# افزایش مقاومت توتون به برخی ویروس‌های گیاهی با خاموشی ژن رمز کننده آنزیم آر ان ا پلی‌مراز وابسته به آر ان ای ۱*

# SILENCING OF RNA DIRECTED RNA POLYMERASE 1 GENE OF TOBACO LEADS TO ENHANCED RESISTANCE TO SOME PLANT VIRUSES

مسعود شمس بخش[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۲۶)

## چکیده

**بیان ژن رمز کننده آنزیم آر ان ا پلی‌مراز وابسته به آر ان ا ۱ (*RDR1*) بر اثر آلودگی گیاه میزبان به ویروس تحریک شده و به نظر می‌رسد در مقاومت گیاه میزبان به بعضی از ویروس‌ها دخالت دارد. در پژوهش حاضر، واکنش دو لاین توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) تراریخت که ژن *RDR1* در آنها خاموش شده بود در برابر تعدادی از ویروس‌های گیاهی در شرایط گلخانه ارزیابی شد. خاموشی ژن *RDR1* در واکنش میزبان به آلودگی به برخی از ویروس‌ها تغییر نکرد، در حالی‌که همان‌گونه که انتظار می‌رفت حساسیت به ویروس موزائیک توتون (TMV) افزایش یافت. در مقابل، مقاومت به چندین ویروس شامل ویروس جغ جغک توتون (TRV) از جنس *Tobravirus* و ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی (TBSV) از جنس *Tombusvirus* افزایش یافت. این نتایج نشان داد که برهمکنش پیچیده‌ای بین مسیرهای مقاومت در گیاهان رخ می‌دهد به طوری که مهار یک بخش درگیر در مقاومت ممکن است در دیگر مسیرهای مقاومت تأثیر داشته باشد. با این وجود خاموشی بیان ژن *RDR1* ممکن است مقاومت عمومی میزبان در برابر طیف وسیعی از ویروس‌ها را افزایش دهد.**

**واژه‌های کلیدی: پاسخ دفاعی، مقاومت، خاموشی ژن**

Archive of SID

*: بخشی از نتایج تحقیقات انجام شده در فرصت مطالعاتی نگارنده در مؤسسه تحقیقات گیاهی اسکاتلند

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران



www.SID.ir

**مقدمه**

نزدیک به ۴۰ سال است که فعالیت آنزیم‌های آر ان ا پلیمراز وابسته به آر ان ا (RNA dependent RNA polymerase, RdRp)، که اخیراً به (RNA directed RNA polymerase, RDR) تغییر نام پیدا کرده است (Xie *et al.* 2004)، در گیاهان شناخته شده است (Astier-Manifacier & Cornuet 1971). هر چند وظیفه این آنزیم‌ها تا سال‌ها ناشناخته بود، از آنجایی که میزان بیان RDR در گیاهان آلوده به ویروس افزایش می‌یابد نتیجه‌گیری شد که RDR در تکثیر ویروس دخالت دارد. پس از این که مشخص شد ژنوم ویروس توسط آنزیم آر ان ا پلیمراز وابسته به آر ان ا (RdRp) رمز شده توسط ژنوم خود ویروس همانندسازی می‌شود (Zabel *et al.* 1974; Dorssers *et al.* 1984)، اشتباه بودن این نظریه ثابت شد. در ژنوم گیاه مدل آرابیدوپسیس *Arabidopsis thaliana* شش ژن رمز کننده پروتئین‌های RDR شناسایی شده است (Dalmay *et al.* 2000) و بر اساس مطالعات فیلوژنی *AtRDR1-AtRDR6* نامیده شده‌اند. بیان ژن *RDR1* در گیاه آلوده به ویروس (Zabel *et al.* 1974; Dorssers *et al.* 1982)، ویروئید (Khan *et al.* 1986) و هم‌چنین توسط سالیسیلیک اسید (Xie *et al.* 2001) القا می‌شود. نقش RDR1 و RDR6 در مسیر خاموشی آر ان ا ثابت شده است (Wassenegger & Krczal 2006). احتمالاً یکی از نقش‌های بیوشیمیایی این آنزیم‌ها در سیستم خاموشی آر ان ا تولید آر ان ای دو لا (dsRNA) است. آر ان ا های دو لا توسط آنزیم‌های مشابه RNase III به نام (Dicer like, DCL) به قطعات کوچک ۲۱ تا ۲۴ جفت نوکلئوتیدی به نام آر ان های کوچک مداخله‌گر (Small interfering RNA, siRNA) به عنوان عامل تشخیص اختصاصی در مجموعه‌های القا کننده خاموشی آر ان ا (RNA induced silencing complex, RISC) به کار گرفته می‌شود (Baulcombe 2004). از طرف دیگر، برای دفاع عمومی گیاه به ویروس، سیگنال خاموشی از طریق پلاسمودسماها و آوندهای آبکشی در کل گیاه پراکنده می‌شود.

ماهیت دقیق سیگنال خاموشی نامعلوم است ولی احتمالاً آر ان های کوچک مداخله‌گر نقش مهم و اساسی در آن دارند. مطالعات اخیر منجر به ارائه مدلی شد که نشان می‌دهد RDR6 در انتشار سیگنال خاموشی در مسافت طولانی در گیاه دخالت دارد (Schwach *et al.* 2005). بر اساس این مدل طی مراحل تکثیر ویروس ایکس سیب زمینی (Potato virus X, PVX)، آر ان ای دولای ویروسی در سلول‌های مایه‌زنی شده تولید می‌شود. آنزیم DCL، آر ان های دو لا را به عنوان ماده زمینه تشخیص داده، آنها را بریده و آر ان های کوچک مداخله‌گر تولید می‌کند. مجموعه القاکننده خاموشی (RISC)، آر ان های کوچک مداخله‌گر را به سوی آر ان ای ویروس هدایت می‌کند. ژنوم ویروس و آر ان های کوچک مداخله‌گر حاصل از ویروس، هم‌زمان وارد سلول‌های نواحی دورتر از شروع آلودگی می‌شوند و در نتیجه آر ان های کوچک مداخله‌گر بلافاصله به آر ان ا ویروس متصل شده و به عنوان آغازگر برای شروع فعالیت آنزیم RDR6 و تولید آر ان های دولا جدید عمل می‌کند و بالاخره منجر به تولید سریع آر ان های کوچک مداخله‌گر ثانویه می‌شوند (Schwach *et al.* 2005). اگر سیگنال خاموشی و RDR6 در سلول‌های دریافت کننده وجود نداشته باشند، این پاسخ ایجاد نشده و آر ان های کوچک مداخله‌گر ویروس تولید نمی‌شود. هم‌چنین با مطالعه روی ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) و ویروس آبله آلو



Archive of SID

www.SID.ir

(Plum pox virus, PPV) نشان داده شد که RDR6 برای تولید آر ان ای های کوچک مداخله‌گر ثانویه که در واکنش ضد ویروسی بسیار مؤثرند، ضروری است (Vaislij & Jones 2009). علاوه بر RDR6، در لاین‌های تراریخت توتون *Nicotiana tabacum* که ژن *NtRDR1* در آنها خاموش شده بود، تجمع ویروسی بیشتر و علائم شدیدتری بعد از آلودگی به ویروس موزائیک توتون (Tobacco mosaic virus, TMV) و ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) ایجاد نموده است (Xie *et al.* 2001). هم‌چنین نشان داده شد که ایجاد موتاسیون در *AtRDR1* نیز که ارتولوگ *NtRDR1* در آرابیدوپسیس (*A. thaliana*) است و با اسید سالسیلیک تحریک می‌شود، سبب افزایش حساسیت لاین‌های تراریخت نسبت به لاین غیر تراریخت به آلودگی ویروس موزائیک توتون (TMV) و ویروس جغ جغک توتون (Tobacco rattle virus, TRV) گردیده است و میزان تجمع ویروس در لاین‌های تراریخت افزایش می‌یابد (Yu *et al.* 2003).

گیاهان با استفاده از راهبردهای مختلف به ویروس‌ها مقاومت نشان می‌دهند. علاوه بر راهبرد مقاومت بر اساس خاموشی آر ان ا ، یکی دیگر از این راهبردها پاسخ فوق حساسیت به ویروس است. در نتیجه این پدیده سلول‌های آلوده شده می‌میرند و در نتیجه سبب جلوگیری از آلودگی بیشتر می‌شوند. این پدیده معمولاً به وسیله یک ژن غالب کنترل می‌شود. ژن N در توتون یکی از ژن‌های شناخته شده‌ای است که ویروس موزائیک توتون (TMV) را کنترل می‌کند (Maule *et al.* 2007). به منظور به دست آوردن درک بهتری از نقش ژن *RDR1* و تعامل آن با ژن مقاومت N، در پژوهش حاضر نقش آنزیم پلی‌مراز (*NtRDR1*) گیاه توتون دارای ژن مقاومت (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) به ویروس موزائیک توتون (TMV) در واکنش به تعدادی از ویروس‌های گیاهی از جنس‌های مختلف بررسی شد.

## مواد وروش‌ها

### ویروس‌ها و گیاهان

در این مطالعه از استرین T-46 ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه فرنگی (Tomato bushy stunt virus, TBSV) از کلکسیون مرکز تحقیقات گیاهی اسکاتلند (Mowat, 1972)، استرین $U_1$ ویروس موزائیک توتون (TMV-$U_1$) و ویروس موزائیک توتون بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز (TMV-GFP) (Canto and Palukaitis 2002) و ویروس جغ جغک توتون (TRV) (Liu *et al.* 2002) استفاده شد. هم‌چنین استرین W260 از ویروس موزائیک کلم گل (Cauliflower mosaic virus, CaMV) از J.E. Schoelz ( دانشگاه میسوری، کلمبیا) و ویروس موزائیک بافت مرده شبدر قرمز (Red clover necrotic mosaic virus, RCNMV) از S.A. Lommel (دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی) دریافت شد. برای نگهداری ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) از شلغم (*Brassica rapa* cv. Just Right) و برای سایر ویروس‌ها از *N. clevelandii* یا *N. benthamiana* استفاده شد.

در این پژوهش از لاین‌های *N. tabacum* cv. Samsun دارای ژن مقاومت N استفاده شد. برای بررسی نقش ژن *NtRDR1* در مقاومت در برابر ویروس‌های مختلف از دو لاین تراریخت که ژن آنزیم آر ان ا پلی‌مراز وابسته به آر ان ا یک آنها با چند نسخه ژنتیکی ساختار ساقه و حلقه (R-5) و یا یک نسخه



Archive of SID

www.SID.ir

ژنتیکی ساقه و حلقه (R-14) خاموش شده بود، استفاده شد. بذرهای توتون تراریخت R-5 و R-14 از مرکز تحقیقات گیاهی اسکاتلند دریافت شد (Rakhshandehroo *et al.* 2009).

### مطالعه گلخانه‌ای

در هر آزمایش سه بوته توتون از هر کدام از لاین‌های تراریخت R-5 و R-14 و سه بوته غیر تراریخت با هر یک از ویروس‌ها مایه‌زنی شدند. آزمایش‌ها دست کم دو بار تکرار شدند. همه آزمایش‌ها در شرایط گلخانه با دمای ۲۵ °C در روز و ۱۸ °C درشب و با ۱۶ ساعت روشنایی انجام شد، به استثنای آزمایش‌های مربوط به TMV-GFP که در اتاقک رشد با دمای ۳۳ °C و نور ممتد به عمل آمد.

### بررسی خاموشی ژن *NtRDR1* و آزمون (Small interfering RNA blotting (Si-Blotting

بذرهای توتون تراریخت R-5 و R-14 پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ در محیط Murshige-Skoog (MS) حاوی کانامایسین کشت داده شدند. سپس گیاهچه‌های کوچک دو برگچه‌ای به گلدان حاوی ماسه، پیت و پرلیت به نسبت مساوی منتقل و در شرایط گلخانه یاد شده در بالا نگهداری شدند. خاموشی ژن *RDR-1* درگیاهان تراریخت با استفاده از روش Si-Blotting تأیید شد. این آزمون بر اساس روش *وانیتا رایني* (Vanitharani *et al.* 2003) انجام گرفت. برگ‌های کاملاً رشدیافته لاین‌های توتون تراریخت (R-14 و R-5) و غیر تراریخت (شاهد) در نیتروژن مایع پودر شد و آر ان ای کل با روش شرح داده شده توسط *کانتو* (Canto *et al.* 2002) استخراج و در ژل پلی آکریل آماید ۱۷/۵٪ با ۷ مولار اوره و در بافر TBE با غلظت یک برابر (شامل ۱/۰۸ گرم تریس، ۰/۵ گرم اسید بوریک، ۰/۰۳۷ گرم $Na_2EDTA$، در یک لیتر آب دیونیزه و پی اچ ۸/۳) و در ولتاژ ثابت ۱۰۰ به مدت سه ساعت الکتروفورز شدند. سپس آر ان ا مطابق دستورالعمل شرکت سازنده و توسط دستگاه Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) با شدت جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر و به مدت یک ساعت به غشای نایلونی (Hybond $N^+$ Amersham) منتقل شد. نشاندار کردن پروب اختصاصی ژن *NtRDR1*، هیبریداسیون و ظهور آن طبق روش شرح داده شده توسط رخشنده و همکاران (Rakhshandehroo *et al.* 2009) انجام شد.

### حرکت سیستمیک ویروس

حرکت سیستمیک TMV-GFP با استفاده از عکس‌برداری گیاهان زیرنور UV طبق روش *کانتو و پالوکایتیس* (Canto & Palukaitis 2002) انجام شد. بررسی حضور ویروس موزائیک بافت مرده شبدر قرمز (RCNMV) و ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه فرنگی (TBSV) در برگ‌های مایه‌زنی شده و برگ‌های بالایی به وسیله آزمون مایه‌زنی برگشتی به گیاهان *N. clevelandii* و *N. benthamiana* انجام گرفت. هم‌چنین حضور ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) به وسیله PCR و مایه‌زنی برگشتی روی شلغم بررسی شد.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر پیشرو 5'-GAGAACATAGAAAAACTCCTCAT-3' منطبق بر نوکلئوتید ۵۷۷۹-۵۸۰۱ و آغازگر برگشتی 5'-GGATTGAAGTTCAACCTATCTG-3' مکمل نوکلئوتیدهای ۶۳۷۰-۶۳۵۰ مرتبط با ژن شماره



Archive of SID

www.SID.ir

شش ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) و با واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ °C به مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و در آخر امتداد نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE با غلظت یک برابر و در ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید، از ژل‌ها عکس تهیه شد. به منظور برآورد جرم مولکولی، قطعات دی ان ای تولید شده از نشانگر با جرم مولکولی ۱۰۰ جفت باز GeneRuler$^{TM}$100bp (DNA ladder, Fermentas) استفاده شد.

## نتایج و بحث

در این پژوهش نقش آنزیم NtRDR1 در واکنش توتون (*N. tabacum* cv. Samsun NN) به ویروس‌های گیاهی از جنس‌ها وخانواده‌های مختلف و هم‌چنین تعامل آن با ژن مقاومت N بررسی شد.

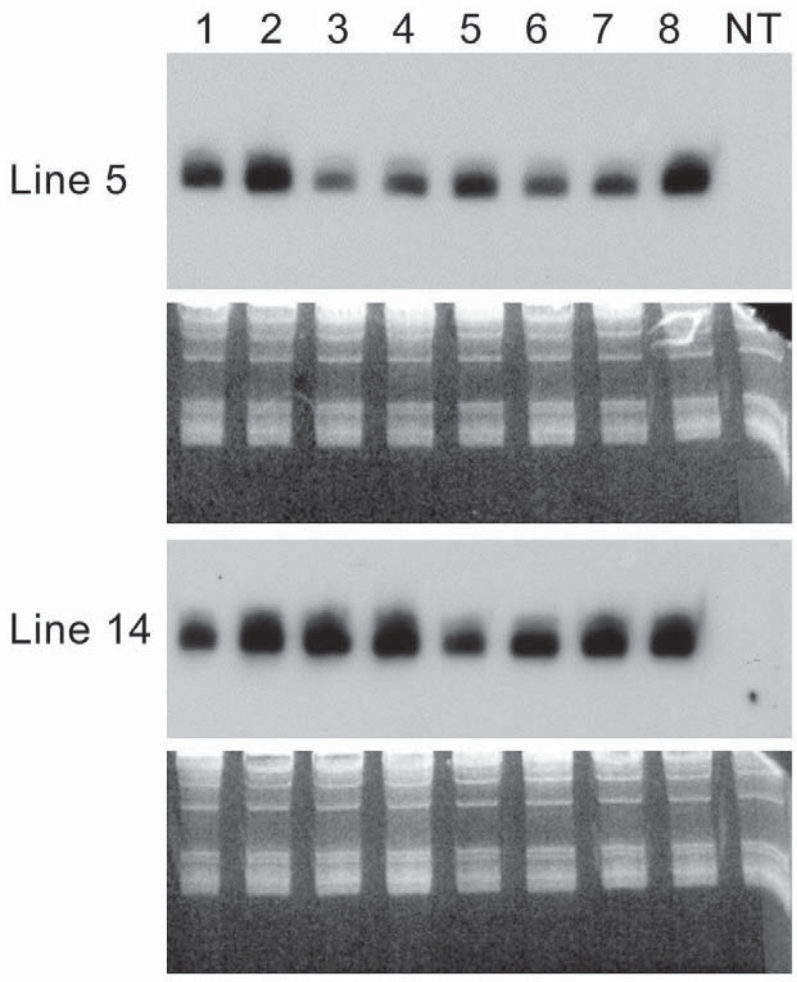
جوانه زدن و رشد بذر توتون‌های تراریخت در محیط MS حاوی کانامایسین و ردیابی آر ان اهای کوچک در گیاهان تراریخت (R-14 و R-5) توسط کاوشگر اختصاصی ژن *NtRDR1* و عدم ردیابی آنها در گیاهان غیر تراریخت نشان داد که این ژن در لاین‌های تراریخت خاموش بود (شکل ۱).

لاین‌های توتون R-5، R-14 و هم‌چنین گیاهان توتون غیر تراریخت در دمای ۲۵ °C به ویروس موزائیک توتون (TMV) مقاومت نشان دادند و فقط در برگ‌های مایه زنی شده لکه‌های موضعی بافت مرده تولید نمودند با این تفاوت که تعداد لکه‌ها در لاین‌های تراریخت بیشتر و اندازه آنها بزرگ‌تر بود. متوسط تعداد لکه‌ها در توتون تراریخت ۱۲۸ لکه در هر برگ مایه‌زنی شده و متوسط قطر لکه‌ها ۱/۶۷ میلی‌متر بود در حالی که تعداد لکه‌ها در توتون غیرتراریخت ۶۳ لکه در هر برگ مایه‌زنی شده و متوسط قطر لکه‌ها ۱/۰۶ میلی‌متر بود (شکل۲). هم‌چنین مایه‌زنی گیاهان با TMV-GFP و نگه‌داری آنها در دمای ۲۵°C نیز هیچ‌گونه علائمی در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت بروز نداد که نشان‌دهنده فعال بودن ژن مقاومت N در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت و عدم تداخل ژن آنزیم آر ان ا پلی‌مراز وابسته به آر ان ا یک (*RDR1*) در فعالیت ژن مقاومت N در این گیاهان بود. در حالی‌که در دمای ۳۳ °C که ژن مقاومت N غیر فعال می‌شود، ویروس موزائیک توتون (TMV) در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت به طور سیستمیک منتشر شد. در گیاهان مایه‌زنی شده با TMV-GFP نیز فلورسنت تولید شد با این تفاوت که لکه‌های فلورسنت در گیاه تراریخت R-5 بیشتر از غیر تراریخت و حتی در لاین R-14 فلورسنت به رگبرگ برگ‌های جدید گیاه نیز گسترش یافت (شکل ۳). بنابراین در حضور و غیاب فعالیت ژن مقاومت N حساسیت گیاهان تراریخت به ویروس موزائیک توتون (TMV) افزایش یافت. این نتایج با یافته‌های (Xie *et al.* 2001) که نشان داده‌اند تجمع ویروس و علائم بیماری بعد از آلودگی لاین‌های تراریخت توتون *N. tabacum* که ژن *NtRDR1* در آنها خاموش شده بود به ویروس موزائیک توتون (TMV) افزایش می‌یابد، مطابقت دارد (Xie *et al.* 2001). هم‌چنین یو همکاران (Yu *et al.* 2003) نشان داده‌اند که میزان تجمع ویروس در گیاه *A. thaliana* فاقد فعالیت *AtRDR1* بعد از آلودگی به ویروس موزائیک توتون (TMV) افزایش



Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۱. ردیابی RNA های کوچک توسط آزمون si-blotting در تعدادی از گیاهان تراریخت R-14 و R-5 (۱-۸) و لاین غیر تراریخت توتون (NT) (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) با استفاده از پروب اختصاصی NtRDR1**

**Fig. 1. Detection of small RNAs using si-blotting technique in several transgenic R-14 and R-5 plants (1-8) and wild type (NT) tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) by specific NtRDR1 probe.**

Archive

می‌یابد.

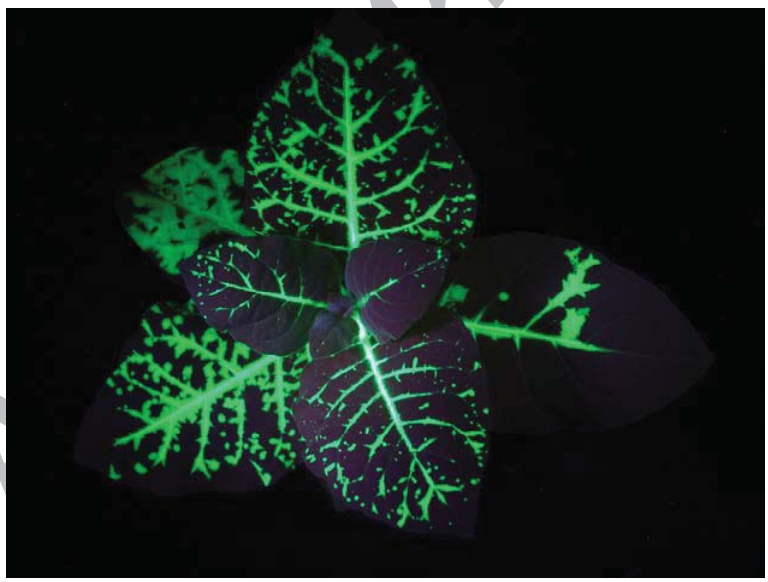
مایه‌زنی تعدادی از گیاهان توتون تراریخت لاین‌های R-5 و R-14 با ویروس جغ جغک توتون (TRV) منجر به بروز لکه‌های بافت مرده موضعی در برگ‌های مایه‌زنی شده گردید در حالی که سایر برگ‌ها هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند (شکل ۴). هم‌چنین مایه‌زنی برگشتی (back inoculation) با عصاره برگ‌های بالایی فاقد علایم قادر به ایجاد آلودگی در سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor*)، میزبان حساس به ویروس، نشد در حالی که مایه‌زنی گیاه توتون غیر تراریخت با ویروس جغ جغک توتون (TRV) منجر به بروز علائم شدید و سیستمیک در گیاه مایه زنی شده شد (شکل ۴). مایه‌زنی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی (TBSV) نیز



www.SID.ir

شکل ۲. مقایسه واکنش لاین تراریخت R-5 (چپ) و لاین غیر تراریخت (راست) توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) به مایه‌زنی با ویروس موزائیک توتون (TMV) نگهداری شده در دمای ۲۵°C.

**Fig. 2. Compression of transgenic line R-5 (left) and wild type (right) tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) reactions to TMV inoculation and incubation at 25 °C.**



شکل ۳. واکنش لاین توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) تراریخت R-14 به ویروس موزائیک توتون بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز( TMV-GFP).

**Fig. 3. Reaction of transgenic line R-14 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) to Tobacco mosaic virus-GFP.**



www.SID.ir

**شکل ۴. واکنش لاین توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) تراریخت R-5 (راست) وتیپ وحشی (چپ) به ویروس جغ جغک توتون (TRV).**

**Fig. 4. Reaction of transgenic line R-5 (right) and wild type (left) tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) to Tobacco rattle virus (genus *Tobravirus*).**

نتایج مشابهی را نشان داد (شکل ۵) مایه زنی برگشتی عصاره برگ‌های بالایی فاقد علایم ویروسی در *N. benthamiana* نیز نشان‌دهنده عدم آلودگی آنها بود. این نتایج نشان داد که گیاهان تراریخت برخلاف انتظار به ویروس جغ جغک توتون (TRV) و ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی (TBSV) مقاوم شدند. نتایج این تحقیق با نتایج *پالوکایتس* (۲۰۰۷) مطابقت دارد. آنها نشان داده‌اند که مقاومت همین گیاهان توتون تراریخت به ویروس وای سیب زمینی (PVY) و ویروس موزائیک آرابیس (Arabis mosaic virus, ArMV) افزایش می‌یابد. هم‌چنین اخیراً نشان داده شد که تراریخت نمودن توتون *N. benthamiana* که به طور طبیعی دارای *RDR1* موتانت و غیر فعال است (Yang *et al*. 2004) توسط ژن *NtRDR1* نسبت به این غیر تراریخت به ویروس موزائیک خیار (CMV)، ویروس آبله آلو (PPV) و ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) حساسیت بیشتری دارد (Ying *et al*. 2010).

مایه‌زنی گیاهان توتون تراریخت R-5 و R-14 و توتون غیرتراریخت با ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) هیچ‌گونه علائمی را نشان نداد. آزمون پی سی آر نشان داد که ویروس بدون بروز علائم در برگ‌های مایه‌زنی شده قابل تکثیر است ولی در برگ‌های بالایی (آلودگی سیستمیک) ردیابی نشد. نتایج مشابهی نیز در مایه‌زنی گیاهان توتون تراریخت و غیرتراریخت با ویروس



Archive of SID

www.SID.ir

**شکل ۵. واکنش لاین توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) تراریخت R-5 (چپ) و تیپ وحشی (راست) به ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی(TBSV) از جنس تومبوس ویروس.**

**Fig. 5. Reaction of transgenic line R-5 (left) and wild type (right) tobaccoes (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) to Tomato bushy stunt virus (genus *Tombusvirus*).**

موزائیک بافت مرده شبدر قرمز(RCNMV) به دست آمد. بنابراین خاموشی ژن *RDR1* هیچ‌گونه تأثیری در حساسیت توتون نسبت به ویروس موزائیک بافت مرده شبدر قرمز(RCNMV) و ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) نشان نداد.

ژن *RDR1* توسط آلودگی به ویروس تحریک شده و در مقاومت به آلودگی به بعضی ویروس‌ها دخالت دارد. ژن *RDR1* بخشی از پاسخ دفاعی است که توسط اسید سالیسیلیک تحریک می‌شود. در این مطالعه همان‌گونه که انتظاری می‌رفت حساسیت تعدادی از لاین‌های توتون که ژن *RDR1* آنها خاموش شده بود به ویروس موزائیک توتون افزایش یافت. در مقابل مقاومت بعضی از لاین‌های توتون تراریخت با ژن *RDR-1* خاموش به چندین ویروس شامل ویروس جغ جغک توتون و ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی افزایش یافت. افزایش میزان مقاومت از عدم سیستمیک شدن تا تأخیر در سیمتیک شدن آلودگی همراه با کاهش تجمع ویروس در گیاه و عدم تولید علایم متغیر بود. این نتایج نشان می‌دهد که برهمکنش پیچیده‌ای بین مسیرهای مقاومت در گیاهان رخ می‌دهد و با این وجود خاموشی و یا حتی احتمالاً افزایش بیان ژن *RDR1* ممکن است مقاومت عمومی میزبان در برابر طیف وسیعی از ویروس‌ها را افزایش دهد.

در مطالعات مشابهی، لاین‌هایی از *N. tabacum* و *Arabidopsis* که در آنها *RDR1* غیر فعال شده بود، نسبت به برخی ویروس‌ها حساس‌تر شدند. تجمع آر ان ای ویروسی و ظهور علائم در این گیاهان بالاتر از گیاهان تیپ وحشی بود. ویروس ایکس سیب زمینی در گیاهان تیپ وحشی توتون سیستمیک نشد ولی در گیاهان بدون *NtRDR1* به حالت سیستمیک درآمد (Xie *et al.* 2001). هم‌چنین گیاه موتانت آرابیدوپسیس فاقد ژن آر ان ا پلیمراز (*AtRdRP1*) به آلودگی TMV، (Tobacco vine-clearing virus,TVCV) و



Archive of SID

www.SID.ir

TRV خیلی حساس‌تر از گیاهان غیر تراریخت بود (Yu *et al.* 2003). به علاوه توتون *N. benthamiana* که نسبت به تعداد زیادی از ویروس‌ها حساس است، دارای یک قطعه اضافی به اندازه ۷۲ نوکلئوتید در ژن *RDR1* می‌باشد که منجر به ناقص شدن پروتئین NbRDR1 شده است. با تراریخت کردن *N. benthamiana* توسط ژن *MtRDR1* از گیاه *Medicago truncatula* حساسیت آن نسبت به TMV، TVCV و Sunn hemp mosaic virus کاهش یافت (Yang *et al.* 2004).

برای بررسی نقش *NbRDR6* در دفاع علیه ویروس، گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس فاقد RDR6 (RDR6i) به واکنش ویروس‌های PVX, PVY, TRV, TMV, TCV و CMV دارای ستلایت وای (Y) و بدون ستلایت بررسی شده‌اند. علایم بیماری حاصل از ویروس‌های TCV، TRV، TMV و CMV بدون ستلایت Y روی گیاهان RDR6i و گیاهان غیر تراریخت (NT) یکسان بوده است. ولی PVX، PVY و CMV همراه با ستلایت وای (Y)، علائم بسیار شدیدتری در گیاهان تراریخت RDR6i نسبت به گیاهان غیر تراریخت (NT) تولید کردند. این علائم در مورد PVX شدیدتر بود (Mourrain *et al.* 2000; Dalmay *et al.* 2000). ویروس موزائیک خیار در مقایسه با دیگر ویروس‌های با ژنوم آر ان ا، تولید abRNA نموده که به عنوان الگو برای RDR6 جهت تولید آر ان های دولای ثانویه در *N. benthamiana* عمل می‌کند، هم‌چنین در دفاع علیه ویروس ایکس سیب زمینی در سطح سیستمیک عمل کرده و از حمله ویروس به مریستم جلوگیری می‌کند (Schwach *et al.* 2005). این نتایج نشان می‌دهد که RDR6 نیز مانند RDR1 در میزبان‌های متفاوت و در مقابل ویروس‌های مختلف وظایف و نقش‌های متفاوتی دارد.

در مجموع نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که حساسیت لاین‌های تراریخت به تعدادی از ویروس‌ها مانند ویروس موزائیک توتون (TMV) افزایش و در مقابل نسبت به برخی از ویروس‌ها مانند ویروس جغ جغک توتون (TRV) و ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی (TBSV) کاهش یافت و این گیاهان بر خلاف انتظار مقاومت نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً ژن *RDR1* دارای اثر دوگانه می‌باشد، به این معنا که از یک طرف در همکاری با اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه میزبان را تحریک کرده و سبب افزایش مقاومت به برخی ویروس‌ها می‌شود و از طرف دیگر در مقابل تعداد دیگری از ویروس‌ها باعث مهار سیستم خاموشی شده و سبب افزایش حساسیت میزبان می‌شود. نتایج انتشار یافته اخیر (Ying *et al.* 2010) نیز این نتیجه‌گیری را تأیید می‌کند.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پروفسور پالوکایتیس (Prof. P. Palukaitis) و مؤسسه تحقیقات گیاهی اسکاتلند به دلیل تأمین بودجه و امکانات آزمایشگاهی مورد نیاز برای انجام این تحقیق و دانشگاه تربیت مدرس برای اعطای فرصت مطالعاتی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## منابع

جهت ملاحظه به صفحات (87-85) متن انگلیسی مراجعه شود.



Archive of SID
www.SID.ir