

ساخت سازه RNA سنجاق سری القاء کننده خاموشی ژن و بررسی مقاومت ناشی از آن در برابر ویروس برگ بادبزی مو GFLV

• سمیرا پاکباز*: گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

استفاده از ارقام مقاوم گیاهی بهترین راه برای کنترل عوامل ویروسی می باشد. القاء مقاومت به واسطه خاموشی RNA یک روش خوب برای ایجاد ارقام مقاوم به ویروس ها می باشد. ویروس برگ بادبزی مو (*Grapevine fanleaf virus GFLV*) عامل یکی از مخرب ترین بیماری های ویروسی مو در سراسر دنیا است. به منظور بررسی امکان ایجاد مقاومت به GFLV مو با استفاده از سیستم القاء مقاومت به واسطه RNA، از توالی نوکلئوتیدی دو ژن این ویروس برای ساخت سازه سنجاق سری استفاده شد که در آن قطعه ای از هر ژن به طور جداگانه در جهت سنس و آنتی سنس در دو طرف یک ناحیه اینترونی و در مقابل ۳۰SCaMV در پلاسمید pGA482G قرار گرفت. جهت تراریختی گیاهان *Nicotiana benthamiana* از سیستم *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شد. پس از تأیید انتقال ژن، گیاهان تراریخت به منظور ارزیابی مقاومت نسبت به GFLV، مایه زنی مکانیکی شدند. ۱۰ روز پس از مایه زنی ویروس سه نوع واکنش مقاومت، حساسیت و تأخیر در بروز علائم در گیاهان مایه زنی شده مشاهده شد. آزمون الیزا نیز عدم حضور ویروس را در گیاهان مقاوم تراریخت تأیید کرد. در این گیاهان حتی یک ماه پس از مایه زنی، هیچ گونه علائم ویروسی مشاهده نشد. در حالی که گیاهان تراریختی که حضور ویروس در آن ها با آزمون الیزا ردیابی شد، علائم موزاییک را یک هفته پس از مایه زنی و مشابه تیپ وحشی گیاهان مایه زنی شده با GFLV نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که سازه به کار رفته برای القاء مقاومت کارایی بالایی داشته و می توان از آن برای ایجاد مقاومت در ارقام مختلف مو نسبت به GFLV استفاده کرد.

کلمات کلیدی: تراریخت، خاموشی ژن، سنجاق سر، ویروس برگ بادبزی مو



مقدمه

از آنجایی که ویروس‌ها ژنوم کوچک و تعداد محدودی ژن دارند که در طول همانندسازی ویروس ظاهر می‌یابد، این پاتوژن‌ها برای مقاومت منشأ گرفته از بیمارگر (Pathogen Derived Resistance, PDR) مناسب هستند (Baulcombe, 1996). مقاومت به واسطه پروتئین پوششی ویروس، بیان یک منطقه کدکننده در رپلیکاز، استفاده از آنتی‌سنس RNA و استفاده از RNAهای ماهواره‌ای (Satellite RNA) مواردی از استفاده‌های موفق براساس روش PDR می‌باشد (Dawson و Hilf, 1992). یک مکانیسم مهم در PDR خاموشی RNA (RNA Silencing) نامیده می‌شود. خاموشی ژن به پدیده کاهش یا توقف بیان یک ژن گفته می‌شود که قبلاً بیان می‌شده و یا در غیاب پدیده خاموشی ژن بیان خواهد شد. خاموشی یک مکانیسم تنظیم بیان ژن و تدبیر دفاعی سلول‌های زنده علیه توالی‌های DNA پارازیت از قبیل ترانسپوزون‌ها، رتروترانسپوزون‌ها و توالی‌های DNA و RNA از ویروس‌ها می‌باشد (Kim و همکاران، 2011) که اگر مبتنی بر مشابهت باشد می‌تواند روی ژن انتقال یافته و ژن درونی مشابه آن اثر بگذارد (Koteer و همکاران، 1999). مشخص شده است که بسیاری از واکنش‌های مقاومت نیاز به سنتز پروتئین ندارند و به واسطه RNA انجام می‌شوند (Dasgupta و همکاران، 2003). ایجاد مقاومت به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) و ویروس Y سیب‌زمینی (*Potato virus Y, PVY*) نشان داد که بین بیان ژن منتقل شده و مقاومت ایجاد شده ارتباط مستقیمی وجود ندارد (Kawchuke و همکاران، 1991). مقاومت به واسطه RNA یک حالت از خاموشی ژن در سطح پس از نسخه برداری (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS) می‌باشد (Vazquez و همکاران، 2002) که نوعی مکانیسم تجزیه RNA است که به وسیله ویروس می‌تواند القاء شود. ویروس‌ها هم هدف و القاگر PTGS هستند و هم مهارکننده PTGS را تولید می‌کنند. این مسئله باعث شده که ویروس‌ها به‌عنوان بازیکنان اصلی خاموشی به واسطه RNA معرفی شوند (Rovere و Delvas, 2002). از تکنیک خاموشی ژن پس از نسخه برداری برای ایجاد مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است (Lennfors و همکاران، 2006). سازه‌های مختلفی به منظور افزایش کارایی این سازوکار و ایجاد مقاومت مؤثر معرفی شده‌اند که از این میان سازه‌های سنجاق سری دارای اینترون از عملکرد مناسبی برخوردار بوده‌اند (Smith و همکاران، 2000). مزیت کاربرد سازه سنجاق سری جهت مهار ویروس این است که توالی تکراری معکوس به فرم RNA

دورشته‌ای در سیستم تراریخت بیان می‌گردد و این dsRNA سبب خاموش شدن ژن هدف می‌شود (Kerschen و همکاران، 2004). از این طریق می‌توان حتی قطعه‌ای به طول 50 جفت باز یا بیش تر که از لحاظ ژنتیکی با ژن هدف مشابه باشد را برای خاموش نمودن ژن مورد نظر در گیاه بیان نمود. هم‌اکنون از ناقل‌های بیان‌کننده ساختارهای ژنتیکی ساقه-حلقه یا همان توالی تکرار معکوس به‌طور وسیعی به منظور ایجاد محصولات تراریخت شده با استفاده از مکانیسم خاموشی RNA و خاموش نمودن ژن هدف استفاده می‌شود (Carr و Palukaitis, 2008). تاکنون 64 عامل ویروسی آلوده‌کننده مو در سراسر دنیا شناسایی شده‌اند که یکی از مخرب‌ترین آن‌ها ویروس برگ بادبزی مو (*Grapevine fanleaf virus, GFLV*) می‌باشد (Martelli, 2014). GFLV یک عضو دو پیکره‌ای با ژنوم دو قسمتی از زیر گروه A در جنس *Nepovirus*، زیر تیره *Comovirinae*، تیره *Secoviridae* و راسته *Picornavirales* می‌باشد (Sanfacon و همکاران، 2009). ویروس‌های این ویروس ایزومتریک بوده و حدود 30 نانومتر قطر دارند. ژنوم ویروس از دو قطعه RNA تک رشته‌ای (Single-stranded Ribonucleic Acid, ssRNA) با قطبیت مثبت تشکیل شده است که در انتهای 5' دارای پروتئین متصل به ژنوم (Viral Protein genome-linked, VPg) و در انتهای 3' به صورت پلی‌آدنینی (Poly A) می‌باشند. هر قطعه محتوی یک چارچوب خوانش باز (Open Reading Frame) است و یک پلی‌پروتئین (P1) و P2 را رمز می‌کند. هر پلی‌پروتئین به کمک پروتئینازی که توسط RNA1 رمز می‌شود به پروتئین‌های کوچک‌تر که هر یک دارای وظیفه مشخصی هستند، شکسته می‌شود (Lai-Kee-Him و همکاران، 2013). پلی‌پروتئین رمز شونده توسط RNA1 (P1) به 5 پروتئین شکسته می‌شود که اجزاء تکثیری ویروس هستند و از انتهای آمینی به کربوکسیلی شامل یک کوفاکتور پروتئیناز فرضی (1A)، هلیکاز فرضی (1B)، پروتئین متصل به ژنوم ویروس (1C)، پروتئین سیستئین (1D) و RNA پلیمرز وابسته به RNA (EPol= RNA-2) می‌باشد. RNA2 پلی‌پروتئین P2 را رمز می‌کند که از انتهای آمینی به کربوکسیلی با فعالیت پروتئولیتیکی به ترتیب به سه پروتئین شامل 2AHP که برای تکثیر RNA2 مورد نیاز است و می‌تواند به‌عنوان پروتئین خانگی (Homing Protein) عمل کند، پروتئین حرکتی 2BMP که پروتئین اصلی مشاهده شده در پلاسما سوماتاست و پروتئین پوششی 2CCP شکسته می‌شود. هر دو RNA ژنومی برای آلودگی سیستمیک گیاه ضروری هستند (Naraghi-Arani و همکاران، 2001). در پژوهش حاضر امکان ایجاد مقاومت به ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) به کمک ترادف نوکلئوتیدی بخشی از دو ژن



اینترون دوم گیاه سیب زمینی (IV2) که در ناقل pBin19-Gus-*Intron* همسانه‌سازی شده بود و توسط آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه Cornell در اختیار این پژوهش قرار گرفت (Vancanneyt و همکاران، ۱۹۹۹) به‌عنوان جداکننده طراحی شد (جدول ۱).

تکثیر قطعه‌ها: برای تکثیر رشته‌های سنس و آنتی‌سنس قطعات ۱A و ۱B از آغازگرهای طراحی شده و نیز برگ‌های گیاه *Chenopodium quinoa* آلوده به GFLV (نژاد GHu) استفاده شد و آزمون RT-PCR با استفاده کیت یک مرحله‌ای شرکت کیژن طبق دستورالعمل انجام شد. هم‌چنین برای تکثیر اینترون از DNA حاصل از استخراج پلاسمید ناقل pBin19-Gus-*Intron* و آغازگرهای طراحی شده استفاده شد (آزمون PCR با استفاده از کیت Q5 Hot start High-Fidelity DNA polymerase شرکت New England Biolabs) و محصولات تکثیر یافته روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) و نیز ارزیابی سطوح مقاومت گیاه *Nicotiana benthamiana* نسبت به این ویروس که توسط سازه تکرار معکوس حاوی اینترون القاء شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر: توالی نوکلئوتیدی کامل RNA1 مربوط به نه جدایه از GFLV که در NCBI موجود است، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit هم‌ردیف‌سازی و سپس یک ناحیه حفاظت شده نوکلئوتیدی از هر ژن (۱A و ۱B) برای ساخت سازه انتخاب شد. طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس در دو جهت سنس و آنتی‌سنس انجام پذیرفت. هم‌چنین جایگاه آنزیم‌های برشی مناسب و مطابق با نقشه‌زنتیکی ناقل pEPT8MCS2 (Gottula و همکاران، ۲۰۱۴) در آغازگرها در نظر گرفته شد. هم‌چنین آغازگرهای مستقیم و معکوس با جایگاه آنزیم‌های برشی مناسب از توالی نوکلئوتیدی

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد نیاز جهت ساخت سازه سنجاق سر و جایگاه‌های برشی آن‌ها

نام آغازگر	جهت	توالی آغازگر	جایگاه برشی	اندازه قطعه bp
۱A.For	Sense	۳' TACCACCATGGATGTGGCAGGTGCCYAGGGCTCCC ۵'	<i>NcoI</i>	۱۳۵
۱A.Rev		۵' GCT GTG GTA CCA CAA GAC GYG TGC TCA TMY AAC ۳'	<i>KpnI</i>	
۱A.For	Anti sense	۳' AGTGAGGATCCATGTGGCAGGTGCCYAGGGCTCCC ۵'	<i>BamHI</i>	۱۳۵
۱A.Rev		۵' AAT GCG TCG ACA CAA GAC GYG TGC TCA TMY AAC ۳'	<i>SalI</i>	
۱B.For	Sense	۳' TAC CAC CAT GGA TGG YTG RTG ARG GRG AAT CYC ۵'	<i>NcoI</i>	۱۴۱
۱B.Rev		۳' GATGTGGTACCTATGAAAARCTCCCCAGYTTRA AGC ۵'	<i>KpnI</i>	
۱B.For	Anti sense	۳' AGT GAG GAT CCA TGG YTG RTG ARG GRG AAT CYC ۵'	<i>BamHI</i>	۱۴۱
۱B.Rev		۳' AATGCGTCGACTATGAAAARCTCCCCAGYTTRA AGC ۵'	<i>SalI</i>	
Int.For	-	۳' GCT GTG GTA CCG TTT GTT TCT GCT TCT ACC TTT G ۵'	<i>KpnI</i>	۲۱۱
Int.Rev	-	۳' AAT GCG TCG ACC TAA ACA TCA CCA TGT TTT GGTC ۵'	<i>SalI</i>	

جامد LB حاوی آمپی‌سیلین انتخاب شدند. به‌منظور یافتن کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب، 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 قطعات ۱A و ۱B به‌طور جداگانه در جهت سنس انتخاب شدند. این پلاسمید و نیز قطعات سنس تکثیر یافته از دو ژن 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 پس از استخراج پلاسمید، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *NcoI* و *KpnI* انجام شد. پلاسمید کلونی‌هایی که علاوه بر اینترون، قطعه سنس را نیز دریافت کرده بودند، این بار برای دریافت قطعه در جهت آنتی‌سنس

همسانه‌سازی قطعه‌ها: جهت ساخت سازه تکرار معکوس، از ناقل pEPT8MCS2 که دارای جایگاه چندگانه همسانه‌سازی (Multiple Cloning Site) 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. جهت ساخت سازه، ابتدا محصول تکثیر یافته اینترون و نیز پلاسمید pEPT8MCS2 با استفاده از آنزیم‌های *KpnI* و *SalI* هضم شدند. اینترون برش یافته پس از خالص‌سازی با استفاده از کیت خالص‌سازی (Omega) Enzyme Clean Up توسط آنزیم T4DNA Ligase (BioLabs) به‌ناقل هضم شده متصل شد. سپس این همسانه به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 α انتقال داده شد. باکتری‌های حامل این همسانه در محیط



استفاده شدند. همسانه‌سازی قطعات آنتی سنس مشابه قطعات سنس و با استفاده از آنزیم‌های برشی Sall و BamHI انجام و تأیید شد. پلاسمید کلونی‌هایی که قطعات اینترون، سنس و آنتی‌سنس را دریافت کرده بودند، جهت اطمینان با دو آنزیم BamHI و NcoI که جایگاه آن‌ها به ترتیب در آغازگر مستقیم رشته سنس و آنتی سنس قرار دارد برش داده شدند که انتظار می‌رود با انجام این واکنش، توالی سنجاقت سری یا تکرار معکوس به طول حدود ۴۳۰ جفت باز از پلاسمید جدا شود. این پلاسمیدها بار دیگر با آنزیم HindIII منطبق با نقشه ژنتیکی پلاسمید برش داده شدند. با انجام این واکنش انتظار می‌رود سازه تکرار معکوس به همراه ناحیه پیش‌برنده و خاتمه دهنده ۳۵SCaMV از پلاسمید جدا شود.

انتقال کاست‌های ژنی حاوی سازه تکرار معکوس به ناقل pGA482G: جهت انتقال سازه مورد نظر به گیاه از ناقل دوگانه pGA482G استفاده شد که دارای ژن گزینش‌گر نومایسین فسفوترانسفراز II (nptII) می‌باشد. تکثیر کاست‌های ژنی حاوی توالی تکرار معکوس تحت پیش‌بر ۳۵SCaMV و انتقال کاست‌های ژنی ۳۵SPro، ۱ASense، Int، ۱AAntisense، ۳۵STer و HpaI و BglIII انجام شد.

استفاده شدند. همسانه‌سازی قطعات آنتی سنس مشابه قطعات سنس و با استفاده از آنزیم‌های برشی Sall و BamHI انجام و تأیید شد. پلاسمید کلونی‌هایی که قطعات اینترون، سنس و آنتی‌سنس را دریافت کرده بودند، جهت اطمینان با دو آنزیم BamHI و NcoI که جایگاه آن‌ها به ترتیب در آغازگر مستقیم رشته سنس و آنتی سنس قرار دارد برش داده شدند که انتظار می‌رود با انجام این واکنش، توالی سنجاقت سری یا تکرار معکوس به طول حدود ۴۳۰ جفت باز از پلاسمید جدا شود. این پلاسمیدها بار دیگر با آنزیم HindIII منطبق با نقشه ژنتیکی پلاسمید برش داده شدند. با انجام این واکنش انتظار می‌رود سازه تکرار معکوس به همراه ناحیه پیش‌برنده و خاتمه دهنده ۳۵SCaMV از پلاسمید جدا شود.

انتقال کاست‌های ژنی حاوی سازه تکرار معکوس به ناقل pGA482G: جهت انتقال سازه مورد نظر به گیاه از ناقل دوگانه pGA482G استفاده شد که دارای ژن گزینش‌گر نومایسین فسفوترانسفراز II (nptII) می‌باشد. تکثیر کاست‌های ژنی حاوی توالی تکرار معکوس تحت پیش‌بر ۳۵SCaMV و انتقال کاست‌های ژنی ۳۵SPro، ۱ASense، Int، ۱AAntisense، ۳۵STer و HpaI و BglIII انجام شد.

جدول ۲: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای پیش‌بر ۳۵SCaMV و خصوصیات آن‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر	آنزیم برشی
۳-۳۵S-Pro	۵' CGT GCG AGC TCT GAG ACT TTT CAA CAA AGG G ۳'	HindIII
۳-۳۵S-Ter	۵' GCA CCG TTA ACG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AG ۳'	HpaI
۴-۳۵S-Pro	۵' CGT GCG TTA ACT GAG ACT TTT CAA CAA AGG G ۳'	HpaI
۴-۳۵S-Ter	۵' GCA CCA GAT CTG ATT TTG GTT TTA GGA ATT AG ۳'	BglIII

کشت شدند و ریزنمونه‌های برگ‌ی سترون از گیاهان رشد یافته از این بذور تهیه شدند. ریز نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تهیه شده از MS حاوی سوسپانسیون *A. tumefaciens* سویه C58Z707 (OD₆₀₀:۰/۶-۰/۸) حامل سازه مورد نظر فرو برده شدند و سپس روی کاغذ صافی آب اضافی آن‌ها گرفته شد. ریز نمونه‌ها به محیط کشت جامد MS حاوی هورمون‌های BAP (۶-Benzyl Amino Purine) با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر و NAA (۴- α -Naphthalene Acetic Acid) 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 هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت گزینش‌گر حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند و به مدت ۶-۴ هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶:۸ (نور):

انتقال ناقل pGA482G حامل کاست‌های ژنی به آگروباکتریوم: نمونه‌هایی که حضور کاست ژنی ۱A و ۱B در آن‌ها تأیید شده بود جهت انتقال به آگروباکتریوم انتخاب شدند. تراریختی سویه C58Z707 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* از طریق شوک الکتریکی روی سلول‌های مستعد حاوی پلاسمید نوترکیب انجام شد و سپس سلول‌های باکتری در محیط کشت LB جامد حاوی غلظت مناسبی از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کانامایسین کشت داده شدند. سپس حضور کاست‌های ژنی در پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر کاست ژنی بررسی شد.

تراریزش (*Nicotiana benthamiana* Transformation):

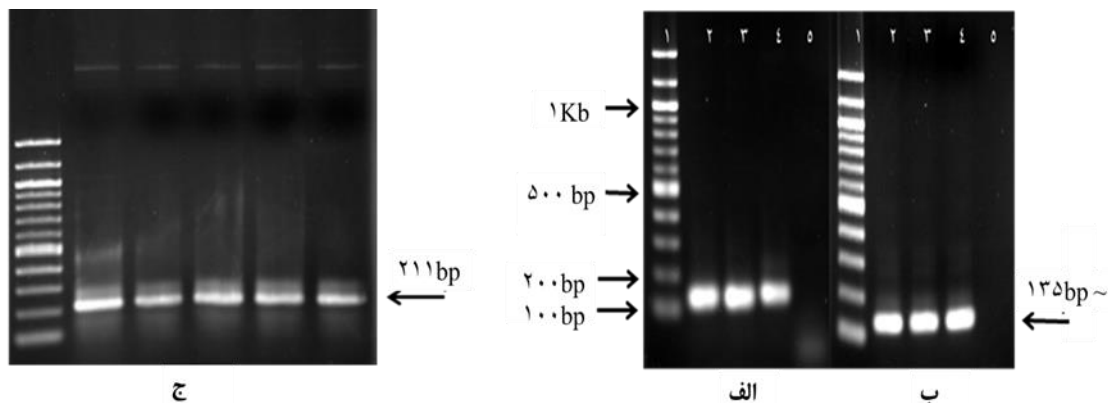
جهت تراریختی از تیپ وحشی گیاه *N. benthamiana* استفاده شد. بذرها در شرایط استریل بر روی محیط کشت جامد حاوی نصف غلظت نمک‌های MS تکمیل شده (Skoog و Murashige)،



۰/۱ مولار (pH: ۷/۴) عصاره گیری شدند. سپس مایه زنی مکانیکی با استفاده از عصاره گیاهی حاوی ویروس و به کمک کمی پودر کاربوراندوم روی برگ های ۷۰ گیاه مستقل از لاین های تراریخت شده (T₀) با سازه ۱A+۱B که تراریختی آن ها تأیید شده بود و در مرحله ۴-۵ برگی بودند صورت گرفت. هم چنین ۵ گیاه از تیپ وحشی و غیر تراریخت گیاه *N. benthamiana* نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و مایه زنی با GFLV روی آن ها انجام شد. هفت روز پس از مایه زنی، علائم تظاهر یافته احتمالی در گیاهان تراریخت بررسی و تا روز دهم پس از مایه زنی ادامه داشت. هم چنین جهت اندازه گیری غلظت ویروس، آزمون سرولوژیکی الایزا (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent assay, DAS-ELISA) با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی پروتئین پوششی GFLV (کیت شرکت Bioreba) و نیز بافرهای این کیت انجام شد. این آزمون در روز نهم پس از مایه زنی مکانیکی روی برگ های نوظهور و مایه زنی نشده گیاهان تراریخت انجام گرفت. در مرحله آخر آزمون پس از افزودن ماده زمینه، میزان تغییر رنگ چاهک ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان (Synergy2 Microplate Reader) (شرکت Biotek) و نرم افزار Gen5 اندازه گیری شد.

نتایج

در این پژوهش قطعه هایی به طول ۱۳۵ bp از ژن ۱A و ۱۴۱ bp از ژن ۱B برای هر دو رشته سنس و آنتی سنس این قطعات از ویروس GFLV تکثیر شد (شکل ۱- الف و ب). هم چنین با استفاده از آغازگرهای طراحی شده مربوط به اینترون IV2 با کمک آزمون PCR قطعه ای به طول ۲۱۱ جفت باز از DNA حاصل از پلاسمید ناقل pBin19-Gus-Intron تکثیر شد (شکل ۱- ج).



شکل ۱: الکتروفورز محصول تکثیر یافته قطعات سنس (الف) و آنتی سنس (ب) و اینترون (ج)

الف و ب: ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. ۲ و ۳- ژن ۱A (۱۳۵ جفت باز). ۴- ژن ۱B (۱۴۱ جفت باز). ۵- شاهد منفی واکنش PCR

تاریکی) جهت باززایی و القاء جوانه نگهداری شدند. در طول این مدت نمونه های باززا شده هفته ای یک بار در محیط تازه تجدید کشت شدند. جهت انتخاب گیاهچه های تراریخت احتمالی، از محیط MS حاوی کانامایسین با غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. این روند فرصتی را به نوساقه های تراریخت می دهد تا به آرامی با غلظت های بالاتر کانامایسین سازگار شوند و نوساقه های غیر تراریخت در غلظت نهایی کانامایسین سفید خواهند شد. نوساقه های رشد یافته به محیط کشت ریشه زایی منتقل شدند. محیط ریشه زایی با افزودن هورمون IBA (-Indole-³-Butyric Acid) به همراه آنتی بیوتیک های کانامایسین و سفوتاکسیم به محیط کشت پایه MS حاوی یک درصد ساکاروز و ۰/۷ درصد آگار به دست آمد. گیاهچه های ریشه دار در ظروف مخصوص محتوی خاک استریل حاوی ورمیکولایت، پیت و پرلایت (به نسبت ۲:۲:۱) کشت و با محلول غذایی MS مایع نصف غلظت محلول پاشی شدند. گیاهچه ها جهت سازگاری با دما و رطوبت محیط به مدت دو هفته در شرایط اتاقک رشد و پس از آن در گلخانه نگهداری شدند.

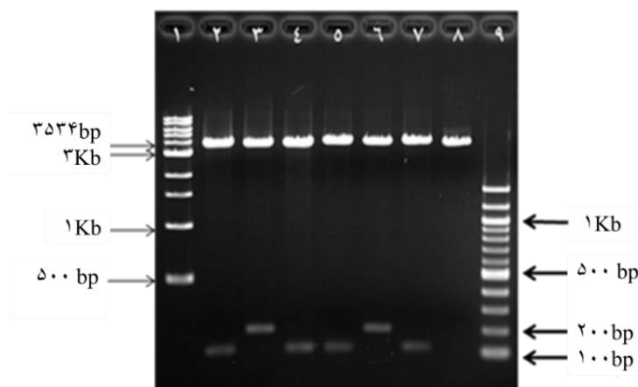
بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی: جهت تأیید

حضور سازه و تراریختی گیاهان، استخراج DNA از برگ های جوان گیاهان تراریخته احتمالی نسل T₀ با استفاده از کیت استخراج DNA گیاهی Omega صورت گرفت. سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از کیت Hot start High-Fidelity (Biolabs) DNA polymerase و آغازگرهای ژن گزینش گر *nptII* ناقل pGA482G انجام شد. گیاهانی که حضور سازه در آن ها تأیید شد، برای مایه زنی با ویروس انتخاب شدند.

مایه زنی گیاهان تراریخته و ارزیابی میزان مقاومت:

برگ های *C. quinoa* آلوده به GFLV با استفاده از بافر فسفات

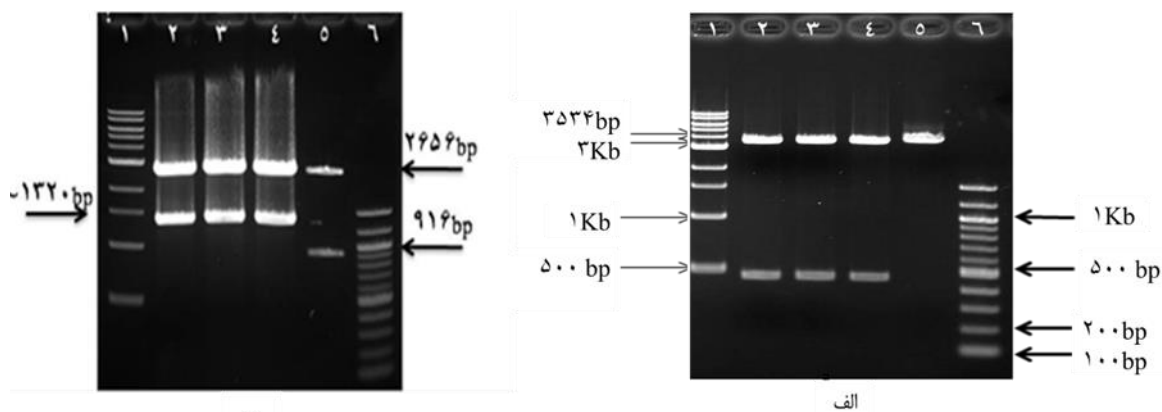




شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pEPT8MSC2 حامل

سازه تکرار معکوس ۱A+۱B

۱- نشانگر مولکولی یک کیلو باری. ۲- قطعه سنس ۱A (۱۲۳ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *NcoI* و *KpnI*. ۳- قطعه اینترون در سازه تکرار معکوس ۱A (۲۰۰ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *KpnI* و *Sall*. ۴- قطعه آنتی سنس ۱A (۱۲۳ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *Sall* و *BamHI*. ۵- قطعه سنس ۱B (۱۲۹ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *NcoI* و *KpnI*. ۶- قطعه اینترون در سازه تکرار معکوس ۱B (۲۰۰ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *KpnI* و *Sall*. ۷- قطعه آنتی سنس ۱B (۱۲۹ bp). برش پلاسمید با آنزیمهای *Sall* و *BamHI*. ۸- پلاسمید بدون قطعه و برش یافته با آنزیمهای *NcoI* و *BamHI* به عنوان کنترل. ۹- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.



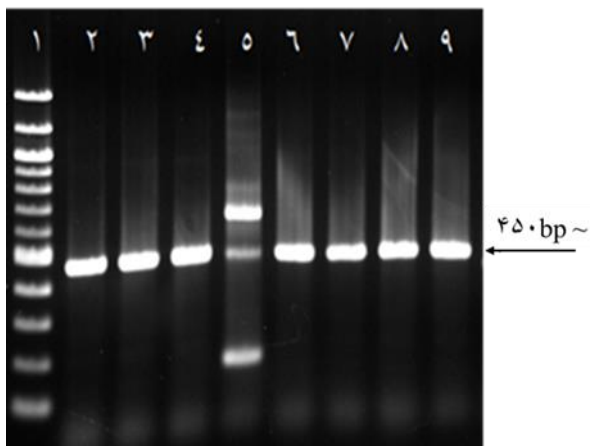
شکل ۳: الکتروفورز محصول واکنش برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب حامل سازه تکرار معکوس

الف: با استفاده از آنزیمهای *NcoI* و *BamHI*. ۱- نشانگر مولکولی یک کیلو باری. ۲ و ۳- سازه تکرار معکوس ۱A (۴۲۹ bp). ۴- سازه تکرار معکوس ۱B (۴۴۱ bp). ۵- پلاسمید بدون قطعه به عنوان کنترل. ۶- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. ب: با استفاده از آنزیم برشی *HindIII*. ۱- نشانگر مولکولی یک کیلو باری. ۲ و ۳- کاست ژنی ۱A (۱۳۱۷ bp). ۴- کاست ژنی ۱B (۱۳۲۹ bp). ۵- پلاسمید بدون قطعه به عنوان کنترل. ۶- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

۳-۳۵S کاست ژنی ۱A از پلاسمید نو ترکیب ناقل pEPT8MSC2 تکثیر شد (شکل ۴). پس از تأیید همسانه سازی این کاست توسط واکنش برش آنزیمی (شکل ۵)، کاست ژنی ۱B با استفاده از آغازگرهای ۳-۳۵S تکثیر و پس از برش، به ناقل pGA482G حامل کاست ژنی ۱A انتقال یافت و تأیید حضور کاست ژنی ۱B در این ناقل توسط واکنش برش با آنزیمهای *HpaI* و *BglIII* انجام شد (شکل ۶). در نتیجه یک سازه سنجاقت سری حامل کاستهای ژنی ۱A و ۱B ساخته شد. پلاسمید نو ترکیب کلونی هایی که حضور کاستهای مورد نظر در آنها تأیید شده بود، از طریق شوک الکتریکی به سویه C58Z707 آگروباکتریوم منتقل شدند.

همسانه سازی قطعات سنس، آنتی سنس و اینترون در ناقل pEPT8MSC2 با استفاده از واکنش برش و آنزیمهای مربوط به هر یک تأیید شد (شکل ۲). هم چنین، واکنش برش آنزیمی روی پلاسمیدهای نو ترکیب pEPT8MSC2 حامل سازه های تکرار معکوس هر ژن با استفاده از آنزیمهای *NcoI* و *BamHI* توانست قطعه های حدود ۴۳۰ جفت باز ایجاد کند که نشان دهنده طول کامل هر سازه تکرار معکوس بود (شکل ۳-الف). واکنش برش جهت تأیید مجدد توسط آنزیم برشی *HindIII* روی سازه ها انجام شد که بر اساس نقشه ژنتیکی ناقل pEPT8MSC2 توانست قطعه ای حدود ۱۳۲۰ جفت باز که همان کاست ژنی حامل سازه تکرار معکوس است را از پلاسمید جدا کند (شکل ۳-ب). با استفاده از آغازگرهای

سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توالی تکرار معکوس هر ژن (آغازگر مستقیم رشته سنس و آنتی سنس هر ژن) روی پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده انجام و حضور سازه‌های سنجاق سری در سلول‌های آگروباکتریوم تأیید شد (شکل ۷).

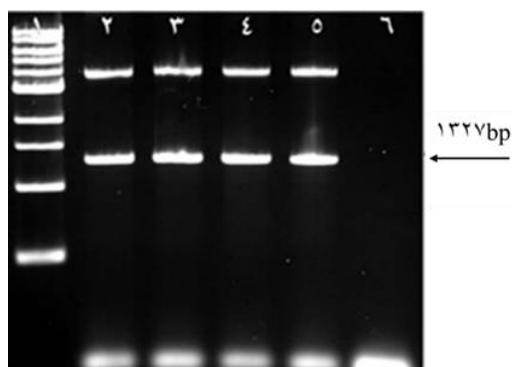


شکل ۷: الکتروفورز محصول واکنش PCR جهت تأیید حضور

سازه‌های تکرار معکوس در سلول‌های آگروباکتریوم

۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. ۲-۵- سازه تکرار معکوس ۱A (۴۴۹ bp).
۶-۹- سازه تکرار معکوس ۱B (۴۶۱ bp). ۸-۹.

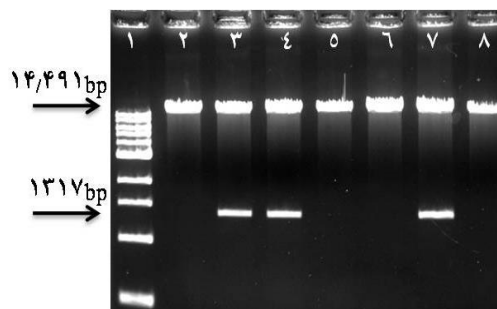
سازه ساخته شده در این تحقیق شامل دو توالی تکرار معکوس ۱A و ۱B در حد فاصل نواحی مرزی RB و LB ناقل pGA482G بود و در جلوی ژن *nptII* قرار گرفت. هر دو توالی تکرار معکوس به طور جداگانه توسط ناحیه پیش برنده و خاتمه دهنده ۳۵SCaMV در برگرفته شده‌اند (شکل ۸). با توالی‌یابی سازه از قرارگیری صحیح قطعات اطمینان حاصل شد. سازه‌های تکرار معکوس پس از نسخه‌برداری در گیاه تولید mRNAهایی با ساختار سنجاق سری می‌کنند که این ساختار سبب القاء خاموشی ژن و سیستم دفاعی در گیاه می‌شود. به منظور ارزیابی کارایی سازه در ایجاد مقاومت به GFLV از روش تراریختی پایدار گیاه *N. benthamiana* استفاده شد. آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* توانست قطعه‌ای به طول ۱۱۰۵ جفت باز را از DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت تکثیر کند و در نتیجه حضور سازه در این گیاهان تأیید شد (شکل ۹ و ۱۰). پس از تأیید تراریختی گیاهان، ۷۰ گیاه مستقل از لاین‌های تراریخت شده (T₀) با سازه سنجاق سری ۱A+۱B انتخاب و جهت آزمایشات ارزیابی مقاومت استفاده شدند. به منظور بررسی میزان مقاومت ایجاد شده نسبت به GFLV، لاین‌های تراریخت حاصل با استفاده از عصاره برگ‌های *C. quinoa* آلوده به این ویروس مایه‌زنی شدند.



شکل ۴: الکتروفورز محصول تکثیر یافته کاست ژنی ۱A با استفاده از

روش PCR و آغازگرهای ۳-۳۵S

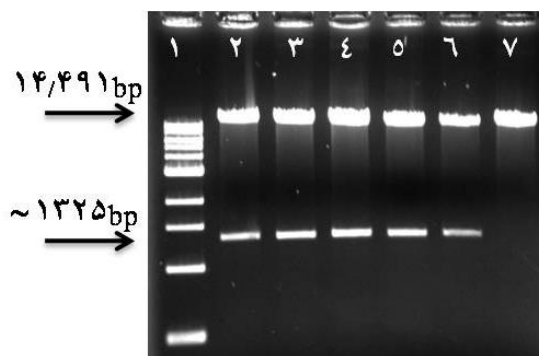
۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی. ۲-۵- کاست ژنی ۱A به طول ۱۳۲۷ جفت باز. پلاسمید pEPT8MSC2 حامل کاست ژنی ۱A که جهت الگوی واکنش استفاده شد به طول ۳۹۷۳ جفت باز قابل مشاهده است. ۶- کنترل منفی واکنش PCR.



شکل ۵: الکتروفورز محصول واکنش برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب

pGA482G جهت تأیید همسانه‌سازی کاست ژنی ۱A

۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی. ۲-۷- برش ناقل حاوی کاست ژنی ۱A با استفاده از آنزیم‌های *HpaI*/*HindIII* که نمونه‌های ۳، ۴ و ۷ مثبت بوده و سازه را دریافت کرده‌اند. ۸- برش ناقل بدون قطعه به عنوان کنترل منفی

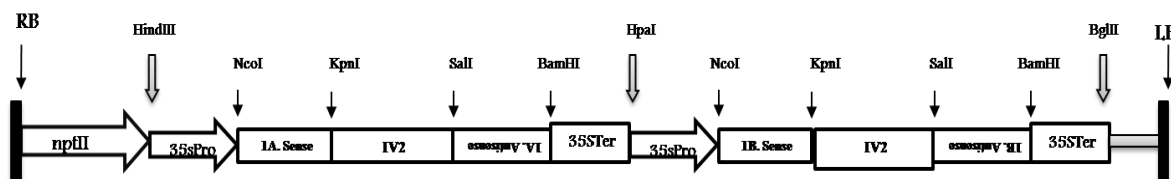


شکل ۶: الکتروفورز محصول واکنش برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب

pGA482G جهت تأیید همسانه‌سازی کاست‌های ژنی سازه‌های ۱A+۱B

۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی. ۲ و ۳- برش ناقل حاوی سازه سنجاق سری ۱A+۱B با آنزیم‌های *HpaI*/*HindIII*. کاست ژنی ۱A (۱۳۱۷ bp). ۴-۶- برش ناقل حاوی سازه سنجاق سری ۱A+۱B با آنزیم‌های *BglIII*/*HpaI*. کاست ژنی ۱B (۱۳۲۹ bp). ۷- برش ناقل بدون قطعه به عنوان کنترل منفی



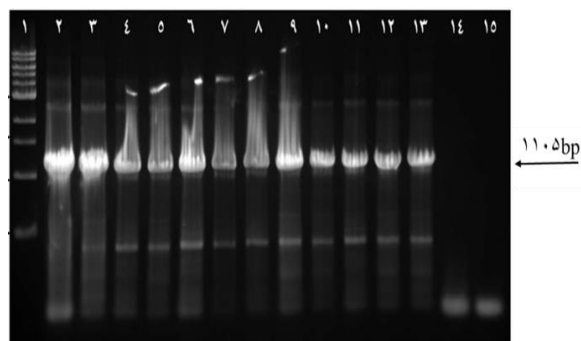


شکل ۸: سازه سنجاقتی سری ۱A+۱B طراحی و ساخته شده

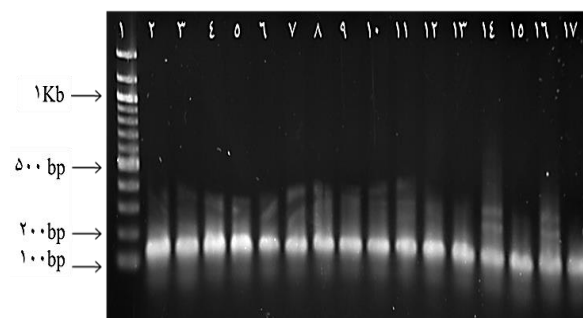
شده بودند. آلودگی در این گیاهان با آزمون الایزا نیز تأیید شد و نتایج ارزیابی‌های چشمی در این گیاهان تراریخت با نتایج آزمون الایزا مطابقت داشت. این گیاهان در مجموع حساس به GFLV ارزیابی شدند. در تعدادی از گیاهان تراریخت، آزمون الایزا توانست حضور ویروس را با غلظت پایین‌تری نسبت به کنترل مثبت ردیابی کند. این در حالی بود که هنوز علائم بیماری به‌طور چشمی در این گروه از گیاهان تراریخت مشاهده نشده بود. علائم بیماری در این گیاهان با تأخیر و حدود ۳ تا ۴ هفته بعد از مایه‌زنی ظاهر شد. علاوه بر این، علائم با شدت کم‌تری نسبت به گیاهان غیرتراریخت و حساس ایجاد شد (شکل ۱۲-ب). تعدادی از گیاهان تراریخت حتی پس از یک ماه نیز علائمی از آلودگی به GFLV نشان ندادند (شکل ۱۲-الف) و واکنش آن‌ها مشابه گیاهان غیرتراریخت بود که مایه‌زنی مکانیکی با ویروس در آن‌ها صورت نگرفته بود (۱۱-ب). آزمون الایزا نیز عدم آلودگی به ویروس را در این گیاهان تأیید کرد و این گیاهان در مجموع مقاوم ارزیابی شدند. براساس نتایج علائم‌شناسی و نیز آزمون الایزا، ۶۱/۴ درصد از گیاهان تراریخت شده با سازه ۱A+۱B مقاوم به ویروس بوده، ۱۵/۷ درصد از این گیاهان علائم آلودگی را با تأخیر نشان دادند و ۲۲/۹ درصد مشابه گیاه غیرتراریخت حساسیت نشان دادند (جدول ۳).



شکل ۱۱: واکنش گیاه *N. benthamiana* غیرتراریخت و حساس به GFLV
الف: گیاه غیرتراریخت مایه‌زنی شده با GFLV به‌عنوان کنترل مثبت. ب: گیاه غیرتراریخت بدون مایه‌زنی با GFLV به‌عنوان کنترل منفی

شکل ۹: نمونه‌ای از تأیید تراریختی گیاهان *N. benthamiana* بااستفاده از آغازگرهای ژن *nptII*

۱- نشانگر مولکولی یک کیلوپازی. ۲-۱۳- گیاهان تراریخت شده با سازه سنجاقتی سری ۱A+۱B. ۱۴- گیاه غیرتراریخت. ۱۵- کنترل منفی آزمون PCR.

شکل ۱۰: نمونه‌ای از تأیید تراریختی گیاهان *N. benthamiana* با

استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر سازه

۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. ۲-۹- تکثیر باند ۱۳۵ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای ژن ۱A در گیاهان تراریخت شده با سازه سنجاقتی سری ۱A+۱B. ۱۰- تکثیر باند ۱۴۱ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای ژن ۱B در گیاهان تراریخت شده با سازه سنجاقتی سری ۱A+۱B.

در روزهای هفتم تا دهم پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در تعدادی از گیاهان تراریخت شده با سازه به‌طور واضحی قابل مشاهده بود (شکل ۱۲-ج). علائم بیماری مانند موزاییک در این گیاهان کاملاً مشابه با گیاهان غیرتراریخت مایه‌زنی شده با GFLV (شکل ۱۱-الف) بود که به‌عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده

جدول ۳: واکنش گیاهان تراریخت با سازه سنجاق سری ۱A+۱B و نیز گیاهان غیر تراریخت نسبت به GFLV-GHu بر اساس علایم، آزمون الایزا و PCR

آزمون الایزا آغازگر <i>nptII</i> با PCR	ظهور علایم (روز پس از مایه‌زنی)	واکنش گیاه	تعداد کل گیاه آلوده (%)	-
-	بدون علایم	مقاومت	۴۳/۷۰ (۶۱/۴٪)	گیاهان تراریخت با سازه ۱A+۱B
+	۲۵-۳۰	تأخیر علایم	۱۱/۷۰ (۱۵/۷٪)	
+	۷-۱۰	حساسیت*	۱۶/۷۰ (۲۲/۹٪)	
-	۷-۱۰	حساسیت	۱۰/۱۰ (۱۰۰٪)	گیاهان غیر تراریخت

*: یک هفته پس از مایه‌زنی، علایم موزاییک و زردی در گیاهان حساس مشاهده شد.

تأییدکننده نتایج مطالعات قبلی جهت کارایی بالای سازه‌های تکرار معکوس در القاء مقاومت می‌باشد. به عبارتی دیگر در این پژوهش بیان یک توالی نوکلئوتیدی غیرقابل ترجمه قادر به ایجاد گیاه مقاوم تراریخت بود. هم‌چنان که تحقیقات قبلی نشان داده است که علاوه بر سازه‌های قابل ترجمه، سازه‌های غیرقابل ترجمه نیز قادر به ایجاد مقاومت هستند (Dougherty و Lindbo، ۱۹۹۲). تاکنون تلاش‌های زیادی برای ایجاد گیاه تراریخت مقاوم به GFLV صورت گرفته است. مقاومت به GFLV در چندین لاین از پایه‌های تراریخت بیان‌کننده ژن پروتئین پوششی بعد از یک آزمایش سه ساله در تاکستانی در فرانسه که به‌طور طبیعی آلوده شده بود، گزارش شد. این موه‌های تراریخت اثر قابل ردیابی روی ظهور گونه‌های نو ترکیب GFLV در یک دوره آزمایشی سه ساله در تاکستان‌هایی که به‌طور طبیعی آلوده شدند، نداشت (Fuchs و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه‌ای گیاهچه مو با استفاده از توالی‌های حفاظت شده‌ای از ویروس‌های GFLV، موزاییک آرابیس (*Arabis*) (*mosaic virus, ArMV*) و ویروس لکه حلقوی تمشک (*Raspberry ringspot virus, RbRSV*) در قالب یک سازه تکرار معکوس به منظور القاء مقاومت چندگانه به این ویروس‌ها تراریخت شد و بار دیگر کارایی این نوع سازه تأیید شد (Reustle و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه‌ای دیگر سازه‌ای براساس توالی‌های GFLV برای ایجاد موه‌های تراریخت که خاموشی اختصاصی GFLV را القاء می‌کرد، طراحی شد. سازه تکرار معکوس با استفاده از قطعاتی از ناحیه حفاظت‌شده ژن پروتئین حرکتی یک جدایه GFLV از تونس همراه با کاست‌های محتوی نئومایسین فسفوترانسفراز II یا ژن *bar* به‌عنوان گزینش‌گر طراحی شد. این سازه از طریق *A. tumefaciens* به گیاه *N. benthamiana* منتقل شد. مدتی بعد از مایه‌زنی گیاهان تراریخت با GFLV واکنش‌های مقاومت، بهبودی، به تعویق افتادن آلودگی و حساسیت در این گیاهان مشاهده شد. از طرفی تفاوت در واکنش به آلودگی با GFLV در گیاهان تیپ وحشی و *N. benthamiana* تراریخت حامل سازه تکرار معکوس، احتمال وقوع خاموشی اختصاصی GFLV را در گیاهان تراریخت افزایش و عملکرد سازه

شکل ۱۲: واکنش گیاهان *N. benthamiana* تراریخت شده با سازه سنجاق سری

۱A+۱B به مایه‌زنی مکانیکی با GFLV

الف- نمونه‌ای از گیاه مقاوم تراریخت با سازه ۱A+۱B. ب- گیاه تراریخت با سازه ۱A+۱B که در بروز علایم بیماری ویروسی تأخیر داشت. ج- گیاه تراریخت با سازه ۱A+۱B که به GFLV حساس بود.

بحث

در پژوهش حاضر به دلیل این که طول توالی کامل دو ژن ۱A و ۱B زیاد و ۳۶۵۱ جفت باز بود، تلاش برای ساخت سازه سنجاق سری حامل توالی کامل این دو ژن بی‌نتیجه بود و از آن جا که تعیین دقیق موتیف‌های مسئول مهارکنندگی خاموشی در توالی نوکلئوتیدی دو ژن نام‌برده نیاز به آزمایشات بیشتر داشت، جهت ساخت سازه القاء‌کننده از نواحی حفاظت‌شده نوکلئوتیدی در این ژن‌ها که دارای شباهت نوکلئوتیدی بیش‌تر از ۹۰ درصد بودند استفاده شد تا سازه موردنظر با شناسایی و هدف قرار دادن این توالی‌ها در ژنوم GFLV بتواند در برابر جدایه‌های دیگر این ویروس (۹ جدایه ثبت شده در NCBI) نیز مقاومت ایجاد کند. در نتیجه در این پژوهش برای این که حداقل ۹۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی در توالی انتخاب‌شده وجود داشته باشد، توالی‌های حفاظت‌شده‌ای به طول حدود ۱۲۰-۱۳۰ نوکلئوتید از ژن‌های مورد مطالعه در GFLV برای ساخت سازه سنجاق سری استفاده شد و براساس نتایج به‌دست آمده سازه سنجاق سری که حامل توالی‌های نوکلئوتیدی دو ژن ۱A و ۱B بود، جهت القاء خاموشی ژن‌های هدف و ایجاد مقاومت در گیاهان توتون مورد آزمایش عملکرد خوبی داشت که



ویروس GFLV با توالی مشابه را دارند و به عبارتی توالی ژن پروتئین حرکتی ویروس به عنوان یک توالی هدف اولیه خواهد بود که siRNAها قادر به شناسایی آن هستند. در این آزمایش در تعدادی از گیاهان تراریخت اگرچه هیچ گونه آلودگی تا روز هفتم پس از مایه زنی مشاهده نشد، اما دو هفته پس از مایه زنی، آلودگی به طور واضحی در این گیاهان مشاهده شد. به عبارت دیگر سازه حاوی ژن پروتئین حرکتی نتوانست مقاومت کاملی در این گیاهان ایجاد کند و در تعداد زیادی از گیاهان تراریخت منجر به بروز واکنش تأخیر در آلودگی شد (Jardak-Jamoussi و همکاران، ۲۰۰۹).

حساسیت و تأخیر در آلودگی علاوه بر آزمایشات Jardak و همکاران (۱۹۹۴)، هم چنین در *N. benthamiana* تراریخت بیان کننده ژن پروتئین پوششی GFLV پس از مایه زنی با این ویروس مشاهده شد (Bardonnnet و همکاران، ۱۹۹۴). در این پژوهش به دست آمدن گیاهان تراریختی که علائم را با تأخیر نشان می دادند ضمن تأیید و مطابقت با نتایج مطالعات قبل می تواند مربوط به میزان تولید siRNA در این گیاهان باشد. در نتیجه جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در این زمینه تعیین سطح siRNA در گیاهان تراریخت به دست آمده ضروری می باشد. احتمالاً گیاهانی که علائم را با تأخیر نشان می دهند دارای سطوح پایین تر siRNA نسبت به گیاهان مقاوم تراریخت شده با سازه های ساخته شده در این تحقیق می باشند. با توجه به این که کارایی بالای تکنیک القاء خاموشی ژن توسط سازه حاوی توالی تکرار معکوس (سازه سنجاقت سری) در منابع تأیید شده است، در تحقیق حاضر نیز از استراتژی سازه حاوی توالی تکرار معکوس بهره گرفته شد که در آن توالی های سنس و آنتی سنس قطعات مورد مطالعه از ژنوم GFLV مکمل یکدیگر بوده و در عین حال توسط یک اینترون از هم جدا شدند. پس از ورود این سازه به گیاه از طریق آگروباکتريوم و نسخه برداری از آن، این ساختار به صورت یک سازه سنجاقت سری بیان شده و از آن جا که توالی های مکمل نوکلئوتیدی موجود در ساقه تشکیل یک RNA دورشته ای را می دهند، این سازه می تواند به عنوان القاء کننده مکانیسم دفاعی خاموشی ژن در گیاه عمل کند.

گرچه خاموشی ژن در درختان چوبی کم تر مطالعه شده است، اما تلاش برای ایجاد درختچه های مو مقاوم به ویروس همواره مورد توجه بوده است. به طور مثال سازه تکرار معکوس حاوی ژن پروتئین حرکتی در مطالعات Jardak-Jamoussi و همکاران (۲۰۰۹) از طریق *A. tumefaciens* به سلول های جنینی مو (*Vitis vinifera*) منتقل شد و آزمون لکه گذاری نورترن، نسخه های تکرار معکوس را در لاین های مستقل مو

تکرار معکوس را نشان داد که یک استراتژی مؤثر برای ایجاد گیاهان مقاوم به GFLV می باشد. در این آزمایش در گیاهان تراریختی که مقاومت را نشان دادند، نتایج آزمون الیزا در روز هفتم و روز چهاردهم پس از مایه زنی منفی بود (Jardak-Jamoussi و همکاران، ۲۰۰۹). در پژوهش حاضر گیاهان تراریخت شده با سازه ۱A+۱B در برابر مایه زنی مکانیکی با GFLV به سه دسته حساس، مقاوم و دارای تأخیر در بروز علائم تقسیم شدند. با مایه زنی مکانیکی ویروس به گیاه آلودگی شروع می شود و ویروس در سلول های اولیه همانند سازی کرده و سپس به سلول های مجاور حرکت می کند و سلول به سلول گسترش می یابد تا به سیستم آوندی برسد. سپس حرکت سریع ویروس شروع می شود. در مقابل سیستم خاموشی در گیاه شروع به فعالیت کرده و سیگنال خاموشی متحرک را تولید می کند. بنابراین گیاه و ویروس با هم وارد یک مسابقه می شوند. اگر حرکت ویروس به حرکت سیگنال غلبه کند، آلودگی با ویروس ایجاد می شود و ویروس به فواصل دورتر در گیاه حرکت می کند و سیستمیک می شود. اگر سیگنال خاموشی به حرکت ویروس غلبه کند، ویروس در فواصل سلولی هدف خاموشی قرار می گیرد و آلودگی سیستمیک نمی شود. در مجموع به دست آمدن نتایج متفاوت در رابطه با گیاهان تراریخت جهت ایجاد مقاومت، نشان دهنده پیچیده بودن واکنش بین گیاه و ویروس می باشد (Jacqumond، ۲۰۰۱).

در پژوهش حاضر نیز مشابه آزمایش های Jardak و همکاران (۲۰۰۹) تفاوت در واکنش گیاهان تیپ وحشی *N. benthamiana* و نیز گیاهان تراریخت شده و مقاوم به مایه زنی با GFLV، بیان گر وقوع خاموشی ژن در این گیاهان تراریخت بوده و کارایی سازه های ساخته شده را نشان می دهد. در آزمایشات Jardak سنجاقت هیبریداسیون لکه گذاری نورترن که در آن یک توالی با منشأ ویروسی (پروتئین حرکتی، MP) به عنوان کاوش گر استفاده شد، غیاب siRNA پس از مایه زنی را در گیاهان تیپ وحشی غیر تراریخت به همراه سطح بالایی از RNA ویروس GFLV نشان داد. این در حالی بود که در توتون های تراریخت مقاوم که حامل کاست تکرار معکوس ژن GFLV-MP بودند، siRNAهای اختصاصی ژن انتقال یافته به گیاه تراریخت *N. benthamiana* پس از مایه زنی با GFLV ردیابی شدند. ردیابی siRNAهای اختصاصی ژن پروتئین حرکتی GFLV در برگ های نوظهور (سیستمیک) گیاهان تراریخت مقاوم، این فرضیه را تأیید می کند که تراژن MP با ایجاد RNA دورشته ای در مکانیسم PTGS درگیر می شود که RNA دورشته ای به نوبه خود siRNAها را تولید می کند. این siRNAها پس از ملحق شدن به RISC، مسئولیت تخریب RNA



نسخه‌های خاموش کننده در لاین‌های مختلف با روش‌های مولکولی مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین ارزیابی سطح مقاومت در نسل‌های بعدی لاین‌های تراریخت به دست آمده در تکمیل نتایج ضروری به نظر می‌رسد و مایه‌زنی لاین‌های تراریخت به دست آمده با جدایه‌های دیگری از GFLV و نیز ویروس‌های دیگر از جنس *Nepovirus* و ویروس‌هایی که دارای رابطه سرولوژیک با ویروس برگ بادبزی می‌باشند و در عین حال بررسی کارایی سازه القاء کننده می‌تواند به نتیجه‌گیری‌های کلی‌تر در این پژوهش کمک کند.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱. پاکباز، س.؛ پژوهنده، م.؛ عینی‌گندمانی، ا. و سخندان، ن.؛ ۱۳۹۷. القاء مقاومت به ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) به روش RNA Silencing. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. دوره ۳۱، شماره ۲، صفحات ۲۶۸ تا ۲۷۸.
۲. Bardonnet, N.; Hans, F.; Serghini, L. and Pinck, L., 1994. Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of *Grapevine fanleaf virus*. Plant Cell Reports. Vol. 13, pp: 357-360.
۳. Baulcombe, D.C., 1996. Mechanisms of pathogen derived resistance to viruses in transgenic plants. Plant cell. Vol. 8, pp: 1833-1844.
۴. Dasgupta, V.; Malathi, G. and Mukherjee, S.K., 2003. Genetic engineering for virus resistance. Current Science. Vol. 84, pp: 3-10.
۵. Dawson, W. and Hilf, M.E., 1992. Host-range determinants of plant viruses. Annu Rev plant physiol plant Mol Biol. Vol. 43, pp: 527-555.
۶. Fuchs, M. and Gonsalves, D., 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. Annual Review of Phytopathology. Vol. 45, pp: 173-202.
۷. 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. Vol. 19, No. 1, pp: 17-27.

تراریخت که خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری را نشان می‌دادند، ردیابی کرد. در مطالعه‌های دیگر، خاموشی ژن در درختچه‌های مو تراریخت شده با ژن پروتئین پوششی GFLV مشاهده شد و با این که احتمال خاموشی ژن در سطح نسخه‌برداری نمی‌توانست به طور کامل رد شود، خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری در پنج لاین از هشت لاین تراریخت القاء شد و میزان بیان ژن پروتئین پوششی GFLV در هشت لاین تراریخت مو توسط آزمون لکه‌گذاری نورترن ارزیابی گردید. همه این هشت لاین تراریخت پس از مایه‌زنی با GFLV جهت سنجش مقاومت در برابر این ویروس در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند، حتی زمانی که علائم GFLV را در گلخانه نشان نمی‌دادند. رشد و نگهداری موه‌های تراریخت در شرایط گلخانه (نه در مزرعه) می‌تواند دلیل عدم ظهور علائم در این گیاهان در حداقل دو سال اول پس از مایه‌زنی باشد. تشدید علائم بیماری در این گیاهان ممکن است به شرایط محیط و شرایط فیزیولوژیکی گیاه مربوط باشد (Gambino, ۲۰۰۹). در مطالعه‌های دیگر عملکرد سازه حامل ژن کامل پلیمرز ۱E^{Pol} در آزمون‌های بیان موقت نشان داد که این ژن کارایی لازم را جهت مهار خاموشی ژن ندارد و زمانی هم که از بخشی از توالی نوکلئوتیدی این ژن جهت ساخت سازه سنجاق سری استفاده شد، مقاومت کاملی را القاء نکرد و نسبت گیاهان تراریخت شده حساس به GFLV و گیاهانی که علائم را با تأخیر نشان می‌دادند بالاتر از گیاهان تراریخت و مقاوم به دست آمده در این آزمایش بود (پاکباز و همکاران، ۱۳۹۷).

در مجموع نتایج به دست آمده در این تحقیق، ضمن ایجاد گیاهان توتون تراریخت مقاوم به GFLV، نشان داد که سازه سنجاق سری ساخته شده بر اساس بخشی از توالی دو ژن ۱A و ۱B، توانایی و کارایی خوبی در ایجاد مقاومت به این ویروس دارد و می‌توان از آن برای القاء مقاومت در ارقام مختلف گیاه مو جهت کنترل این ویروس مهم و اقتصادی استفاده کرد. با توجه به کارایی بالای سازه‌های تکرار معکوس حاوی اینترون در ایجاد مقاومت و نتایج به دست آمده در این تحقیق، بررسی بیش‌تر توالی نوکلئوتیدی ژنوم ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) در ناحیه دو ژن ۱A و ۱B جهت یافتن موتیف مسئول مهارکنندگی خاموشی ژن (VSR) در این ویروس ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان سازه القاء کننده سنجاق سری یا Artificial miRNA با استفاده از این موتیف‌ها ساخته و به گیاه منتقل نمود و میزان مقاومت را در گیاهان تراریخت حاصل بررسی کرد.

پیشنهاد می‌شود برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر، میزان siRNA در لاین‌های تراریخت به دست آمده تعیین شود و حضور



- Ghorbel, A.; Brendel, G.; Ipach, U. and Krczal, G., 2006. Resistance against nepoviruses: molecular and biological characterization of transgenic tobacco and grapevine plants. Extended abstracts of the 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006, pp: 59-60.
۲۳. Rovere, C.V. and Del vas, M.H.E., 2002. RNA mediated virus resistance. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 13, pp: 167-172.
۲۴. Smith, N.A.; Singh, S.P.; Wang, M.B.; Stoutjesdijk, P.A.; Green, A.G. and Waterhouse, P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature. Vol. 407, pp: 319-320.
۲۵. 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. Molecular Genetics and Genomics. Vol. 220, pp: 245-250.
۲۶. Vazquez, R.C.; Del Vas, M. and Hopp, H.E., 2002. RNA- mediated virus resistance. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 13, pp: 167-172.
۸. Gottula, J.; Berthold, F.; Labarile, R.; Gutting, H.; Demangeat, G.; Cantilina, K. K.; Vigne, E.; Marmonier, A.; Lemaire, O.; Ritzenthaler, C.; Schmitt-Keichinger, C. and Fuchs, M., 2014. *Grapevine fanleaf virus* and a virus-induced gene silencing and protein expression vector for *Vitis* spp. Dissertation of Doctor of Philosophy. 282 p.
۹. 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. Molecular Breeding. Vol. 8, pp: 85-94.
۱۰. Jardak-Jamoussi, R.; Winterhagen, P.; Bouamama, B.; Dubois, C.; Mliki, A.; Wetzel, 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. Vol. 97, pp:187-196.
۱۱. 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. Molecular Plant-Microbe interaction. Vol. 4, pp: 247-۲۵۳.
۱۲. Kerschen, A.; Napoli, C.A.; Jorgensen, R.A. and Muller, A.E., 2004. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. Federation of European Biochemical Societies Letters. Vol. 566, pp: 223-228.
۱۳. Kim, K.; Eamens, A. and Waterhouse, P., 2011. RNA Processing Activities of the Arabidopsis Argonaute Protein Family. RNA Processing. Vol. 8, pp: 137-156.
۱۴. Koteer, J.M.; Matzke, M.A. and Meyer, P., 1999. Listening to the silent genes: transgenic silencing, gene regulation and pathogen control. Trend Plant Science. Vol. 4, pp: 340-347.
۱۵. Lai-Kee-Him, J.; Schellenberger, P.; Dumas, C.; Richard, E.; Trapani, S.; Komar, V.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. and Bron, P., 2013. The backbone model of the *Arabidopsis mosaic virus* reveals new insights into functional domains of nepovirus capsid. Journal of Structural Biology. Vol. 182, pp:19-29.
۱۶. 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. Vol. 18, pp: 313-325.
۱۷. Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G., 1992. Untranslatable transcripts of *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplast. Virology. Vol. 189, pp: 725-733.
۱۸. Martelli, G.P., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology. Vol. 96, No. S1, pp: 1-4.
۱۹. Murashige, S. and Skoog, M., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. Vol. 15, pp: 473-497.
۲۰. Naraghi-Arani, P.; Duabert, S. and Rowhani, A., 2001. Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. Journal of General Virology. Vol. 82, pp: 1791-1795.
۲۱. Palukaitis, P. and Carr, J.P., 2008. Plant resistance responses to viruses. Journal of Plant Pathology. Vol. 90, pp: 153-171.
۲۲. Reustle, G.; Winterhagen, P.; Jardak-Jamoussi, R.; Cobanov, P.; Dubois, C.; Manthey, T.; Wetzel, T.;

