

القای مقاومت به روش RNA Silencing نسبت به ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV)

سمیرا پاکباز^۱، مقصود پژوهنده^{۲*}، امید عینی گندمانی^۳ و نعمت سخندان^۱

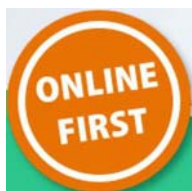
^۱ تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

^۲ تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

^۳ زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۷



چکیده

ویروس‌های گیاهی از عوامل محدود کننده در کشاورزی به شمار می‌روند. تاکنون ۶۴ عامل ویروسی آلوده‌کننده مو در دنیا شناسایی شده است که یکی از مخرب‌ترین آنها ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) می‌باشد. برای کنترل ویروس‌ها از روش‌های سنتی مثل تناوب گیاهی، تشخیص زودهنگام و حذف گیاهان آلوده، ریشه‌کنی گیاهان منبع آلودگی، حفاظت تقاطعی، اصلاح برای مقاومت و کنترل شیمیایی ناقلین آنها استفاده شده است. استفاده از ارقام مقاوم گیاهان بهترین راه برای کنترل عوامل ویروسی بوده و مقاومت به واسطه RNA Silencing یک روش جدید و کارآمد برای ایجاد ارقام مقاوم به ویروس‌ها می‌باشد. در این تحقیق امکان القای مقاومت نسبت به ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن RNA پلیمرز وابسته به RNA (RdRP) این ویروس بررسی شد. به این منظور یک سازه سنجاق سری حاوی اینترون با استفاده از ترادفی از ژن RdRP ساخته شد. جهت تراریختی گیاهان *Nicotiana benthamiana* از *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شد. پس از ایجاد ۴۰ دودمان از گیاهان توتون تراریخت، تأیید تراریختی با استفاده از آزمون PCR انجام شد. گیاهان تراریخته به منظور ارزیابی مقاومت آنها نسبت به GFLV، با این ویروس مایه‌زنی مکانیکی شدند. نتایج آزمون الایزا و نیز علائم ظاهری گیاهان نشان داد که به ترتیب ۲۷/۵ و ۴۰ درصد از گیاهان تراریخت نسبت به ویروس مقاوم بوده و یا در بروز علائم و آلودگی تأخیر داشتند. نتایج این تحقیق ضمن ایجاد تعدادی گیاه تراریخت توتون متحمل به GFLV نشان داد که توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن 1E^{Pol} که جهت ساخت سازه سنجاق سری در این تحقیق استفاده شد، فعالیتی مشابه با ژن مهار کننده خاموشی رمز شونده توسط ویروس ندارد و مقاومت القاء شده توسط این سازه در گیاه، به وسیله ژن ناشناخته مهار کننده خاموشی در این ویروس شکسته شده و سبب بروز واکنش حساسیت در گیاهان تراریخت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خاموشی ژن، تراریخت، مقاومت، ویروس برگ بادبزنی مو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۴۳۲۷۵۷۲، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

مقدمه

موزاییک و ابلقی شدن برگ و نواحی بین رگبرگها و در نهایت زردی کامل برگ از علائم بیماری است. در صورت شدت بیماری، خوشه‌ها به ندرت تشکیل شده و در صورت وجود نیز حبه‌های بسیار کمی داشته و یا اصلاً محصولی تولید نمی‌شود (۲۲). ویروس برگ بادبزنی مو به طور

بیماری برگ بادبزنی مو قدیمی‌ترین بیماری ویروسی شناخته شده در گیاه *Vitis vinifera* می‌باشد (۹). تاکنون ۶۴ عامل ویروسی آلوده‌کننده مو در سراسر دنیا شناسایی شده‌اند که یکی از مخرب‌ترین آنها ویروس برگ بادبزنی مو *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) می‌باشد (۲۱).

ایجاد کرده است (۱۴). مقاومت وابسته به بیمارگر اولین بار به وسیله Johnston و Sanford در سال ۱۹۸۵ پیشنهاد شد (۳۷) و از قسمتی از مواد ژنتیکی بیمارگر برای دفاع میزبان بر علیه همان بیمارگر استفاده شد. گفته شده که بیان ژنهای مشخصی از بیمارگر در میزبان باعث به هم ریختن تعادل عادی ویروس و بنابراین به هم ریختن چرخه همانند سازی بیمارگر می‌شود (۲۹). از آنجایی‌که ویروسها ژنوم کوچک و تعداد محدودی ژن دارند که در مدت همانندسازی ویروس روشن می‌شود، این پاتوژنها برای مقاومت منشأ گرفته از بیمارگر مناسب می‌باشند (۴). مقاومت به واسطه پروتئین پوششی ویروس، بیان یک منطقه کد کننده در رپلیکاز، استفاده از آنتی‌سنس RNA و استفاده از RNA های ماهواره‌ای مواردی از استفاده‌های موفق بر اساس روش PDR می‌باشد (۶). یک مکانیسم مهم در PDR خاموشی RNA نامیده می‌شود. مشخص شده است که بسیاری از واکنشهای مقاومت نیاز به سنتز پروتئین ندارند و به واسطه RNA وساطت می‌شوند (۵). شناسایی این روش زمانی اتفاق افتاد که ژن رپلیکاز ویروس موزاییک توتون (TMV) جهت ایجاد مقاومت به گیاه توتون منتقل شد و مقاومت بالایی در توتون تراریخت مشاهده شد، در حالی که بیان شدن پروتئین رپلیکاز مشاهده نشد (۱۲). مقاومت به واسطه RNA یک حالت از خاموشی ژن در سطح پس از نسخه‌برداری می‌باشد (۳۳). از تکنیک خاموشی ژن پس از نسخه برداری (PTGS) برای ایجاد مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است (۱۸). سازه‌های مختلف به منظور افزایش کارایی این سازوکار و ایجاد مقاومت مؤثر معرفی شده اند که سازه های سنجاق سری دارای اینترون از عملکرد مناسبی برخوردار بوده‌اند (۳۱). در تحقیق حاضر امکان ایجاد مقاومت به ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) به کمک ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن پلیمراز و نیز ارزیابی سطوح مقاومت توتون نسبت به این ویروس که توسط

طبیعی تنها از طریق نماتد اکتوپارازیت *Xiphinema index* انتقال می‌یابد (۳). حمل و نقل مواد تکثیری به ویژه ارقام حساس مو نیز نقش مهمی در گسترش این ویروس دارد (۲۳). ویروس GFLV یک عضو دو پیکره‌ای با ژنوم دو قسمتی از جنس *Nepovirus*، زیرخانواده *Comovirinae*، خانواده *Secoviridae* و راسته *Picornavirales* می‌باشد (۲۸). ژنوم ویروس از دو قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت تشکیل شده است (+ssRNA) که در انتهای ۵' دارای پروتئین متصل به ژنوم (VPg) و در انتهای ۳' به صورت پلی‌آدینی (Poly A) می‌باشند. هر قطعه محتوی یک چارچوب خواندنی باز است و یک پلی‌پروتئین را رمز می‌کند (P1 و P2) (۲۶). پلی‌پروتئین رمزشونده توسط RNA1 (P1) به پنج پروتئین شکسته می‌شود که در تکثیر ویروس نقش دارند و به ترتیب شامل یک کوفاکتور پروتئیناز فرضی، هلیکاز فرضی، پروتئین متصل به ژنوم ویروس (VPg)، پروتئیناز سیستئین و RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRP) ($1E^{Pol}$) می‌باشد (۲۵). RNA2 پلی پروتئین P2 را رمز می‌کند که با فعالیت پروتئولیتیکی به ترتیب به سه پروتئین شامل $2A^{HP}$ که برای تکثیر RNA2 مورد نیاز است و می‌تواند به عنوان پروتئین خانگی عمل کند (۱۰)، پروتئین حرکتی $2B^{MP}$ که پروتئین اصلی مشاهده شده در پلاسماوسماتاست (۲۷) و پروتئین پوششی $2C^{CP}$ (۳۰) شکسته می‌شود. هر دو RNA ژنومی برای آلودگی سیستمیک گیاه ضروری هستند (۳۵ و ۳۶).

ویروسهای گیاهی از عوامل محدود کننده در کشت محصولات کشاورزی در دنیا به شمار می‌روند. برای کنترل این بیمارگرها از روشهای سنتی مثل تناوب گیاهی و تکنیکهای دیگر کشت، تشخیص زودهنگام و حذف گیاهان آلوده، ریشه‌کنی گیاهان منبع آلودگی، حفاظت تقاطعی، اصلاح برای مقاومت و کنترل شیمیایی ناقلین آنها استفاده شده است. افزایش دانش بشر در ژنتیک مولکولی ویروسهای گیاهی و سیستمهای دفاعی طبیعی گیاه میزبان، راههای تازه‌ای برای کنترل بیماریهای ویروسی در گیاه

سازه تکرار معکوس حاوی اینترون القاء شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

ساخت سازه سنجاق‌سری **GFLV**: طراحی آغازگر (Primer): ابتدا توالی نوکلئوتیدی کامل RNA1 مربوط به ۹ جدایه از GFLV که در NCBI موجود است، با استفاده از نرم افزار Bioedit زیر هم چینی شد و یک ناحیه حفاظت شده از ژن RdRP ($1E^{Pol}$) به اندازه ۱۱۶ جفت باز جهت ساخت سازه سنجاق‌سری انتخاب شد. طراحی آغازگرهای رفت و برگشت برای ناحیه حفاظت شده در دو جهت سنس و آنتی سنس و بر اساس جایگاه آنزیمهای برشی (جدول ۱) در نقشه ژنتیکی ناقل pEPT8_{MCS2} (۳۴) (شکل ۱) انجام پذیرفت. همچنین از توالی نوکلئوتیدی اینترون دوم گیاه سیب زمینی که در ناقل pBin19-Gus-Intron همسانه‌سازی شده بود (۳۲) به عنوان جداکننده در ساختار تکرار معکوس استفاده شد. این ناقل نو ترکیب توسط آزمایشگاه ویروس شناسی گیاهی دانشگاه کرنل آمریکا در اختیار این تحقیق قرار گرفت. طراحی همه آغازگرها به کمک نرم افزار 5 Primer Premier صورت گرفت.

آزمون RT-PCR: استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA کل شرکت Omega (Biotek) و از برگ‌های گیاه *Chenopodium quinoa* آلوده به GFLV انجام شد. تکثیر رشته‌های سنس و آنتی سنس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و نیز کیت یک مرحله‌ای RT-PCR شرکت کیاژن انجام شد. این آزمون مطابق با دستورالعمل شرکت و طی برنامه‌ای شامل ۳۰ دقیقه جهت نسخه‌برداری معکوس در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه جهت فعال سازی اولیه PCR در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه دمایی شامل ۳۰ ثانیه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه، یک دقیقه جهت اتصال آغازگرها در ۵۸ درجه و یک دقیقه جهت گسترش توالی در ۷۲

درجه و در نهایت ۱۰ دقیقه جهت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. جهت مشاهده محصولات تکثیر شده، از ژل آگارز ۱/۵ درصد و نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت باز استفاده شد.

آزمون PCR: جهت تکثیر قطعه اینترون ابتدا استخراج پلاسمید از ناقل pBin19-Gus-Intron توسط کیت استخراج پلاسمید Omega صورت گرفت. سپس آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و کیت Q5 Hot start High-Fidelity DNA polymerase (شرکت New England Biolabs) روی DNA استخراج شده انجام شد. برنامه دمایی آزمون PCR مطابق با دستورالعمل شرکت و به صورت ۳۰ ثانیه واسرشت سازی اولیه در ۹۸ درجه، ۳۰ چرخه دمایی شامل ۱۰ ثانیه واسرشت سازی اولیه در ۹۸ درجه، ۲۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها در ۵۸ درجه و ۳۰ ثانیه جهت گسترش توالی در ۷۲ درجه و در نهایت ۲ دقیقه جهت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد.

همسانه‌سازی قطعات: جهت ساخت سازه تکرار معکوس، از ناقل pEPT8_{MCS2} که دارای جایگاه چندگانه همسانه سازی می‌باشد استفاده شد. این ناقل با دارا بودن جایگاه چندین آنزیم برشی، امکان همسانه‌سازی چند ژن را در کنار هم فراهم می‌کند و در نتیجه برای ساخت سازه تکرار معکوس مناسب می‌باشد. این ناقل همچنین دارای ناحیه پیش برنده و خاتمه دهنده 35SCaMV می‌باشد. جهت ساخت سازه، ابتدا محصول تکثیر یافته اینترون و نیز پلاسمید pEPT8_{MCS2} با استفاده از آنزیمهای *Sall* و *KpnI* هضم شدند. اینترون برش یافته پس از خالص سازی با استفاده از کیت خالص سازی Enzyme Clean Up (Omega) توسط آنزیم T₄DNA Ligase (BioLabs) به ناقل هضم شده متصل شد. سپس این همسانه به باکتری *E. coli* سویه DH5 α انتقال داده شد.

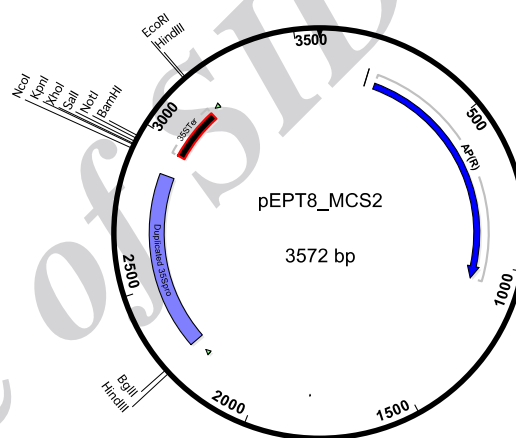
جدول ۱- ترادف آغازگرها و جایگاه برشی در نظر گرفته شده در آنها

اندازه قطعه	جایگاه برشی	ترادف آغازگر و محل اثر آنزیم برشی	جهت	* نام آغازگر
۲۱۱bp	<i>KpnI</i>	5' GCTGTGGTACCGTTTGTCTTCTGCTTCTACCTTTG 3'	-	Int.For
	<i>SalI</i>	5' AATGCGTCGACCTAAACATCACCATGTTTGGTC 3'	-	Int.Rev
۱۳۸bp	<i>NcoI</i>	5' TACCACCATGGGTTTCTGTGGTGCCCTTGGCATAAC 3'	Sense	1E.For
	<i>KpnI</i>	5' GATGTGGTACCAAGGATTGATGCCTACTTGAC 3'	Sense	1E.Rev
۱۳۸bp	<i>BamHI</i>	5' AGTGAGGATCCGTTTCTGTGGTGCCCTTGGCATAAC 3'	Antisense	1E.For
	<i>SalI</i>	5' AATGCGTCGACAAGGATTGATGCCTACTTGAC 3'	Antisense	1E.Rev

*: نام آغازگرها به طور مخفف در جدول آمده است که Int بیانگر اینترون، For بیانگر آغازگر رفت و Rev بیانگر آغازگر برگشت می‌باشد.

شد. پلاسمید کلونیهایی که علاوه بر اینترون، قطعه سنس را نیز دریافت کرده بودند این بار برای دریافت قطعه در جهت آنتی‌سنس استفاده شدند. این پلاسمیدها و نیز قطعه آنتی‌سنس تکثیر شده ژن پلیمرز با استفاده از آنزیمهای برشی *SalI* و *BamHI* برش یافتند و پس از همسانه‌سازی و انتقال به میزبان *E. coli*، جهت تأیید حضور قطعه آنتی-سنس، واکنش برش با استفاده از این دو آنزیم انجام شد. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی سازه سنجاق سری جهت اطمینان با آنزیم *HindIII* برش داده شدند. با انجام این واکنش انتظار می‌رود سازه تکرار معکوس به همراه ناحیه پیش برنده و خاتمه دهنده 35SCaMV با طول ۱۳۲۳ جفت باز از پلاسمید جدا شود. در تمام مراحل همسانه-سازی، جهت بررسی و مشاهده محصولات برش از ژل آگارز ۱/۵ درصد و نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و نیز یک کیلوبازی استفاده شد.

انتقال کاست ژنی به ناقل pGA482G: جهت انتقال سازه مورد نظر به گیاه از ناقل دوگانه pGA482G استفاده شد که دارای ژن گزینشگر نوومایسین فسفوترانسفراز II (*nptII*) می‌باشد. این ناقل همچنین دارای مناطق مرزی چپ و راست می‌باشد که در انتقال T-DNA از *Agrobacterium tumefaciens* به سلول گیاهی نقش دارد (۲۰). تکثیر کاست ژنی 35SPro.1E_{Sense}.Int.1E_{Antisense}.35STer با استفاده از آغازگرهای ناحیه 35SCaMV (جدول ۲) که

شکل ۱- نقشه ژنتیکی ناقل pEPT8_{MCS2}

باکتریهای حامل این همسانه در محیط جامد LB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آمپی سیلین انتخاب شدند. به منظور یافتن کلونی حاوی پلاسمید نو ترکیب از روش Colony PCR استفاده شد. پس از استخراج پلاسمید وجود قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیمهای نامبرده تأیید شد. پلاسمید کلونیهایی که برای دریافت اینترون مثبت ارزیابی شدند، جهت دریافت قطعه در جهت سنس انتخاب شدند. این پلاسمید و نیز قطعه سنس تکثیر یافته ژن پلیمرز با آنزیمهای برشی *NcoI* و *KpnI* هضم شدند. پس از خالص‌سازی محصول برش، همسانه‌سازی و انتقال به میزبان *E. coli* مشابه قطعه اینترون انجام شد و برای تأیید حضور قطعه سنس از روش Colony PCR و نیز واکنش هضم آنزیمی با آنزیمهای *NcoI* و *KpnI* استفاده

انجام شد و انتقال به میزبان *E.coli* صورت گرفت. حضور کاست مورد نظر با استفاده از واکنش برش آنزیمی با آنزیمهای *HpaI* و *HindIII* روی پلاسمید استخراج شده تأیید شد. پلاسمید نو ترکیب pGA482G حاوی کاست ساخته شده با استفاده از روش شوک الکتریکی در سلولهای مستعد *A. tumefaciens* سویه C58Z707 همسانه‌سازی شد. سویه نامبرده توسط آزمایشگاه ویروس-شناسی گیاهی دانشگاه کرنل آمریکا در اختیار این پژوهش قرار گرفت.

دارای جایگاه آنزیمهای برشی منطبق با نقشه ژنتیکی ناقل دوگانه pGA482G بودند انجام شد. سپس واکنش برش با آنزیمهای *HpaI* و *HindIII* روی محصول تکثیر یافته و نیز ناقل pGA482G انجام شد. کاست ژنی $1E^{Pol}$ برش یافته، روی ژل آگارزی که درصد خلوص بیشتری داشته و برای خالص‌سازی اسید نوکلئیک از ژل مناسب می‌باشد الکتروفورز و با استفاده از کیت خالص‌سازی Omega از ژل جداسازی شد. سپس با استفاده از آنزیم T_4DNA و *Ligase* واکنش اتصال و همسانه‌سازی در ناقل pGA482G

جدول ۲ - ترادف آغازگرها و جایگاه برشی در نظر گرفته شده در آنها

ترادف آغازگر و محل اثر آنزیم برشی	ترادف آغازگر	آنزیم برشی
5' CGT GCG AGC TCT GAG ACT TTT CAA CAA AGG G 3'	35S-Pro	<i>HindIII</i>
5' GCA CCG TTAACG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AG 3'	35S-Ter	<i>HpaI</i>

* نام آغازگرها به طور مخفف در جدول آمده است که 35S-Pro بیانگر آغازگر مربوط به ناحیه پیش‌بر 35S-CaMV و 35S-Ter بیانگر آغازگر مربوط به ناحیه خاتمه دهنده 35S-CaMV می‌باشد.

در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند و به مدت ۴-۶ هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۸:۱۶ (نور: تاریکی) جهت باززایی و القای جوانه‌نگهداری شدند. در طول این مدت نمونه‌های باززا شده هفته‌ای یک بار در محیط تازه تجدید کشت شدند. جهت انتخاب گیاهچه‌های تراریخت احتمالی، از محیط MS حاوی کانامایسین با غلظتهای ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. این روند فرصتی را به نوساقه‌های تراریخت می‌دهد تا به آرامی با غلظتهای بالاتر کانامایسین سازگار شوند و نوساقه‌های غیر تراریخت در غلظت نهایی کانامایسین سفید خواهند شد. نوساقه‌های رشد یافته به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شدند. محیط ریشه‌زایی با افزودن دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA به همراه آنتی‌بیوتیکهای کانامایسین و سفوتاکسیم به محیط کشت پایه MS حاوی یک درصد ساکاروز و ۰/۷ درصد آگار بدست آمد. گیاهچه‌های ریشه‌دار در ظروف مخصوص محتوی خاک استریل حاوی ورمیکولایت، پیت و پرلایت (به نسبت

تراریختش *Nicotiana benthamiana* جهت تراریختی از تیپ وحشی گیاه *N. benthamiana* استفاده شد. بذرها در شرایط استریل بر روی محیط کشت جامد حاوی نصف غلظت نمکهای MS تکمیل شده (۲۴) کشت شدند و ریزنمونه‌های برگ‌ی سترون از گیاهان رشد یافته از این بذور تهیه شدند. ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تهیه شده از MS حاوی سوسپانسیون *A. tumefaciens* سویه C58Z707 (OD_{600} : ۰/۸-۰/۶) حامل سازه مورد نظر فرو برده شدند و سپس روی کاغذ صافی آب اضافی آنها گرفته شد. ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد حاوی هورمونهای BAP با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به طوری که سطح فوقانی نمونه‌ها روی محیط کشت قرار بگیرد، منتقل و نمونه‌ها در شرایط تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند. ۴۸ ساعت پس از طی دوره هم-کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت گزینش‌گر حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم

آزمون در روز نهم پس از مایه‌زنی مکانیکی روی برگهای نوظهور و مایه‌زنی نشده گیاهان تراریخت انجام گرفت. در مرحله آخر آزمون پس از افزودن ماده زمینه، میزان تغییر رنگ چاهکها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان Synergy2 (شرکت Biotek) و نرم افزار Gen5 اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

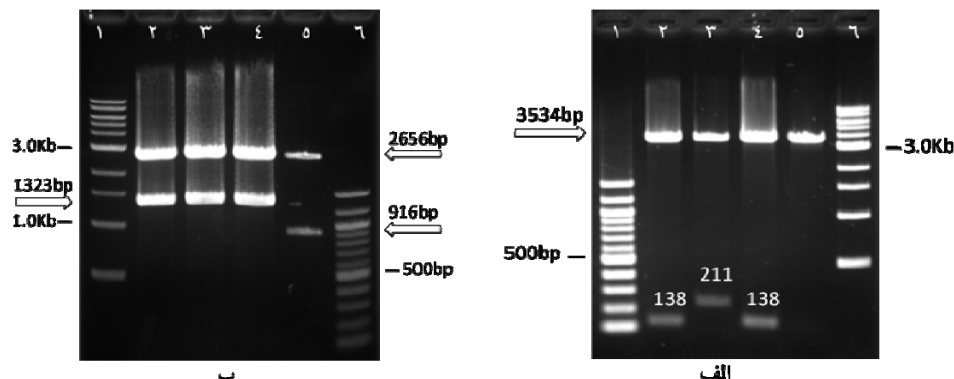
این تحقیق به منظور ایجاد گیاهان تراریخت توتون مقاوم به GFLV و تست کارایی سازه سنجاق‌سری برای ایجاد مقاومت بر اساس RNA Silencing انجام شد.

ساخت سازه سنجاق‌سری: آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توانست دو قطعه به اندازه ۱۳۸ جفت باز برای رشته سنس و آنتی سنس ژن $1E^{Pol}$ تکثیر کند. همچنین آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از توالی نوکلئوتیدی اینترون دوم گیاه سیب زمینی، توانست قطعه‌ای به اندازه ۲۱۱ جفت باز برای اینترون تکثیر کند. پس از همسانه‌سازی این قطعات، واکنش هضم آنزیمی توسط ترکیب آنزیمی موجود بر روی سازه، حضور سازه سنجاق‌سری را در ناقل pEPT8_{MCS2} (شکل ۲- الف) تأیید کرد. واکنش برش آنزیمی با استفاده از آنزیم *HindIII* نیز توانست قطعه‌ای به اندازه ۱۳۲۳ جفت باز را از پلاسمید نوترکیب pEPT8_{MCS2} جدا کند. این قطعه حامل سازه سنجاق‌سری $1E^{Pol}$ همراه با پیش‌بر 35SCaMV می‌باشد (شکل ۲- ب). پس از همسانه‌سازی این قطعه در ناقل دوگانه pGA482G، حضور قطعه ۱۳۲۳ جفت بازی با استفاده از واکنش هضم آنزیمی به کمک آنزیمهای *HindIII* و *HpaI* در این ناقل تأیید شد (شکل ۳).

کشت و با محلول غذایی MS مایع نصف غلظت محلول‌پاشی شدند. گیاهچه‌ها جهت سازگاری با دما و رطوبت محیط به مدت دو هفته در شرایط اتاقک رشد و پس از آن در گلخانه نگهداری شدند.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی: جهت تأیید حضور سازه و تراریختی گیاهان، استخراج DNA از برگهای جوان گیاهان تراریخته احتمالی نسل T_0 با استفاده از کیت استخراج DNA گیاهی Omega صورت گرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت Hot start High-Fidelity DNA (Biolabs) و آغازگرهای ژن *nptII* ناقل polymerase pGA482G انجام شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. گیاهانی که حضور سازه در آنها تأیید شد، برای مایه‌زنی با ویروس انتخاب شدند.

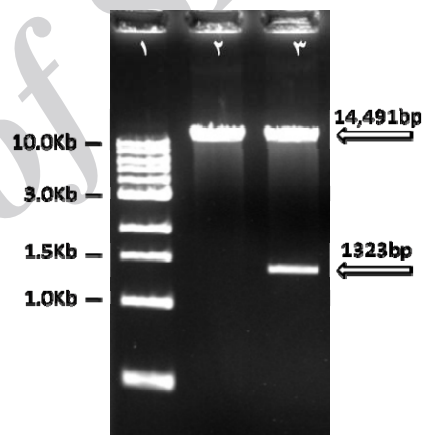
مایه‌زنی گیاهان تراریخته و ارزیابی میزان مقاومت: برگهای *C. quinoa* آلوده به GFLV با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH: ۷/۴) عصاره‌گیری شدند. سپس مایه زنی مکانیکی (مالش روی برگ) با استفاده از عصاره گیاهی حاوی ویروس و به کمک کمی پودر کاربوراتوم روی برگهای ۴۰ گیاه مستقل که تراریختی آنها تأیید شده بود و در مرحله ۴-۵ برگی بودند صورت گرفت. همچنین ۵ گیاه از تیپ وحشی و غیرتراریخت گیاه *N. benthamiana* نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و مایه‌زنی با GFLV روی آنها انجام شد. هفت روز پس از مایه‌زنی، علائم تظاهر یافته احتمالی در گیاهان تراریخت بررسی و تا روز دهم پس از مایه‌زنی ادامه داشت. همچنین جهت اندازه‌گیری غلظت ویروس، آزمون سرولوژیکی الایز (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال و اختصاصی پروتئین پوششی GFLV (کیت شرکت Bioreba) و نیز بافرهای این کیت انجام شد. این



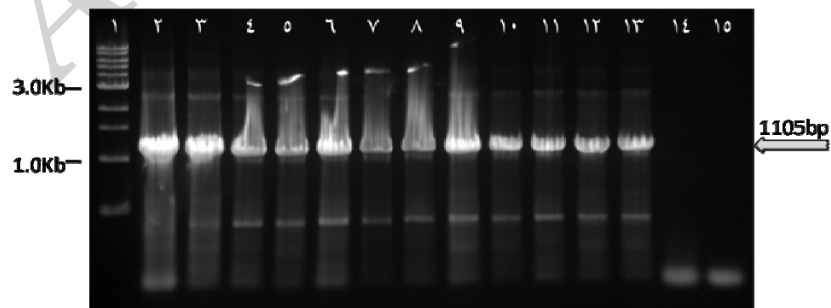
شکل ۲- محصول واکنش برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pEPT8_{MSC2} حامل سازه تکرار معکوس 1E^{Pol}. الف- چاهک ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۲- قطعه سنس 1E^{Pol}. ناقل هضم شده با آنزیمهای *NcoI* و *KpnI* چاهک ۳- قطعه ایترون. ناقل هضم شده با آنزیمهای *KpnI* و *Sall*. چاهک ۴- قطعه آنتی سنس 1E^{Pol}. ناقل هضم شده با آنزیمهای *Sall* و *BamHI* چاهک ۵- ناقل فاقد قطعه و هضم شده با آنزیمهای *NcoI* و *BamHI* به عنوان کنترل. چاهک ۶- نشانگر مولکولی یک کیلو بازی. ب- چاهک ۱- نشانگر مولکولی یک کیلو بازی. چاهک ۲- چاهک ۳- ناقل فاقد قطعه و هضم شده با آنزیم *HindIII* چاهک ۴- ناقل حامل سازه تکرار معکوس 1E^{Pol} هضم شده با آنزیم *HindIII* چاهک ۵- ناقل فاقد قطعه و هضم شده با آنزیم *HindIII* چاهک ۶- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. به عنوان کنترل که ناحیه 35SCaMV به طول ۹۱۶ جفت باز از پلاسمید جدا شده است. چاهک ۶- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

قطعات برگ توتون *N. benthamiana* برای تراریزش استفاده شد و پس از کالوس‌زایی، جوانه زنی و ریشه دهی تعداد ۴۰ دودمان (لاین) تراریخت مستقل ایجاد و تکثیر یافت.

تعیین تراریختی بوته‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ژن *nptII* گزینش‌گر روی DNA گیاهان تراریخت احتمالی، توانست قطعه‌ای به طول ۱۱۰۵ جفت باز را تکثیر کند (شکل ۴). این در حالی بود که این قطعه در گیاهان غیر تراریخت تکثیر نشد. در نتیجه تکثیر این ناحیه حاکی از تراریختی گیاهان با سازه سنجاق سری حامل بخشی از ژن پلیمرز بود.



شکل ۳- محصول واکنش برش آنزیمی ناقل pGA482G با استفاده از آنزیمهای *HindIII* و *HpaI* چاهک ۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی. چاهک ۲- ناقل فاقد قطعه. چاهک ۳- ناقل نو ترکیب حامل سازه تکرار معکوس 1E^{Pol}.



شکل ۴- نمونه‌ای از تأیید تراریختی گیاهان *N. benthamiana* با استفاده از آغازگرهای ژن *nptII*. چاهک ۱- نشانگر مولکولی یک کیلو بازی. چاهک ۲- ۱۳- قطعه ۱۱۰۵ جفت بازی تکثیر یافته از ژن *nptII* در گیاهان تراریخت شده با سازه تکرار معکوس 1E^{Pol}. چاهک ۱۴- گیاه غیر تراریخت. چاهک ۱۵- کنترل منفی آزمون PCR.

نشده با ویروس که به عنوان کنترل منفی در این تحقیق استفاده شدند (شکل ۵-ب)، ارزیابی شدند. بر اساس نتایج علائم شناسی و نیز آزمون الایزا ۲۷/۵ درصد از گیاهان تراریخت، مقاوم به ویروس بوده و ۳۲/۵ درصد از آنها مشابه گیاهان غیرتراریخت حساسیت نشان دادند. همچنین ۴۰ درصد از گیاهان تراریخت در حالی در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند که هنوز علائم آلودگی را نشان نداده بودند و علائم ویروسی روی این گیاهان با تأخیر ظاهر شد (جدول ۳).

در پژوهش حاضر تراریختی گیاهان توتون مورد مطالعه با استفاده از *A. tumefaciens* حامل سازه سنجاق‌سری با موفقیت انجام شد. همچنان که در مطالعه‌ای، *A. tumefaciens* حامل پلاسمید pZM1047 به گیاه داتوره منتقل و جهت تعیین تراریختی گیاهان از آزمون PCR و آغازگرهای ژن nptII استفاده شد. نرخ تراریختی حاصل از قطعات برگی در این آزمایش ۱۳ درصد گزارش شد که در مقایسه با نرخ ۷۸ درصدی حاصل از آزمایش مشابه روی گیاهان توتون نشان داد که گیاه توتون از لحاظ ژنتیکی نسبت به دریافت T-DNA بسیار خوب و مستعدتر از گیاه داتوره عمل می‌کند. البته شرایط محیطی مانند دما، حضور مواد فنلی و بعضی از آنزیمها در محیط کشت می‌تواند بر روی انجام موفق تراریختی اثر گذار باشد (۲).

پس از تأیید تراریختی گیاهان، ۴۰ دودمان گیاه تراریخت جهت بررسی میزان مقاومت ایجاد شده نسبت به GFLV با این ویروس مایه‌زنی شدند. علاوه بر بررسی علائم ظهور یافته از روز هفتم تا دهم پس از مایه‌زنی، آزمون الایزا نیز جهت تعیین حضور یا عدم حضور GFLV در گیاهان تراریخت در روز نهم پس از مایه‌زنی انجام و توسط دستگاه الایزا خوان میزان غلظت ویروس در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در روزهای هفتم تا دهم پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در تعدادی از گیاهان تراریخت شده با سازه IE^{Pol} به طور واضحی قابل مشاهده بود. این آلودگی با آزمون الایزا نیز تأیید شد و این گیاهان در مجموع حساس به GFLV ارزیابی شدند (شکل ۵-ه). واکنش این گیاهان به مایه‌زنی، کاملاً مشابه گیاهان توتون غیرتراریخت و مایه‌زنی شده با GFLV بود که به عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده شدند (شکل ۵-الف). در تعدادی از گیاهان تراریخت علائم بیماری با شدت کمتری نسبت به گیاه غیرتراریخت و حساس ایجاد شد. علاوه بر این، علائم در این گیاهان با تأخیر و حدود ۳ تا ۴ هفته بعد ظاهر شد (شکل ۵-د). تعدادی از گیاهان تراریخت حتی پس از یک ماه نیز علائمی از آلودگی به GFLV نشان ندادند. آزمون الایزا نیز عدم حضور ویروس را در این گیاهان تأیید کرد و این گیاهان در مجموع مقاوم (شکل ۵-ج) و مشابه با گیاهان غیرتراریخت و مایه‌زنی

جدول ۳- واکنش گیاهان تراریخت با سازه IE^{Pol} و غیرتراریخت نسبت به GFLV بر اساس علائم، آزمون الایزا و PCR.

آزمون PCR با آغازگر nptII	آزمون الایزا	ظهور علائم (روز پس از مایه‌زنی)	واکنش گیاه	تعداد کل/گیاه آلوده	-
+	-	بدون علائم	مقاومت	۴۰ / ۱۱ (۲۷/۵)	
+	+	۲۵-۳۰	تأخیر	۴۰ / ۱۶ (۴۰)	گیاهان تراریخت
+	+	۷-۱۰	حساسیت*	۴۰ / ۱۳ (۳۲/۵)	
-	+	۷-۱۰	حساسیت	۵/۵	گیاهان غیرتراریخت

*: یک هفته پس از مایه‌زنی، ظهور علائم موزاییک و زردی در گیاهان حساس ظاهر شد.



شکل ۵- واکنش گیاهان *N. benthamiana* تراریخت با سازه تکرار معکوس $1E^{Pol}$ و غیرتراریخت به GFLV. الف- گیاه غیرتراریخت و مایه‌زنی شده به عنوان کنترل مثبت. ب- گیاه غیرتراریخت بدون مایه‌زنی به عنوان کنترل منفی. ج- نمونه ای از گیاه مقاوم تراریخت با سازه $1E^{Pol}$. د- گیاه تراریخت با سازه $1E^{Pol}$ ه- گیاه تراریخت با سازه $1E^{Pol}$.

پروتئین $1E^{Pol}$ در هیچ کدام از دو نژاد F13 و GHu برخلاف CMV-2b قادر به افزایش بیان GFP نبود. این در حالی بود که پروتئین $1E^{Pol}$ در قسمتهای آگرواینفیلتر شده به آسانی توسط آزمون وسترن بلائینگ ردیابی شد. نتایج این آزمایشات، هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی خاموشی قابل ردیابی در ارتباط با پروتئین $1E^{Pol}$ در دو نژاد GHu و F13 ویروس GFLV نشان نداد (۳۴). نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر با نتایج این محققین مطابقت دارد. همچنان که توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن $1E^{Pol}$ که در ساخت سازه سنجاق‌سری در این پژوهش به کار برده شد، کارایی لازم جهت القای مقاومت نسبت به GFLV را نداشت و نتیجه به دست آمده بیانگر این است که ژن یا ژنهای دیگری در این ویروس مسئولیت بیماری‌زایی و مهار خاموشی ژن (VSRs) را بر عهده دارند و این ژن یا ژنها علی‌رغم حضور یک سازه تکرار معکوس که بیان‌کننده یک RNA دو رشته‌ای (dsRNA) بوده و القاء‌کننده مکانیسم خاموشی ژن در گیاه است، می‌توانند بر مقاومت ایجاد شده ناشی از این سازه غلبه کنند و سبب بروز

تعیین‌کننده‌هایی که تاکنون در مورد اعضاء خانواده *Secoviridae* شناسایی شده و سبب بروز علائم می‌شدند، پروتئینهای درگیر در تکثیر و پلی‌پروتئین بالغ مثل هلیکاز نوع III و پروتئیناز سیستئین شبه 3C بودند (۷ و ۱۳). در آزمایشات Vigne و همکاران، وجود دومینهای اختصاصی نژاد، روی ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRP) ویروس GFLV تأیید و مشخص شد که این دومینها وظیفه تنظیم عوامل تعیین‌کننده علائم را دارند. برای شناسایی این تعیین‌کننده‌ها، کلونهای عفونی cDNA مربوط به RNA1 و RNA2 نژاد GHu و F13 ویروس GFLV تهیه و با استفاده از رویکرد ژنتیک معکوس مشخص شد که در نژاد GHu، تعیین‌کننده‌های علائم روی RNA1 خصوصاً در ۴۰۸ نوکلئوتید انتهای ۳' RdRP ($1E^{Pol}$) قرار دارند، اما به نظر نمی‌رسد این ناحیه به عنوان مهارکننده خاموشی عمل کند. این محققین در آزمایش دیگری نشان دادند که ژن $1E^{Pol}$ در مهار خاموشی EGFP در *N. benthamiana* تراریخته بیان‌کننده EGFP موفق عمل نکرد. این آزمایش بار دیگر با استفاده از رقم وحشی *N. benthamiana* انجام شد، اما

کرد. تفاوت در برابر مایه‌زنی با GFLV در گیاهان وحشی و *N. benthamiana* تراریخته حاوی ساختار تکرار معکوس، تصور وقوع خاموشی اختصاصی GFLV در گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد و نشان دهنده عملکرد ساختار تکرار معکوس است که یک استراتژی مؤثر برای ایجاد گیاهان مقاوم به GFLV می‌باشد (۱۶). در تحقیق حاضر نیز مشابه آزمایشات Jardak و همکاران تفاوت در واکنش تیپ وحشی گیاهان *N. benthamiana* و نیز گیاهان تراریخت مقاوم به مایه‌زنی با GFLV، بیان‌گر وقوع خاموشی ژن در گیاهان تراریخت بوده و کارآیی سازه ساخته شده را نشان می‌دهد. اگرچه پیشنهاد شده است که خاموشی ژن در درختان چوبی نسبتاً نادر است (۷) اما در مطالعه‌ای دیگر توسط Gambino و همکاران در سال ۲۰۰۹، خاموشی ژن در درختچه‌های تراریخت با ژن پروتئین پوششی GFLV مشاهده شد و با اینکه احتمال خاموشی ژن در سطح نسخه برداری (TGS) نمی‌توانست به طور کامل رد شود، خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری (PTGS) در پنج دودمان از هشت دودمان تراریخته القاء شد و میزان بیان ژن پروتئین پوششی GFLV در هشت دودمان تراریخته مو توسط آزمون لکه‌گذاری نورترن ارزیابی گردید (۱۱). همچنین در نتایج Gambino و همکاران حساسیت و تأخیر در آلودگی در *N. benthamiana* تراریخت بیان‌کننده ژن پروتئین پوششی GFLV پس از مایه‌زنی با این ویروس مشاهده شد که این نتایج با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۱). کاربرد ترادفهای تکرار معکوس (IR) منشاء گرفته از دو قطعه ژنومی ویروس به عنوان روشی به منظور دستیابی به مقاومت بر علیه MV در سطوح بالا بوده است. نتایج نشان می‌دهد که سازه‌های سنجاق‌سری می‌توانند مقاومت در سطح بالایی را ایجاد نمایند (۳۶). در مطالعه‌ای روی گیاهان تراریخت *N. tabacum* cv Samsun که ژن RDR1 (RNA-Directed-RNA Polymerase-1) در آنها توسط ساختارهای ساقه - حلقه دارای مشابهت ژنتیکی با

واکنش حساسیت در گیاهان تراریخت شده با این سازه شوند. در سال ۱۹۹۸ مشخص شد که ویروسها پروتئینهایی رمز می‌کنند که مهارکننده خاموشی ژن (VSRs) می‌باشند. این یافته علاوه بر حمایت از این ایده که خاموشی RNA به عنوان یک مکانیسم دفاعی طبیعی بر علیه ویروس است، همچنین ابزار قابل دسترسی برای توصیف مسیرهای خاموشی ژن می‌باشد (۳۶). دانش موجود از تعیین‌کننده‌های علائم و مهارکننده‌های خاموشی ویروسهای جنس *Nepovirus* خیلی محدود است (۳۴ و ۳۵) و تاکنون تلاش‌های زیادی در این زمینه صورت گرفته است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ سازه‌ای بر اساس توالی‌های GFLV برای ایجاد موهای تراریخت که خاموشی اختصاصی GFLV را القاء می‌کرد، طراحی شد. سازه تکرار معکوس با استفاده از قطعاتی از ناحیه حفاظت شده ژن پروتئین حرکتی یک جدایه GFLV از تونس همراه با کاستهای محتوی نئومایسین فسفوترانسفراز II یا ژن bar به عنوان گزینش‌گر طراحی شد. این سازه از طریق *A. tumefaciens* به *N. benthamiana* منتقل شد. مدتی بعد از مایه‌زنی گیاهان تراریخته با GFLV ایجاد مقاومت، بهبودی، به تعویق افتادن آلودگی و حساسیت در این گیاهان مشاهده شد. تجزیه و تحلیل آزمون لکه‌گذاری نورترن (Northern blotting) که در آن یک توالی با منشأ ویروسی (پروتئین حرکتی) به عنوان کاوش‌گر استفاده شد، توانست RNA های کوچک مداخله‌کننده (siRNA) اختصاصی ژن انتقال یافته به گیاه *N. benthamiana* تراریخته بعد از مایه‌زنی را ردیابی کند. همچنین سازه تکرار معکوس از طریق *A. tumefaciens* به سلولهای جنینی مو (*V. vinifera*) منتقل شد. ۶۶/۶۷ درصد گیاهان تراریخته مو به ویروس مقاوم شدند. آزمون ای‌ایز مقاومت را در گیاهان تراریخته تأیید کرد و همچنین تجزیه و تحلیل آزمون لکه‌گذاری نورترن، سطوح متفاوتی از نسخه‌های تکرار معکوس را در دودمانهای مستقل مو تراریخته، که خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری را نشان می‌دادند، ردیابی

با تأخیر نشان می‌دادند می‌تواند مربوط به میزان تولید siRNA در این گیاهان باشد و احتمالاً این گیاهان دارای سطوح پایین‌تر siRNA نسبت به گیاهان مقاوم تراریخت می‌باشند. بنابراین بررسی سطوح siRNA در گیاهان تراریخت ضروری می‌باشد. در مجموع با توجه به کارایی بالای سازه‌های تکرار معکوس حاوی اینترون در ایجاد مقاومت و نتایج به دست آمده در این تحقیق و ایجاد تنها تعدادی گیاه تراریخت مقاوم به GFLV، بررسی بیشتر ترادف نوکلئوتیدی ژنوم ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) جهت یافتن ناحیه مسئول مهارکنندگی خاموشی ژن (VSR) در این ویروس ضروری به نظر می‌رسد. Vigne و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که اگرچه مهارکننده‌های خاموشی (VSRs) در بیشتر جنس‌های ویروس‌های گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند، اما شناسایی آنها در اعضاء *Nepovirus* به تعویق افتاده است (۳۴). بنابراین انجام آزمایشات بیشتر جهت یافتن ژن مهارکننده خاموشی این ویروس و ساخت سازه القاء‌کننده‌ای مبتنی بر آن، می‌تواند در رسیدن به مقاومت کاملی علیه این ویروس بسیار کمک کننده باشد، زیرا در غیر این صورت استفاده از هر ناحیه از ترادف نوکلئوتیدی این ویروس، کارایی لازم برای القای مقاومت به این ویروس در گیاه را نخواهد داشت.

سپاسگزاری

از آقای دکتر مارک فیوکس به خاطر در اختیار گذاشتن مواد و امکانات مورد نیاز جهت انجام این پژوهش در آزمایشگاه ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه کرنل آمریکا (ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی در ایالت نیویورک) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

ژن *RDR1* خاموش شده بود، میزان پایداری خاموشی ژن بررسی شد. بدین منظور میزان حساسیت به آلودگی سیستمیک ویروس *PVY^o (Potato virus Y strain o)* و نیز میزان بیان ژنهای *RDR1* و *RDR6* یک هفته پس از مایه‌زنی نسل‌های دوم (T2) و سوم (T3) توتونهای تراریخت بررسی شد. نتایج نشان داد که نسل دوم این گیاهان نسبت به نسل بعدی از میزان بیان کمتر ژن *RDR1* برخوردار می‌باشد. همچنین لاینهای نسل دوم در مقایسه با نسل سوم از حساسیت بیشتر به ویروس *PVY^o* برخوردار بود. در مجموع نتایج نشان داد کارایی ساختار ساقه - حلقه در خاموشی ژن *RDR1* در نسل بعد کاهش یافته است. از آنجایی که ژن *RDR6* تحت تأثیر ژن *RDR1* بوده و برای انتقال پیام خاموشی در طول گیاه و افزایش مقاومت گیاهان به آلودگی ویروسی لازم می‌باشد، پیشنهاد شد که سرکوب ژن *RDR1* در توتونهای تراریخت موجب جلوگیری از بیان ژن *RDR1* و در نهایت موجب کاهش انتقال عمودی ساختارهای ساقه - حلقه خاموش کننده به نسل بعد شده است (۱).

همچنین ایجاد مقاومت به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه-فرنگی (TSWV) و *PVY* نشان داد که نسبتی بین بیان ژن منتقل شده و مقاومت ایجاد شده وجود ندارد (۱۷). مشخص شده است که علاوه بر سازه‌های قابل ترجمه، سازه‌های غیر قابل ترجمه نیز قادر به ایجاد مقاومت هستند (۱۹). همچنان که در تحقیق حاضر بیان یک ترادف نوکلئوتیدی غیر قابل ترجمه قادر به ایجاد گیاه تراریخت مقاوم به ویروس بود. به دست آمدن نتایج متفاوت در رابطه با گیاهان تراریخت جهت ایجاد مقاومت نشان دهنده پیچیده بودن واکنش بین گیاه و ویروس می‌باشد (۸ و ۱۵). علاوه بر این به دست آمدن گیاهان تراریختی که علائم را

منابع

- ۱- رخشنده‌رو، ف.، پالوکایتیس، پ.، شمس بخش، م. (۱۳۹۲)، ناپایداری ساختارهای ساقه - حلقه در جلوگیری از بیان

۲- همایی بروجنی، ط.، احسانپور، ع. ا.، اصغری، غ. (۱۳۹۴). انتقال T-DNA و ایجاد گیاه تراریخت داتوره (*Datura metel* L). مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۸، شماره ۲. صفحه ۳۱۰-۳۱۷.

ژن‌های مسئول مقاومت در برابر آلودگی‌های ویروسی در توتون‌های تراریخت. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۶، شماره ۳. صفحه ۴۰۱-۴۱۵.

- 3- Andert-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Ving, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. and Fuchs, M. (2004). *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86: 183- 195.
- 4- Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of pathogen- derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant ell*. 8:1833-1844.
- 5- Dasgupta, V. G., Malathi, S. and Mukherjee, K. (2003). Genetic engineering for virus resistance. *Current Science*, 84:3-10.
- 6- Dawson, W. O. and Hilf, M. E. (1992). Host-range determinants of plant viruses. *Annu Rev plant physiol plant Mol Biol*.43: 527-555.
- 7- Fan, Q., Niroula, M., Feldstein, P.A. and Bruening, G. (2011). Participation of the *Cowpea mosaic virus* protease in eliciting extreme resistance. *Virology* 417: 71-78.
- 8- Fladung, M., Kumar, S., and Ahuja, R. (1997). Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimaeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6: 111-121.
- 9- Fuchs, M., Pinck, M., Serghini, M. A., Ravelonandro, M., Walter, B., and Pinck, L. (1989). The nucleotide sequence of satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus*, strain F13. *Journal of General Virology*. 70: 955-962.
- 10- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. and Ritzenthaler, C. (1999). Protein 2A of *Grapevine fanleafnepovirus* is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264: 25-36.
- 11- Gambino, G., Perrone, I., Carra, A., Chitarra, W., Boccacci, P., Marinoni, D., Barberis, M., Maghuly, F., Laimer, M., and Gribaudo, I. (2009). Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Research* 19 (1): 17-27.
- 12- Golemboski, D .B., Lomonosoff, G. P., and Zaitlin, M. (1990). Plants transformed with a tobacco mosaic virus non structural gene sequence are resistance to the virus. *proc Nat/AcadSci USA*.87: 6311-6315
- 13- Gu, H., and Ghabrial, S.A. (2005). The Bean pod mottle virus proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. *Virology* 333: 271-283.
- 14- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. San Diego: Academic Press.
- 15- Jacquemond, M., Teycheney, P. Y., Carrere, I., Navas- Castillo, J., and Tepfer, M. (2001). Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different *Cucumber mosaic virus* (CMV) coat protein genes. *Mol. Breed*. 8: 85-94.
- 16- Jardak-Jamoussi, R., Winterhagen, P., Bouamama, B., Dubois, C., Mliki, A., Wetzell, T., Ghorbel, A., and Reustle, G. (2009). Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 187-196.
- 17- Kawchuke, L. M., Martin, R.R., and Macpherson, P. (1991). Sense and antisense RNA mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. plant-Microbe interact*.4:247-253
- 18- Lennefors, B. L., Savenkov, E. I., Bensefelt, J., Wremerth, E., Roggen, P., Tuveesson, S., Valkonen, J. P. T., and Gielen, J. (2006). dsRNA- mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Mol breeding* 18: 313-325.
- 19- Lindbo, J, A. and Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replivcation in transgenic plants and protoplast. *Virology*. 189: 725 - 733.
- 20- Ling, K. S., Zhu, H. Y., Alvizo, H., Hu, J. S., Drong, R. F., Slightom, J. L., and Gonsalves, D. (1997). The coat protein gene of *Grapevine leafroll associated 162 Closterovirus-3*: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Archives of Virology*. 142: 1101-1116.

- 21- Martelli, G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*. 96: (1S). 1-4.
- 22- Martelli, G. P., and Savino, V. (1988). Fanleaf degeneration. pp: 48- 49. In *Compendium of Grape Diseases* (Pearson R.C., and Goheen A.C. Eds). The American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota. 93 p.
- 23- Martelli, G. P., and Savino, V. (1990). Fanleaf degeneration. In: Pearson R.C. and Goheen A. (eds.). *Compendium of grape diseases*, pp. 48-49. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- 24- Murashige, S. and Skoog, M. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473-497.
- 25- Naraghi-Arani, P., Duabert, S., and Rowhani, A. (2001). Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of General Virology* 82: 1791- 1795.
- 26- Pinck, L., Fuchs, M., Pinck, M., Ravelonandro, M. and Walter, B. (1988). A satellite RNA in *grapevine fanleaf virus* strain F13. *Journal of General Virology* 69: 233-239.
- 27- Ritzenthaler, C., Pink, M., and Pink, L., (1995). *Grapevine fanleaf nepovirus* P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo. *Journal of General Virology* 76: 907-15..
- 28- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., Vlugt, van der, R., and Wetzels, T. (2009). *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Archives of Virology* 154: 899-907.
- 29- Scholthof, K. B. G., Scholthof, H. B., Jackson, A. O. (1993). Control of plant virus diseases by Pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 102, 7-12.
- 30- Serghini, M. A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B., and Pinck, L. (1990). RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology* 71: 1433-1441.
- 31- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*. 407: 319-320.
- 32- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., and Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220: 245-250
- 33- Vazquez, R. C., Del Vas, M, Hopp, H. E. (2002). RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 167-172.
- 34- Vigne, E., Gottula, J., Schmitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., Rakotomalala, L., Lemaire, O., Ritzenthaler, C., and Fuchs, M. (2013). A strain specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of *Grapevine fanleaf virus* determines symptoms in *Nicotiana* species. *Journal of General Virology*. 94: 2803-2813.
- 35- Viry, M., Serghini, M.A., Hans, F., Ritzenthaler, C., Pinck, M., and Pinck, L. (1993). Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine nepovirus RNAs. *Journal of General Virology* 74: 169-174.
- 36- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A. (2001). Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-590.
- 37- Sanford J.C. and Johnston S. (1985). The concept of parasite-derived resistance-Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113(2): 395-405.

Induction of Resistance by RNA Silencing Method against *Grapevine fanleaf Virus (GFLV)*

Pakbaz S.¹, Pazhouhandeh M.², Eini Gandomani O.³ and Sokhandan N.¹

¹ Plant Protection Dept., Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

² Biotechnology Dept., Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

³ Plant Protection Dept., Agriculture Faculty, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Plant viruses have been the limiting factor in agriculture. To date, 64 viral agents infecting grapes have been identified around the world. One of the most destructive of these agents is GFLV. To control these pathogens, traditional methods, such as crop rotation, early detection and elimination of infected plants, eradication of the infection source plants, cross protection, genetically modified plants for resistance and chemical control of vectors, have been used. The most efficient method to control viruses is the use of resistant plant varieties and the RNA Silencing-based resistance is the best way to establish the resistance to viruses in plants. In this study, the possibility of induction of resistance to GFLV using a partial GFLV RdRP gene sequence was evaluated. For this purpose, a hairpin construct containing intron and a partial RdRP gene sequence was developed. *Agrobacterium tumefaciens* was used for *Nicotiana benthamiana* transformation. 40 lines of transgenic *N. benthamiana* plants were created and confirmed by PCR reactions. The transgenic plants were mechanically inoculated with GFLV in order to evaluate their resistance to GFLV. The results of ELISA testing and plant symptoms showed that 27.5% of transgenic plants were resistant to GFLV and 40% of them showed the symptom and infection with delay. In this research, in addition to produce some transgenic *N. benthamiana* plants resistant to GFLV, the results showed that the nucleotide sequence of partial 1E^{Pol} gene which was used to develop the hairpin construct in this study, doesn't have any activity similar to viral suppressor of RNA silencing (VSR) and the induced resistance by this construct in plant is suppressed by unknown VSR which encode by this virus and causes to express susceptibility reaction in transgenic plants.

Key words: GFLV, RNA Silencing, Resistant, Transgenic Plant.