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

محسن سجادی فرد[۱]، مقصود پژوهنده[۲*]، اکبر شیرزاد[۳] و هانیه محجل شجاء[۴]

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 ٤٠٠ نوکلوتیدی از ژن *P25* این ویروس که ممانعت کننده 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 همسانه سازی 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 پوششیPVX 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 به‌کمک 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

ویروس X سیب زمینی دارای گسترش جهانی و از شایع‌ترین ویروس‌های توتون بوده و از خانواده *Alphaflexiviridea*، 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 و انتشار می‌یابد (کوکرهام ۱۹۵۸ و سالازار ۱۹۹٦). ویروس PVX در ایران از اکثر مناطق کشور روی توتون گزارش شده است (فروتنی و همکاران٢٠٠٤).

توتون یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی به شمار می‌رود که در اقتصاد کشورهای تولید کننده آن نقش مهمی را ایفا می‌کند. شیوع آفات و بیماری‌های توتون، بویژه بیماری‌های ویروسی علاوه بر کاهش کیفیت محصول، موجب افزایش هزینه

توتـون کـاری مـی‌شـود. تنهـا راه رهـایی از خسـارت ویـروس‌هـا اسـتفاده از ارقـام مقـاوم، بـذر عـاری از ویروس و کنترل ناقلین در مزرعه است. هـدف بیشـتر پژوهش‌های جدیـد در بیمـاری‌شناسـی گیـاهی یـافتن شیوه‌های کم خطر برای کنترل بیماری می‌باشد که بـه سلامت انسان و محیط زیست آسـیب کمتـری را وارد می‌کنند. از امید بخش‌ترین این شـیوه‌هـا مـی‌تـوان بـه تولید گیاهان مقاوم به بیماری توسـط اصـلاح نباتـات سنتی، مهندسی ژنتیک و کاربرد تکنیـک خاموشـی ژن اشاره کرد.

واژه RNA Silencing به فرایندی اطلاق می شـود که طی آن یک مولکول RNA دو رشته‌ای از بیان ژنـی با توالی مشابه آن جلوگیری می‌کند. مهار بیـان ژن از طریق تجزیه mRNA انجام می‌شود و به همـین دلیـل ایــن فراینــد را نــوعی مکانیســم خاموشــی بعــد از رونویسی ژن می‌نامند (پادیسـون و همکـاران ۲۰۰۲). اجزای کلیدی در ایـن فراینـد، دو آنـزیم بـه نـام‌هـای دایسـر و آرگونـات و مولکـول‌هـای کوچـک بـه نـام siRNA است (چن و همکاران ۲۰۰۸). گیاهان به طـور طبیعی از این مکانیسـم بـه عنـوان روش دفـاعی علیـه ویروس‌ها استفاده می‌کنند و در بسیاری از ویروس‌ها توانایی مختل کردن این مکانیسـم تکامـل یافتـه اسـت. اغلب ویروس‌ها پروتئین‌هایی را بیان می‌کنند که RNA Silencing گیاه را سرکوب می‌کند و در نتیجـه باعـث بهم خوردن کنترل بیـان ژن‌هـا در گیـاه مـی‌شـود کـه بصــورت ناهنجاریهــای فنــوتیپی بــه عنــوان علائــم ویروسی مثل کوتولگی و کتابی شـدن و از ایـن قبیـل، معــروف شــده‌انــد (فرایــدمن و همکــاران ۲۰۰۹ و مویسیارد و ووینت ۲۰۰٤ و پژوهنده ۲۰۰۹ و ۲۰۰٦).

یکی از راهبردهای موثر بـرای ایجـاد مقاومـت بـه ویروس‌هـا در گیاهـان اسـتفاده از مقاومـت ناشـی از پاتوژن (Pathogen-derived resistance) است کـه بـر اسـاس اسـتفاده از ژن‌هـا یـا تـوالی‌هـایی بـا منشـاء ویروس و انتقال آنهـا بـه گیـاه میزبـان اسـتوار اسـت (سانفورد و جانسـتون ۱۹۸۵). در ایجـاد مقاومـت بـه ویروس‌ها توسط مهندسی ژنتیک یکی از مـواردی کـه باید مورد توجه قرار گیرد، این است که کـدام ژن‌هـای ویروسی بهتر است مورد استفاده قرار گیرند. از جمله منابع ژنی مورد استفاده ژن‌های بیـان کننـده پوشـش پروتئینـی و ژن‌هـایی کـه سـبب اخـتلال در مکانیسـم خاموشی ژن در گیاهان می‌شوند را می‌توان نـام بـرد (دوان و همکـاران ۲۰۱۲). بیشـتر کارهـای مهندسـی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به ویروس‌هـای گیـاهی کـه بر اساس پاتوژن طراحی شده بود و کم و بیش باعـث ایجاد مقاومت گردیده بود بـا کشـف مکانیسـم RNA Silencing از سال ۲۰۰۰ میلادی جهت‌دهی دقیق شـد. تمام تلاش‌های انجام یافتـه تـا آن زمـان بـرای ایجـاد گیاهان تراریخته مقـاوم بـه ویـروس، بخـاطر متوقـف شدن RNA silencing توسط پروتئین‌هـای ویروسـی ممانعت کننده از RNA Silencing میزبان، دیر یـا زود با شکست مواجه می‌شد و مقاومت قابل قبولی بدسـت نمی‌آمد. زیرا با حمله ویروس سیستم دفاعی القا شـده در گیـاه، دیگـر قـادر بـه حفـظ گیـاه از آثـار مخـرب ویروس نیست. در PVX، P25 یکـی از پـروتئین‌هـایی است که توسط ژنـوم ویـروس بیـان شـده و ممانعـت کننـده از خاموشـی ژن مـی‌باشـد (چیـو و همکـاران ۲۰۱۰) و جزو بهترین گزینه ها برای ایجاد مقاومت در گیاه تلقی می‌گردد.

ژن‌های مقـاومتی همچـون Rx در سـیب‌زمینـی در مقابل ویروس‌ها شناسایی شده اند (کوهم و همکـاران ۱۹۹۳ و ورچـوت-لـوبیز و همکـاران ۲۰۰۷). تـاکنون چندین مطالعـه منجـر بـه گـزارش گیاهـان مقـاوم بـه ویروس به کمک انتقال ژن‌هـای ویروسـی بـه میزبـان شده است. در تحقیقی نشان داده شده اسـت کـه بیـان پروتئین پوششی PVX در سیب زمینـی باعـث ایجـاد مقاومت به ایـن ویـروس مـی گـردد (بـای و همکـاران ۲۰۰۹) و یـا بیـان ژن رپلیکـاز PVX در سـیب‌زمینـی مقاومــت خــوبی بــه PVX نتیجــه داد (لانگســتاف و

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 توباموویروس‌ها 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 سنجاق‌سری 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 ۲۰۰٦). به‌کمک همین فرایند گیاه مقاوم سیب زمینی شیرین در مقابل ویروسهای Sweet Potato feathery mottle virus, Sweet Potato chlorotic stunt virus, و Sweet Potato mild mottle virus ایجاد شده است (سیوپرساد و گوبا ۲۰۱٤).

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.

مواد و روش‌ها

همسانه سازی برای تهیه‌ی ساختار سنجاق سری قطعه ژن P25 در ناقل pFGC5941

ناقل pFGC5941 با ۱۱٤۰۷ جفت باز طول حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان انتخابگر در باکتری و ژن مقاومت به علفکش Basta بعنوان 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 طرّاحی 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 (AA<u>TCTAGA*CTCGAG*</u>ATACCAGGCACTTT TTGCTGAC) حاوی سایت های برشی *Nco*I و *Bam*HI و P25R (AAGGATCCCCATGGCTATGTCCCTGCGCGGA CATA) به عنوان آغازگر برگشتی حاوی سایت های برشی *Xho*I و *Xba*I با واکنش PCR قطعه ٤۰۰ جفت بازی انتهای P25 تکثیر شد. (*Xho*I و *Nco*I محل ورود قطعه سنس بر روی ناقل pFGC5941 می‌باشد) محصول PCR پس از برش با آنزیم‌های *Nco*I، *Xho*I 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

اینترون CHS و پایین دست پروموتور CaMV-35S قرار گرفت. در مرحله دوم، پس از تایید همسانه سازی این قطعه در جهت سنس، قطعه ٤٠٠ جفت بازی تکثیر و با استفاده از آنزیم‌های *Xba*I و *Bam*HI، 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 (CTTTCTACCTTCCCACAATTCG) 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 نوترکیب 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 تائید گردید.

تراریزش گیاه توتون به روش آگروباکتریوم

ناقل pFGC5941 نوترکیب حاصل که حاوی ساختار سنجاق سری قطعه ٤٠٠ جفت بازی ژن P25 می‌باشد، به روش شوک الکتریکی (دو کیلوولت به مدت پنج هزارم ثانیه) به *Agrobacterium tumefaciens*، نژاد LBA4404 منتقل شد. کلنی‌های بدست آمده، پس از تایید به روش PCR، برای انتقال ساختار سنجاق 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_{600}= 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 (mg/l ۳۵۰) از محیط حذف گردید. سپس این جدا کشت‌ها به محیط کالوس‌زایی که شامل محیط MS معمولی (موراشیگ و اسکوگ ۱۹٦۲) بود، منتقل شدند. پس از ۱۸ تا ۲٤ 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 (mg/l ۱۰) کشت شدند. گیاهان تراریخته به گلخانه منتقل و بذر گیری 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 دویله و دویله (۱۹۸۷)، در ادامه همه محتویات هاون به لوله استریل ۱/۵

میلی‌لیتری منتقل شده و بـه مـدت ۲۰ دقیقـه در دمـای ٦٥°C قرار گرفت (هر پنج دقیقه به مـدت۱۰ ثانیـه هـم زده شد). سپس یک حجم از کلروفرم به نمونه اضـافه و به مدت پنج دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰rpm انجام و فاز رویی بـه لولـه جدیـد منتقـل شـد. در انتهـا DNA بـه روش اتانول رسوب داده شد و بعد از خشـک شـدن ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب اسـتریل اضـافه و در ۲۰°C- نگهـداری گردید. جهت تایید حضـور تـرانس ژن مـورد نظـر در گیاهان تراریخته توتون واکنش PCR انجام گرفت.

استخراج RNA کل

مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های گیاهـان تراریخـت درون هاون و در حضور ازت مایع ساییده شـدند. در ادامه به ازاء هر ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت،۷۰۰ میکرولیتـر از ترایزول (Trizol، میکروژن) اضافه و مخلوط گردید تـا محلـول یکنـواختی ایجـاد شـود. مطـابق روش کـومزینکس و سـاچی (۱۹۸۷) محتویـات هـاون بـه تیـوب‌هـای اسـتریل ۱/۵ میلـی‌لیتـری منتقـل شـده و بلافاصـله روی یـخ قـرار گرفتنـد. سـپس بـه آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضـافه گردیـد و پـس از ورتکـس کردن، سانتریفوژ با سـرعت ۱٤۰۰۰rpm بـه مـدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤°C صورت گرفت. مایع رویی به لوله جدید منتقل و به میزان دو حجـم ایزوپروپـانول سـرد اضافه گردید. تیوب‌هـا بـه مـدت یـک شـب در ۲۰°C- نگهداری شـدند و روز بعـد سـانتریفوژ بـه مـدت ۲۰ دقیقـه در دمـای ٤°C بـا سـرعت ۱٤۰۰۰rpm انجـام گردید. در ادامه رسوب‌دهی به روش اتانول انجام شـد و بعد از خشک شدن، به میزان ۵۰-۳۰ میکرولیتـر آب مقطر استریل عاری از RNase به آنها اضـافه گردیـد. به منظور حذف مولکول‌های DNA از RNA اسـتخراج شـده، واکـنش DNase توسّـط کیـت کیـاژن روی آن انجام گرفت. کمیت و کیفیـت RNA اسـتخراج شـده از گیاهان توتون تراریخته، با دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

سنتز cDNA

سـنتز cDNA بـا کیـت (Superscript III) سـاخت شرکت اینویتروژن بـه کمـک چهـار میکروگـرم RNA انجام گردیـد، بـرای بررسـی میـزان بیـان ژن از روی cDNA واکنش RT-PCR بـا آغازگرهـای اختصاصـی انجام شـد، بـرای اطمینـان از کیفیـت RNA اسـتخراج شده و درستی سنتز cDNA ابتدا یک واکنش PCR بـا آغازگرهای یک ژن خانـه دار (house-keeping) بنـام Actin مربوط به توتون انجام شد و نتیجه واکنش بـر روی ژل آگارز بررسی گردید.

واکنش PCR

واکـنش هـای PCR بـه کمـک آنـزیم Mag® *Taq* DNA Pol در دستگاه Biometra (آمریکا) و با چرخه های دمایی C °۹۲ به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مـدت ۳۵ ثانیـه در ۳۰ چرخـه انجـام شدند.

مایه زنی مکانیکی ویروس

برای تلقیح ویروس از عصاره‌ی استخراج شـده از گیاهان آلوده بـه ویـروس در بـافر PBS-T و از روش مکانیکی و مالش روی برگهـای میـانی گیـاه بـه کمـک پودر کاربوراندم استفاده شد.

بررسـی مقاومـت گیاهـان توتـون تراریختـه بـه ویروس PVX با ELISA:

پس از اطمینان از تراریخت بودن گیاهان نسل دوم با انتخاب توسـط علفکـش بسـتا و بررسـی مولکـولی وجود تراژن، عصاره‌ی ویروس PVX تکثیـر شـده در آزمایشگاه به صورت مکانیکی به این گیاهان تراریخته (هفت لایـن، ده گیـاه از هـر لایـن بـه عنـوان تکـرار) و همچنین گیاهان غیرتراریخته توتون بـه عنـوان شـاهد تلقیح شد. تلقیح به روش مکانیکی روی برگهـای سـوم و چهارم گیاهان انجام شد. بعد از گذشت دو هفتـه، از برگ‌های بالایی جدید برای آزمون ELISA و همچنین استخراج RNA عصاره‌گیری انجام شـد. جهـت تعیـین

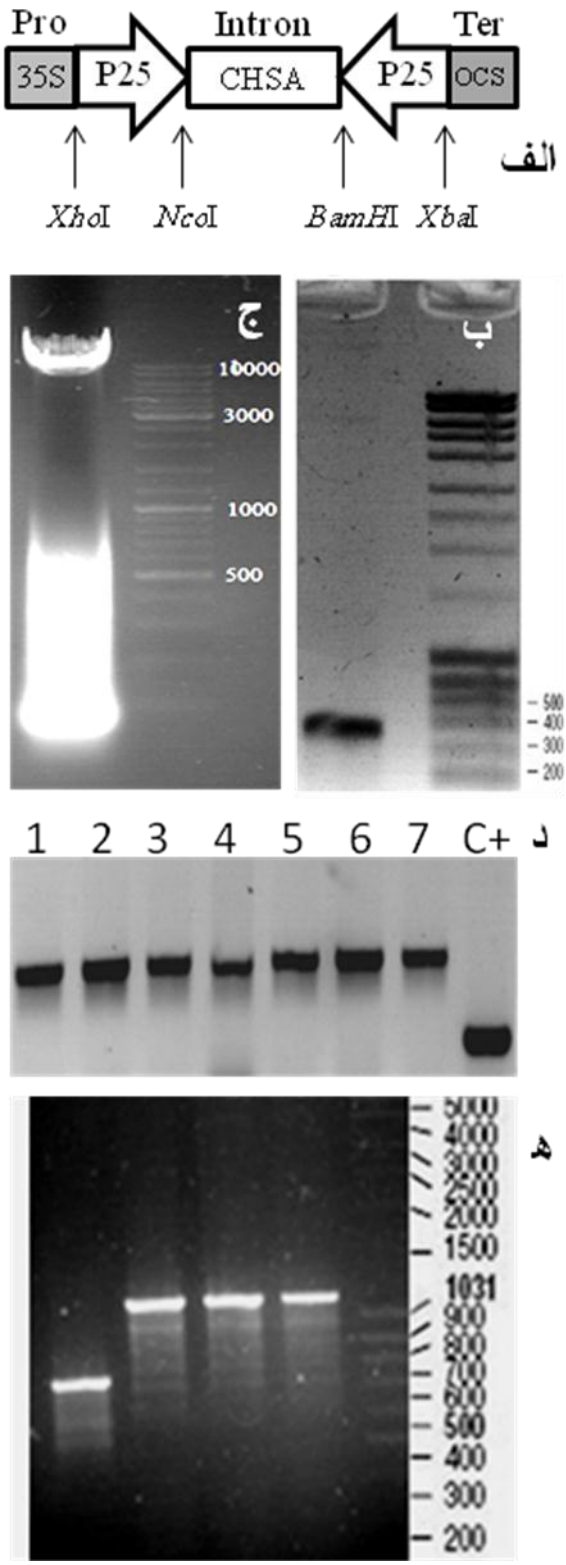
مقاومت گیاهان تراریخت در مرحله نخست از روش DAS-ELISA روی پلیت های ۹۶ چاهکی با آنتی بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX تهیه شده از CIP (پرو) استفاده شد.

نتایج

همسانه سازی برای تهیه‌ی ساختار سنجاق 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 می‌باشد. بدین منظور سازه سنجاق سری تکرار معکوس قطعه انتهایی ژن *P25* در ناقل pFGC5941 مطابق شکل (۱- الف) 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 ٤٠٠ 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 کلنی‌های حاصل واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل در جهت سنس انجام شد (شکل ۱- د).

محصول PCR در ناقل نوترکیب جدید بایستی معادل ٦٢٠ bp (۸۰-۳۰۰+٤٠٠) باشد که در شکل (۱ ه) مشخص می‌باشد. اندازه قطعه ژن *P25* وارد شده ٤٠٠ bp و فاصله آغازگرها روی ناقل خالی ۳۰۰ bp و در برش آنزیمی قطعه افتاده از ناقل ۸۰ bp می‌باشد. کلیه کلنی‌هایی که روی محیط انتخابی رشد کرده بودند، باند درستی را نشان دادند که در شکل (۱- د)



شکل ۱- همسانه سازی **P25** در ناقل **pFGC5941**: الف) نقشه خلاصه شده ناقل و استراتژی همسانه سازی قطعه‌ای از ژن ***P25*** در جهت سنس و آنتی‌سنس . 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-

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 ٤٠٠ جفت بازی) ج) الکتروفورز ناقل خالی **pFGC5941** با اندازه ١١٤٠٧ جفت باز پس از برش آنزیمی با ***Xho*I** و ***Nco*I** 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 نوترکیب محصول همسانه‌سازی اول قطعه ژن ***P25*** در جهت سنس. ٧-١ قطعه ٦٢٠ جفت بازی نشان می دهد. در ستون آخر قطعه تقریبا ٣٠٠ جفت بازی نتیجه **PCR** روی ناقل خالی به عنوان کنترل مثبت **(+C)** می‌باشد که در آن فاصله این دو آغازگر ٣٠٠ جفت باز است. ه) الکتروفورز محصول **PCR** برای تائید همسانه‌سازی دوم قطعه ژن ***P25*** در جهت آنتی‌سنس روی سه ناقل استخراج شده از کلنی‌های مثبت که حاوی قطعه ای با اندازه ١١٧٢ جفت باز هستند و ستون سمت چپ نتیجه آزمون **PCR** روی ناقل خالی به‌عنوان کنترل.

نتیجه PCR روی هفت کلنی آورده شده است. جهت تائید نهایی کلنی‌های مثبت، پلاسمیدهای آن‌ها استخراج و از آن‌ها نیز PCR با شرایط فوق انجام گردید. از یکی از آن‌ها برای شروع همسانه سازی دوم در جهت آنتی‌سنس استفاده شد. به منظور قرار-گیری قطعه *P25* در جهت آنتی‌سنس در ناقل، بار دیگر با واکنش PCR قطعه ٤٠٠ 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 ١١٧٢ bp به دست آمد (شکل١-ه).

آغازگر Rext از نوکلئوتید ٤٢٩١ و آغازگر Fint از نوکلئوتید ٣٥٠٥ به ناقل اتصال پیدا می‌کنند، لذا قطعه حاصله روی ناقل خالی باید دارای ٧٨٦bp باشد (شکل ١-ه سمت چپ)، و در صورت داشتن قطعه *P25* در جهت آنتی‌سنس با افتادن ١٤ bp هنگام برش بایستی قطعه ١١٧٢ bp(١٤-٤٠٠+٧٨٦) بدست آید. سه کلنی گزینش شده چنین نتیجه‌ای را نشان دادند. از این سه کلنی، استخراج پلاسمید صورت گرفت و برای تائید 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 به‌شماره GQ863228 مطابقت کامل دارد و از آن برای ادامه کار استفاده گردید.

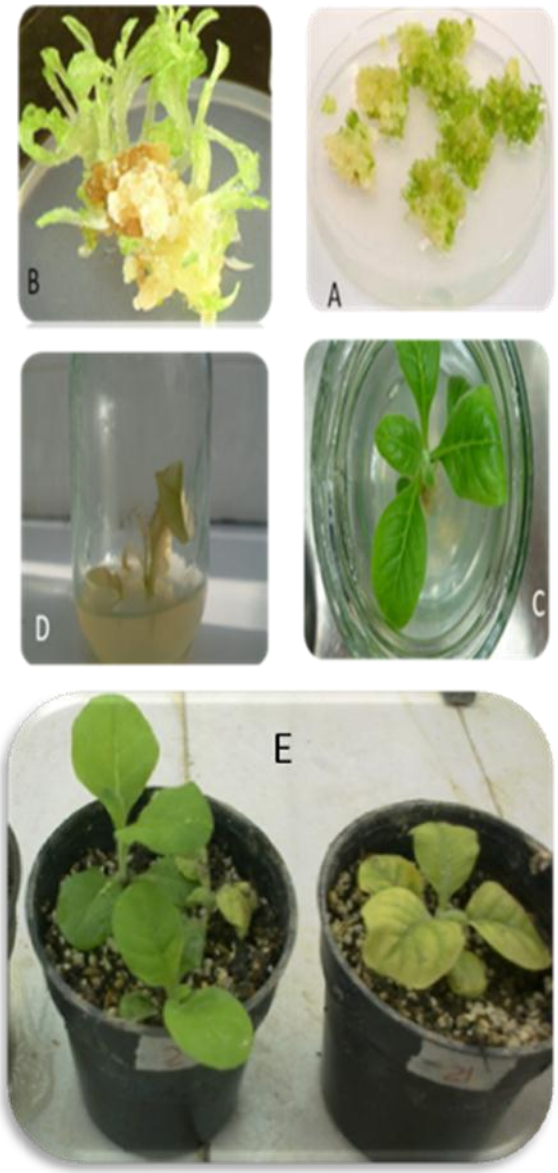
تراریزش گیاه توتون به کمک آگروباکتریوم و گزینش گیاهان تراریخته

به منظور انتقال سازه RNAi تولید شده به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)، از روش انتقال ژن با اگروباکتریوم استفاده شد. گیاهان تراریخته نسل T1 گزینش شده و بعد از انتقال به گلدان تحت شرایط گلخانه نگهداری گردیدند تا بذرگیری از آنها انجام شود (شکل ٢).

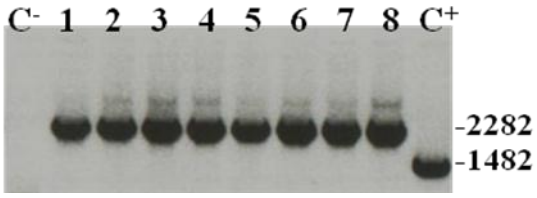
مجددا گیاهان شاهد و تراریخته نسل T2 با علفکش بستا اسپری و انتخاب شدند که پس از گذشت یک هفته مشاهده شد که گیاهان شاهد زرد شده و قدرت فتوسنتز خود را از دست داده‌اند ولی گیاهان تراریخته قادر به ادامه رشد می‌باشند (شکل ٢E).

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 (شکل٣).



شکل ۲- تراریزش گیاه توتون و گزینش گیاهان تراریخته: **A)** تشکیل کالوس **B)** تشکیل شاخه و برگ در محیط کشت **MS** حاوی هورمن **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.



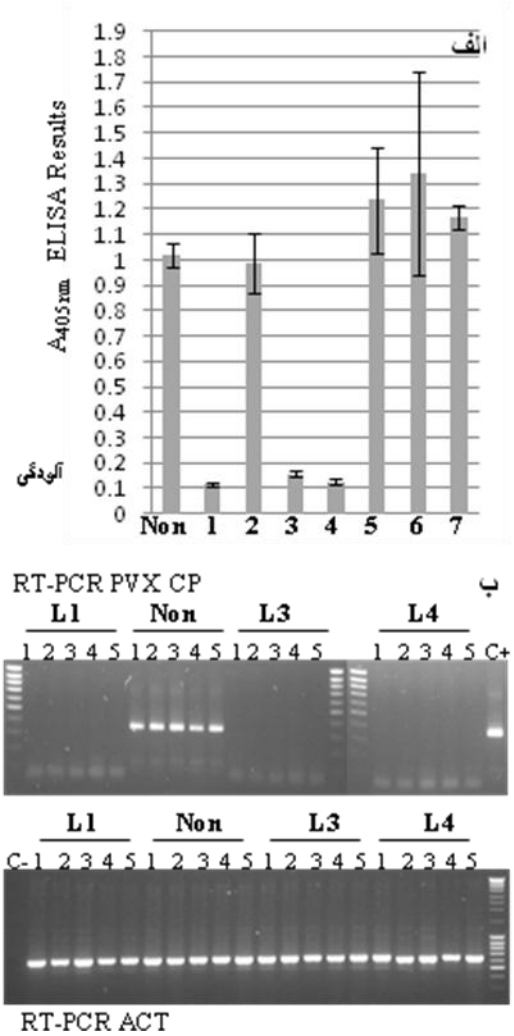
شکل ۳- الکتروفورز محصول **PCR** تکثیر شده با آغازگرهای **Fext** و **Rext** اختصاصی ناقل روی **DNA** هفت گیاه تراریخته توتون، قطعه موجود در ستون‌های ۲ تا ۸، حاوی ۲۲۸۲ جفت باز بوده و با قطعه موجود در ستون ۱ که روی ناقل نوترکیب انجام شده برابر است، کنترل مثبت (C^+) قطعه ۱٤۸۲ جفت باز روی ناقل خالی است و کنترل منفی (C^-) 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 و ٤) مقاومت به PVX را دریافت کرده اند (شکل ٤-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 پروتوکل 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 ٤ب).



شکل ٤- بررسی مقاومت گیاهان تراریخت به **PVX**: (الف) به روش **ELISA** به کمک آنتی بادی **PVX-CP**: هر ستون نشانگر میانگین نتایج **ELISA** ده گیاه (تکرار) در یک لاین می‌باشد. **Non**: گیاه غیرتراریخت توتون و ۷-۱ گیاهان هفت لاین تراریخت. (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 و ۵-۱ گیاهان (تکرار) در هر لاین.

نتیجه الکتروفورز نشان داد که سنتز cDNA در همه نمونه‌ها تقریبا 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 تراریخته سه لاین تراریخت مقاوم به PVX هستند (شکل ٤ ب). محصول PCR ژن CP در کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخت دیده شد اما در تکرارهای سه لاین تراریخت مشاهده نگردید. بدین وسیله نتیجه ELISA با RT-PCR تایید شد (شکل ٤ب).

بحث

در مکانیسم خاموشی ژن، مولکول‌های آغازگر این فرایند dsRNAهای چند صد جفت‌بازی می‌باشند که توسّط آنزیم Dicer به قطعات دو رشته‌ی ۲۳-۲۱ نوکلئوتیدی به نام siRNA شکسته می‌شوند. سپس تنها رشته آنتی‌سنس آنها متّصل به کمپلکس خاموشی القا شده با RNA (RNA Induced Silencing Complex: RISC) باقی می‌ماند تا RNA تک رشته‌ای مکمّل 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 فوق‌الذکر در برابر ویروس‌ها ایجاد مقاومت می‌کنند، ولی در طی زمان ویروس‌ها سازوکارهای لازم را جهت مبارزه با این مکانیسم بدست آورده‌اند. در ویروس X سیب-زمینی پروتئین ژن *P25* ممانعت کننده از RNA Sliencing است و این کار را با تخریب پروتئین آرگونات از طریق مسیر پروتئازوم انجام می‌دهد (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 سنجاق سری ایجاد شده در گیاه برای P25، میزبان را به تولید دائمی siRNAهای P25 وادار می‌کند 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

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 توباموویروسها ایجاد کرد (آرس ۱۹۹۸) که احتمالا 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 ٤٠٠ 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 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 تقریبا 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 ویروسPVX ثابت می‌شود. تولید گیاهان توتون با چنین روش تراریزش 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 CaMV 35S 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 IBMP[1] فرانسه بخاطر توالی یابی و تامین برخی مواد تشکر می‌نماییم.

[1]Institute de Biologie Moleculaire des Plantes.

منابع

دیدار ن، پژوهنده پ و محمودی ف، ۱۳۹۳. ایجاد گیاهان زودگل‌ده آرابیدوپسیس از طریق خاموش کردن ژن CLF به روش RNA silencing. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ٦، شماره ۲، ص ٧٤-٦١ .

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 microR NAs.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[1], M Pazhouhandeh[2]*, A Shirzad[3] and H Mohajjel Shoja[4]

[1]Former MSc. Student in Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University.
[2]Associate Prof. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University.
[3]Associate Prof. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University.
[4]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.