

القای مقاومت به ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) در گندم نان

با به‌کارگیری روش خاموشی ژن پس از ترانویسی*

INDUCTION OF RESISTANCE TO BARLEY YELLOW DWARF VIRUS (PAV) IN BREAD WHEAT USING POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING (PTGS)

محسن یاسایی^{۱*}، علیرضا افشاریفر^۱، علی نیازی^۲، شادی صالح زاده^۱ و کرامت‌اله ایزدپناه^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۱۵)

چکیده

بیماری‌های کوتولگی زرد جو و کوتولگی زرد غلات از مخرب‌ترین و وسیع‌ترین بیماری‌های ویروسی غلات دانه ریز هستند. خسارت‌های ناشی از ویروس‌های عامل بیماری از یک سو و محدود بودن، ناکارآمد بودن و ژنتیک پیچیده ژن‌های مقاومت از دیگر سو، زمینه به‌کارگیری رهیافت‌های نوین مبتنی بر مقاومت با واسطه ویروس را توجیه می‌نماید. در تحقیق حاضر سه نوع سازه سنس، آنتی سنس و سنجاق سری دارای اینترون با استفاده از قسمتی از ژن پلیمرز ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) در ناقل دوتایی pWVec8 همسانه‌سازی شدند. سازه‌ها با استفاده از آگروباکتریوم به جنین کامل گندم الوند بر اساس محیط کشت‌های بهینه‌سازی شده و به‌کارگیری نشانگر انتخابی هیگرومایسین منتقل شدند. تراریختی بوته‌ها با استفاده از آزمون‌های زنجیره‌ای پلی مرز و لکه‌گذاری نقطه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. آلوده‌سازی بوته‌ها با شته‌های حامل BYDV-PAV انجام و واکنش هر لاین با آزمون الیزا ارزیابی شد. متوسط راندمان تراریختی بر اساس آزمون الیزا معادل ۱/۸، ۱/۳ و صفر در صد به ترتیب برای سازه‌های سنجاق سری واجد اینترون، سنس و آنتی سنس برآورد گردید. بوته‌های تراریخت آلوده شده مصنوعی با BYDV-PAV، در مقایسه با الوند تیپ وحشی، علاوه بر تفاوت قابل ملاحظه جذب در آزمون الیزا، از ظاهری طبیعی بدون ظهور زردی و کوتولگی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: ویروس کوتولگی زرد جو - PAV، خاموشی ژن پس از ترانویسی، سازه دی ان ا، مقاومت، سازه‌های خاموشی ژن

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

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

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری (در حال حاضر عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس)، دانشیار، کارشناس ارشد و

استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. استادیار پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شیراز

مقدمه

بیماری‌های کوتولگی زرد جو و غلات که توسط ویروس‌های متعلق به دو جنس از خانواده *Luteoviridae* ایجاد می‌شوند، از مهم‌ترین بیماری‌های اقتصادی غلات دانه ریز شامل گندم‌های نان و دوروم، جو، چاودار، ترتیکاله و یولاف می‌باشند (Hewings & Eastman 1995, Burnett et al. 1995, Lister & Ranieri 1995). ویروس‌های عامل بیماری حداقل یک صد گونه دیگر از گیاهان تیره گندم از جمله ذرت و برنج را نیز آلوده می‌نمایند (Burnett et al. 1995). این ویروس‌ها به آوند آبکشی محدود بوده و به صورت اختصاصی با شته‌های ناقل منتقل می‌شوند (Rochow 1969). خسارت معمول این بیماری‌ها در جو، گندم و یولاف به ترتیب معادل ۱۵، ۱۷ و ۲۵ درصد برآورد شده است (Oerke et al. 1994). این در حالی است که خسارت‌هایی در حد ۹۰ تا ۱۰۰ درصد از ایران و سایر نقاط دنیا نیز گزارش گردیده است (Mozhaeva & Kastalyeva 2002, Sahragard & Masumi 2004). ویروس‌های عامل بیماری در تمامی مناطق غله خیز ایران وجود داشته، باعث بروز خسارت‌هایی در ابعاد مختلف می‌شوند. گونه BYDV-PAV از وسیع‌ترین پراکنش در نقاط مختلف دنیا و ایران برخوردار است (Afsharifar et al. 2004, Lister & Ranieri 1995).

روش‌های مختلفی برای مدیریت این بیماری پیشنهاد شده است. رهیافت‌های سنتی کنترل ویروس شامل روش‌های زراعی (تنظیم تاریخ کاشت) و به‌کارگیری ارقام مقاوم می‌باشد (Burnett et al. 1995, Plump & Johnstone 1995). هم‌چنین بیماری‌های ناشی از لوتئوویروس‌ها را می‌توان با کاربرد حشره‌کش‌هایی بر علیه ناقل‌های آنها کنترل نمود. این در حالی است که رهیافت اخیر به دلیل هزینه بالا و مسائل زیست محیطی مورد تأکید نمی‌باشد

(Koev et al. 1998). تاکنون ژن‌های مقاومت و تحمل اندکی هم چون *Bdv2*، *Yd2* و *Bdv1* بر علیه ویروس‌های عامل کوتولگی زرد جو و غلات معرفی شده‌اند که قادر به بروز مقاومت در لاین‌های خاصی از جو و خویشتاوندان گندم شده‌اند (Gao et al. 2009, Miller & Young 1995, Sing et al. 1993). به دلیل اینکه ارزیابی تحمل و مقاومت نسبت به عامل بیماری مشکل بوده، منابع مقاومت حقیقی کمیاب و کاربرد آنها به واسطه توارث پیچیده آنها آسان نیست (Burnett et al. 1995)، روش‌های نوین ایجاد مقاومت از جمله انتقال ژن مورد توجه بوده است. این رهیافت امکان تولید سریع مقاومت به BYDVs در یولاف و سایر غلات را فراهم آورده است (Koev et al. 1998). فناوری زیستی و به خصوص امکان دست‌ورزی ژنوم آر ان ای ویروس‌های گیاهی به همراه تولید گیاهان تراژن و روش‌های باززایی امکان به‌کارگیری ژن‌های مقاومت مصنوعی بر علیه ویروس‌های کوتولگی زرد را فراهم آورده است (Miller & Young 1995).

تراریختی گیاهان تک لپه همچون برنج، ذرت، جو و گندم با استفاده از آگروباکتریوم که در ابتدا با مشکلاتی همراه بود، هم‌اکنون قابل اجرا می‌باشد (Patnaik & Khurana 2001, Patnaik et al. 2006). از این روش برای تراریختی جنین‌های نارس و کامل استفاده شده است (Hiei et al. 1994, Patnaik et al. 2006).

ژن‌های مقاومت مصنوعی متنوعی به گیاهان وارد شده‌اند که قادرند چرخه تکثیر ویروس را از طریق تغییر در کارکرد ژن (های) ویروسی و یا مداخله در برهمکنش‌های میزبان- ویروس تحت تأثیر قرار دهند (Miller & Young 1995). هم‌چنین تراژن‌هایی با منشأ ویروس (Virus derived transgenes)، مقاومت به بیمارگر

ترانویسی (Transcriptional gene silencing, TGS) از طریق اثر روی فعالیت پیشبر می‌تواند سرکوب شود (Meister & Tuschl 2004). مراحل سه گانه RNAi شامل فرایند تبدیل آر ان ای دولای بیان شده و یا وارد شده به سلول به آر ان ای دولای کوچک (siRNA) به وسیله ریبونوکلاز III (Dicer)، تک لا شدن (تشکیل رشته راهنما (guide strand)) و الحاق آن به مجموعه (Complex) پروتئینی تحت نام RISC (RNA-induced silencing complex) و در پایان جستجوی آر ان ای های هدف که دارای تشابه ترادفی با رشته راهنما باشند جهت تخریب توسط این مجموعه می‌باشد (Meister & Tuschl 2004, Tomari & Zamore 2005).

تراریختی گیاهان با آر ان ای هایی به شکل های سنس و آنتی سنس گزارش شده است. به کارگیری یک ساقه-حلقه (Stem-loop) که پایه آن با ژن هدف از تشابه برخوردار است، به صورت مؤثرتری در مقایسه با آر ان ای منفی، فنوتیپ سرکوبی را القا نموده است (Mette *et al.* 2000, Chuang & Meyerowitz 2000).

همچنین استفاده از سازه‌های stem-loop تهیه شده از ترادف ژن پلی مرز ویروس‌ها، منجر به تولید گیاهان تراژن بسیار مقاومی شده است (Waterhouse *et al.* 2001). پائولوسکی و همکاران (Pawloski *et al.* 2005) با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز به صورت تکرار معکوس (Inverted repeat-PCR, IR-PCR) موفق به ساخت سازه‌هایی به صورت ihpRNA (Intron hairpin RNA) گردیدند. این سازه‌ها ضمن پایداری مناسب از کارایی بسیار بالایی برای خاموش‌سازی ژن برخوردار بوده‌اند (Helliwell & Waterhouse 2003, Smith *et al.* 2000). در یک مطالعه بوچر و همکاران (Bucher *et al.* 2006) با کاربرد ترادف‌هایی از

را از طریق تولید پروتئین‌های معین، مکانیزم سرکوبی ترادف اختصاصی به واسطه نسخه‌های تراژن و یا هر دو روش القا می‌نمایند (Plaukaitis & Fitch & Beachy 1993). (Dougherty *et al.* 1994, Baulcombe 1996, Zaitlin 1997). مثال‌هایی از به‌کارگیری این تراژن‌ها شامل مقاومت به واسطه پروتئین پوششی ویروس (coat protein mediated resistance)، ژن رپلیکاز ویروس، ستلایت‌های آر ان ای، آر ان ای با قطبیت منفی و آر ان ای های ناقص مداخله گر (Defective Interfering RNAs-DI RNAs) می‌باشد (Miller & Young 1995).

در مورد غلات در قیاس با سایر گیاهان موارد محدود تری از مقاومت حاصل از بیمارگر وجود دارد که به دلیل محدودیت‌های موجود در راه انتقال نسخه‌هایی از بیمارگر و نیز روش‌های مشکل تر کشت بافت غلات دانه ریز بوده است (Huntley & Hall 1996). تراژن‌های به‌دست آمده از ویروس‌ها قادر به ایجاد مقاومت نسبت به لوتوویروس‌ها بوده‌اند. از آن جمله می‌توان به ترادف‌های مربوط به پروتئین پوششی، پلیمرز و پروتئین حرکتی ویروس اشاره کرد.

کشف آر ان ای مداخله گر (Interfering RNA, RNAi) انقلابی در زیست‌شناسی آر ان ای بوده (Siomi & Siomi 2009) و به صورت معمول برای جلوگیری از بیان ژن در گیاهان، حیوانات و قارچ‌ها از آن استفاده شده است (Meister, Tuschl 2004, Wang & Baulcombe 2004, Waterhouse 2001, Travella *et al.* 2006). RNAi می‌تواند ترادف‌های خاصی از RNA را به منظور تخریب و یا ممانعت از ترجمه از طریق فرایند خاموشی پس از ترانویسی (Post transcriptional gene silencing, PTGS) مورد هدف قرار دهد (Jinek & Doudna 2009). هم‌چنین بیان ژن طی فرایند خاموشی در زمان

طراحی و ساخته شد. بدین منظور از ناقلین القاء پدیده خاموش سازی ژن، شامل pStarling و pWBVec8 (مؤسسه تحقیقات بین‌المللی CSIRO استرالیا) استفاده شد. از ناقل اول برای همسانه‌سازی قطعات سنس، آنتی‌سنس و یا ihp-loop و از pWBVec8 بعنوان یک ناقل دو گانه (Binary vector) جهت انجام آلوده سازی با اگروباکتریوم استفاده شد (شکل ۱).

به منظور ساخت سازه‌ها، ابتدا آغازگرهای اختصاصی واجد دنباله‌هایی با جایگاه‌های برشی خاص جهت ورود قطعه به صورت‌های سنس و آنتی سنس در pStarling طراحی گردید (جدول ۱). به این منظور از یک همسانه ویروس (تحت نام Ros-1189 با رس شمار FJ87401 در پایگاه بانک ژن NCBI (Pakdel et al. 2010)) به عنوان قالب واکنش زنجیره‌ای پلی مرز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BYDVStarlingF/R (جدول ۱) و برنامه‌ای شامل پنج دقیقه در ۹۴°C، ۳۵ چرخه دمایی ۹۴، ۶۰ و ۷۲°C هر یک به مدت یک دقیقه و به دنبال آن ۲۰ دقیقه در ۷۲°C به عنوان گسترش نهایی اجرا شد.

محصول PCR معادل ۴۰۰ جفت باز در ناقل pTZ57R/T الحاق گردید و سپس در باکتری *E. coli* DH5α همسانه‌سازی شد. باکتری همسانه‌سازی شده روی تشتک‌های محیط LB حاوی آمپی سیلین، Xgal و IPTG پخش گردید و چند عدد از پرگنه‌های به دست آمده به صورت مجزا در LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت شد. پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت Bioneer) استخراج گردید و وجود قطعه مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Pst*I و *Eco*RI و ترادف‌یابی، تأیید گردید. این همسانه تحت نام pTZ400BYDV (شکل ۲)

چهار توسپوویروس مختلف به صورت ترادف‌های شیمیری (Chimeric) با حداقل اندازه، گیاهانی با مقاومت به هر چهار ویروس را به صورت قابل توارث به دست آوردند.

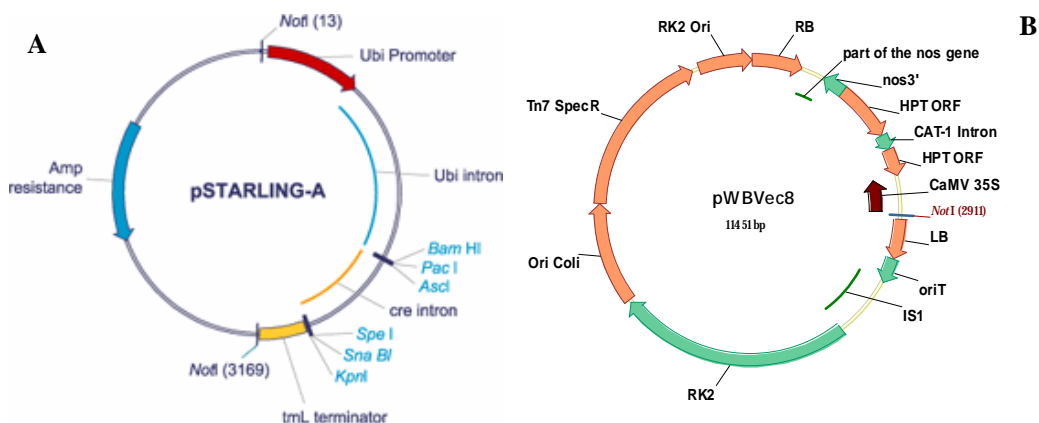
مقاومت به BYDV در جو و یولاف تراژن با استفاده از ترادف‌های پلی مرز، پروتئین پوششی، پروتئین حرکتی و یا نواحی غیر کد کننده مربوط به پیشبر آر ان ا های زیر ژنومی گزارش شده است (McGrath, Koev et al. 1998). Yan et al. 2007 and Dupre et al. 2002, et al. 1997 هم چنین مک گرات و همکاران (McGrath et al. 1997) با استفاده از روش بمباران ژنی موفق به انتقال ژن پروتئین پوششی تعدادی از ویروس‌های کوتولگی زرد جو و غلات به یولاف و جو شده‌اند. کوئف و همکاران از نیمه ۵ ژنوم BYDV-PAV (ژن پلی مرز) برای انتقال به یولاف از طریق بمباران ژنی بدون تعیین سازوکار دقیق این مقاومت (به واسطه RNA و یا بیان پروتئین) استفاده نمودند (Koev et al. 1998). هم چنین انتقال یک تراژن ویروسی که hairpin RNA را کد می‌نمود، مصونیت در برابر BYDV-PAV در یولاف را باعث شده است (Wang et al. 2000 and Abbott et al. 2002).

در تحقیق حاضر به کارگیری فناوری PTGS به منظور دستیابی به درجاتی از مقاومت نسبت به ویروس کوتولگی زرد جو-PAV بررسی شد. هدف از این بررسی، علاوه بر بهینه‌سازی شیوه انتقال ژن به غلات، ساخت سازه‌های سنس، آنتی سنس و سنجاج سری واجد ایترون و مقایسه کارایی آنها در القاء مقاومت به ویروس مزبور بود.

روش بررسی

ساخت سازه

در این تحقیق سه سازه سنس، آنتی سنس و سنجاج سری دارای ایترون cre جو (Intron hairpin-loop, ihp-loop)



شکل ۱. ساختار شماتیک ناقلین pStarling (A) و pWBVec8 (B). محل‌های ورود قطعات سنس (*Bam*HI/*Asc*I) و آنتی سنس (*Kpn*I/*Spe*I) در pStarling و آزادسازی سازه‌ها از ناقل اخیر و ورود آنها (*Not*I) در ناقل دوگانه pWBVec8 نمایش داده شده است. فلش‌های علامت‌گذاری شده با RB، nos3'، HPT ORF، CaMV35S و LB به ترتیب مربوط به مرز راست، خاتمه دهنده nos3'، چهارچوب خوانش ژن مقاومت به هیگرومایسین، پیشبر 35S ویروس موزائیک کلم گل و مرز چپ می‌باشد (Wang et al. 1998).

Fig. 1. Schematic demonstration of pStarling (A) and pWBVec8 (B). Cloning sites for sense (*Bam*HI/*Asc*I) and antisense (*Kpn*I/*Spe*I) insertions into pStarling constructs, excision site (*Not*I) from this vector and insertion into pWBVec8 binary vector are shown. RB, nos3', HPT ORF, CaMV35S and LB arrows indicate right border, nos3' terminator, *hygromycin phosphotransferase* (hpt) gene, CaMV35S promoter and left border, respectively (Wang et al. 1998).

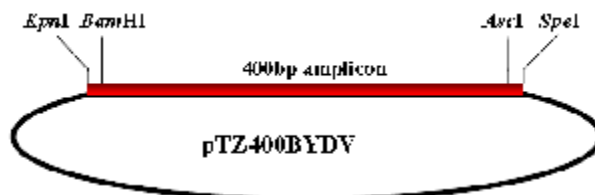
جدول ۱. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Primers used in this research

نام آغازگر	آنزیم‌های برشی	دمای اتصال	ترادف آغازگر
Primer name	Restriction Enzyme ¹	T _a (°C)	Primer sequence (5' → 3')
BYDVStarlingF	<i>Kpn</i> I and <i>Bam</i> HI	60	ggtaccggtacccttgggcatatggctgac
BYDVStarlingR	<i>Spe</i> I and <i>Asc</i> I	60	tcactagtggcgcgcctctggcgtgtccttcg
hptF	-	62	ctattcctttggcctcggacgagt
hptR	-	62	tcacgtgcaagacctgcctga

T_a: Annealing temperature

1: Restriction enzyme sites are shown by bold or under lined-italic nucleotides.



شکل ۲. همسانه pTZ400BYDV حاوی ۴۰۰ جفت باز از ژن پلی‌مرز BYDV-PAV. محل استقرار آنزیم‌های برشی جهت ساخت سازه‌های سنس، آنتی سنس و سنجاق سری واجد اینترون در دو انتهای قطعه مشاهده می‌شود.

Fig. 2. pTZ400BYDV clone containing 400 bp PCR product of BYDV-PAV polymerase gene with appropriate restriction sites at both ends to facilitate making sense, antisense and ihp-loop constructs.

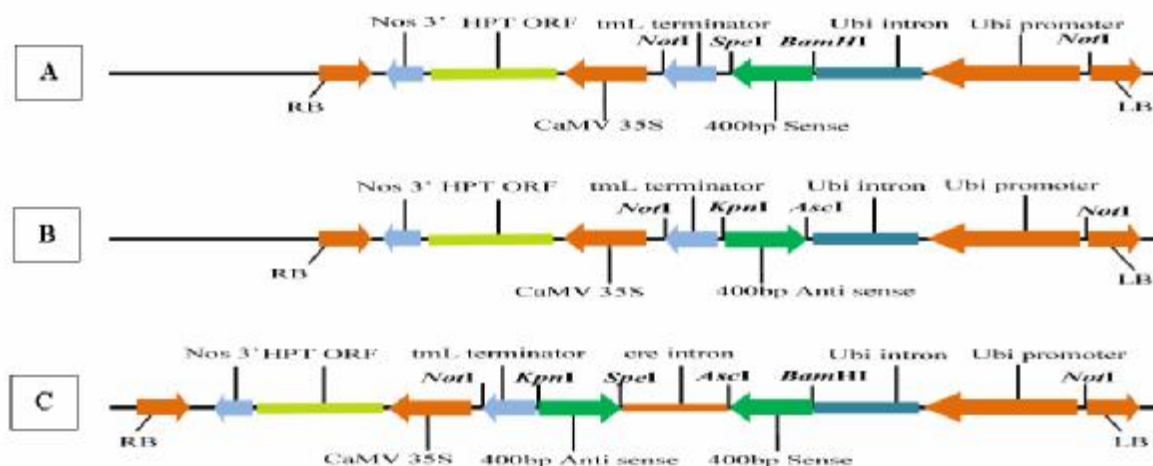
در دمای 65°C - نگهداری شد.

برای ساخت سازه سنجاق سری دارای ایترون برای انجام برش‌های لازم با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی مناسب، قطعاتی به صورت سنس و آنتی سنس از ناقل pTZ400BYDV خارج و مراحل الحاق این قطعات به شرح ذیل انجام شد. پلاسمیدهای pStarling و pTZ400BYDV با جفت آنزیم مناسب (*BamHI/AscI*) جهت ورود قطعه سنس برش داده شدند و باندهای مورد نظر با استفاده از کیت استخراج ژل (شرکت Qiagen) مطابق روش پیشنهادی سازنده از ژل آگاروز استخراج گردید. عمل الحاق با استفاده از ناقل خطی شده pStarling و قطعه سنس خارج شده از pTZ400BYDV با استفاده از آنزیم T4 ligase (شرکت Takara) مطابق روش پیشنهادی انجام گردید. پلاسمید حاصل با استفاده از کیت همسانه‌سازی Fermentas همسانه‌سازی گردید و سپس روی تشتک‌های حاوی آمپی‌سیلین پخش شد. پرگنه‌های حاصل پس از یک شب برداشت و در LB مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت گردید. حضور قطعه سنس در ناقل pStarling با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی، PCR و ترادف‌یابی به تأیید رسید. این همسانه تحت نام pStarling+400BYDV:S نام‌گذاری شد. جهت الحاق قطعه آنتی سنس، پلاسمیدهای pTZ400BYDV و pStarling+400BYDV:S با جفت آنزیم مناسب (*KpnI/SpeI*) بریده و از ژل آگاروز استخراج شد. سپس قطعه آنتی سنس به pStarling+400BYDV:S خطی شده الحاق شد. وجود قطعات سنس و آنتی سنس با انجام واکنش‌های آنزیمی مناسب و نیز ترادف‌یابی به تأیید رسید. با انجام این همسانه‌سازی قطعات سنس و آنتی سنس در دو طرف ایترون cre جو قرار گرفت. این

سازه تحت نام pStarling+400BYDV:S+AS نام‌گذاری شد.

به منظور ساخت سازه‌های سنس و آنتی سنس، ایترون cre جو به ترتیب با جفت آنزیم *SpeI/BamHI* و *KpnI/AscI* از pStarling خارج گردید. برش‌های فوق بر روی pTZ400BYDV نیز انجام شد. الحاق قطعات سنس و آنتی سنس در pStarling Δ cre خطی شده با جفت آنزیم متناظر، مطابق قبل انجام شد و حضور قطعات با آزمون‌های مناسب تأیید گردید. سازه‌های دارای قطعات سنس و آنتی سنس به ترتیب با نام‌های pStarling Δ cre:400BYDV-AS و pStarling Δ cre:400BYDV-S در 65°C - نگهداری شدند.

وجود جایگاه مشترک و یگانه برش آنزیمی *NotI* بر روی اسکلت pStarling و ناقل دوگانه pWVec8 همسانه‌سازی قطعات سنس، آنتی سنس و ihp-loop را در این ناقل دوگانه امکان‌پذیر می‌نماید. با انجام این برش آنزیمی روی سه همسانه pStarling+400BYDV:S+AS، pStarling Δ cre:400BYDV-AS و pStarling Δ cre:400BYDV-S قطعاتی حدود ۴۰۰۰ (سازه ihp-loop) و ۲۸۰۰ (سازه‌های سنس و آنتی سنس) جفت باز خارج، و سپس در ناقل pWVec8 خطی شده با *NotI* و با استفاده از آنزیم T4 ligase الحاق شد. پلاسمید الحاق شده بر روی تشتک‌های محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین کشت گردید. پرگنه‌های به دست آمده برداشت و مجدداً در محیط کشت حاوی این آنتی بیوتیک کشت شد. حضور قطعه مورد نظر در ناقل pWVec8 با انجام آزمون PCR به تأیید رسید. پلاسمیدهای حاصل تحت نام‌های pWVec8:S+AS، pWVec8:S و pWVec8:AS نام‌گذاری (شکل ۳) و در آگروباکتریوم مستعد سویه AGLO به روش یخ و ذوب



شکل ۳. نقشه سازه‌های سنس (A) (pWBVec8:S)، آنتی سنس (B) (pWBVec8:AS) و سنس‌جاق سری دارای اینترون (C) (pWBVec8:S+AS) در ناقل دوگانه pWBVec8. در هر سه نوع سازه قطعات سنس، آنتی سنس و ihp-loop در پایین دست پیشبر و اینترون Ubiquitin که مناسب به کارگیری در تراریختی گرامینه است قرار می‌گیرند. اینترون cre در بین قطعات سنس و آنتی سنس در سازه C دیده می‌شود. ترادف خاتمه‌دهنده در این سازه‌ها tmL terminator می‌باشد. چهارچوب خوانش ژن هیگرومایسین ترانس‌فراز (HPT ORF) تحت پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده nos3' عمل می‌نماید. در هر سه سازه، مرزهای راست (RB) و چپ (LB)، جایگاه‌های برشی ورود قطعات سنس، آنتی سنس و ihp-loop و نیز جایگاه همسانه‌سازی (NotI) در pWBVec8 دیده می‌شود.

Fig. 3. Schematic representation of sense (pWBVec8:S)(A), antisense (pWBVec8:AS)(B) and intron hair pin-loop (pWBVec8:S+AS)(C) constructs. Sense, antisense and ihp-loop fragments are driven by Ubiquitin promoter, upstream of Ubiquitin intron and terminated by tmL. Hygromycin transferase ORF (HPT ORF) is driven under CaMV35S promoter and terminated by nos3'. Left and right borders, insertion sites of sense, antisense and ihp-loop segments and NotI cloning site in pWBVec8 are demonstrated

مواد گیاهی جهت اخذ جنین کامل استفاده شد. علت انتخاب رقم فوق، حساسیت آن به ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) و نیز سطح زیر کشت غالب آن در اقلیم سرد کشور است. جنین رسیده گندم به عنوان ریز نمونه با هدف ساقه‌زایی مستقیم در نظر گرفته شد. بذره‌های سالم گندم مادری رقم الوند انتخاب گردید و به مدت ۱/۵ دقیقه در الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد همراه با تریتون X-100 به مدت ۳۰ دقیقه ضد عفونی شد. بذور ضد عفونی شده چهار تا پنج بار با آب مقطر سترون شستشو و سپس در بین کاغذ صافی مرطوب پخش و به مدت یک شب در ۶°C نگهداری گردید. جنین بذره‌های یاد شده با

(Weigel & Glazebrook 2006) همسانه‌سازی و سپس روی تشک‌های LB حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین و ریفامپیسین پخش شد. چند عدد از کلنی‌های به دست آمده در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک‌های فوق کشت گردید. حضور قطعات مورد نظر با آزمون هضم آنزیمی، PCR و ترادف‌یابی به تأیید رسید. از این همسانه‌های باکتریایی جهت انجام تراریختی جنین رسیده گندم استفاده گردید.

تراریختی و کشت بافت گندم

مواد مادری

در تحقیق حاضر از بذره‌های گندم الوند مادری به عنوان

کشت انتخابی

بسه دلیل و جود ژن انتخابی *hygromycin phosphotransferase (hpt)* در پلاسمید دوگانه pWBVec8 که مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومیسین را القا می‌نماید، از این آنتی بیوتیک در کشت انتخابی جهت غربالگری و انتخاب بافت های رویشی تراریخت شده استفاده شد (جدول ۲). این کشت در سه تا چهار هفته متوالی با تعویض محیط و در دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انجام شد.

کشت باززایی

در این مرحله گیاهچه هایی که فشار انتخاب مرحله قبل را تحمل نموده و همچنان به رشد خود ادامه داده بودند، با استفاده از شرایط هورمونی مناسب به ساقه رفتند. شرایط محیطی این مرحله مطابق کشت انتخابی در نظر گرفته شد.

کشت ریشه زایی

این مرحله برای ریشه دار کردن گیاهچه‌ها از ترکیب هورمونی مناسب به همراه سولفات مس استفاده شد.

شرایط محیطی این مرحله مطابق کشت انتخابی در نظر گرفته و زیر کشت های متوالی انجام شد.

پس از تشکیل ریشه مناسب در شرایط درون شیشه، بوته‌ها در دو مرحله به خاک انتقال داده شدند. ابتدا گیاهچه‌ها از محیط شیشه خارج و ریشه‌ها با آب فراوان سترون جهت حذف محیط کشت، شستشو و به بستر حاوی سه قسمت ورمی کولایت و یک قسمت پیت ماس سترون منتقل شدند. به منظور حفظ رطوبت لازم، گلدان‌ها با پلاستیک پوشیده و با محیط MS مایع با نصف غلظت، تغذیه و آبیاری شدند. پس از یک هفته، گیاهچه‌ها به بستر

استفاده از پنس و اسکالپل در زیر هود لامینار و در شرایط سترون از اندوسپرم جدا شد.

مراحل کشت بافت

پیش کشت

در این مرحله جنین‌های جدا شده در تشتک های حاوی محیط پیش کشت مناسب (جدول ۲) به شکلی که محل جدا شدن جنین از بذر روی سطح محیط کشت و اسکوتلوم بالا باشد، قرار داده شدند. مدت زمان قرار گرفتن در این مرحله یک شب در تاریکی و دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

کشت توام

آگروباکتریوم واجد سازه‌های مورد نظر در محیط LB مایع دارای آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و اسپکتینومیسین در دمای 28°C و تاریکی به مدت یک شب در شیکر انکوباتور کشت گردید. کشت مایع آگروباکتریوم با غلظت حدود یک در OD600 تهیه و به آن استوسیرینگون (40 mg/L)، عصاره خام توتون ($3/5\ \mu\text{l/ml}$) و $0/1$ درصد توئین ۲۰ اضافه شد. جنین‌های مرحله قبل، با سوسپانسیون باکتری به مدت یک ساعت تیمار و سپس بر روی محیط کشت توام (جدول ۲) قرار گرفتند. این مرحله در تاریکی و دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. سپس جنین‌ها از محیط کشت توام برداشته و با آنتی بیوتیک سفوتاکسیم 400 mg/ml به منظور حذف آگروباکتریوم تیمار شدند.

کشت استراحت

در این مرحله ریز نمونه‌ها در محیط کشت استراحت به منظور ایجاد آمادگی و بیان ژن مقاومت به هیگرومیسین به مدت یک هفته نگهداری شدند.

جدول ۲. معرفی محیط‌های کشت مورد استفاده در کشت بافت و انتقال ژن با آگروباکتریوم

Table 2. Media used in tissue culture and transformation via *Agrobacterium*

ترکیب Composition	نام محیط کشت Culture medium
MS ¹ +Saccharose(30g/L)+casein(200 mg/L)+myo-inositol(100 mg/L)+NAA ² (0.009 mg/L)+BAP ³ (1 mg/L)	پیش کشت Preculture
MS+Saccharose(30g/L)+casein(200 mg/L)+myo-inositol(100 mg/L)+NAA(0.009 mg/L)+BAP(1 mg/L)+Acetosyringone(40 mg/L)	کشت توام Co-cultivation
MS+Saccharose(30g/L)+casein(200 mg/L)+myo-inositol(100 mg/L)+NAA(0.009 mg/L)+BAP(1 mg/L)+Cefotaxime(400 mg/L)	کشت استراحت Rest culture
MS+Saccharose(30g/L)+casein(200 mg/L)+myo-inositol(100 mg/L)+NAA(0.009 mg/L)+BAP(1 mg/L)+Hygromycin (25, 30 or 35 mg/L)+Cefotaxime(400 mg/L)	کشت انتخابی و باززایی Selection and regeneration culture
MS1/2X+NAA(0.18 mg/L)+BAP(1 mg/L)+CuSo4(2mg/L)+Cefotaxime(400 mg/L)	ریشه زایی Root induction

1. MS, Murashige and Skoog medium (1962) 2. NAA, Naphthalene acetic acid 3: BAP, Benzylaminopurine

هیبریداسیون نقطه‌ای استفاده شد. به این منظور نمونه برگ‌های جوان بوته‌های ریشه دار برداشت و پس از قرار دادن در ازت مایع، تا زمان استخراج دی‌ان‌ا در -65°C نگهداری شدند. استخراج دی‌ان‌ا با استفاده از CTAB و مطابق روش ساقی-معروف و همکاران (Saghi-Marooof *et al.* 1984) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

آزمون PCR با دو جفت آغازگر اختصاصی hptF/R و BYDVStarlingF/R (جدول ۱) جهت تکثیر قطعاتی از ژن پلیمرز BYDV-PAV و hpt موجود روی اسکلت سازه‌ها، با استفاده از دی‌ان‌ای استخراج شده به

حاوی سه قسمت پیت ماس و یک قسمت خاک گلخانه سترون منتقل و با پلاستیک پوشیده شدند. آبیاری و تغذیه با MS مایع با نصف غلظت به مدت چهار روز و سپس با آب جاری انجام شد. در این مرحله تغذیه با کود کامل به فواصل هفت تا ده روز یک بار تا تشکیل خوشه انجام شد. شرایط فیزیکی اتاق رشد در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ تا ۷۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شد.

آزمون‌های تعیین تراریختی بوته‌ها

برای تعیین تراریختی بوته‌های به‌دست آمده از کشت بافت، از آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و

عنوان قالب و مطابق برنامه قبل و با در نظر گرفتن دمای اتصال هر جفت آغازگر انجام شد.

آزمون هیبریداسیون نقطه‌ای

شناسگر غیر رادیواکتیو hpt با استفاده از کیت PCR ELISA DIG-Labeling (Roche Applied Science) ناقل pWBVec8 به عنوان قالب و جفت آغازگر hptF/R طی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۵۰ میکرولیتر مطابق دستور شرکت سازنده ساخته شد. جهت اطمینان از صحت واکنش، شناسگر یاد شده همراه با محصول PCR (واکنش فاقد DIG-11-dUTP) در ژل آگاروز یک در صد بارگذاری شد. دی ان ای استخراج شده از بوته‌های گندم تراریخت به همراه گندم الوند دست ورزی نشده بر روی ژل آگاروز یک در صد به منظور غلظت سنجی بارگذاری شد. پس از یک‌نواخت سازی غلظت دی ان ای (حدود ۵۰ ng)، با حجم مساوی از محلول واسرشتگی (۲۵/۰ مولار NaOH و NaCl) مخلوط، در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری و سپس به روی یخ منتقل شد. غشا نایلون دارای بار مثبت در بافر SSC×2 خیس‌سازنده و در دستگاه لکه‌گذار نقطه‌ای (Dot blotter) قرار داده شد. پس از اتصال به دستگاه مکش، محلول دی ان ای واسرشته در چاهک‌ها بارگذاری شد. اتصال دی ان ای روی کاغذ با استفاده از اشعه ماورای بنفش و دستگاه UV cross linker انجام شد. از کیت DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche Applied Science) جهت انجام هیبریداسیون، blocking و واکنش سرولوژیکی با اعمال برخی تغییرات از جمله بافر پیش هیبریداسیون و هیبریداسیون (بافر فسفات ۲۵/۲ مولار، ۷/۲ pH EDTA ۱mM و ۷% SDS) و دمای هیبریداسیون و شستشوی شدید (stringency) ۶۵ °C استفاده شد.

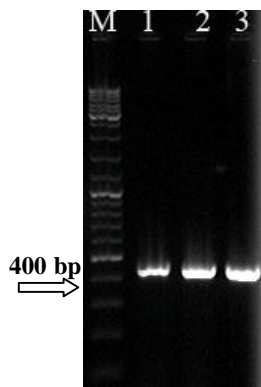
آلوده‌سازی بوته‌ها جهت ارزیابی مقاومت

ویروس کوتولگی زرد جو BYDV-PAV جدایه دشتک با شته‌های ناقل آن *Rhopalosiphum padi* در شرایط گلخانه (دمای ۲۵±۲ °C و تاریکی/روشنایی، ۱۶/۸ ساعت) به عنوان منبع ویروس تکثیر شد. شته‌های آلوده ۱۴ روز پس از تغذیه از منبع ویروس به گیاهان تراژن و کنترل منتقل شدند. برای هر بوته مستقر در خاک، حدود ۲۰ شته آلوده به BYDV-PAV در نظر گرفته شد. شته‌ها پس از هفتاد و دو ساعت با حشره کش کنفیدور (Bayer) سمپاشی شدند. نمونه‌برداری از بوته‌ها جهت آزمون الیزا پانزده روز پس از حذف شته‌ها انجام شد. آزمون الیزای غیر مستقیم با استفاده از گاماگلوبولین تهیه شده علیه BYDV-PAV (Bioreba, Switzerland) با رقت پیشنهادی شرکت سازنده و روش کانورس و مارتین (Converse & Martin 1990) انجام شد.

نتایج و بحث

ساخت سازه

صحت سازه‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سنجاق سری دارای ایترون (pWBVec8:S+AS)، سنس (pWBVec8:S) و آنتی سنس (pWBVec8:AS) که دارای نشانگر hpt هستند، با آزمون‌های مختلف به تأیید رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگر BYDVStarlingF/R، قطعاتی به طول حدود ۴۰۰ جفت باز را تکثیر نمود (شکل ۴). آزمون هضم آنزیمی با استفاده از ترکیب آنزیم‌های موجود روی سازه‌ها (شکل ۳) قطعاتی با اندازه‌های مورد انتظار را آزاد ساخت. انجام ترادف یابی با استفاده از آغازگرهای فوق منجر به تأیید نهایی سازه‌ها شد.



شکل ۴. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۴۰۰ ~ جفت باز) با استفاده از آغازگرهای BYDVStarlingF/R. راهک‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب مربوط به سازه‌های سنس، آنتی سنس و ihp-loop است.

Fig. 4. PCR product (~ 400 bp) using BYDVStarlingF/R primers. Lanes 1, 2 and 3 are from sense, antisense and ihp-loop constructs, respectively.

تراریختی و کشت بافت گندم

مطالعات بسیاری جهت بهبود شرایط تراریختی گندم با استفاده از آگروباکتریوم به عنوان یک روش ساده، کم هزینه و مؤثر صورت پذیرفته و بهترین سویه‌های باکتری برای تراریختی گرامینه معرفی شده‌اند (Wu *et al.* 2003, Patnaik and Khurana 2001 and Jones *et al.* 2005). هیگرومایسین به عنوان یک نشانگر انتخابی مؤثر در گندم معرفی شده است که در کنار سایر نشانگرهای انتخابی از جمله علف کش‌ها و آنتی بیوتیک‌ها کاربرد دارد (Ortiz *et al.* 1996). در تحقیق حاضر با انجام آزمایش‌های متعدد، شرایط جهت کشت بافت از طریق باززایی مستقیم جنین کامل گندم در محیط کشت‌های مختلف بهینه‌سازی شد (جدول ۲). مراحل مختلف کشت بافت و تراریختی با سه نوع سازه مختلف با استفاده از آگروباکتریوم سویه AGLO با از بین رفتن تعدادی از ریزنمونه‌ها در هر مرحله به ویژه محیط انتخابی دارای هیگرومایسین به غلظت ۳۵ mg/L همراه بود (جدول ۳). سفید شدگی بوته‌ها و در نهایت مرگ آنها در محیط انتخابی با غلظت فوق نشان از کارایی

مناسب این نشانگر در غربالگری داشت و می‌تواند حاکی از احتمال بالای انتقال سازه به لاین گندم باشد. شکل ۵A بوته حذف شده در محیط حاوی هیگرومایسین در مقایسه با بوته مقاوم به این آنتی بیوتیک که تراریخت شده است را نشان می‌دهد. تشکیل ساقه‌های اصلی، از محیط انتخابی آغاز گردید و در بسیاری از بوته‌ها ساقه‌های فرعی (۲-۴ عدد) در کنار ساقه اصلی به وجود آمد. بوته‌ها در محیط ریشه‌زایی درون شیشه پس از چهار تا شش هفته و تعویض محیط به ریشه رفتند. ریشه‌ها در ابتدا فاقد انشعاب بوده به تدریج واجد تارهای کشنده شدند (شکل ۵B). میزان متوسط باززایی بوته‌ها و تولید بوته‌های ریشه‌دار برای سازه‌های سنس، آنتی سنس و سنجاق سری دارای اینترون به ترتیب معادل ۱۰/۹، ۹/۳ و ۱۱/۵ درصد محاسبه شد (جدول ۳).

آزمون‌های تعیین تراریختی بوته‌ها

تراریختی بوته‌ها بر اساس آزمون‌های الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و لکه‌گذاری نقطه‌ای ارزیابی شد.

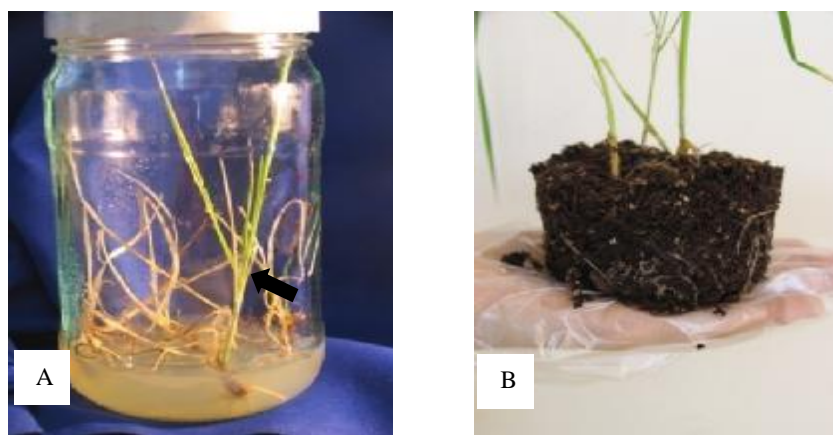
جدول ۳. تعداد جنین‌های موجود در هر مرحله از کشت بافت برای سازه‌های سنس، آنتی‌سنس و سنس‌جاق سری دارای اینترون

Table 3. Survival of wheat embryos and plants transformed with sense, antisense or ihp-loop constructs in various stages of development

تعداد در صد موفقیت	تعداد در خاک	تعداد در محیط کشت ریشه - زایی	تعداد در محیط کشت انتخابی *۳	تعداد در محیط کشت انتخابی *۲	تعداد در محیط کشت انتخابی *۱	تعداد در محیط استراحت	تعداد در کشت توام	تعداد جنین	تیمار
Success rate (%)	No. in soil	No. in root induction medium	No. in selection medium 3	No. in selection medium 2	No. in selection medium 1	No. in regeneration medium	No. in co-cultivation medium	No. of embryos	Treatment
									سازه سنس‌جاق سری
									دارای اینترون
									ihp-loop construct
6.15	8	17	33	40	47	130	130	130	Experiment 1
1	2	5	16	32	64	200	200	200	Experiment 2
18.1	20	47	63	DU	DU	110	110	110	Experiment 3
7.27	8	10	19	27	DU	110	110	110	Experiment 4
2.9	9	13	23	DU	DU	310	310	310	Experiment 5
18	54	81	99	DU	DU	300	300	300	Experiment 6
27.3	82	102	152	DU	DU	241	300	300	Experiment 7
	183	275	405	99	111	1401	1460	1460	Total
11.53									Average
									سازه سنس
10.96	34	48	100	DU	DU	300	310	310	Sense construct
									سازه آنتی سنس
9.35	29	42	67	-DU	DU	310	310	310	Antisense construct

DU: These media were not used

* 25, 30 and 35 mg/L hygromycin for selection media 1, 2 and 3 respectively



شکل ۵. A: محیط کشت انتخابی هیگرومایسین (۳۵mg/L). زرد شدن ریزنمونه‌های تراریخت نشده و ادامه رشد یک ریزنمونه تراریخت (فلش) در این محیط کشت دیده می‌شود. B: تشکیل ریشه‌های موئین در خاک.

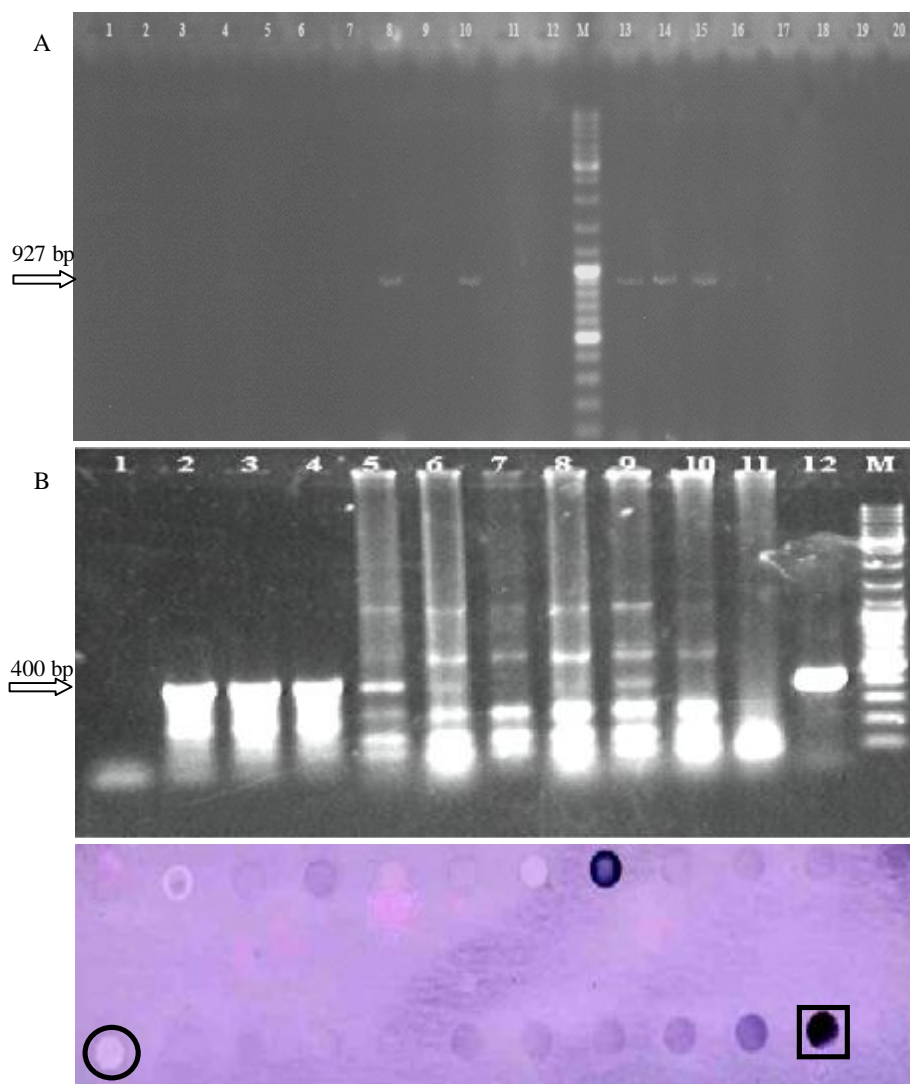
Fig. 5. Hygromycin selection medium (35mg/L). A: Declining non-transformed explants compared to a vigorous transformed explants (arrow) B: Hairy root formation of explants in soil.

(Patnaik et al. 2006, Bhalla et al. 2006).
 بوته‌های تراریخت که به طور مصنوعی با BYDV-PAV مایه‌زنی شده بودند، علاوه بر تفاوت قابل ملاحظه جذب در آزمون الیزا در مقایسه با الوند تیپ وحشی، از ظاهری طبیعی بدون ظهور زردی و کوتولگی برخوردار بودند (شکل ۷). تعدادی از بوته‌ها علیرغم دارا بودن تراژن، مقاومت پائینی را در برابر ویروس داشتند. این موضوع می‌تواند به واردشدگی غیر مناسب تراژن (تعداد نسخه و یا محل وارد شدگی) که سازوکار خاموشی ژن را حمایت نمی‌نماید، مربوط دانست (Kohli et al. 2003). وجود گیاهان تراژن با مقاومت پایین در مطالعات یان و همکاران (Yan et al. 2007)، وانگ و همکاران (Wang et al. 2000) و نیز ابوت و همکاران (Abbott et al. 2002) گزارش شده است.

در تحقیق حاضر، تراریختی با سازه‌های سنجاق سری دارای اینترون و سنس بهترین کارایی برای کاهش عیار ویروس را به دست داد. این در حالی بود که تراریختی با سازه آنتی سنس هیچ مقاومتی را القا نکرد. مقایسه میانگین تراریختی برای دو سازه برتر نشان داد که سازه ihp-loop به مراتب بهتر از سازه سنس عمل نموده است. وانگ و همکاران (۲۰۰۰) و نیز ابوت و همکاران (۲۰۰۲) سازه‌ای سنجاق سری (بدون اینترون) با استفاده از ترادفی از ژن‌های پلیمراز BYDV-PAV به عنوان ساقه (۱/۶ kb) و حلقه (۰/۸۶ kb) جهت تراریختی یولاف را علی‌رغم توصیه به کاربرد سازه‌های سنجاق سری با ساقه کوتاه‌تر از ۵۰۰ bp به علت کارایی بالاتر آنها (Wesley et al. 2001, Yan et al. 2009)، استفاده نمودند که به مقاومت کامل در تعدادی از لاین‌های به دست آمده منجر شد. هم‌چنین یان و همکاران (۲۰۰۷) سازه‌ای ساقه- حلقه به ترتیب با استفاده از ژن‌های رپلیکاز (ساقه) و

بوته‌هایی که عیار ویروس در آنها ۵۰٪ عیار ویروس کنترل مثبت (گیاه غیر تراریخت) و یا کمتر اندازه‌گیری شده بود به عنوان یک رخداد مقاومت در نظر گرفته شد. آزمون الیزا عدم آلودگی تعدادی از بوته‌های T₀ پس از آلوده‌سازی مصنوعی با شته‌های حامل BYDV-PAV را برای سازه‌های سنجاق سری دارای اینترون و سنس نشان داد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با جفت آغازگرهای hptF/R و BYDVStarlingF/R و دی ان ای استخراج شده از برگ بوته‌های تراریخت به ترتیب منجر به ساخت قطعاتی معادل ۹۲۷ و ۴۰۰ جفت باز در تعدادی از لاین‌ها گردید. این در حالی بود که این قطعه برای گندم‌های تراریخت نشده و نیز تیپ وحشی گندم الوند ساخته نشد (شکل‌های ۶A و ۶B). وجود باندهای فوق در تعدادی از لاین‌ها قوی‌تر و در برخی ضعیف‌تر بود. در آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای نیز با استفاده از شناسگر hpt حضور این تراژن در ژنوم تعدادی از بوته‌های تراریخت با شدت و ضعف به تأیید رسید. این در حالی است که هیچ واکنشی برای بوته‌های تراریخت نشده و نیز الوند تیپ وحشی دیده نشد (شکل ۶C). شدت و ضعف این لکه‌ها و نیز باندهای PCR می‌تواند بواسطه ورود یک و یا تعداد اندک نسخه تراژن توسط آگروباکتریوم باشد که از مزایای آن می‌باشد (Bhalla et al. 2006). نتایج ارزیابی تراریختی و راندمان آن بر اساس آزمون‌های الیزا، PCR و لکه‌گذاری نقطه‌ای با اختلافی اندک همپوشان بود (جدول ۴). متوسط راندمان تراریختی بر اساس آزمون الیزا معادل ۱/۸، ۱/۳ و صفر در صد به ترتیب برای سازه‌های سنجاق سری واجد اینترون، سنس و آنتی سنس بر آورد گردید. این اعداد با نتایج سایر مطالعات تراریختی با استفاده از نشانگر هیگرومایسین و آگروباکتریوم همخوانی دارد



شکل ۶. تعیین تراریختی بوته‌های گندم T_0 با استفاده از آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (A و B) و لکه‌گذاری نقطه‌ای (C) با استفاده از دی ان ا استخراج شده از بوته‌های تراریخت شده. تکثیر قطعات ۹۲۷ و ۴۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای hptF/R و BYDVStarlingF/R به ترتیب در قسمت های A و B نشان از وجود تراژن در ژنوم لاین مورد نظر دارد. (قسمت A: راهک‌های ۸، ۱۰ و ۱۳-۱۵ مربوط به بوته‌های تراریخت شده و راهک‌های ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به آب و گندم تراریخت نشده است، قسمت B: راهک‌های ۵ و ۹ مربوط به گیاهان تراریخت شده با pWBVec8:S+AS، راهک ۶ گیاه تراریخت شده با pWBVec8:S و راهک ۱۰ مربوط به گیاه تراریخت شده با pWBVec8:AS می‌باشند. راهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷ و ۱۲ به ترتیب مربوط به آب، پلاسمید سازه‌های pWBVec8:S، pWBVec8:AS، pWBVec8:S+AS، گیاه تراریخت نشده و پلاسمید همسانه-pRos 1189 می‌باشد. در قسمت C لکه‌های محصور شده در مربع و دایره به ترتیب مربوط به دی ان ای‌های پلاسمید pWBVec8:S+AS و گندم تراریخت نشده می‌باشد. لکه‌های پررنگ نشانگر شناسایی تراژن در دی ان ای لاین‌های تراریخت است.

Fig. 6. Test of transformation of T_0 wheat lines using PCR (A and B) and dot blot (C) assays with extracted DNAs. Amplification of 927 and 400 bp segments in PCR using hptF/R (A) and BYDVStarlingF/R (B) primers reveal successful transformation (A: lanes 8, 10 and 13-15 for transformed explants, 1 and 2 water and nontransformed Alvand, B: wheat explants transformed with pWBVec8:S (lane 6), pWBVec8:AS (lane 10) and pWBVec8:S+AS (lanes 5 and 9). Lanes 1, 2, 3, 4, 7 and 12 are loaded with water, pWBVec8:S, pWBVec8:AS, pWBVec8:S+AS, negative control (non manipulated Alvand DNA) and pRos-1189 purified plasmid, respectively. In C, rectangled and circled dots show pWBVec8:S+AS plasmid and non-transformed wheat, respectively. Chromatic dots indicate transgene detection in transformed lines.

جدول ۴. راندمان تراریختی سازه‌ها بر اساس آزمون‌های الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و لکه گذاری نقطه‌ای

Table 4. Transformation rates of constructs based on ELISA, PCR and dot blot assays.

در صد تراریختی Transformation rate ^e (%)	آزمون لکه گذاری نقطه ای Dot blot assay	آزمون زنجیره ای پلیمرز PCR assay	الیزا ELISA assay	تیمار Treatment
				سازه سنجاق سری دارای ایترون ihp-loop construct
1.5	4 ^d /130 ^b	4 ^e /130 ^b	2 ^a /130 ^b	Experiment 1
0.5	1/200	2/200	1/200	Experiment 2
4.5	3/110	4/110	5/110	Experiment 3
0.9	1/110	1/110	1/110	Experiment 4
0	0/310	0/310	0/310	Experiment 5
1	4/300	4/300	3/300	Experiment 6
4	13/300	13/300	12/300	Experiment 7
1.8	1.8/100	2/100	1.8/100	Average
1.3	3/310	4/310	4/310	سازه سنس Sense construct
0	0/310	0/310	0/310	سازه آنتی سنس Antisense construct

a: No. of plants with virus content equal to 50% or lower than that of corresponding positive control (non transformed Alvand)

b: Total explants in each experiment (Table 3)

c: No. of plants amplifying 927bp band using hptF/R primers in PCR

d: No. of plants with positive hybridization results using hpt probe

e: Transformation rates based on ELISA values



شکل ۷. بوته‌های تراریخت شده (راست) و نشده (چپ) با سازه ihp-loop که با BYDV-PAV مایه‌زنی شده‌اند. گلدان سمت چپ کوتولگی و زردی را در مقایسه با لاین تراریخت که ظاهری سالم دارد نشان می‌دهد.

Fig. 7. Transformed (right) and nontransformed (left) wheat lines with ihp-loop construct, inoculated with BYDV-PAV showing dwarfing and yellowing in nontransformed compared to vigorous transformed plants.

مطالعه حاضر نیز کاربرد سازه دارای اینترون که پایه‌ای معادل ۴۰۰ جفت باز را داراست، به بروز مقاومت و عیار پایین ویروس (در حد گیاهان سالم) در تعدادی از بوته‌های تراریخت شده، منجر شد. مطالعات تکمیلی برای تعیین تعداد نسخه تراژن و نیز نحوه وراثت‌پذیری در لاین‌های تراریخت انتخابی در نسل‌های بعدی در دست انجام است.

سپاسگزاری

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

پروتئین پوششی (حلقه) BYDV-GPV را به جنین نارس گندم با بمباران ژنی منتقل و درجات مختلفی از مقاومت و حساسیت را به دست آوردند.

مطالعات اسمیت و همکاران (Smith *et al.* 2000) کارایی سازه‌های دارای اینترون با قابلیت splicing را در سازه‌های سنجاغ سری جهت القای مقاومت نسبتاً کامل در مقابل ویروس‌ها و ژن‌های داخلی در مطالعات ژنتیک معکوس، ژنومیکس، مهندسی مسیرهای متابولیکی و محافظت در برابر بیمارگر نشان داده است. حضور اینترون موجب پایداری سازه گردیده و در فرایند پردازش آر ان ای پیش پیک (pre-mRNA) جدا می‌شود. به نظر می‌رسد خروج اینترون از سازه شرایط برای هیبریداسیون آر ان ای در جهت تشکیل آر ان ای دولا و نیز محافظت سازه سنجاغ سری در برابر نوکلئازها را فراهم می‌سازد (Wesley *et al.* 2001 and Smith *et al.* 2000).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (15-18) متن انگلیسی مراجعه شود.