کلونینگ توالی سنتتیک ویروس تریستزای مرکبات (CTV) جهت القاء مقاومت علیه این بیماری در مرکبات

امیر حسین زمانی (۱)، محمد مهدی سوهانی (۲)، عبدالله حاتم زاده (۲)، علیرضا افشاری فر (۳)، محمدرضا میرزایی (۴)، اندیشه پورمساله گو (۱)، گیتا ناصری (۱)

۱و۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳- عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه شیراز، ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

بیماری تریستزا از لحاظ اقتصادی مهمترین بیماری ویروسی مرکبات است که سبب نابودی بیش از ۸۵ میلیون اصله درخت در سراسر جهان شده است. امروزه مهمترین و کاربردی ترین راهبرد ایجاد مقاومت علیه ویروس ها بر اساس سیستم "مقاومت حاصل از پاتوژن" (PDR) و مکانیسم اپی ژنتیک PTGS جهت تخریب RNA ویروسی پایه گذاری شده است. در این شیوه، انتقال بخشی از ژن ویروسی موجب اختلال در چرخه زیستی ویروس مرتبط یا خویشاوند در گیاه میزبان می شود. با القا موثر مکانیسم طبیعی PTGS از طریق ورود یک رشته dsRNA سنتتیک، توالی های هدف ویروس شناسایی و تحت برش اندونوکلئولیتیکی قرار گرفته و سرکوب می شوند. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف ساخت یک بخش بسیار حفاظت شده از ژن کپسید پروتئینی ویروس CTV به صورت توالی های سنس و آنتی سنس و کلونینگ آن در وکتور القاء خاموشی ژن pFGC5941 (ABRC) جهت تولید dsRNA و امکان القا مقاومت PDR در گیاه مرکبات انجام شده است. قطعه کلون شده به صورت موزاییک بوده و در دو مرحله در وکتور مذکور و در دو طرف اینترون CHSA وارد شد. بررسی نهایی پلاسمید نوترکیب توسط PCR و هضم دوگانه آنزیمی انجام شد و نشان دهنده تکثیر صحیح و صحت درج و حضور قطعات مذکور در پلاسمید خاموشی موردنظر بود. انتظار می رود با انتقال سازه خاموشی حاصل به گیاه مرکبات و تولید dsRNA، مکانیسم PTGS علیه طیف گسترده ای از نژادهای ویروس CTV فعال شود.

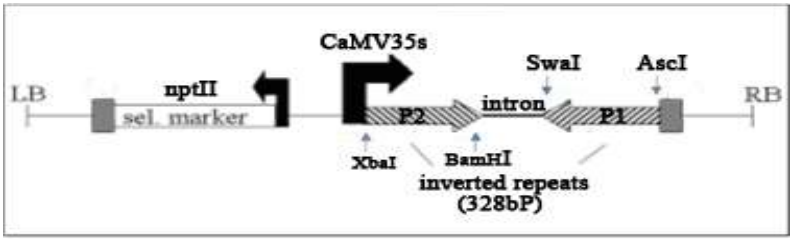
واژه های کلیدی: کلونینگ ، وکتور خاموشی PFGC5941 ، CTV ، dsRNA ، PDR ، PTGS

مقدمه

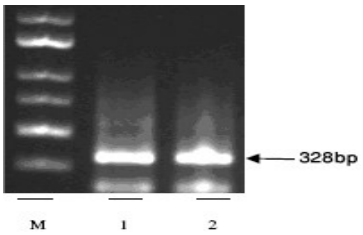
بیماری تریستزا از لحاظ اقتصادی مهمترین بیماری ویروسی مرکبات است که سبب نابودی بیش از ۸۵ میلیون اصله درخت در سراسر جهان شده است. عامل بیماری، یک ویروس شته‌زاد از جنس کلسترو ویروس و با ژنوم RNA تک-رشته‌ای به ابعاد nm ۱۲-۱۰ × ۲۰۰۰ می‌باشد. این ویروس دارای دو کپسید پروتئینی P۲۵ (CP) و P۲۷ می‌باشد [۱]. یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین راهبردهای ایجاد مقاومت علیه ویروس‌ها بر اساس سیستم "مقاومت حاصل از پاتوژن" (PDR) و مکانیسم اپی‌ژنتیک PTGS جهت تخریب RNA ویروسی است. با القا موثر مکانیسم طبیعی PTGS از طریق ورود یک رشته dsRNA سنتتیک و تولید siRNA های bp ۲۶-۲۱، توالی‌های هدف ویروس شناسایی و تحت برش اندونوکلئولیتیکی قرار گرفته و سرکوب می‌شوند [۲].

مواد و روش ها

به منظور افزایش کارایی سیستم PTGS، چندین توالی ژن کپسید پروتئینی p25 نژادهای مختلف ویروس CTV از قطب علمی ویروس‌شناسی شیراز دریافت و طی بلاست با بانک‌های اطلاعاتی، دو توالی که کمترین همپوشانی با یکدیگر و بیشترین همپوشانی را با توالی‌های موجود در بانک ژن داشتند انتخاب شدند. بخش‌هایی از توالی‌های مذکور جهت سنتز یک قطعه موزائیک کاملاً همولوگ با سایر نژادهای ویروس استفاده شدند. طی واکنش PCR دو پلاسمید کلونینگ PTZ57R/T حاوی دو ژن کپسیدی ۱C و ۳C با آغازگرهای اختصاصی و در شرایط استاندارد، به ترتیب قطعات ۱Ca و ۳Ca جداسازی و تکثیر شدند. پس از آشکارسازی باندها زیر نور UV و تأیید تکثیر صحیح، دو قطعه ۱Ca و ۳Ca با آنزیم XhoI هضم آنزیمی شده و دو قطعه مذکور طی واکنش لایگیشین به یکدیگر متصل شدند. از قطعه موزائیک حاصله با پرایمرهای اختصاصی، قطعات سنس و آنتی سنس P1 و P2 جداسازی و تکثیر شد، سپس قطعه P1 تحت تاثیر دو آنزیم AscI و SmiI و قطعه P2 با آنزیم‌های XbaI و BamHI هضم آنزیمی شده و در جایگاه‌های مرتبط در وکتور pFGC5941 که با آنزیم های مشابه برش خورده بودند درج شدند. جهت تکثیر سازه نوترکیب، ترانسفورماسیون محصول واکنش الحاق در باکتری‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α صورت گرفت و سپس واکنش‌های PCR و هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای نوترکیب جهت بررسی حضور قطعات تراژن انجام شد.



شکل ۱. ساختار سازه PFGC5941 حاوی قطعات P1 و P2



شکل ۲ . واکنش PCR پلاسمیدهای نوترکیب و تایید حضور تراژن‌های P1 و P2

نتایج و بحث

به دنبال واکنش‌های PCR جهت جداسازی و تکثیر قطعات اولیه ۱Ca و ۳Ca با وزن مولکولی ۲۵۰bp، هضم آنزیمی آن‌ها صورت گرفته و با الحاق آن‌ها به یکدیگر، قطعه موزائیک که دارای بالاترین سطح تشابه در بین نژادهای ویروسی است، حاصل شد (اطلاعات منتشر نشده). قطعه موزائیک به عنوان الگوی DNA در واکنش PCR استفاده شد تا قطعات سنس و آنتی سنس P1 و P2 به اندازه ۳۲۸ bp سنتز شود. پس از آن هضم دوگانه دو قطعه P1 و P2 و جایگاه‌های مرتبط در وکتور pFGC5941 صورت گرفته و به صورت مکمل و معکوس یکدیگر در دو طرف توالی اینترون CHSA درج شدند (شکل ۱). آنالیز MSA نشان داد که دو قطعه P1 و P2 ساخته شده، دارای بیش از ۹۸٪ تشابه با بخش‌های حفاظت شده سایر توالی‌های ویروسی بودند. واکنش PCR صورت گرفته روی پلاسمیدهای نوترکیب، حضور تراژن‌های P2 و P1 را تأیید کرد (شکل ۲). کارایی سازه pFGC5941 حاوی قطعات سنس و آنتی سنس در تولید dsRNA و القا

خاموشی علیه ویروس PVX-Eg2 سیب‌زمینی و توتون و ویروس TYLC گوجه فرنگی با موفقیت به ثبت رسیده است [۳و۲]. تشکیل ساختار سنجاق‌سری در توالی dsRNA به علت وجود اینترون CHSA در سازه pFGC5941، مابین دو قطعه درج شده، سبب افزایش کارایی بیش از پیش فرآیند خاموشی در ۱۰۰-۹۰٪ موارد شده است [۳]، همچنین وجود اینترون، ثبات و پایداری ساختارهای dsRNA ها را در سلول‌های باکتریایی و گیاهی تضمین می‌کند. انتظار می‌رود با انتقال سازه خاموشی حاصل به گیاه مرکبات و تولید dsRNA، مکانیسم PTGS علیه طیف گسترده‌ای از نژادهای ویروس CTV فعال شود.

منابع

[1] Kerschen, A., C. A. Napoli, R. A. Jorgensen and A. E. Muller 2004. Effective of RNA interference in transgenic plants. FEBS Letters 566: 223-228.

[2] Rezk, A.A., N. A. Abdallah, A. M. Abdel-Salam 2006. Transgene-mediated RNA silencing of TYLCV gene affecting the accumulation of viral DNA in plants. Arab J. Biotech 9: 143-158.

[3] Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu and P. S. Gooding, 2001. Construct design for efficient, effect and hight throughput gene silencing in plants. Plant J., 27(6): 581-590.

Cloning of citrus tristeza virus (CTV) synthetic sequence in order to induce resistance against CTV

A.H. Zamani[1], M.M. Sohani[2], A. Hatamzadeh[2], A.R. Afsharifar[3], M.R. Mirzaei[1], A. Purmasalegu[1], G. Naseri[1]

1- MSc students of agriculture faculty of ,Guilan university 2- Assistant Professor of Biotechnology depatmemant of Guilan university 3- Assistant Professor of Plant protection of Shiraz university

Abstract

The most important viral economicaly disease in Citrus is a Tristeza Virus have been destroyed over than 85 million trees in the world. the main transgenic strategy to obtain virus resistant plants is based on PDR system by which transforming host plants with partial viral gene cause to block a same virus multiplication and PTGS mechanism enables plants to specifically degrade invasive RNAs in a sequence-specific manner. This study was aimed to synthesis of conserved sense and antisense fragments of CTV P25 coat protein and their cloning into PFGC5941(ABRC) silencing binary vector to potent PDR resistance induction in citrus. Final evaluation of recombinant plasmid using PCR amplification and double digestion by restriction enzyme demonstrated the integrity of fragments insertion into PFGC5941 silencing vector. To be expected after dsRNA synthesis by said silencing construct-mediated citrus transformation cause to activate PTGS mechanism against abroad range of CTV strain.

Keywords CTV . cloning . dsRNA . PDR . PTGS . PFGC5941 vector