

## تولید گیاه توتون مقاوم به ویروس PVX با استفاده از مکانیسم RNA Silencing

محسن سجادی فرد<sup>۱</sup>، مقصود پژوهنده<sup>۲\*</sup>، اکبر شیرزاد<sup>۳</sup> و هانیه محجل شجاع<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

۳- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

۴- استادیار گروه زیست شناسی گیاهی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز.

\*مسئول مکاتبه pazhouhandeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۰

### چکیده

یکی از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای خانواده سولاناسه ویروس *Potato X virus (PVX)* می‌باشد که سبب ایجاد لکه‌های موزاییک سیستمیک در توتون (*Nicotiana tabacum L.*) و خسارت اقتصادی به آن می‌شود. بهترین روش مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم توتون است. در این تحقیق جهت ایجاد گیاهان توتون مقاوم به PVX ابتدا سازه سنجاق‌سری قطعه‌ای ۴۰۰ نوکلوتیدی از ژن P25 این ویروس که ممانعت‌کننده از RNA Silencing در گیاه است، ساخته شد. برای این کار قطعه ژن P25 به روش PCR با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و در دو مرحله، در دو جهت سنس و آنتی‌سنس در ناقل pFGC5941 همسانه‌سازی شد. در مرحله بعد، سازه RNAi از روی این ناقل نوترکیب به واسطه آگروباکتریوم، به ریزنمونه‌های (قطع‌ات برگ) گیاهان توتون رقم سامسون انتقال یافت و گیاهان تراریخته با گزینش روی محیط کشت حاوی بستا بدست آمده که پس از تکثیر مورد بررسی‌های فنوتیپی و مولکولی قرار گرفتند. بررسی مولکولی با PCR روی DNA گیاهان، وجود تراژن را تایید کرد. نسل بعدی گیاهان تراریخته در گلخانه به روش مکانیکی با PVX تلقیح شدند. نتایج ELISA با آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX مقاومت سه لاین تراریخته را نشان داد. تایید مولکولی این سه لاین مقاوم توتون به PVX با استفاده از RT-PCR روی RNA استخراج شده از گیاهان به کمک آغازگرهای CP ویروس انجام شد و ویروس در گیاهان تراریخت ردیابی نگردید. نتیجه این تحقیق منجر به تولید سه لاین مستقل توتون مقاوم به PVX شد که بررسی مقاومت آنها در شرایط مزرعه در حال انجام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توتون، ویروس PVX، مقاومت، گیاه تراریخته، RNA Silencing.

### مقدمه

و انتشار می‌یابد (کوکرهام ۱۹۵۸ و سالازار ۱۹۹۶). ویروس PVX در ایران از اکثر مناطق کشور روی توتون گزارش شده است (فروتنی و همکاران ۲۰۰۴). توتون یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی به شمار می‌رود که در اقتصاد کشورهای تولیدکننده آن نقش مهمی را ایفا می‌کند. شیوع آفات و بیماری‌های توتون، بویژه بیماری‌های ویروسی علاوه بر کاهش کیفیت محصول، موجب افزایش هزینه

ویروس X سیب زمینی دارای گسترش جهانی و از شایع‌ترین ویروس‌های توتون بوده و از خانواده *Alphaflexiviridae*، جنس *Potexvirus* با ژنوم RNA تک رشته مثبت و یک پیکره رشته‌ای می‌باشد. میزان خسارت ناشی از آن بسته به نژاد ویروس و رقم گیاه از ۱۰ تا بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است (بیمستر و بوکس ۱۹۸۷). این ویروس بصورت مکانیکی انتقال

(سانفورد و جانستون ۱۹۸۵). در ایجاد مقاومت به ویروس‌ها توسط مهندسی ژنتیک یکی از مواردی که باید مورد توجه قرار گیرد، این است که کدام ژن‌های ویروسی بهتر است مورد استفاده قرار گیرند. از جمله منابع ژنی مورد استفاده ژن‌های بیان‌کننده پوشش پروتئینی و ژن‌هایی که سبب اختلال در مکانیسم خاموشی ژن در گیاهان می‌شوند را می‌توان نام برد (دوان و همکاران ۲۰۱۲). بیشتر کارهای مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به ویروس‌های گیاهی که بر اساس پاتوژن طراحی شده بود و کم و بیش باعث ایجاد مقاومت گردیده بود با کشف مکانیسم RNA Silencing از سال ۲۰۰۰ میلادی جهت‌دهی دقیق شد. تمام تلاش‌های انجام یافته تا آن زمان برای ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس، بخاطر متوقف شدن RNA silencing توسط پروتئین‌های ویروسی ممانعت‌کننده از RNA Silencing میزبان، دیر یا زود با شکست مواجه می‌شد و مقاومت قابل قبولی بدست نمی‌آمد. زیرا با حمله ویروس سیستم دفاعی القا شده در گیاه، دیگر قادر به حفظ گیاه از آثار مخرب ویروس نیست. در PVX، P25 یکی از پروتئین‌هایی است که توسط ژنوم ویروس بیان شده و ممانعت‌کننده از خاموشی ژن می‌باشد (چیو و همکاران ۲۰۱۰) و جزو بهترین گزینه‌ها برای ایجاد مقاومت در گیاه تلقی می‌گردد.

ژن‌های مقاومتی همچون Rx در سیب‌زمینی در مقابل ویروس‌ها شناسایی شده اند (کوهم و همکاران ۱۹۹۲ و ورچوت-لوبیز و همکاران ۲۰۰۷). تاکنون چندین مطالعه منجر به گزارش گیاهان مقاوم به ویروس به کمک انتقال ژن‌های ویروسی به میزبان شده است. در تحقیقی نشان داده شده است که بیان پروتئین پوششی PVX در سیب زمینی باعث ایجاد مقاومت به این ویروس می‌گردد (بای و همکاران ۲۰۰۹) و یا بیان ژن رپلیکاز PVX در سیب‌زمینی مقاومت خوبی به PVX نتیجه داد (لانگستاف و

توتون کاری می‌شود. تنها راه‌هایی از خسارت ویروس‌ها استفاده از ارقام مقاوم، بذر عاری از ویروس و کنترل ناقلین در مزرعه است. هدف بیشتر پژوهش‌های جدید در بیماری‌شناسی گیاهی یافتن شیوه‌های کم‌خطر برای کنترل بیماری می‌باشد که به سلامت انسان و محیط زیست آسیب کمتری را وارد می‌کنند. از امید بخش‌ترین این شیوه‌ها می‌توان به تولید گیاهان مقاوم به بیماری توسط اصلاح نباتات سنتی، مهندسی ژنتیک و کاربرد تکنیک خاموشی ژن اشاره کرد.

واژه RNA Silencing به فرایندی اطلاق می‌شود که طی آن یک مولکول RNA دو رشته‌ای از بیان ژنی با توالی مشابه آن جلوگیری می‌کند. مهار بیان ژن از طریق تجزیه mRNA انجام می‌شود و به همین دلیل این فرایند را نوعی مکانیسم خاموشی بعد از رونویسی ژن می‌نامند (پادیسون و همکاران ۲۰۰۲). اجزای کلیدی در این فرایند، دو آنزیم به نام‌های دایسر و آرگونات و مولکول‌های کوچک به نام siRNA است (چن و همکاران ۲۰۰۸). گیاهان به طور طبیعی از این مکانیسم به عنوان روش دفاعی علیه ویروس‌ها استفاده می‌کنند و در بسیاری از ویروس‌ها توانایی مختل کردن این مکانیسم تکامل یافته است. اغلب ویروس‌ها پروتئین‌هایی را بیان می‌کنند که RNA Silencing گیاه را سرکوب می‌کند و در نتیجه باعث بهم خوردن کنترل بیان ژن‌ها در گیاه می‌شود که بصورت ناهنجاری‌های فنوتیپی به عنوان علائم ویروسی مثل کوتولگی و کتابی شدن و از این قبیل، معروف شده‌اند (فرایدمن و همکاران ۲۰۰۹ و مویسیارد و وینت ۲۰۰۴ و پژوهنده ۲۰۰۹ و ۲۰۰۶). یکی از راهبردهای موثر برای ایجاد مقاومت به ویروس‌ها در گیاهان استفاده از مقاومت ناشی از پاتوژن (Pathogen-derived resistance) است که بر اساس استفاده از ژن‌ها یا توالی‌هایی با منشأ ویروس و انتقال آنها به گیاه میزبان استوار است

## مواد و روش‌ها

همسانه سازی برای تهیه‌ی ساختار سنجاق سری

## قطعه ژن P25 در ناقل pFGC5941

ناقل pFGC5941 با ۱۱۴۰۷ جفت باز طول حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان انتخابگر در باکتری و ژن مقاومت به علفکش Basta به عنوان انتخابگر در گیاه می‌باشد، این ناقل دارای دو ترادف MCS (Multiple cloning site) بوده که توسط اینترون CHS (Chalcon Synthase) از هم جدا شده‌اند. به طوری که می‌توان با همسانه‌سازی یک قطعه ژن در دو جهت سنس و آنتی‌سنس در بالادست و پایین دست این اینترون، یک سازه RNAi برای ژن مورد نظر طراحی کرد (سامبروک و همکاران ۱۹۸۹ و دیدار و همکاران ۱۳۹۳). با چهار میکروگرم از RNA استخراج شده از یک گیاه سیب زمینی آلوده به PVX با استفاده از کیت SuperscriptIII (Invitrogen) سنتز cDNA انجام و به کمک آغازگرهای اختصاصی P25Fint به عنوان آغازگر رو به جلو (AATCTAGACTCGAGATACCAGGCACTTT و TTGCTGAC) حاوی سایت های برشی NcoI و BamHI و P25R (AAGGATCCCCATGGCTATGTCCCTGCGCGGA) به عنوان آغازگر برگشتی حاوی سایت های برشی XhoI و XbaI با واکنش PCR قطعه ۴۰۰ جفت بازی انتهای P25 تکثیر شد. (XhoI و NcoI محل ورود قطعه سنس بر روی ناقل pFGC5941 می‌باشد) محصول PCR پس از برش با آنزیم‌های NcoI و XhoI و خالص‌سازی روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین، در بین همین جایگاه‌های برشی با انجام واکنش لیگاسیون به ناقل متصل گردید. محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* سویه Top10 منتقل و کلنی‌هایی که بر روی محیط حاوی کانامایسین (ژن مقاومت در ناقل) رشد کرده بودند با PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی ناقل بررسی و انتخاب شدند. در این مرحله، قطعه تکثیر شده در جهت سنس، در بالا دست

همکاران ۱۹۹۳). همچنین در تحقیقی مشابه پروتئین P25 این ویروس در توتون بیان شد و گیاه حاصله مقاومت خوبی نسبت به PVX، TMV و سایر توپاموویروس‌ها نشان داد (آرس و همکاران ۱۹۹۸).

برای خاموش کردن یک ژن در گیاه می‌توان از دو ابزار استفاده کرد که یکی قرار دادن بخشی از آن بصورت تکرار معکوس در سازه سنجاق سری است و دیگری هدف قرار دادن آن با یک microRNA مصنوعی و استفاده از سازه‌های آماده تولید کننده microRNA است. به عنوان مثال گزارش شده که با استفاده از miR159a، miR171a و miR167b از گیاه *Arabidopsis thaliana* و طراحی دو نوع miRNA توانستند توالی‌های P25 مربوط به PVX و HCPro مربوط به PVY را در گیاهان توتون تراریخت آلوده به این دو ویروس مورد هدف قرار دهند و بدین ترتیب مقاومت بسیار بالایی در برابر این دو ویروس در گیاهان هدف گزارش کردند (ای و همکاران ۲۰۱۱). در تحقیقی دیگر با استفاده از قطعاتی از ویروس تریستزای مرکبات در گیاه توتون مقاومت به این ویروس بر مبنای RNA Silencing ایجاد شد (روی و همکاران ۲۰۰۶). به کمک همین فرایند گیاه مقاوم سیب زمینی شیرین در مقابل ویروس‌های Sweet Potato feathery mottle virus، Sweet Potato mild و chlorotic stunt virus، mottle virus ایجاد شده است (سیوپرساد و گوبا ۲۰۱۴).

در تحقیق حاضر، امکان تولید لاین‌های توتون مقاوم به PVX بر مبنای RNA Silencing و به کمک سازه سنجاق سری مورد بررسی قرار گرفته است تا در این گیاه siRNAهای P25 به طور دائم تولید شود و به محض حمله ویروس آن را مورد هجوم و تجزیه قرار دهد. هدف نهایی این تحقیق تولید لاینی از توتون می‌باشد که مقاومت خوبی به PVX نشان دهد.

بدست آمده، پس از تایید به روش PCR، برای انتقال ساختار سنجا ق سری به گیاهان توتون به روش کشت بافت استفاده شدند.

همزمان با پیش‌کشت ریزنمونه‌های گیاهی، کشت آگروباکتریوم حاوی ناقل pFGC5941-P25 در دمای ۲۸°C تهیه شد تا برای تلقیح ریزنمونه‌ها آماده گردند. برای تلقیح ریزنمونه‌ها، از سوسپانسیون آگروباکتریوم با OD<sub>600</sub> = 0.8 استفاده گردید و به مدت دو روز کشت توأم شدند. بعد از دو روز کشت توأم آگروباکتریوم و گیاه، سوسپانسیون آگروباکتریوم توسط محلول شستشوی آگروباکتریوم حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۳۵۰ mg/l) از محیط حذف گردید. سپس این جدا کشت‌ها به محیط کالوس‌زایی که شامل محیط MS معمولی (موراشیگ و اسکوک ۱۹۶۲) بود، منتقل شدند. پس از ۱۸ تا ۲۴ روز تشکیل کالوس مشاهده شد، کالوس‌های تشکیل شده جهت تشکیل ریشه و شاخه به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، BAP با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و GA3 با غلظت ۰/۰۲۰ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شد. جهت گزینش گیاهان تراریخته، گیاهان بدست آمده در محیط انتخابی MS حاوی Basta (۱۰ mg/l) کشت شدند. گیاهان تراریخته به گلخانه منتقل و بذرگیری از آنها انجام شد. بذور نسل اول کشت گردید (از آنجائیکه گیاهان نسل اول تراریخت تنها یک کپی از T-DNA را در ژنوم خود دارند بایستی به نسل دوم بروند تا هموزیگوت شوند)، بنابراین گیاهان تراریخت به نسل دوم برده شده، بذر آنها جمع آوری و مورد گزینش با علفکش Basta قرار گرفتند.

#### استخراج DNA از گیاهان

مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های گیاه درون هاون چینی همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB به خوبی ساییده شد. طبق روش دوپله و دوپله (۱۹۸۷)، در ادامه همه محتویات هاون به لوله استریل ۱/۵

اینترون CHS و پایین دست پرموتور CaMV-35S قرار گرفت. در مرحله دوم، پس از تایید همسانه سازی این قطعه در جهت سنس، قطعه ۴۰۰ جفت بازی تکثیر و با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* در جایگاه MCS دوم ناقل محصول همسانه‌سازی اول متصل شد. با این عمل، قطعه مذکور در جهت آنتی-سنس (خلاف جهت قطعه وارد شده در مرحله اول و در پایین دست اینترون CHS) وارد گردید. همسانه سازی مرحله دوم نیز به روش PCR و با استفاده از آغازگرهای متصل شونده به قطعه ژن و همچنین به ناقل در نواحی بالا دست و پایین دست محل همسانه سازی ژن تایید گردید. با استفاده از pFGC5941 Fext (AATCCCACTACCTTCGCAAGACC) به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rint (CTTTCTACCTTCCCACAATTCCG) به عنوان آغازگر برگشتی برای همسانه سازی اول در جهت سنس و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pFGC5941 Fint (CAGACAGATGTTTCCCAGCGAA) به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rext (AAACCGGCGGTAAGGATCTGAG) به عنوان آغازگر برگشتی تایید همسانه سازی دوم در جهت آنتی‌سنس انجام شد. برای تایید بیشتر ناقل‌های نو ترکیب حاصل، ناقل‌های نهایی برای توالی‌یابی به انستیتو CNRS-IBMP فرانسه ارسال شدند که مرتب چینی توالی نوکلئوتیدهای ثبت شده ژن P25 در NCBI، با توالی همسانه سازی شده در ناقل در جهت سنس و آنتی‌سنس تایید گردید.

#### تراریزش گیاه توتون به روش آگروباکتریوم

ناقل pFGC5941 نو ترکیب حاصل که حاوی ساختار سنجا ق سری قطعه ۴۰۰ جفت بازی ژن P25 می‌باشد، به روش شوک الکتریکی (دو کیلوولت به مدت پنج هزارم ثانیه) به *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 منتقل شد. کلنی‌های

### سنتز cDNA

سنتز cDNA با کیت (Superscript III) ساخت شرکت اینویتروژن به کمک چهار میکروگرم RNA انجام گردید، برای بررسی میزان بیان ژن از روی cDNA واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد، برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده و درستی سنتز cDNA ابتدا یک واکنش PCR با آغازگرهای یک ژن خانه دار (house-keeping) بنام Actin مربوط به توتون انجام شد و نتیجه واکنش بر روی ژل آگارز بررسی گردید.

### واکنش PCR

واکنش های PCR به کمک آنزیم *Mag® Taq* DNA Pol در دستگاه Biometra (آمریکا) و با چرخه های دمایی C ۹۲° به مدت ۲۰ ثانیه، C ۵۸° به مدت ۲۰ ثانیه و C ۷۲° به مدت ۳۵ ثانیه در ۳۰ چرخه انجام شدند.

### مایه زنی مکانیکی ویروس

برای تلقیح ویروس از عصاره‌ی استخراج شده از گیاهان آلوده به ویروس در بافر PBS-T و از روش مکانیکی و مالش روی برگهای میانی گیاه به کمک پودر کاربوراندوم استفاده شد.

### بررسی مقاومت گیاهان توتون تراریخته به

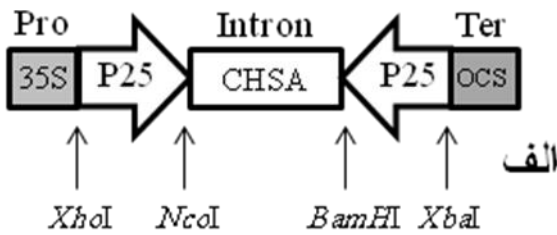
#### ویروس PVX با ELISA:

پس از اطمینان از تراریخت بودن گیاهان نسل دوم با انتخاب توسط علفکش بستا و بررسی مولکولی وجود تراژن، عصاره‌ی ویروس PVX تکثیر شده در آزمایشگاه به صورت مکانیکی به این گیاهان تراریخته (هفت لاین، ده گیاه از هر لاین به عنوان تکرار) و همچنین گیاهان غیرتراریخته توتون به عنوان شاهد تلقیح شد. تلقیح به روش مکانیکی روی برگهای سوم و چهارم گیاهان انجام شد. بعد از گذشت دو هفته، از برگهای بالایی جدید برای آزمون ELISA و همچنین استخراج RNA عصاره‌گیری انجام شد. جهت تعیین

میلی لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای C ۶۵° قرار گرفت (هر پنج دقیقه به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شد). سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه اضافه و به مدت پنج دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰rpm انجام و فاز رویی به لوله جدید منتقل شد. در انتها DNA به روش اتانول رسوب داده شد و بعد از خشک شدن ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب استریل اضافه و در C ۲۰°- نگهداری گردید. جهت تایید حضور ترانس ژن مورد نظر در گیاهان تراریخته توتون واکنش PCR انجام گرفت.

### استخراج RNA کل

مقدار ۲۰۰ میلی گرم از برگهای گیاهان تراریخت درون هاون و در حضور ازت مایع ساییده شدند. در ادامه به ازاء هر ۲۰۰ میلی گرم از بافت، ۷۰۰ میکرولیتر از ترایزول (Trizol، میکروژن) اضافه و مخلوط گردید تا محلول یکنواختی ایجاد شود. مطابق روش کومزینکس و ساچی (۱۹۸۷) محتویات هاون به تیوبهای استریل ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده و بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. سپس به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه گردید و پس از ورتکس کردن، سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای C ۴° صورت گرفت. مایع رویی به لوله جدید منتقل و به میزان دو حجم ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. تیوبها به مدت یک شب در C ۲۰°- نگهداری شدند و روز بعد سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای C ۴° با سرعت ۱۴۰۰۰rpm انجام گردید. در ادامه رسوبدهی به روش اتانول انجام شد و بعد از خشک شدن، به میزان ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase به آنها اضافه گردید. به منظور حذف مولکولهای DNA از RNA استخراج شده، واکنش DNase توسط کیت کیاژن روی آن انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از گیاهان توتون تراریخته، با دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتر بررسی شد.



مقاومت گیاهان تراریخت در مرحله نخست از روش DAS-ELISA روی پلیت های ۹۶ چاهکی با آنتی بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX تهیه شده از CIP (پرو) استفاده شد.

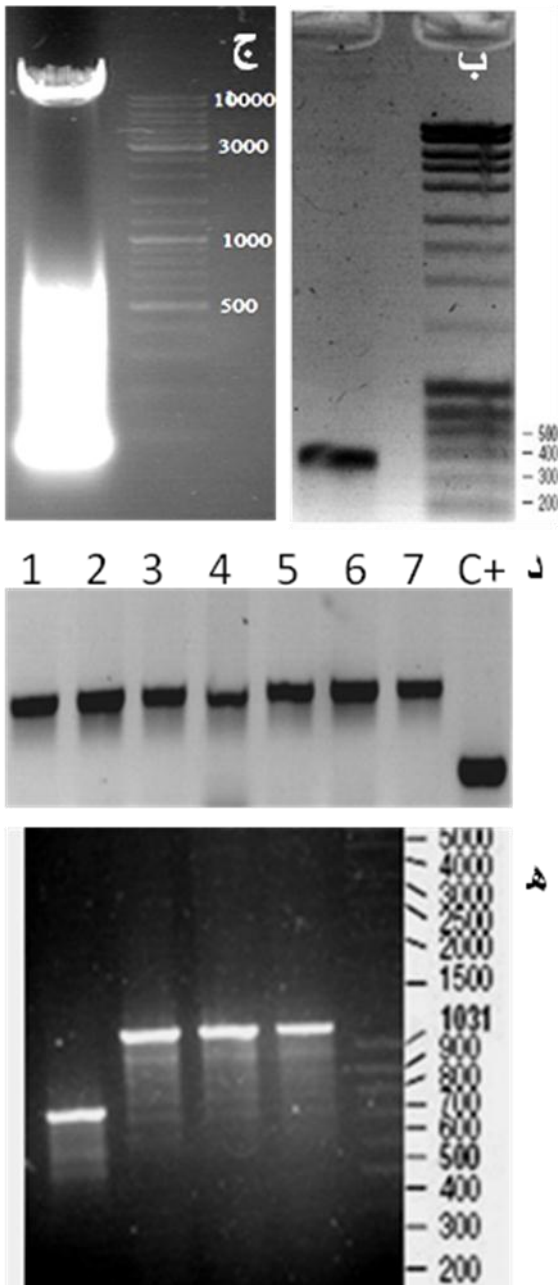
### نتایج

همسازیه سازی برای تهیهی ساختار سنجاغ سری

#### قطعه ژن P25 در ناقل pFGC5941

در قدم اول برای ایجاد مقاومت به PVX در توتون، هدف خاموش کردن ژن P25 از ژنوم PVX می باشد. بدین منظور سازه سنجاغ سری تکرار معکوس قطعه انتهایی ژن P25 در ناقل pFGC5941 مطابق شکل (الف-۱) طراحی و ساخته شد تا به توتون منتقل گردد. پس از بدست آوردن ویروس از روی نمونه های آلوده و استخراج RNA و ساخت cDNA واکنش PCR برای تکثیر قطعه ژن انجام شد (شکل ۱-ب). پس از تایید محصول ۴۰۰ جفت بازی PCR برش آنزیمی همزمان روی ناقل خالی نیز صورت گرفت (شکل ۱-ج). از برش آنزیمی ناقل خالی بخاطر نزدیک بودن دو مکان برشی با حذف تقریباً ۸۰ bp ناقل به شکل خطی درآمد. بعد از اتصال به ناقل و انتقال به باکتری، روی کلنی های حاصل واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل در جهت سنس انجام شد (شکل ۱-د).

محصول PCR در ناقل نو ترکیب جدید بایستی معادل ۶۲۰ bp (۸۰-۳۰۰+۴۰۰) باشد که در شکل ۱) ه) مشخص می باشد. اندازه قطعه ژن P25 وارد شده ۴۰۰ bp و فاصله آغازگرها روی ناقل خالی ۳۰۰ bp و در برش آنزیمی قطعه افتاده از ناقل ۸۰ bp می باشد. کلیه کلنی هایی که روی محیط انتخابی رشد کرده بودند، باند درستی را نشان دادند که در شکل (۱-د)



شکل ۱- همسازیه سازی P25 در ناقل pFGC5941 (الف) نقشه خلاصه شده ناقل و استراتژی همسازیه سازی قطعه ای از ژن P25 در جهت سنس و آنتی سنس. از چپ به راست داخل T-DNA، پروموتور CaMV-35S، محل ورود ژن در جهت سنس، اینترون ژن Chalcone Synthase A محل ورود ژن در جهت آنتی-

گزینش شده چنین نتیجه‌ای را نشان دادند. از این سه کلنی، استخراج پلاسمید صورت گرفت و برای تأیید آن‌ها واکنش PCR دوباره انجام یافت. توالی‌یابی این سه ناقل نهائی نشان داد که توالی یکی از این ناقلها برای هر چهار آغازگر اختصاصی ناقل با توالی P25 ثبت شده در NCBI به شماره GQ863228 مطابقت کامل دارد و از آن برای ادامه کار استفاده گردید.

### تراریزش گیاه توتون به کمک آگروباکتریوم و گزینش گیاهان تراریخته

به منظور انتقال سازه RNAi تولید شده به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)، از روش انتقال ژن با آگروباکتریوم استفاده شد. گیاهان تراریخته نسل T1 گزینش شده و بعد از انتقال به گلدان تحت شرایط گلخانه نگهداری گردیدند تا بذریکری از آنها انجام شود (شکل ۲).

مجدداً گیاهان شاهد و تراریخته نسل T2 با علفکش بستا اسپری و انتخاب شدند که پس از گذشت یک هفته مشاهده شد که گیاهان شاهد زرد شده و قدرت فتوسنتز خود را از دست داده‌اند ولی گیاهان تراریخته قادر به ادامه رشد می‌باشند (شکل ۲E).

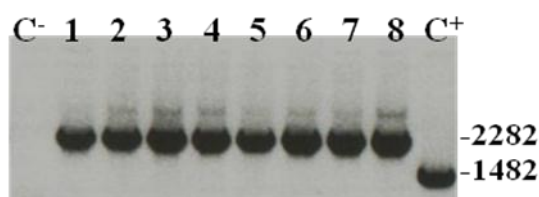
### بررسی مولکولی گیاهان توتون تراریخته نسل دوم:

جهت گزینش گیاهان تراریخته و تایید حضور ترانسژن در آنها، DNA ژنومی از بافت برگ گیاهان نسل دوم استخراج و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل انجام گرفت و وجود تراژن در گیاهان تراریخته تایید گردید (شکل ۳).

سنس، ترمیناتور ژن *Octopine Synthase* قرار دارد. محل مکان برشی آنزیم‌ها در شکل مشخص شده است (ب) الکتروفورز محصول PCR حاوی قطعه ژن تکثیر شده P25 روی cdNA ویروس PVX با استفاده از آغازگرهای اختصاصی P25Fint و P25R روی ژل آگارز (باند ۴۰۰ جفت بازی) (ج) الکتروفورز ناقل خالی pFGC5941 با اندازه ۱۱۴۰۷ جفت باز پس از برش آنزیمی با *XhoI* و *NcoI* روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. (د) الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل (Fext) و (Rint) روی ناقل‌های استخراج شده از باکتری حاوی ناقل نو ترکیب محصول همسانه‌سازی اول قطعه ژن P25 در جهت سنس. ۷-۱ قطعه ۶۲۰ جفت بازی نشان می‌دهد. در ستون آخر قطعه تقریباً ۳۰۰ جفت بازی نتیجه PCR روی ناقل خالی به عنوان کنترل مثبت (C+) می‌باشد که در آن فاصله این دو آغازگر ۳۰۰ جفت باز است. (ه) الکتروفورز محصول PCR برای تأیید همسانه‌سازی دوم قطعه ژن P25 در جهت آنتی‌سنس روی سه ناقل استخراج شده از کلنی‌های مثبت که حاوی قطعه ای با اندازه ۱۱۷۲ جفت باز هستند و ستون سمت چپ نتیجه آزمون PCR روی ناقل خالی به‌عنوان کنترل.

نتیجه PCR روی هفت کلنی آورده شده است. جهت تأیید نهایی کلنی‌های مثبت، پلاسمیدهای آن‌ها استخراج و از آن‌ها نیز PCR با شرایط فوق انجام گردید. از یکی از آن‌ها برای شروع همسانه‌سازی دوم در جهت آنتی‌سنس استفاده شد. به منظور قرار-گیری قطعه P25 در جهت آنتی‌سنس در ناقل، بار دیگر با واکنش PCR قطعه ۴۰۰ bp تکثیر شد. پس از برش آنزیمی و اتصال در ناقل و انتقال به باکتری، گزینش کلنی‌ها با واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل انجام و از کلنی‌های مثبت حاوی قطعه ژن مورد نظر، باند تقریباً ۱۱۷۲ bp به دست آمد (شکل ۱-ه).

آغازگر Rext از نوکلئوتید ۴۲۹۱ و آغازگر Fint از نوکلئوتید ۳۵۰۵ به ناقل اتصال پیدا می‌کنند، لذا قطعه حاصله روی ناقل خالی باید دارای ۷۸۶bp باشد (شکل ۱-ه سمت چپ)، و در صورت داشتن قطعه P25 در جهت آنتی‌سنس با افتادن ۱۴ bp هنگام برش بایستی قطعه ۱۱۷۲ bp (۷۸۶+۴۰۰-۱۴) بدست آید. سه کلنی



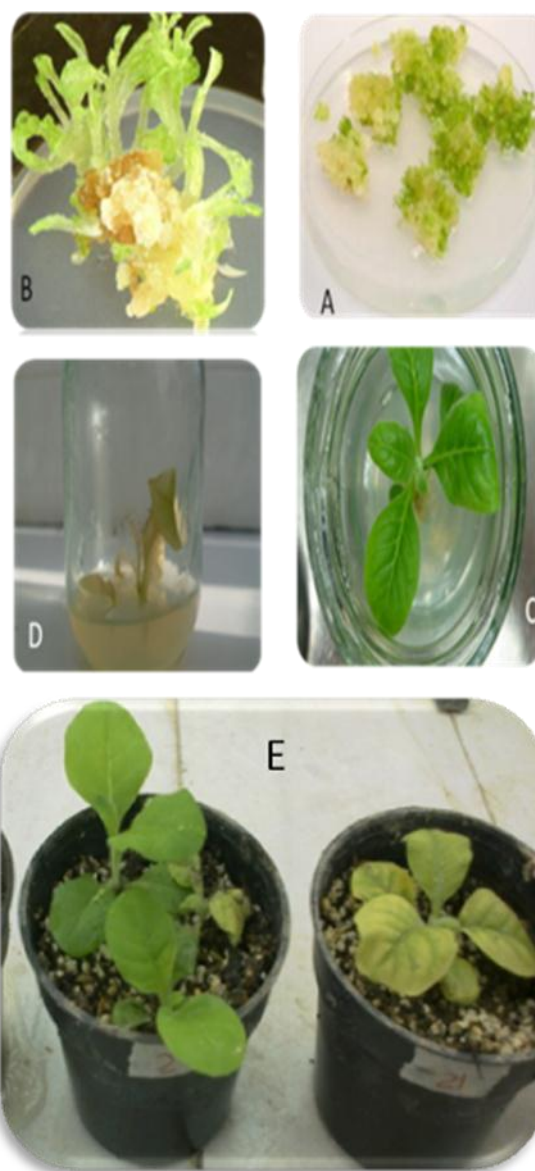
شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای **Fext** و **Rext** اختصاصی ناقل روی DNA هفت گیاه تراریخته توتون، قطعه موجود در ستون‌های ۲ تا ۸ حاوی ۲۲۸۲ جفت باز بوده و با قطعه موجود در ستون ۱ که روی ناقل نوترکیب انجام شده برابر است، کنترل مثبت (C<sup>+</sup>) قطعه ۱۴۸۲ جفت باز روی ناقل خالی است و کنترل منفی (C<sup>-</sup>) روی گیاه غیرتراریخته توتون می باشد.

### بررسی مقاومت گیاهان توتون تراریخته به ویروس PVX با ELISA

بعد از گذشت دو هفته از تلقیح ویروس PVX روی برگهای سوم و چهارم گیاهان تراریخت نسل دوم، از برگهای بالایی جدید عصاره‌گیری برای آزمون ELISA و همچنین استخراج RNA انجام شد. نتایج ELISA با آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX نشان داد که از هفت لاین انتخاب شده تراژن، سه لاین (۱، ۳، ۴) مقاومت به PVX را دریافت کرده اند (شکل ۴-الف). نتایج آزمون ELISA با میانگین تکرارهای (ده تکرار) هر لاین نشان داده شده است.

### تایید مقاومت گیاهان تراریخته توتون به ویروس PVX با RT-PCR

استخراج RNA از چند گیاه مربوط به سه لاین تراریخته مقاوم (با توجه به نتایج ELISA) و همچنین از گیاه غیرتراریخت توتون طبق پروتوکول موجود در بخش مواد و روش‌ها صورت گرفت. سپس سنتز cDNA و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد. از آنجا که اکتین باید در تمام نمونه‌ها به میزان یکسانی بیان گردد، بنابراین محصول واکنش PCR روی cDNA آن هم باید به یک اندازه و یکدست باشند (شکل ۴-ب).



شکل ۲- تراریزش گیاه توتون و گزینش گیاهان تراریخته: (A) تشکیل کالوس (B) تشکیل شاخه و برگ در محیط کشت MS حاوی هورمون (C) ریشه‌زایی و انتخاب بر روی محیط حاوی علف کش بستا (D) حذف گیاهان شاهد در محیط کشت انتخابی حاوی علف کش بستا. (E) انتقال به گلدان جهت بذرگیری و تیمار مجدد با بستا. در اثر علفکش بستا، گیاه شاهد (سمت راست)، قدرت فتوسنتز خود را از دست داده و گیاهان تراریخته (سمت چپ) قادر به رشد بودند.

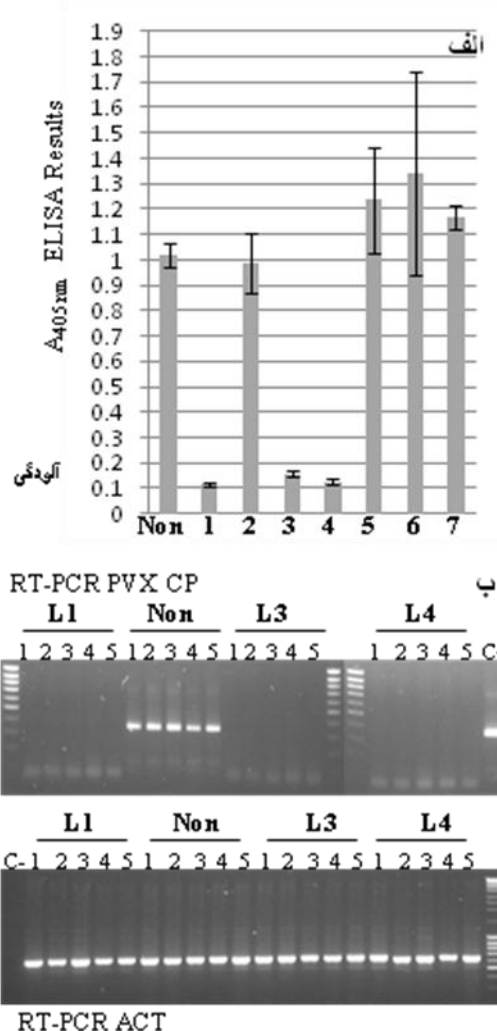


(شکل ۴ ب). محصول PCR ژن CP در کنترل مثبت و گیاهان غیر ترا ریخت دیده شد اما در تکرارهای سه لاین ترا ریخت مشاهده نگردید. بدین وسیله نتیجه ELISA با RT-PCR تایید شد (شکل ۴ ب).

### بحث

در مکانیسم خاموشی ژن، مولکولهای آغازگر این فرایند dsRNAهای چند صد جفت بازی می باشند که توسط آنزیم Dicer به قطعات دو رشته‌ی ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی به نام siRNA شکسته می شوند. سپس تنها رشته آنتی سنس آنها متصل به کمپلکس خاموشی القا شده با RNA (RNA Induced Silencing Complex: RISC) باقی می ماند تا RNA تک رشته‌ای مکمل خود را پیدا کرده و با آن جفت شود (هوت - واگنر و زامور ۲۰۰۲، هوک و میستر ۲۰۰۸، تهسین و همکاران ۲۰۱۰).

از آنجایی که گیاهان با مکانیسم فوق الذکر در برابر ویروس‌ها ایجاد مقاومت می کنند، ولی در طی زمان ویروس‌ها سازوکارهای لازم را جهت مبارزه با این مکانیسم بدست آورده اند. در ویروس X سیب-زمینی پروتئین ژن P25 ممانعت کننده از RNA Slicing است و این کار را با تخریب پروتئین آرگونات از طریق مسیر پروتئازوم انجام می دهد (چیو و همکاران ۲۰۱۰). در تحقیق حاضر، جهت ایجاد گیاه مقاوم در ابتدا قطعه کوچکی از ژن P25 به گونه-ای در ناقل pFGC5941 همسانه سازی شد که بتواند در سلولهای گیاه هدف، یک RNA دو رشته‌ای (dsRNA) تولید کند. سازه سنجاقت سری ایجاد شده در گیاه برای P25، میزبان را به تولید دائمی siRNAهای P25 وادار می کند تا به محض حمله ویروس RNA های آن را از محل P25 مورد حمله قرار دهد. با این روش، دیگر ویروس قادر به خاموش کردن و از کار انداختن سیستم RNA Silencing در میزبان نخواهد بود و توسط همین مکانیسم از بین خواهد رفت. هدف قراردادن پروتئینهای ویروسی



شکل ۴- بررسی مقاومت گیاهان ترا ریخت به PVX: (الف) به روش ELISA به کمک آنتی بادی PVX-CP: هر ستون نشانگر میانگین نتایج ELISA ده گیاه (تکرار) در یک لاین می باشد. Non: گیاه غیر ترا ریخت توتون و ۱-۷ گیاهان هفت لاین ترا ریخت. (ب) به روش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی PVX-CP (نتیجه الکتروفورز در ژل بالا) و با آغازگرهای اختصاصی ژن Actin توتون (نتیجه الکتروفورز در ژل پایین). L: لاین ۱-۵ گیاهان (تکرار) در هر لاین.

نتیجه الکتروفورز نشان داد که سنتز cDNA در همه نمونه‌ها تقریباً بصورت یکسان به خوبی انجام شده است. آنگاه واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی CP-PVX صورت گرفت. نتیجه الکتروفورز محصول PCR نشان داد که گیاهان ترا ریخته سه لاین ترا ریخت مقاوم به PVX هستند

که سنتز cDNA و استخراج RNA در آنها به خوبی انجام نشده است اما انجام PCR برای یک ژن خانه‌دار در این نمونه‌ها و مشاهده محصول مربوطه این احتمال را خنثی می‌کند. سنتز cDNA روی RNA گیاهان آلوده شده با ویروس در این تحقیق دو بار انجام گرفت و نتایج PCR تقریباً برای هر دو cDNA مطابق هم بود. بطور کلی ویروس در گیاهان غیرتراریخت همانندسازی کرده است اما قادر به همانندسازی در گیاهان تراریخته لاین اول، سوم و چهارم نبوده است و مقاومت آنها با این تحقیق به ویروس PVX ثابت می‌شود. تولید گیاهان توتون با چنین روش تراریخت مبتنی بر تکنولوژی RNA Silencing از روشهای جدیدی است که در آن هیچ ژنی یا پروتئینی برای مقاومت بیان نمی‌شود و فقط ابزاری بصورت دائمی در گیاه ایجاد می‌گردد که بتواند ویروس را خنثی نماید. از سوی دیگر بخاطر استفاده از پروموتور 35S CaMV برای بیان و تولید سازه سنجاق‌سری مربوطه، مقاومت بصورت دائمی در گیاه و در تمامی بافتهای آن ایجاد می‌شود. این تحقیق منجر به تولید سه لاین توتون مقاوم به PVX از طریق RNA Silencing گردید.

#### سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه آقای دکتر محمد احمدآبادی و خانم مهندس شهلاسادات فاطری رضوانی در روند این تحقیق و همچنین از انستیتو<sup>۱</sup> IBMP فرانسه بخاطر توالی یابی و تامین برخی مواد تشکر می‌نماییم.

ممانعت‌کننده از RNA Silencing در ایجاد مقاومت در گیاه برعلیه ویروس موثرترین روش ایجاد مقاومت به شمار می‌رود. مهمترین برتری و تفاوت این تحقیق با کارهای مشابه قبلی هدف قراردادن و متوقف کردن بیان پروتئین P25 ویروس PVX در گیاه است. در تحقیقی مشابه P25 ویروس PVX در توتون بیان شد و مقاومت خوبی به PVX، TMV و سایر توپاموویروسها ایجاد کرد (آرس ۱۹۹۸) که احتمالاً خاموش شدن ناخواسته P25 در گیاه توتون تراریخته باعث تولید siRNA های ویروس در گیاه شده و با هدف قراردادن خود ویروس مهاجم مانع فعالیت و تکثیر ویروس در گیاه شده است.

روش ایجاد مقاومت در این تحقیق مبتنی بر ساختن سازه سنجاق‌سری قطعه‌ای به طول ۴۰۰ باز از ژن P25 ژنوم PVX بود. هرچه طول این قطعه بیشتر باشد امکان خاموش کردن ژن افزایش می‌یابد اما امکان غیر اختصاصی عمل کردن و هدف قراردادن ژن‌های دیگر در گیاه نیز بیشتر می‌شود. در این مورد از قطعه‌ای از P25 استفاده شد که هیچ شباهتی در ژنوم توتون و گیاهان دیگر نداشته باشد و این کار هنگام انتخاب قطعه از طریق Blast در بانک‌های اطلاعاتی بررسی عمیق گردید. با توجه به اطلاعات موجود و طبیعی بودن مرفولوژی و فیزیولوژی گیاهان تراریخت حاصل، به نظر نمی‌رسد که ژنی از میزبان با این سازه سنجاق‌سری مورد هدف قرار گرفته باشد. بررسی های بیشتر مرفولوژیکی روی گیاهان تراریخته لازم است تا گیاهان مقاوم حاصل هم از لحاظ ریخت شناسی و هم میزان تولید محصول تایید شوند. در این مطالعه گیاهان تراریخته به صورت مکانیکی با PVX تلقیح شده و بعد از تکثیر و گسترش ویروس داخل گیاهان، آزمایشات ELISA و RT-PCR روی آنها انجام شد که نتایج همدیگر را ثابت نمودند. عدم وجود قطعه مربوط به CP ویروس در گیاهان تراریخته شاید این احتمال را بوجود آورد

<sup>1</sup>Institute de Biologie Moleculaire des Plantes.

## منابع

- دیدار ن، پژوهنده پ و محمودی ف، ۱۳۹۳. ایجاد گیاهان زودگلده آرابییدوپسیس از طریق خاموش کردن ژن CLF به روش RNA silencing. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۶، شماره ۲، ص ۷۴-۶۱.
- Ai T, Zhang L, Gao Z, Zhu CX and Guo X, 2011. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology* 13:304-16.
- Ares X, Calamante G, Cabral S, Lodge J, Hemenway P, Beachy R N and Mentaberry A, 1998. Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (P24) are resistant to tobacco Mosaic virus and other tobamoviruses. *Journal of Virology*, 72:731-738.
- Bai Y, Guo Z, Wang X, Bai D and Zhang W, 2009. Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Progress in Natural Science*, 19:543-548.
- Beemster ABR and de Bokx J A 1987. Survey of properties and symptoms. PP. 84-113. In: de Bokx JA and van der Want JPH (eds.) *Viruses of Potato and Seed Potato Production*. Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- Chen JF, Murchison EP and Tang R, 2008. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 105 (6): 2111-6.
- Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC and Tsai CH, 2010. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, 11:641-9.
- Chomczynski P and Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156-9.
- Cockerham G. 1958. Experimental breeding in relation to virus resistance. *Proceedings of the Third Conference on Potato Virus Disease*, Lisse-Wageningen. pp.199-203.
- Doyle JJ and Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19:11-15.
- Duan CG, Wang CH, and Guo HS, 2012. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, 3(1):5. doi:10.1186/1758-907X-3-5.
- Forootani S, Jafarpour B, Falahati Rastegar M and Beigzadeh N. 2004. Identification of races 1 and 3 of PVX in Khorasan and Ardebil Provinces. P. 222. *Proceedings of the 16th. Iranian Plant Protection Congress*, Vol. II. Plant Diseases. 29 Aug- 2 Sep. Tabriz University, Tabriz, Iran.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP, 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19: 92-105.
- Hock J and Meister G, 2008. The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9: 1-8.
- Hutvagner G and Zamore PD, 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12: 225-232.
- Kohm BA, Goulden MG, Gilbert JE, Kavanagh TA and Baulcombe DC, 1993. A potato virus X resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell*, 5:913-920.
- Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S and Baulcombe D, 1993. Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO Journal*, 12:379-86.
- Moissiard G and Voinnet O, 2004. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathology*, 5:71-82.
- Murashige T and Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

- Paddison P, Caudy A and Hannon G, 2002. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (3): 1443–8.
- Pazhouhandeh M, 2009. *Virus and RNA Silencing*. Lambert Academic Publishing (LAP), Germany.
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards KE, Genschik P and Ziegler-Graff V. 2006. F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:1994-1999.
- Roy G, Sudarshana MR, Ullman DE, Ding SW, Dandekar AM and Falk BW, 2006. Chimeric cDNA Sequences from Citrus tristeza virus Confer RNA Silencing-Mediated Resistance in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plants. *Phytopathology*. 96:819-27.
- Salazar LF, 1996. *Potato Viruses and Their Control*. International Potato Center. Peru. 214 pp.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T, 1989. *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanford JC. and Johnston SA. 1985. The concept of pathogene derived resistance. *J. Theoret. Biol*, 113: 395-405.
- Sivparsad BJ and Gubba A, 2014. Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA). *Transgenic Research*, 23:377-88.
- Tehseen M, Imran M, Hussain M, Irum Sh, Ali Sh, Mansoor Sh and Zafar Y, 2010. Development of male sterility by silencing Bcp1 gene of Arabidopsis through RNA Viruses of Potato and Seed Potato Production, Second ed. Production. PUDOC, *Viruses of Potato and Seed Potato Production*, Second ed. PUDOC.
- Verchot-Lubicz J, Ye CM and Bamunusinghe D. 2007, Molecular biology of Potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88:1643-55.

## Production of Tobacco Plant Resistant to PVX by RNA Silencing Mechanism

M Sajjadi Fard<sup>1</sup>, M Pazhouhandeh<sup>2\*</sup>, A Shirzad<sup>3</sup> and H Mohajjel Shoja<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Former MSc. Student in Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University.

<sup>2</sup>Associate Prof. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University.

<sup>3</sup>Associate Prof. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University.

<sup>4</sup>Assistance Prof. Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz.

\*Corresponding author: Email: pazhouhandeh@gmail.com.

Received: 24 Jun 2015

Accepted: 25 Oct 2015

### Abstract

One of the most pathogenic viruses in Solanaceous plants is *Potato X virus* (PVX) which causes systemic mosaic spots and economic loss in *Nicotiana tabacum*. Use of the tobacco resistance varieties is the best method in management of this disease. In this study, to establish the tobacco plants resistant to PVX, an RNAi construct was designed for a 400 bp fragment of PVX's P25 gene which is a suppressor of RNA Silencing in plant. The P25 fragment was amplified with specific primers by PCR and was cloned in two steps (in sense and antisense directions) into the pFGC5941 plasmid. Then, the RNAi construct was transformed from recombinant plasmid into the tobacco explants (Samsun) by means of *Agrobacterium* cells. The transgenic plants were identified by selection on Basta containing media and propagated, followed by molecular and phenotypic analyses. PCR test using plant's DNA confirmed the presence of the transgene in transgenic plants. The next generation of the transgenic plants was inoculated with PVX in greenhouse. ELISA using anti-PVX-CP antibody showed that three transgenic lines are resistant to PVX. Molecular confirmation of three tobacco resistant lines was performed by RT-PCR using plant RNA and CP-specific primers and PVX did not detected in transgenic plants. This study resulted in production of three tobacco lines resistant to PVX. Study of their resistance in the field condition is in progress.

**Keywords:** PVX, Resistance, RNA Silencing, Tobacco, Transgenic Plant.