین شامل P1-pro، HC-pro، P3، 6K1، CI، 6K2، NIa، NIb و CP می‌باشند (Rajamaki, *et al.*, 2005; Robaglia *et al.*, 1989; Riechmann *et al.*, 1992). تاکنون توالی نوکلئوتیدی ژن CP مربوط به چندین جدایه PVY از سراسر دنیا و همچنین ایران (Hosseini *et al.*, 2011) تعیین و در بانک‌های اطلاعاتی نظیر EMBL, GenBank ثبت گردیده‌اند.

ویروس S سیب‌زمینی (PVS) از جنس*Carlavirus* و خانواده *Felixiviridae* دارای پیکره رشته‌ای به‌طول ۶۵۰ و قطر ۱۲ نانومتر است. وزن مولکولی پروتئین پوششی آن ۳۳ کیلو دالتون می‌باشد. ژنوم ویروس از RNA تک‌رشته‌ای مثبت تشکیل شده است که حاوی ۷۵۰۰ نوکلئوتید به‌وزن $۲/۳۹\times۱۰^{۶}$ دالتون بوده و دارای دو RNA زیرژنومی به وزن‌های ۱×۱۰^{۶} و $۰/۷\times۱۰^{۶}$ دالتون می‌باشد. در انتهای ´5 و ´3 ژنوم ویروس به ترتیب ساختارهای کلاهک و دم پلی‌آدنینی قرار دارد. این ویروس دارای ۶ قالب خواندنی باز (ORF) می‌باشد. همچنین PVS دارای دو نژاد معمولی (Ordinary) یا PVS و نژاد آوندی (Andean) یا PVSA می‌باشد (Foster, 1991). در ایران نیز گزارشاتی در مورد فراوانی آلودگی این ویروس به‌وسیله محققین (Pourrahim ; Salari *et al.*, 2011 *et al.*, 2007) ارائه شده است.

تاکنون به‌منظور اهداف متفاوت از توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم ویروس‌های گیاهی در تهیه گیاهان تراژن مقاوم استفاده گردیده است. بر این اساس بر حسب نوع ژنوم، مقاومت‌ها به نام‌های مقاومت با منشأ پروتئین پوششی، آنزیم رپلیکاز (Rep-MR)، پروتئین حرکتی و RNA (RMR) نامگذاری شده‌اند (Powell-Abel *et al.*, 1986 ; Anderson *et al.*, 1992; Von Arnim *et al.*, 1993; De; Haan, 1998). همچنین عوامل مؤثر در بیان ژن در گیاهان شامل پیشبرها، توالی‌های خاتمه‌دهنده، متیله‌شدن DNA تراژن، اثرات جایگاهی، بازشناسی تراژن و هم بازدارندگی می‌باشند.

موضوع مقاومت مشتق شده از پاتوژن (PDR)، اولین بار توسط Sanford و Johnston، در سال ۱۹۸۵ ارائه شد. اولین موفقیت عملی در زمینه تولید گیاه توتون تراژن مقاوم، با انتقال ژن پروتئین پوششی ویروس موزائیک توتون (TMV) به گیاه توتون به‌دست آمد (Powell-Abel *et al.*, 1986). با توجه به میزان خسارت ناشی از ویروس Y سیب‌زمینی در گیاهان سیب‌زمینی و توتون، هر دوی این گیاهان با استفاده از ژن پروتئین پوششی PVY (PVY-CP)، تراژن شده و میزان مقاومت حاصله در برابر آلودگی با PVY مورد ارزیابی قرار گرفته است (Lawson *et al.*, 1990; Kaniewski *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1995). در گیاهان سیب‌زمینی و توتون ترانسفورم شده با ژن PVY-CP که به‌طور نسبی یا کامل در مقابل آلودگی با PVY مقاوم می‌باشند، علی‌رغم این که RNA رونوشت‌برداری شده از ژن PVY-CP در حد بالایی تجمع داشته ولی حضور پروتئین پوششی PVY ناشی از ترجمه تراژن، در آنها قابل تشخیص نبوده است. همچنین در این گیاهان مشخص شده است که میزان مقاومت حاصله در برابر PVY، با میزان تجمع پروتئین پوششی ویروس در گیاه رابطه‌ی مستقیم ندارد (Lawson *et al.*, 1990).

گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد در مقاومت ناشی از CP در *Potyviruses*، مقاوم‌ترین رگه‌ها (لاین‌ها)، لزوماً دارای بیشترین مقدار تولید CP نمی‌باشند (Stark and Beachy, 1989; Lawson *et al.*, 1990).

Smith و همکاران در سال ۱۹۹۵ گیاهان سیب‌زمینی را با نسخه‌هایی از ژن PVY-CP که غیرقابل ترجمه (Untranslatable) بودند، تراژن نمودند. آن‌ها مشاهده نمودند که در این گیاهان نیز مقاومت در مقابل آلودگی نسبت به PVY به‌وجود می‌آید. بر این اساس نامبردگان بیان نمودند که RNA رونوشت‌برداری شده از تراژن PVY-CP، احتمالاً مکانیسمی را از خود سلول که موجب تخریب RNA ویروس می‌گردد، فعال می‌نماید. در مورد کاربرد موفقیت‌آمیز این نوع مقاومت که اصطلاحاً مقاومت با منشأ RNA، (RMR) نامیده می‌شود، در ویروس‌های خانواده *Potyviridae* گزارش‌های

متعددی وجود دارد (Dougherty *et al*., 1994; Lindbo and Dougherty, 1992a; Smith *et al*., 1994; Whitty *et al*., 1994).

گزارشاتی نیز مبنی بر ایجاد مقاومت در گیاه توتون تراریخت شده توسط ژن پوشش پروتئینی ویروس PVS نسبت به استرین ME ویروس PVS توسط MacKenzie و Tremaine در سال ۱۹۹۰ ارائه شده است.

پیشنهاد می‌شود که در مورد گیاهان تراژن با PVS نیز اطلاعاتی ارائه شود چون تا اینجا بیشتر به PVY اشاره شده است. گزارشاتی نیز مبنی بر ایجاد مقاومت در گیاه توتون تراریخت شده توسط ژن پوشش پروتئینی ویروس PVS نسبت به استرین ME ویروس PVS توسط مکینز و ترمین (MacKenzie and Tremaine) در سال ۱۹۹۰ ارائه شده است.

میزان خسارت و بروز علائم در سیب‌زمینی در صورت آلودگی همزمان گیاه توسط دو یا چند ویروس افزایش چشم‌گیری را نشان می‌دهد و موجب از بین رفتن سریعتر گیاهان در مزرعه می‌شود. در تحقیقات انجام شده تاکنون، بیشتر گیاهان سیب‌زمینی تنها توسط توالی یکی از ویروس‌های خانواده *Potyvirideae* تراژن شده‌اند (Missiou *et al*., 2004; Smith *et al*., 1995). این گیاهان معمولاً به بیش از یکی از ویروس‌های این خانواده مقاومت نشان می‌دهند (Lawson *et al*., 1990). لازم به ذکر است تاکنون تحقیقات زیادی در داخل کشور بر روی تراریختی یک ژن انجام شده ولی در زمینه انتقال همزمان دو ژن جهت ایجاد مقاومت تلاشی صورت نگرفته است. به‌همین دلیل در این تحقیق سعی شده است به‌کمک طراحی آغازگرها، ژن‌های پروتئین پوششی (CP) ویروس‌های Y سیب‌زمینی نژاد نکروتیک (PVYN) و ویروس S سیب‌زمینی (PVS) همسانه‌سازی گردیده و توسط این تراژن‌ها بوته‌های *Solanum tubersum* var Agria تراریخت گردند. همچنین وجود و بیان ژن‌های الحاقی در گیاهان تراریخت شده مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

۱. نمونه‌های گیاهان سیب‌زمینی آلوده به ویروس‌های PVYN و PVS

نمونه‌های گیاهان سیب‌زمینی آلوده به ویروس‌های PVYN و PVS از مزارع شهرستان بردسیر (لاله‌زار) جمع‌آوری گردیدند. به‌منظور شناسایی ویروس‌های مذکور، آزمون سرولوژیکی ساندویچ دوطرفه الایزا (Double antibody sandwich ELISA: DAS-ELISA) بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی‌سرم‌های تک و چند همسانه‌ای PVYN و PVS تهیه شده از شرکت Agdi (U.S.A) و بر اساس روش کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977) انجام شد. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول $\bar{x}$ SD 3 + آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. نمونه‌های آلوده PVS و PVYN به‌منظور مطالعات تکمیلی به ترتیب بر روی گیاهان آزمون *Nicotiana debneyii* و *N. tabaccum* cv. Samsun NN. مایه‌زنی گردیدند.

۲. همسانه‌سازی ژن‌های CP ویروس‌های PVY و PVS در پلاسمید pTZ57R و انتقال آن به سلول‌های *E. coli* DH5α

استخراج RNA کل از نمونه‌های آلوده با استفاده از کیت‌های High Pure Viral Nucleic Acids Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) و RNX Plus (سیناژن) طبق دستورالعمل شرکت‌های سازنده و همچنین روش *هوانگ* و همکاران استخراج گردید(Hung *et al*., 2000). جهت عمل نسخه‌برداری معکوس و ساخت دی.ان.ای مکمل، ۲ میکرو لیتر آر.ان.ای کل استخراج به همراه ۲ میکرو لیتر آغازگر معکوس (10µM) و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به تیوب اضافه و برای مدت ۱ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ قرار داده شد. به‌دنبال آن بلافاصله تیوب را روی یخ قرار داده و ۴/۵ میکرولیتر بافر اختصاصی (۵x) M-MLV ، ۲ میکرولیتر مخلوط داکسی ریبونوکلوتید تری فسفات (dNTPs, 10µM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس (M-MLV (200U/µL)و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بازدارنده RNase (10U/µL) به آن اضافه و پس از آن برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای $42^{\circ}C$ نگهداری و در پایان جهت غیرفعال کردن آنزیم M-MLV برای مدت ۳ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ قرار داده شد.

جهت آزمون PCR پس از اضافه نمودن مواد مورد نیاز شامل ۲/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase 5U/μl، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای PVYNR 101/ PVYNF 101 وPVSR 201 / PVSF 201 به‌ترتیب مربوط به ویروس‌هایPVYN و PVS (جدول ۱) با غلظت 10µM، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ 50mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix 10 mM، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer و ۱۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل در تیوب با یکدیگر مخلوط نموده و پس از آن در دستگاه ترموسایکلر Techne مدل TC-132 (Cambridge, UK) قرار داده شدند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده جهت تعیین ویروس‌های PVYN وPVS

Table 1: PCR primer used for the detection and discrimination of PVYN and PVS.

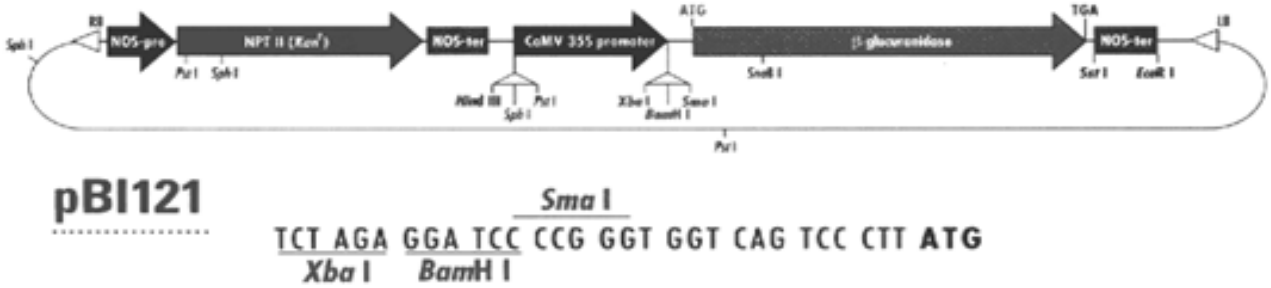
نام آغازگر Primer Name	توالی Sequance	موقعیت Position	اندازه bp Size bp
PVYNF 101	5′-CGC ATT AGA TGA TGA GTT TGA-3′	8524-8565	
PVYNR 101	5′- CGT CCG GAG AGA CAC TAC AT-3′	9376-9395	872 bp
PVYNF 102	5′- GC GGA TCC CGC ATT AGA TGA TGA GTT TGA-3′	8524-8544	
PVYNR 102	5′- CG GAG CTC CGT CCG GAG AGA CAC TAC AT-3′	9376-9395	888 bp
PVSF 201	5′-AAA ATG GCG CCC AAA C-3′	7208-7223	
PVSR 201	5′-TTC ATT GGT TGA TCG CAT TAC-3′	8076-8096	889 bp
PVSF 202	5′- CC GGA TCC AAA ATG GCG CCC AAA C-3′	7208-7223	
PVSR 202	5′- GG GAG CTC TTC ATT GGT TGA TCG CAT TAC-3′	8076-8096	905 bp

جهت تکثیر CP مربوط به PVYN واسرشتی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴°C انجام و PCR در طی ۳۰ چرخه (سیکل) شامل مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، واکنش اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌ترتیب در دمای ۵۰°C جهت جفت آغازگرهای PVYNF 101 / PVYNF 101 و ۶۰°C جهت جفت آغازگرهای PVYNF 102/ PVYNF 102 و ساخت در ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه انجام و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C تکمیل ساخت رشته ثانویه انجام گرفت.

به‌منظور تکثیر قطعه CP در مورد PVS تعداد سیکل‌ها و دماها شبیه PVYN می‌باشد و تنها در مرحله‌ی اتصال جهت جفت آغازگرهای PVSR 201 /PVSF 201 و /PVSF 202 PVSR 202 به‌ترتیب در دمای ۵۰°C و ۶۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و جهت انجام الکتروفورز محصول PCR، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و بافر 1X TBE استفاده گردید. سپس ژل در دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra, Germany) قرار داده شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد انتظار، برای انجام همسانه‌سازی قطعات DNA، از کیت InsT/A Cloning Kit (Fermentas, MBI, Germany) در پلاسمید PTZ57R/T و باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α استفاده گردید. همچنین استخراج پلاسمید نو ترکیب از باکتری توسط High Pure Plasmid Isolation Kit کمپانی (Roche) انجام گرفت. حداقل دو کلنی نوترکیب در مورد هر ویروس جهت تعیین توالی انتخاب گردید و تعیین توالی در هر دو جهت سنس و آنتی‌سنس و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و یا آغازگرهای استاندارد M13 در شرکت MWG و با روش Di-deoxy با دستگاه‌های ABI اتوماتیک انجام گرفت. توالی‌های بدست آمده با استفاده از برنامه BLAST(NCBI) با توالی‌های موجود در بانک ژن هم‌ردیف و مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

۳. تهیه دو سازه pBI 121 حاوی ژن‌های CP ویروس‌های PVY و PVS

بعد از توالی‌یابی ژن‌های پروتئین پوششی ویروس‌های PVYN و PVS و اطمینان از صحت آنها، ابتدا جهت خروج ژن CP از پلاسمید pTZ57R با توجه به طراحی دو جایگاه برشی آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I در دو انتهای 5′ و 3′ ژن CP، برش توسط این دو آنزیم انجام شد. سپس محصول بر روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز و به‌دنبال آن قطعه CP توسط کیت (Roche) Agarose Gele DNA Extraction مطابق دستور شرکت سازنده از ژل خالص‌سازی گردید. در مرحله بعد ژن گزارشگر GUS از ناقل pBI 121 (شکل ۱) خارج و سپس قطعات متفاوت CP مربوط به دو ویروس PVYN و PVS جایگزین آن گردیدند. کدون آغاز ترجمه نیز در مورد ویروس PVY در ابتدای ژن و بعد از نقطه اتصال پرایمر و در مورد ویروس PVS در محل اتصال پرایمر واقع گردیده است.



شکل۱: شمای پلاسمید pBI121

Fig. 1: Schematic diagram of pBI121 plasmid

سازه pBI 121 حاوی ژن CP ابتدا به درون باکتری *E. coli* انتقال و جهت تأیید صحت سازه‌های pBI 121-CP مربوط به ویروس‌های PVY و PVS کلنی‌های انتخاب شده در محیط LB حاوی کانامایسین جهت گزینش باکتری‌های تراژن رشد داده شدند. پس از ۱۶ ساعت استخراج پلاسمید از باکتری انجام و بعد از برش توسط دو آنزیم *BamHI* و *SacI*، طول قطعات حاصله مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین پلاسمیدهای نوترکیب از نظر داشتن تراژن‌های PVYN-CP و PVS- CP، مجدداً به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. قطعات CP توسط آغازگرهای Forward پروموتر CaMV 35S و Reverse قسمت ترمیناتور NOS تکثیر شد و یک قطعه ۱۳۰۰bp به‌دست آمد. تکثیر با برنامه PCR شامل واسرشتی اولیه به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ $^{\circ}C$، و طی ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی ۹۴ $^{\circ}C$ برای مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ $^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ $^{\circ}C$ به‌مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ $^{\circ}C$ انجام شد.

جهت رشد گیاهان، از محیط‌کشت MS، برای غده‌زایی از محیط‌کشت MSP، جهت تراژن کردن ریزغده‌ها از محیط تلقیح و همچنین پس از تراژنی گیاهان، جهت باززایی آنها از محیط MLS استفاده شد (Murashinge and Skoog, 1962) (جدول ۲)، جهت انتقال ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP به طور جداگانه و همزمان به گیاه سیب‌زمینی از قطعات ریزغده (Micro tuber disk) استفاده شد.

پس از تأیید صحت سازه‌های pBI 121-CP هر دو ویروس، این سازه‌ها به درون اگروباکتریوم سویه GV3850 منتقل شدند. برای تراژن باکتری، روش استاندارد انجماد و ذوب (Freeze and Thowing) با استفاده از ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ازت مایع به کار گرفته شد (Sambrook and Russel, 2001). سلول‌های ترانس کانجوگانت حاصله در محیط‌کشت LB حاوی کانامایسین (۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ریفامپیسین (۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت و انتخاب شدند. سلول‌های آگروباکتریوم GV3850 نوترکیب حاوی پلاسمید pBI 121-CP از نظر داشتن تراژن‌های PVYN-CP و PVS-CP، مجدداً به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. جزئیات و مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و بررسی محصول آن، مطابق مراحل شرح داده شده قبلی می‌باشد.

جدول ۲: ترکیب و مشخصات محیط‌های کشت مورد بررسی در این تحقیق

Table 2: Information and composition of cultural medium used in this study

نام محیط کشت Media Name	ترکیب مواد Composition	کاربرد Application
محیط کشت MLS	محیط کشت MS به‌همراه $MnSO_4$ $4H_2O$ و $ZnSO_4$ $7H_2O$	باززایی گیاهان
محیط کشت MSP	محیط کشت MS به‌همراه ۵۰۰ میلی‌گرم CCC و ۵ میلی‌گرم BAP	غده‌زایی
محیط تلقیح Transformation Media	محیط کشت MSP به‌همراه ۸۰ میلی‌گرم/لیتر از سوکروز	تلقیح ریزغده‌ها

۴. انتقال ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP به گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tubersum* cv. Agria) و تولید ریزغده

در این روش ۲۰ قطعه ساقه سیب‌زمینی رقم Agria درون محیط کشت MS آگاردار کشت داده شدند. بعد از رشد کافی گیاهان در مرحله ۸ تا ۱۲ برگی، ساقه آنها جهت ریزغده‌زایی به محیط‌کشت MSP حاوی CCC منتقل شدند. از ریزغده‌های با قطر ۱ تا ۲ سانتی‌متری جهت تراژنی استفاده شد.

باکتری‌های *A. tumefaciens* سویه GV3850 حاوی سازه‌های pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP ، به‌مدت ۲۴ ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۲۸°C کشت داده شدند. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ دور میان‌گریز و رسوب رویی دور ریخته شد. رسوب آگروباکتریوم در حجم مساوی از محیط آلوده‌سازی (Infection medium) (شامل محیط MS حاوی درصد بالای سوکرز، استوسیرنیگون و pH =۵/۵ می‌باشد) حل گردید. سوسپانسیون حاوی آگروباکتریوم برای مدت ۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه تا رسیدن به OD حدود ۰/۵ تا ۰/۶ حرکت داده شد.

به‌منظور انتقال ژن، ریزغده‌ها به‌صورت دیسک برش داده شدند و دیسک‌های آنها در سه گروه توسط آگروباکتریوم سویه GV3850 تراریخت شدند. گروه اول شامل دیسک‌هایی بود که فقط توسط آگروباکتریوم حاوی pBI-PVYN-CP تراریخت شده بودند.

گروه دوم دیسک‌ها توسط آگروباکتریوم حاوی سازه pBI-PVS-CP تراریخت شدند.

گروه سوم آگروباکتریوم حاوی pBI-PVYN-CP و آگروباکتریوم حاوی pBI-PVS-CP با OD یکسان به نسبت مساوی با هم مخلوط کرده و در تراریختی دیسک‌های ریزغده مورد استفاده قرار گرفت. سپس دیسک‌ها بر روی محیط کشت MLS حاوی ۵۰۰ µl/ ml زناتین فاقد آنتی‌بیوتیک و پس از در محیط MLS حاوی ۵۰۰ µl/ lit زناتین، mg/lit ۱۰۰ کانامایسین و mg/lit ۵۰۰ سفوتاکسیم نگهداری شدند. پس از رسیدن طول جوانه‌ها به ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر، از ریزغده‌ها جدا و در محیط MLS حاوی آنتی‌بیوتیک (mg/ml ۵۰۰ سفوتاکسیم) نگهداری شدند. پس از آن از ساقه‌های به طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر انتخاب و به محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. به‌دنبال آن تعدادی از ساقه‌های ریشه‌دار، جهت بررسی انتقال و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

۵. بررسی گیاهان تراژن

بررسی بیان ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP در لاین‌های گیاهان

لاین‌های گیاهان تراژن، از نظر وجود ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP در داخل ژنوم گیاه، با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا DNA بافت برگ در سن ۱۰ تا ۱۵ برگی با استفاده از کیت Plant DNA isolation kit (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. مراحل بعدی آزمون PCR عیناً شبیه مراحل ذکر شده قبلی انجام گردید. بررسی گیاهان تراژن از نظر بیان ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP و تولید پروتئین پوششی PVYN و PVS با استفاده از روش ساندویچ دوطرفه الیزا (DAS-ELISA) و براساس روش *کلارک و آدامز* (Clark and Adams, 1977) انجام شد و به‌منظور یکسان شدن شرایط آزمون الایزا، از برگ‌های دوم و سوم فوقانی هر یک از لاین‌های گیاهان تراریخت در سن ۱۰ تا ۱۵ برگی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برداشته شد.

نتایج

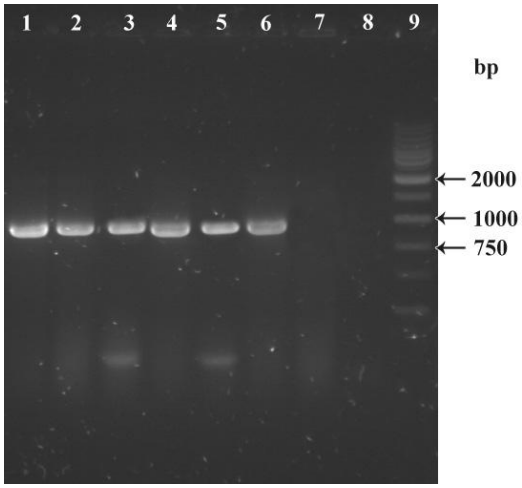
۱. جداسازی ویروس‌های PVYN و PVS از گیاهان سیب‌زمینی آلوده

بعد از نمونه‌برداری از مزارع کشت سیب‌زمینی در منطقه لاله‌زار استان کرمان، نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل شدند و توسط آزمون DAS-ELISA از میان ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۸ نمونه آلوده به PVYN و ۹ نمونه آلوده به PVS شناسایی شدند. از بین ۱۸ نمونه گیاه آلوده به PVYN سه گیاه و از میان ۹ نمونه آلوده به PVS ۲ گیاه که بیشترین میزان جذب را در الیزا نشان دادند جهت مایه‌زنی بر روی گیاهان آزمون *Nicotiana debneyii* و *N. tabaccum* cv. Samsun NN. انتخاب گردیدند.

۲. استخراج آر.ان.ای کل، تکثیر و همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی

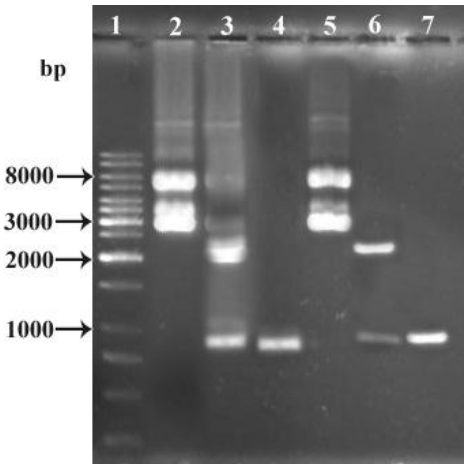
الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای PVYNR 102/102 PVYNF و PVSF 202/PVSR 202 به‌ترتیب منجر به تشکیل باندهای ۸۸۸ و ۹۰۵ جفت بازی مربوط به ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP گردید (شکل ۲). نتایج حاصله از

استخراج پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57- PVYN-CP و pTZ57-PVS-CP از باکتری *E. coli* و برش توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I و تکثیر توالی پروتئین پوششی توسط پرایمر اختصاصی در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد. دو کلونی برای هر ویروس به شماره‌های $P621_{PVYN}$ ، $P622_{PVYN}$ ، $P610_{PVS}$ و $P611_{PVS}$ انتخاب و پلاسمید استخراجی از این کلونی‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت MWG ارسال گردیدند.



شکل ۲: نتایج حاصله از الکتروفورز نمونه‌های مربوط به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(RT-PCR) در ژل آگارز ۱٪. ســتون ۱ و ۲: قطعه bp ۸۸۸ PVYN-CP. ستون ۳ و ۴: قطعه bp ۹۰۵ مربوط به PVS-CP. ستون ۵ و۶: به‌ترتیب قطعاتbp ۸۸۸ کنترل مثبت PVYN-CP و bp ۹۰۵ کنترل مثبت PVS-CP می‌باشند. ستون ۷ و ۸: شاهد منفی در RT-PCR. ستون ۹: مارکر (Lader) 1Kbp

Fig. 2: On a %1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of PVYN-CP and PVS-CP amplification. Lines 1 to 2, amplified 888 bp products of the coat protein of PVYN. Lines 3 to 4, amplified 905 bp products of the coat protein of PVS. Lines 5 to 6, positive control including amplified 888 and 905 bp products of the coat protein of PVYN and PVS, respectively. Lines 7 to 8, negative control. Line 9. molecular weight marker contains 1Kbp

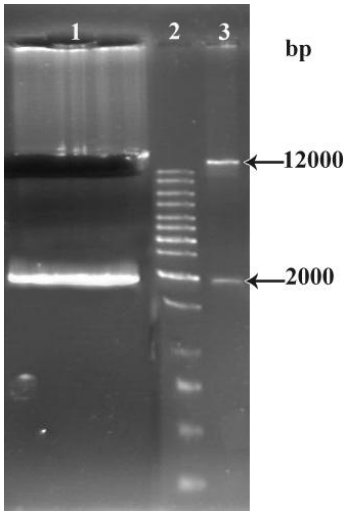


شکل ۳: نتایج حاصله از استخراج پلاسمیدهای pTZ57- PVYN-CP و pTZ57-PVS-CP از باکتری *E. coli* و برش توسط آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* و تکثیر توالی پروتئین پوششی توسط پرایمر اختصاصی. ستون ۱: مارکر 1Kbp. ستون ۲: استخراج سازه pTZ57- PVYN-CP از باکتری. ستون ۳: سازه pTZ57- PVYN-CP که توسط آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* برش یافته و قطعه bp ۸۸۸ بیرون آمده. ستون ۴: قطعه bp ۸۸۸ محصول PCR توالی PVYN-CP. ستون ۵: استخراج پلاسمید pTZ57-PVS-CP از باکتری‌های انتخاب شده در محیط‌کشت انتخابی که صحت آن توسط کلونی PCR و برش تأیید شد. ستون ۶: سازه pTZ57- PVS-CP که توسط آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* برش یافته و قطعه bp ۹۰۵ بیرون آمده. ستون ۷: قطعه bp ۹۰۵ محصول PCR توسط پرایمر PVS-202

Fig. 3: The result of extraction and digestion of recombinant plasmids pTZ57- PVYN-CP and pTZ57-PVS-CP by two restriction enzyme of *BamHI* and *SacI*. Line 1, molecular weight marker contains 1Kbp. Line 2, extraction of recombinant plasmids pTZ57-PVYN-CP. Line 3, recombinant plasmid of pTZ57- PVYN-CP digested by two restriction enzyme of *BamHI* and *SacI* and resulted 888 bp products. Line 4, amplified PCR product of 888 bp of the coat protein of PVYN. Line 5, extraction of recombinant plasmids of pTZ57-PVS-CP. Line 6, recombinant plasmid of pTZ57-PVS-CP digested by two restriction enzyme of *BamHI* and *SacI* and resulted 905 bp products. Lines 7, amplified PCR 905 bp products by PVS-202 primer

۳. همسانه‌سازی ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP در ناقل pBI121 و انتقال به گیاه

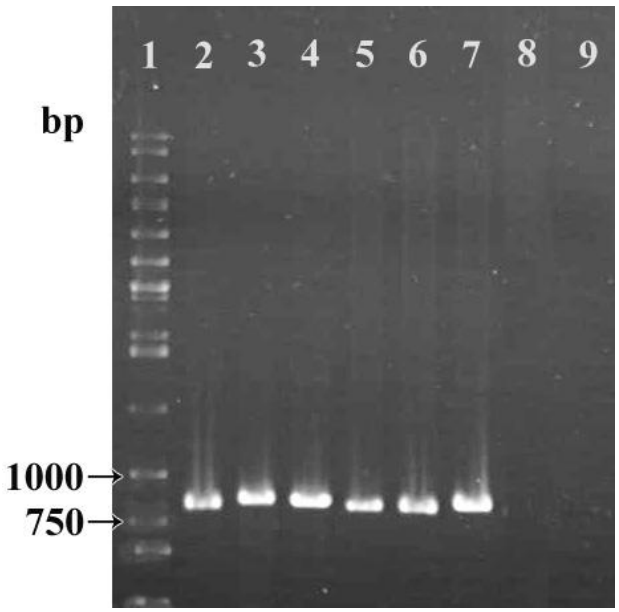
پس از اطمینان از مطابقت توالی ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP با توالی‌های این دو ویروس در بانک ژن، این دو ژن در ناقل pBI121 همسانه‌سازی شدند (شکل ۴). پس از آن دو سازه جدید pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP به‌دست آمده به درون سلول‌های مستعد *E. coli* و سپس به دو آگروباکتریوم مجزای سویه GV3850 منتقل شدند. به‌منظور تأیید حضور ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP در سلول‌های آگروباکتریوم نوترکیب GV3850 حاوی سازه‌های pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP ، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (شکل ۵). محصول واکنش یک قطعه ۸۸۸ و یک قطعه ۹۰۵ جفت بازی به‌ترتیب جهت آگروباکتریوم حاوی سازه pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP می‌باشد. در نهایت کلونی‌های شماره PVYN-T19 و PVS-T22 به‌ترتیب حاوی ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP جهت انتقال ژن انتخاب شدند.



شکل ۴: نتایج حاصل برش پلاسمید pBI121 توسط آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* و حذف ژن GUS جهت جایگزینی توالی ژن پروتئین پوششی ویروس‌ها. ستون ۱: پلاسمید pBI121 برش یافته و از ژل خارج و تخلیص شد. ستون ۲: مارکر 1Kbp ستون ۳: پلاسمید pBI121 برش یافته شامل توالی ژن GUS با اندازه 1800 bp و توالی pBI121 خطی با اندازه 12000 bp

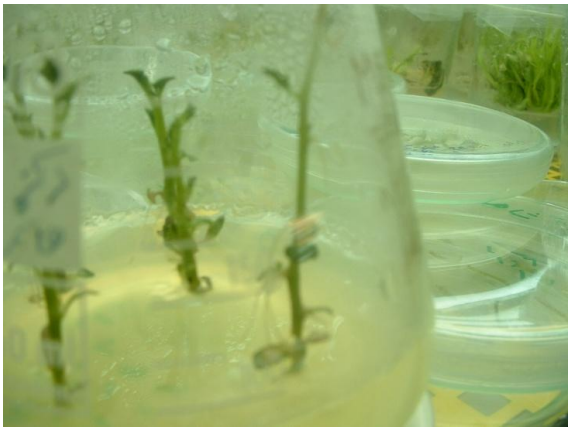
Fig. 4: The result of recombinant plasmid digestion of pBI121 by two restriction enzyme of *BamHI* and *SacI*, removed GUS gene and replaced by coat protein gene. Line 1, digested recombinant plasmid pBI121. Line 2, molecular weight marker contains 1Kbp. Line 3, digested recombinant plasmid pBI121 including1800 bp of GUS gene

جهت تراژنی، ریزغده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا به‌صورت دیسک برش داده شدند و به‌دنبال آن دیسک های ریز غده در سه گروه شامل اگروباکتریوم حاوی سازه pBI-PVYN-CP، آگروباکتریوم حاوی سازه pBI-PVS-CP و گروه سوم آگروباکتریوم‌های حاوی pBI-PVYN-CP و pBI-PVS-CP (با OD یکسان به نسبت مساوی) تراژن شدند. به‌دلیل احتمال تراژن بودن جوانه‌های ثانویه بیشتر از آنها استفاده گردید. گیاهان در مراحل پایانی جهت انتقال به خاک درون محیط MS حاوی کانامایسین 50mg/ml ریشه‌دار شدند (شکل ۶). گروهی از گیاهان نیز جهت نگهداری و انتقال به نسل بعد در محیط غده‌زایی غده‌دار شدند (شکل ۷). همچنین چند دیسک تعداد ۵۲ دیسک ذکر شود نیز توسط آگروباکتریوم فاقد سازه تراژن شدند که بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک از بین رفتند. از مجموع ۱۲۰ ریزغده‌های تراژن شده توسط دو سازه pBI-PVYN-CP و pBI-PVSCP، ۵۲ لاین (۲۳ ریزغده از گروه اول، ۲۲ ریزغده از گروه دوم و ۷ ریزغده نیز از گروه سوم بودند) گیاه در محیط‌کشت به‌دست آمد که از این تعداد ۲۰ گیاه به گلدان منتقل شدند.



شکل ۵: نتایج حاصله از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی پلاسمیدهای pBI- PVYN-CP و pBI-PVS-CP استخراجی ازکلنی‌های نوترکیب آگروباکتریوم GV3850، به‌منظور تائید قطعات الحاقیPVYN-CP و PVS-CP. ستون ۱: مارکر 1Kbp. ستون ۲ و ۳: قطعه 888 bp محصول PCR پلاسمید pBI- PVYN-CP با پرایمر اختصاصی PVYN-102. ستون ۴ و ۵: قطعه 905 bp محصول PCR پلاسمید pBI- PVS-CP با پرایمر اختصاصی PVS-202. ستون ۶: کنترل مثبت برای پروتئین پوششی PVYN با پرایمر اختصاصی PVYN-102. ستون ۷: کنترل مثبت برای توالی پروتئین پوششی PVS با پرایمر اختصاصی PVS-202. ستون ۸ و ۹: شاهدهای منفی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر پروتئین پوششی PVYN و PVS

Fig. 5: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of pBI- PVYN-CP and pBI-PVS-CP plasmids which extracted from recombinant Agrobacterium colonies for confirmation of PVYN-CP and PVS-CP insertion to them. Line 1, molecular weight marker contains 1Kbp. Lines 2 and 3, PCR product of 888 bp by PVYN-102 specific primer. Lines 4 and 5, PCR product of 905 bp by PVS-202 specific primer. Line 6. Positive control of the PCR product of the coat protein of PVYN by PVYN-102specific primer. Line 7. Positive control of the PCR product of the coat protein of PVS by PVS-202 specific primer. Lines 8 and 9, negative control



شکل ۶: ریشه‌دار کردن گیاهان در محیط MS

Fig. 6: Rooting of plantlets on MS medium

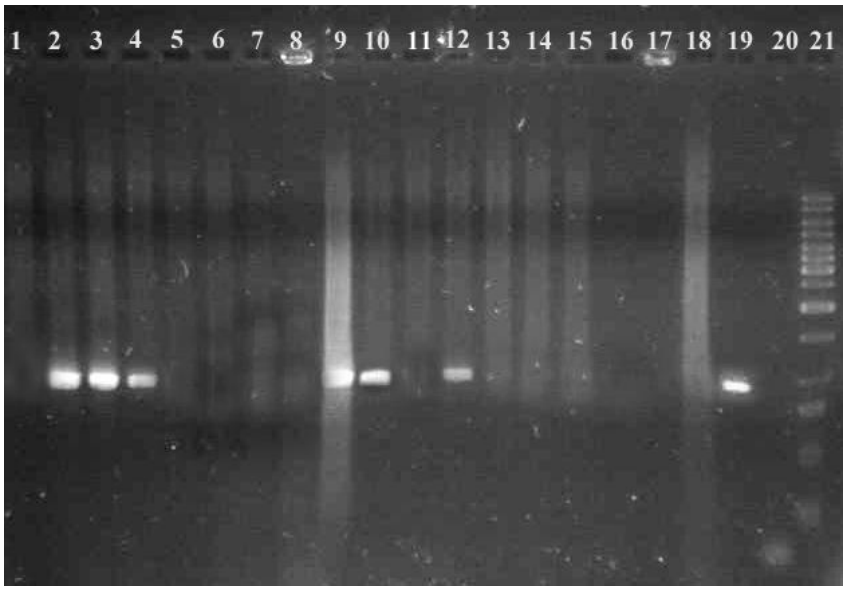
شکل ۷: تولید ریزغده در کشت درون شیشه

Fig. 7: Micro tuber producing *in vitro*

۴. بررسی وجود و بیان ژن‌های PVYN-CP و PVS-CP در گیاهان تراژن

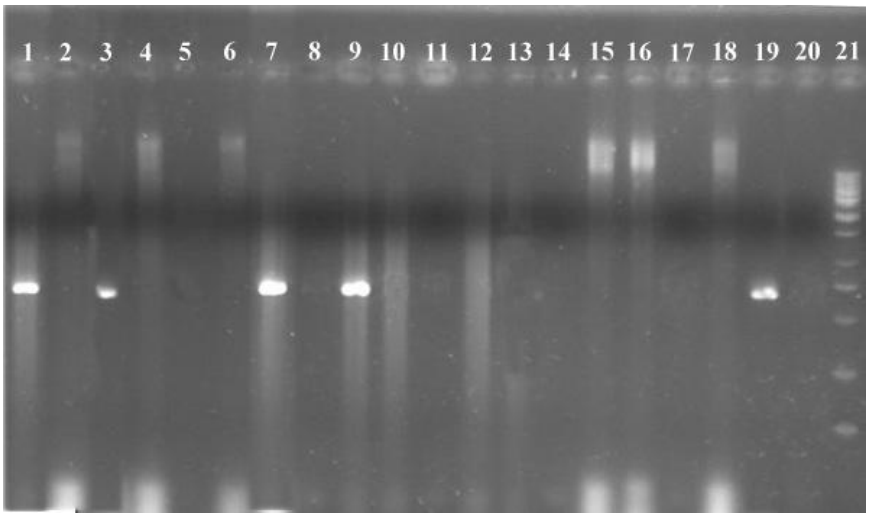
از ۲۰ گیاه انتقال‌یافته به گلدان ۶ گیاه تراژن، حاوی ژن PVYN-CP (لاین‌های L2، L3، L4، L9، L10 و L12) و ۴ گیاه حاوی ژن PVS-CP (لاین‌های L1، L3، L7 و L9) به‌دست آمد. به‌علاوه این که از این گیاهان دو گیاه (لاین‌های L3 و L9) حاوی ژن پروتئین پوششی هر دو ویروس بودند (شکل‌های ۸ و ۹).

بر اساس نتایج حاصل از روش سرولوژیکی DAS-ELISA، در لاین‌های L3، L4، L9، L10 و L12 بیان تراژن PVYN-CP در سطح پروتئین و در لاین‌های L1، L3، L7 و L9 بیان تراژن PVS-CP در سطح پروتئین مشاهده گردید (جدول ۳).



شکل ۸: نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراجی از ۲۰ لاین گیاهی تراریخت که توسط پرایمر اختصاصی PVYN-102 انجام شده است. ستون‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۹، ۱۰ و ۱۲ به‌ترتیب مربوط به لاین‌های تراریخت ۲، ۳، ۴، ۹، ۱۰ و ۱۲ می‌باشند. ستون ۱۹: کنترل مثبت (محصول PCR توالی ژن پروتئین پوششی). ستون ۲۰: کنترل منفی. ستون ۲۱: مارکر 1Kbp

Fig. 8: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of extracted DNA from 20 lines by PVYN-102 primer. Lines 2, 3, 4, 9, 10 and12, Transgenic lines Nomber 2, 3, 4, 9, 10 and12, respectively. Line 19, positive control, Line 20, negative control, Line 21, molecular weight marker contains 1Kbp



شکل ۹: نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراجی از ۲۰ لاین گیاهی تراریخت که توسط پرایمر اختصاصی PVS-202 انجام شده است. ستون‌های شماره ۱، ۳، ۷ و ۹ به‌ترتیب مربوط به لاین‌های تراریخت ۱، ۳، ۷ و ۹ می‌باشند. ستون ۱۹: کنترل مثبت (محصول PCR توالی ژن پروتئین پوششی). ستون ۲۰: کنترل منفی. ستون ۲۱: مارکر 1Kbp

Fig. 9: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of extracted DNA from 20 lines by PVS-202 primer. Lines 1, 3, 7 and 9, Transgenic lines Nomber 1, 3, 7, and 9, respectively. Line 19, positive control, Line 20, negative control, Line 21, molecular weight marker contains 1Kbp

جدول ۳: نتایج ارقام (لاین‌های) مورد بررسی با استفاده از آزمون الیزا

Table 3: The result of ELISA test on different cultivars used in this study

ردیف Number	رقم (لاین) Line	نتایج PVY PVY Results	نتایج PVS PVS Results
1	L1	0.622	1.059[a]
2	L3	1.118	1.018
3	L4	1.531	0.9
4	L7	0/536	1.029
5	L9	0.907	0.979
6	L10	1.017	0.807
7	L12	1.496	0.648
8	میانگین کنترل مثبت	2.65	1.506
9	میانگین کنترل منفی	0.207	0.358
10	میانگین شاهد	0.095	1.102

a: میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر

بحث

مطالعات انجام شده حاکی از ایجاد مقاومت بیشتر در گیاهان سیب‌زمینی حامل تراژن CP با بیان بالای پروتئین را نشان می‌دهد می‌باشد (Cheng and Yeh, 2000). در حالی که این میزان مقاومت در گیاهانی که میزان کمتری از پروتئین CP را بیان می‌نمایند کمتر می‌باشد. ارتباط مستقیم بین میزان بیان پروتئین CP با میزان مقاومت ایجاد شده در گیاهان توتون نیز مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (Nejidat and Beachy, 1990).

در این تحقیق انتقال و بیان ژن CP ویروس‌های بیماری‌زای PVYN و PVS به‌طور جداگانه و همزمان در گیاهان سیب‌زمینی رقم Agria تراژن جهت ایجاد مقاومت نسبت به این دو ویروس مورد بررسی قرار گرفت. ژن پروتئین پوششی هر دو ویروس به‌طور جداگانه در پلاسمید pBI121 بین پیشبر CaMV 35S و ترمیناتور NOS قرار گرفت و توسط آگروباکتریوم سویه GV3850 به گیاه سیب‌زمینی منتقل شدند، پوررحیم و همکاران (۱۳۸۲) نیز از پیشبر CaMV 35S و ناقل pBIN19 و آگروباکتریوم استفاده نمود و در نهایت میزان تراژنی بالایی را به‌دست آوردند.

جهت انتقال همزمان دو ژن به گیاه سیب‌زمینی تاکنون فعالیت‌های بسیار کمی به عمل آمده است. در تحقیق حاضر ابتدا سازه‌های حاوی این دو ژن به درون دو آگروباکتریوم مجزا منتقل و سپس به گیاهان سیب‌زمینی رقم Agria بطور همزمان توسط دو آگروباکتریوم با غلظت مساوی تراژن گردیدند. این روش توسط (Chang *et al.*, 2002) جهت انتقال دو ژن β-1,3-glucanase و chitinase به طور همزمان به درون رقم Russet Burbank سیب‌زمینی نیز استفاده گردید. در روشی دیگر توسط (Daley *et al.*, 1998) جهت به‌دست آوردن گیاهان تراژن فاقد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، دو سازه مجزا از یکدیگر را به‌طور همزمان توسط یک آگروباکتریوم به گیاه توتون رقم Xanthi منتقل نموده و در نسل‌های دوم و سوم بر اساس تفرق صفات، گیاهان فاقد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک به‌دست آمدند. همچنین در این تحقیق مشخص گردید که انتقال و ورود T-DNA به درون ژنوم گیاه مهم‌ترین عامل محدودکننده در انتقال یک یا دو ژن می‌باشد. در تحقیق حاضر مشخص گردید که تعداد ۱۰ لاین از ۲۰ لاین دارای تراژن‌های PVYN-CP یا PVS-CP و یا هر دو می‌باشند. این بدان معنی است که این ۱۰ لاین هم دارای رونوشتی از ژن پروتئین پوششی هستند و هم پروتئین پوششی این ویروس‌ها به‌طور جداگانه و همزمان در این لاین‌ها بیان شده است که این مسئله، حضور RNA رونوشت‌برداری شده از روی این ژن‌ها را در این لاین‌ها تایید می‌کند، در حالی‌که در ۱۰ لاین دیگر وجود رونوشت آر.ان.ای مربوط به PVYN-CP یا PVS-CP قابل تشخیص نبود. گرچه دلیل این موضوع معلوم نیست، اما این احتمال وجود دارد که در این لاین‌ها ژن یا ژن‌های الحاقی پس از انتقال به گیاه خاموش شده باشند. اگرچه عوامل متعددی در خاموشی ژن‌های الحاقی از قبیل تعداد نسخه‌های الحاقی، تغییر ساختار کروماتین و محل الحاق ژنوم و غیره مؤثر می‌باشند (Meyer, 1996).

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۰-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.