آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۶، شماره‌های ۲ و ۱، ۷۷-۱۳۷۶

بیان ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب زمینی (PVX) در گیاه سیب‌زمینی ترانس ژنیک *

Expression of potato virus X (PVX) coat protein gene in transgenic potato

هاله هاشمی، نوح شهرآئین و نیکلای دامونسکی
بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور تهران و
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده

ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب‌زمینی (PVX) تحت کنترل پروموتور PCaMV35 s و توالی‌های افزایش دهنده در داخل ناقل خاص از گروه binary vector کلون شد و سپس با استفاده از باکتری اگروباکتریوم تومه فاسینس *(Agrobacterium tumefaciens)* به داخل ۲ رقم گیاه سیب زمینی منتقل گردید. پس از رشد و تکثیر گیاهان، گیاهان ترانس ژنی که مقاومت به کاناماپسین داشتند در خاک کاشته شدند و پس از یکماه وجود transcript ژن پوشش پروتئینی ویروس X سیب‌زمینی در داخل آنها با روش آزمایش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و وجود transcript ژن پوشش پروتئینی (CP) در داخل برخی از گیاهان فوق به اثبات رسید. در این مقاله، در مورد خالص سازی RNA ویروسی، چگونگی انتقال به گیاه، نحوه انتقال (Transformation)، کلون کردن و انتقال ژن CP بحث شده است. شایان ذکر است که مطالعات ارزیابی میزان مقاومت گیاهان فوق به ویروس X سیب‌زمینی در دست انجام است.

مقدمه

خساراتی که توسط ویروسهای گیاهی به محصولات زراعی، باغی و یا جنگلی و مرتعی وارد میگردد موجب کاهش تولید در شرایط حاد حمله ویروس میگردد. برای جلوگیری از زیان ویروسهای گیاهی، از روشهایی مانند استفاده از بذور عاری از ویروس، کنترل و مبارزه با حشرات ناقل، استفاده از ارقام اصلاح شده و مقاوم به ویروس و از بین بردن گونه های علف هرز که میزبان ویروس میباشند استفاده میگردد (Hide and Lapwood, 1992). در سالهای اخیر بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک پیشرفت سریع و گسترده ای در اغلب زمینه های علوم

* این تحقیق برگرفته از بخشی از رساله دکتری نویسنده اول مقاله میباشد.

زیستی داشته است. کاربرد گسترده این علوم در زمینه گیاهی، اعم از گیاهان زراعی، باغی، جنگلی، مرتعی و زینتی با اهدافی هم چون ایجاد مقاومت در مقابل آفات و بیماریها، تنشهای محیطی، بهبود کیفیت و غیره نتایج پرباری داشته است. در مورد جلوگیری از خسارات وارده از طرف ویروسهای گیاهی، با بکارگیری روشهای نوین مهندسی ژنتیک پیشرفت قابل توجهی در دستیابی به گیاهان مقاوم به ویروس حاصل گردیده است. در حال حاضر مهمترین روشهای فوق عبارتند از :

۱- انتقال ژن به صورت antisense با هدف اختلال در تکثیر ویروس (Hemenway *et al.*, 1988; Macfarlane and Davis, 1992).

۲- انتقال ژن آنزیم ریلیکاز ویروسی جهت ممانعت از تکثیر ویروسی در سلول میزبان (Adreson *et al.*, 1992).

۳- انتقال ژن satellite RNA با هدف کاهش تعداد ویروس در گیاه میزبان (Harrison *et al.*, 1987; Gerlach, 1987).

۴- انتقال ژن پوشش پروتئینی ویروس به گیاه (Powell and stark, 1989).

از بین روشهای فوق، روش آخر تا بحال از موفقیت زیادی برخوردار بوده است. تاکنون ژن پوشش پروتئینی (CP) تعداد زیادی از ویروسهای گیاهی با هدف مقاوم سازی گیاهان در مقابل خسارات ویروسهای مربوط به تعدادی از گیاهان منتقل گردیده است (Lawson and Kaniewski, 1990). گیاهان دستکاری شده ژنتیکی، درجات مختلفی از مقاومت را نشان داده اند که می توان به دلایلی چون تفاوت در نسخه برداری و میزان آن، جایگاه استقرار ژن و تعداد کپی های ژن خارجی که وارد ژنوم گیاه میشود اشاره نمود (Meyer *et al.*, 1996). با توجه به اهمیت سیب‌زمینی به عنوان یک محصول زراعی مهم، تا بحال کوششهای فراوانی در جهت کاهش میزان خسارات وارده به آن توسط عوامل بیماری‌زای گیاهی به عمل آمده است. از جمله این عوامل میتوان به ویروسها اشاره نمود که هر ساله موجب کاهش درصد قابل توجهی از محصول سیب زمینی در زمینهای زیر کشت آن میشود (Lawson and Kaniewski, 1990; Kaniewski *et al.*, 1990). ویروس X سیب زمینی یکی از عوامل ویروسی در مزارع سیب زمینی است. این ویروس به تنهایی سبب کاهش محصول سیب زمینی بین ۱۰ تا ۲۰ درصد میشود. ولی در آلودگی توام با سایر ویروسها بخصوص ویروس (Y) (PVY) سیب‌زمینی میتواند سبب کاهش قابل توجهی در محصول بین ۸۰ تا ۹۰ درصد شود (Kaniewski *et al.*, 1990).

در تحقیق حاضر هدف در وهله اول استفاده و بکارگیری تعدادی از روشهای جدید مهندسی ژنتیک در راستای ایجاد مقاومت به ویروس X در گیاه سیب‌زمینی میباشد که تابحال این گونه روشها در ایران مورد استفاده قرار نگرفته است. در عین حال امید بر آن است که بتوان با بکارگیری فنون فوق واریته‌های مورد کاشت در ایران را نسبت به این ویروس و سایر ویروسها مقاوم نمود.

این بررسی در ۲ مرحله انجام گرفته است که مرحله کلونینگ آن در بخش بیولوژی مولکولی

انستیتو پاستور ایران و مرحله دوم آن که شامل ارزیابی مقاومت گیاهان فوق به ویروس PVX میباشد با همکاری بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آفات و بیمارهای گیاهی، تهران به انجام رسیده است.

مواد و روشها:

۱- ویروس PVX و خالص سازی RNA ویروسی:

سویه ویروسی مورد استفاده در این بررسی از طرف دکتر Viter (انستیتو پترولیوم و بیوارگانیک کیف اوکراین) اهدا شده بود. برای استخراج RNA ویروسی از فنل، کلروفرم و 1% SDS (سدیم دودسیل سولفات) استفاده شد. تمامی ظروف و وسایل شیشه‌ای مورد استفاده برای جلوگیری از عمل RNase (آنزیم تخریب کننده RNA) قبلا استریل شده و تمامی محلولها نیز توسط محلول ۰/۱٪ ماده شیمیائی دی انیل پیروکربنات (DEPC) تیمار شده بودند (Sambrook *et al.*, 1989).

۲- سنتز رشته مکمل ژن پوشش پروتئنی ویروس X

پس از استخراج RNA ویروسی، DNA مکمل (c DNA) توالی نوکلئوتیدی کد کننده ژن پوشش پروتئینی ویروس X با استفاده از عمل آنزیم Reverse transcriptase (نسخه بردار معکوس) ساخته شد.

۱-۲- طراحی پرایمر

بدین منظور در ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی و همچنین اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی EMBL دو پرایمر برای انتهاهای 3̀ و 5̀ ژن مورد نظر طراحی شدند (AC:M38655) به نحوی که دارای جایگاه ویژه برای آنزیم برش دهنده *BamHI* در دو انتهای 3̀ و 5̀ بودند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای ساخته شده به قرار زیر بود:

Primer upstream: 5̀- CCAT GGATCCTCGAAAGATGTCAGCACCAGCTAGC

Primer downstream: 5̀- TAGGGATCCTTATGGTGGTGGTAGAGTGACAAC

۲-۲- سنتز رشته مکمل DNA ژن پوشش پروتئینی

پس از خالص سازی RNA ویروس با استفاده از کیت First cDNA synthesis شرکت GIBCO BRL اقدام به ساختن رشته فوق از روی RNA ویروسی گردید. به طور خلاصه طبق دستورالعمل کیت ابتدا مخلوطی از RNA (۵-۱ میکروگرم) و پرایمر مربوط به انتهای 3̀ در لوله‌های ۰/۵ میلی لیتر تهیه و حجم آن با آب تیمار شده با DEPC به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. پس از انکوباسیون نمونه به مدت ده دقیقه در ۷۰°C، سپس لوله ها روی یخ منتقل و حداقل به مدت یک دقیقه در این وضعیت نگهداری شد. در مرحله بعد مخلوطی از بافر PCR10X و MgCl2 با غلظت ۲۵ میلی مولار و نوکلئوتیدهای تری فسفات (dNTP) با غلظت ده میلی مولار و DDT با غلظت ۰/۱ مولار تهیه و به هر لوله ۷ میکرولیتر از این مخلوط اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۴۲°C قرار داده شدند. سپس یک میکرولیتر از آنزیم Reverse

transcriptase به هر لوله اضافه و برای مدت ۵۰ دقیقه دیگر در درجه حرارت فوق نگاه داشته شدند. اختتام واکنش با قرار دادن لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۷۰°C انجام و سپس لوله‌ها به روی یخ منتقل شدند.

۳-۲- تکثیر قطعه cDNA تک رشته‌ای

در مرحله بعد به لوله‌های ۰/۵ میلی لیتری به میزان ۰/۵ میکرولیتر از cDNA، یک میکرولیتر از هر دو پرایمر و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و سایر مواد لازم برای انجام واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) اضافه شد و سپس طبق برنامه‌ای که داده شد DNA مورد نظر در طی ۳۰ سیکل به کمک ماشین ترموسایکلر تکثیر گشت.

در نهایت ۱ میکرولیتر از محصول PCR پس از اختتام عمل در ژل آگاروز ۰/۸ درصد حاوی ۵ درصد اتیدیوم بروماید قرار داده شد و پس از الکتروفورز به روش submerg و به کمک نور UV، ژل مورد بررسی قرار گرفت.

۲- کلون کردن DNA توالی نوکلوتیدی ژن پوشش پروتئینی در پلاسمید pSK

پس از مشاهده قطعه DNA مورد نظر در ژل و مقایسه آن با مارکر، محصول PCR با استفاده از فنل کلروفرم و رسوب مجدد DNA با اتانول استخراج و خالص گردید، سپس قطعه فوق با آنزیم *BamHI* مورد برش قرار گرفت تا انتها های چسبنده برای آن ایجاد شود. در عین حال پلاسمید pSK (کمپانی استراتژن امریکا) نیز با آنزیم *BamHI* برش داده شد. به منظور جلوگیری از بهم چسبیدن مجدد دو انتهای پلاسمید فوق انتهاهای آن مورد در مقابل آنزیم الکالین فسفاتاز قرار گرفت. پس از آن توسط آنزیم T4DNA Ligase قطعه مورد نظر و حامل به یکدیگر متصل شدند و حاصل عمل به باکتری *E. coli* سویه XLI Blue منتقل گردید و روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد داده شد. به منظور تائید وجود کلنی‌های باکتری حاوی قطعه فوق، پس از ۲۴ ساعت کلنی ها به طور جداگانه در محیط‌های کشت مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و سپس عمل تخلیص پلاسمید صورت گرفت و با استفاده از نقشه ژنی، پلاسمیدها مورد برش با آنزیم *BamHI* قرار گرفتند که در صورت وجود قطعه مورد نظر، سویه باکتریایی حاوی آن نگاهداری میشد.

۳- تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن CP

پس از کلون قطعه فوق در داخل پلاسمید pSK با استفاده از دستگاه DNA Sequencing شرکت فارماسیا (Pharmacia) و با استفاده از کیت T7 Polymerase همین شرکت و استفاده از ماده رادیو اکتیو $dATP_{\alpha}35$ با روش دی دوکسی (di deoxy Method) ژن CP مورد بررسی توالی نوکلئوتیدی قرار گرفت (Sanger *et al.*, 1977).

به طور خلاصه با استفاده از پرایمرهای Universal و Reverse مربوط به کیت فوق و استفاده از پلاسمید pSK حاوی قطعه مورد نظر و اضافه کردن نوکلئوتیدهای دی دوکسی چهارگانه به طور مجزا و آنزیم T7 Polymerase به همراه $dATP_{\alpha}35$ رادیواکتیو در هر لوله، واکنش پلی‌مریزاسیون انجام گرفت. برای اطلاع از چگونگی انجام دقیق روش توصیه میشود به

دستورالعمل کیت و دستگاه فوق مراجعه گردد.

۴- کلون ژن CP در پلاسمید pRTL و ایجاد ناقلین بیان شونده

پلاسمید pRTL حاوی پروموتور $pCaMV35_s$ و یک توالی افزایش دهنده برای افزایش میزان پروتئین میباشد. این پلاسمید دارای جایگاه برش آنزیم *BamHI* در خود میباشد. در ابتدا این پلاسمیدها با آنزیم *BamHI* برش داده شده و تحت تاثیر آنزیم الکالین فسفاتاز قرار گرفت. سپس حاصل عمل Ligation بین پلاسمید فوق و قطعه مورد نظر به سلول *E. coli* سویه XLIBlue منتقل و کلنی های بدست آمده روی محیط آمپی‌سیلین جهت تائید وجود قطعه با استفاده از نقشه ژنی مورد بررسی با آنزیم برش دهنده *BamHI* قرار گرفتند.

۵- انتقال expression cassettes به داخل ناقل Bin 19

ناقل Bin 19 حاوی یک جایگاه برش برای آنزیم *Hind III* میباشد. برای انتقال مجموعه ژن مورد نظر همراه پروموتور PCaMV و توالی نوکلئوتیدی افزایش دهنده و اختتام دهنده ژنی در ابتدا این مجموعه از پلاسمید pRTL با کمک برش با آنزیم *Hind III* جدا شد و سپس در طی واکنش Ligation قطعه مورد نظر در داخل ناقل Bin 19 کلون شد. برای شناسایی سلولهای *E. coli* حاوی قطعه فوق از محیط رشد باکتریایی حاوی کانامایسین استفاده شد، چون ناقل فوق دارای مارکر مقاومت به کانامایسین است (Sambrook *et al.*, 1989).

۶- انتقال ژن CP به گیاه

در ابتدا ناقل وکتور Bin 19 حاوی ژن مورد نظر به داخل سلول اگروباکتریوم سویه PGV 3850 منتقل شد پس از آن با کمک روش PCR و استفاده از پرایمرهای فوق وجود ژن در داخل پلاسمید اگروباکتریوم تائید شد. سپس با استفاده از روش minituber disk در شرایط استریل به میزان ۱۰ میکرولیتر از اگروباکتریوم حاوی ژن فوق به برش های غده سیب‌زمینی منتقل و این برشها برای انتخاب گیاهان ترانسفورم شده بر روی محیط دارای کانامایسین منتقل شدند (Ebsani *et al.*, 1995).

پس از رشد، جوانه های ترانسفورم شده، این جوانه ها به محیط حاوی مواد غذایی لازم جهت ادامه رشد انتقال داده شد و گیاهان فوق در اتاقک رشد (growth chamber) در دمای ۲۵°C با شرایط نوری لازم نگهداری و تکثیر شدند.

۷- آنالیز گیاهان ترانس ژنیک

به منظور ردیابی وجود ژن CP در داخل گیاهان فوق، RNA گیاهان فوق با روش گوانیدین ایزوتیوسیانات چهار مولار استخراج شد (Sambrook *et al.*, 1989). سپس با استفاده از روش RT-PCR یا (Reverse Transcriptase PCR) وجود نسخه های RNA مرتبط با ژن CP در داخل گیاه بررسی شد. در این روش از پرایمرهای اختصاصی ژن CP به منظور ردیابی وجود mRNA حاوی ژن CP استفاده شد.

نتایج:

اصلاح (Modification) پلاسمید pRTL

پلاسمید pRTL دارای یک پروموتور $CaMV35_s$ و یک قسمت افزایش دهنده دوتایی (dual enhancer) میباشد که در ادامه آن توالی نوکلئوتید leader مربوط به ویروس (Tobacco etch virus TEV) قرار گرفته و علاوه بر آن دارای قسمتی از ژن Bگلوکوروتیداز و signal poly A ویروس CaMV میباشد (Carrington, 1990).

این پلاسمید برای تولید افزایش میزان پروتئینهای هترولوگ درگیاهان ساخته شده است. برای استفاده از این پلاسمید برای پروژه مورد نظر باید قسمتی مربوط به قطعه NoCl-SmaI را از آن جداکرده در غیر اینصورت با ۲ کدون ATG مواجه هستیم، در نتیجه ابتدا با آنزیم NaCl عمل برش را انجام داده و سپس انتهای تک رشته را توسط آنزیم Mung bean nuclease و آنزیم Klenow تیمار کرده تا ایجاد انتهاهای blunt (صاف) کند پس از آن پلاسمید با آنزیم SmaI بریده شده تا مجددا دو انتها به یکدیگر متصل شود، ردیف نوکلئوتیدی بدست آمده در شکل ۱ نشان داده شده و توالی نوکلئوتیدی فوق با آزمایش توالی سنجی (sequencing)، تائید شد.

ایجاد ناقلین بیان شونده (expression cassette) حامل ژن CP در گیاه

توالی نوکلئوتیدی برای ژنوم ویروس X سیب زمینی و پوشش پروتئینی آن منتشر شده است و از طریق بانک های اطلاعاتی کامپیوتری نظیر EMBL در دسترس است (AC:M38655). بر پایه این داده ها RNA ژنومیک ویروس X دارای ۶۴۳۵ نوکلئوتید بدون احتساب قسمت انتهایی polyA بوده و دارای پنج قسمت کدکننده مختلف ORF (Open reading frame) میباشد که پنجمین ORF که شامل نوکلئوتیدهای ۵۶۵۰-۶۳۶۳ میشود پروتئین پوشش پروتئینی ویروس X را با وزن مولکولی Mr=25080 کد می‌کند (Huisman *et al.*, 1988; Morozov *et al.*, 1987).

پس از خالص سازی RNA ویروسی با استفاده از پرایمر انتهایی (3) اقدام به سنتز DNA مکمل (cDNA) توالی کدکننده پوشش پروتئینی CP شد (شکل ۲).

قطعه DNA تکثیر شده پس از آن با آنزیم *BamHI* مورد برش قرار گرفت و سپس در جایگاه *BamHI* پلاسمید pSK کلون شد (شکل ۳) و مورد آزمایش توالی سنجی قرار گرفت. نتایج فوق نشان داد که توالی‌های خوانده شده تا 96% همولوژی با سایر نقشه‌های ژنی داده شده در بانک‌های اطلاعاتی مشابهت و همخوانی دارد (Feigelstock *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1987; Huisman *et al.*, 1988). توالی کد شده CP پس از آن در داخل پلاسمید pRTL موجود کلون شد و در نهایت پلاسمیدی با پروموتور $pCaMV35_s$ و قطعات افزایش دهنده (enhancer) قسمت Leader مربوط به ویروس TEV و اختتمام دهنده poly A حاصل گشت (شکل ۴).

ساختار Construct ژنی فوق به منظور انتقال به گیاه ابتدا در داخل جایگاه آنزیمی Hind III ناقل Bin 19 کلون شد و سپس در داخل باکتری اگروباکترویوم تومه فاسینس سویه (PGV 3850) جهت ترانسفورم به گیاه سیب‌زمینی فرستاده شد. بررسیهای حاصله از تخلیص پلاسمید و آزمایش PCR از اگروباکتریومهای ترنسفورم شده نشان دادکه با استفاده از پرایمرهای

Original pRTL101 sequence:

ATAGCCATGGCA.....(45 bp)...GGTGGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGA

TEV NcoI SmaI BamHI XbaI

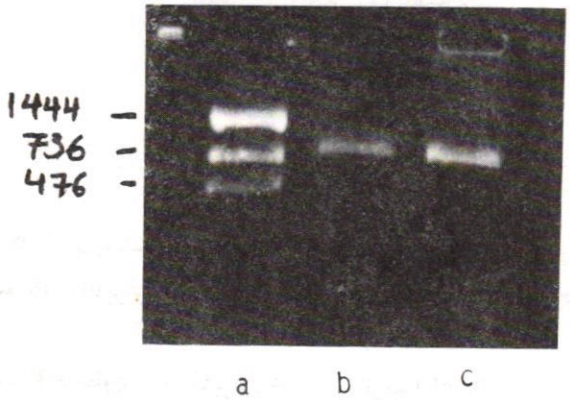
Modified pRTL sequence:

ATAGGGGGATCCTCTAGA

TEV BamHI XbaI

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی پلاسمید pRTL و اصلاحات انجام شده در روی آن

Fig. 1. Structure of relevant portions of recombinant pRTL plasmids



شکل ۲- تکثیر توالی کد کننده پوشش پروتئینی CP ویروس PVX با روش RT-PCR

a: پلاسمید pUC18 برش خورده با آنزیم TaqI با قطعات ۱۴۴۴ و ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت باز بعنوان مارکر

b: استفاده از Oligo dT

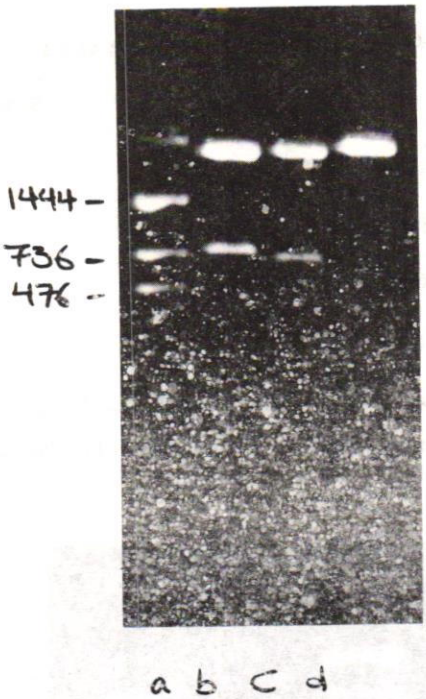
c: استفاده از پرایمر (جلودار) 3

Fig. 2. Amplification of PVX-CP sequence by RT-PCR

a, pUC 18 digested with TaqI (1444, 736, 476)

b, Oligo dT

c, 3 primer



شکل ۳- کلون ژن پوشش پروتئینی PVX در پلاسمید pSK

a: پلاسمید pUC18 برش خورده با آنزیم TaqI با قطعات ۱۴۴۴ و ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت باز بعنوان مارکر

b: پلاسمید pSK حاوی ژن CP برش خورده با آنزیم BamHI

c: پلاسمید pSK حاوی ژن CP برش خورده با آنزیم PstI

d: پلاسمید pSK حاوی ژن CP برش خورده با آنزیم XhoI

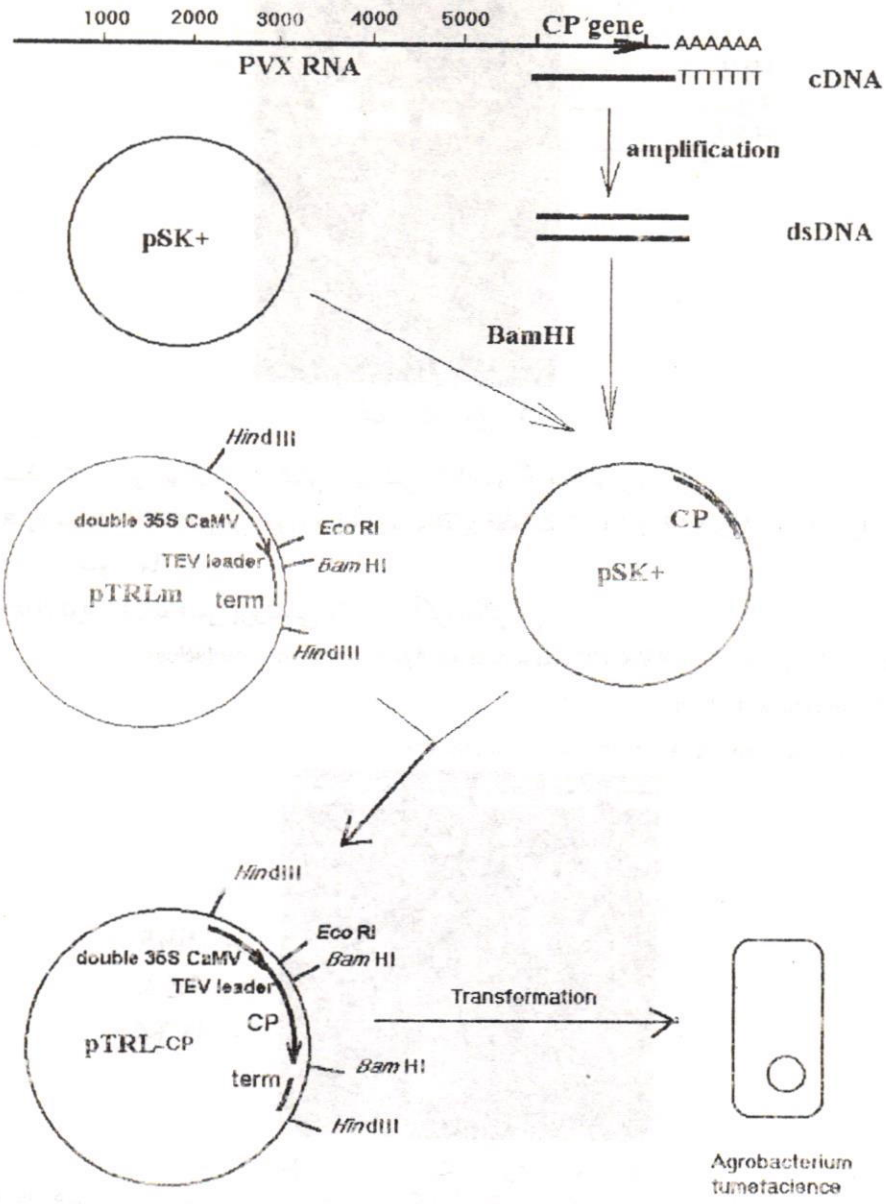
Fig. 3. Cloning of amplified PVX-CP coding sequences in psK

a, pUC 18 digested with TaqI

b, p SK-CP/BamHI

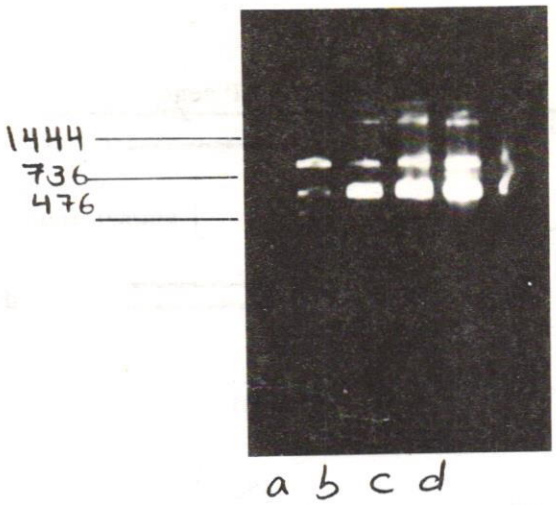
c, p SK-CP/PstI

d, p SK-CP/XhoI



شکل ۴- نمایش شماتیک ایجاد پلاسمید حاوی ژن CP برای انتقال به گیاه

Fig. 4. Construction of expression cassettes containing chimeric PVX CP genes and intermediate plasmid.



شکل ۵- وجود توالی ژن پوشش پروتیئنی PVX در آگروباکتریوم

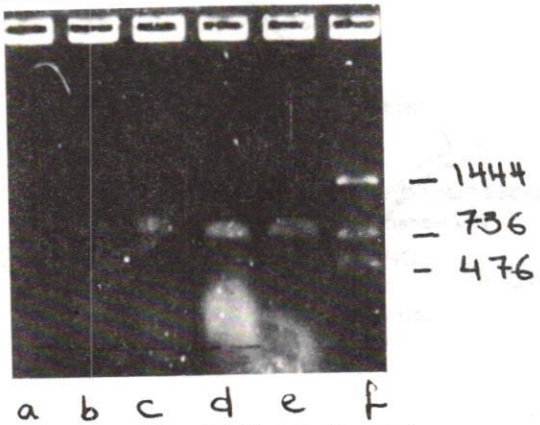
a: پلاسمید pUC18 برش خورده با آنزیم TaqI با قطعات ۱۴۴۴ و ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت باز به عنوان مارکر

d,c,b: توالی ژن پوشش پروتئینی PVX در آگروباکتریوم

Fig. 5. The present. of PVX CP sequences in Agrobacterium tumefaciens

PUC digetsd with TaqI

b,c,d CP fragment in Agrobacterium tumefacience



شکل ۶- بررسی وجود رونوشت ژن CP درگیاهان مقاوم به کانامایسین توسط روش RT-PCR

a: شاهد منفی

e,d,c,b: وجود رونوشت ژن CP در گیاهان

f: پلاسمید pUC18 برش خورده با آنزیم TaqI با قطعات ۱۴۴۴ و ۷۳۶ و ۴۷۶ جفت باز بعنوان مارکر

Fig. 6. Analysis of PVX CP gene trancsript plant by RT-PCR

a- control

b,c,d,e- potato plants transformed by PVX CP gene

f- pUC 18 digested with TaqI (fragments 1444, 736, 467 bp long)

خاص قطعه CP، این قطعه در داخل این باکتریها وجود دارد (شکل ۵).

دو رقم سیب‌زمینی *Lugovsky* و *Nevsky* که در شرایط آزمایشگاهی پرورش داده شده بودند با استفاده از اگروباکتریوم حاوی ناقل فوق به روش minituber disk ترانسفورم گردیده و سلولهای گیاهی حاوی ژن فوق با توجه به مقاوم بودن آنها به کانامایسین انتخاب شده و سپس مورد تکثیر قرار گرفتند.

بررسی وجود رونوشت (transcript) ژن CP در گیاهان ترانس ژنیک

در این مطالعه ده ردیف جداگانه گیاهان ترانس ژنیک حاصل شد که پس از استخراج RNA از آنها و انجام آزمایش RT-PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی وجود ژن CP در تعدادی از آنان دیده شد (شکل ۶).

بحث:

با توجه به اهمیت کشت سیب‌زمینی و استفاده از ارقام مقاوم به ویروس به منظور کاهش دادن میزان خسارت، انتقال ژن پوشش پروتئینی ویروس X به دو رقم سیب‌زمینی *Nevsky,* و *Lugovsky* انجام گرفت. مطالعات قبلی در ارتباط با بیان ژن CP در سیستم های گیاهی به منظور ممانعت از حملات ویروس نشان داده است که حفاظت دیده شده درگیاهان ترانس ژنیک در برخی موارد با افزایش بروز میزان CP و در برخی موارد با کاهش میزان آن همراه بوده است (Powell *et al.,* 1989; Lawson *et al.,* 1990; Hoekema *et al.,* 1989).

در این بررسی سعی شد با توجه به این مسئله از enhancer (قطعات افزایش دهنده) در جهت افزایش میزان بروز CP استفاده گردد که سپس با استفاده از میزان پروتئین CP حاصل، میزان مقاومت گیاهان ترانس ژنیک به ویرس PVX ارزیابی گردد.

پس از آنالیز گیاهان مشخص شد که mRNA مربوط به وجود ژن پوشش پروتئینی ویروس (PVX) در آن وجود دارد و این مسئله در مورد گیاهان کاشته شده در خاک صدق میکرد.

در حال حاضر بخشی دیگر از پروژه فوق و مراحل نهائی که هدف آن ارزیابی و سنجش مقاومت ایجاد شده در گیاهان سیب‌زمینی فوق بر علیه PVX است در حال انجام است.

سپاسگزاری

لازم می دانیم که از کمکهای شایان انستیتو پاستور ایران، بخش بیولوژی مولکولی، دفتر نهاد ریاست جمهوری و موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی بخش تحقیقات ویروس شناسی و خصوصا از جناب آقای مهندس رضا پوررحیم تشکر و قدردانی نمایم.

نشانی نگارندگان: مهندس هاله هاشمی، نیکلای دامونسکی، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور تهران،دکتر نوح شهرآئین موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، بخش تحقیقات ویروس شناسی، صندوق پستی ۱۴۵۴، کدپستی ۱۹۳۹۵، تهران