بررسی امکان خاموش‌سازی ژن *PDS* به روش VIGS در گیاه تنباکوی زینتی

آیت طاهری دهکردی[1*]، عزیزاله خندان میرکوهی[2]، محسن کافی[3]، سید علیرضا سلامی[4]

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج. ۲و ۴- استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج. ۳- استاد گروه علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

[*]نویسنده مسئول: ayat.taheri@ut.ac.ir

چکیده

خاموش‌سازی ژن القاء شده توسط ویروس (VIGS)، یک روش خاموش‌سازی ژن پس از رونویسی (PTGS) است و به عنوان یک مکانیسم دفاعی، می‌تواند از گیاهان در برابر ویروس‌های مهاجم حفاظت کند. این راهبرد دفاعی گیاه، برای توسعه‌ی روشی جهت خاموش‌سازی ژن‌های هدف درونزاد مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. جهت خاموش‌سازی یک ژن خاص، یک قطعه از ژن هدف درون یک حامل ویروسی تغییریافته، همسانه‌سازی شده و به گیاه منتقل می‌شود. ژن فایتوئین دی‌سچوریز (*PDS*)، یک آنزیم محدودکننده‌ی سرعت در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها را کد می‌کند. بنابراین خاموش‌سازی این ژن، سطح بیان را کاهش می‌دهد و روی محتوای کاروتنوئیدی سلول اثر می‌گذارد و در نهایت منجر به فنوتیپ ظاهری سفیدشدگی نوری می‌شود. در این پژوهش به منظور بررسی امکان انجام VIGS برای خاموش‌سازی ژن نشانگر *PDS*، از فناوری خاموش‌سازی همولوگ استفاده شد. گیاهانی که سازه‌ی خاموشی به آنها تزریق شده بود، پس از حدود ۱۰ تا ۱۲ روز، علائم سفید شدگی نوری را بروز دادند. نتایج بدست‌آمده بیانگر کاهش میزان بیان ژن *PDS*، مقدار کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در برگ گیاهان تیمار شده نسبت به گیاه شاهد و کنترل منفی بود. این اولین گزارش در مورد خاموش‌سازی ژن به روش VIGS در گیاه تنباکوی زینتی می‌باشد و می‌تواند ابزار مفیدی برای بررسی عملکرد ژن‌های هدف برای مهندسی این گیاه باشد.

کلمات کلیدی: ناقل ویروسی TRV، اگروباکتریوم ، همسانه‌سازی، بیان نسبی ژن، Real-Time PCR

مقدمه

خاموش‌سازی ژن القا شده توسط ویروس[1] (VIGS)، یک روش خاموش‌سازی پس از رونویسی[2] (PTGS) است که به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر ویروس‌های مهاجم، بوسیله‌ی گیاه استفاده می‌شود (Waterhouse et al., 2001). طی همانندسازی ویروسی، RNA دورشته‌ای[3] (dsRNA) بوسیله‌ی یک RNAپلی‌مراز وابسته به RNA[4] (RdRp)، تولید شده و باعث راه‌اندازی PTGS می‌شود. از این روش می‌توان برای مطالعه عملکرد ژن‌هایی که جهش آن‌ها برای جنین، کشنده است یا باعث تغییر شکل شدید گیاه می‌شود، استفاده کرد (Senthil-Kumar et al., 2008). فرآیند خاموش‌سازی، به‌وسیله‌ی واردکردن یک ژن گزارشگر در ناقل ویروسی که منجر به یک فنوتیپ دیداری می‌شود، بررسی می‌گردد. از پرکاربردترین ژن‌های گزارشگر در VIGS،

[1] Virus-induced gene silencing
[2] Post-transcriptional gene silencing
[3] Double-strand RNA
[4] RNA-dependant RNA polymerase

فایتوئین دی‌سچوریز[5] (*PDS*) است که خاموشی آن منجر به کاهش بیوسنتز کاروتنوئیدها و فنوتیپ سفید شدگی نوری[6] در گیاه می‌شود.

گیاه تنباکوی زینتی[7] با نام علمی *Nicotiana alata* متعلق به خانواده Solanaceae و گیاهی یک‌ساله است (Goodspeed & Thompson, 1945). به دلیل اهمیت این گیاه به لحاظ تجاری در فضای سبز و نیز به دلیل اهمیت جنس *Nicotiana* بواسطه‌ی دارا بودن مواد موثره دارویی بخصوص آلکالوئیدها، این گیاه در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی امکان انجام خاموش‌سازی ژن به روش VIGS در گیاه تنباکوی زینتی به اجرا در آمد و به عنوان یک طرح راهنما برای بررسی عملکرد سایر ژن‌های مرتبط با صفات تجاری در این گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

ابتدا RNA کل گیاه تنباکوی زینتی با استفاده از محلول بایوزول از برگ گیاه استخراج شد و cDNA سنتز گردید؛ سپس یک قطعه‌ی ۳۴۴ جفت‌بازی از ژن *PDS* با استفاده از پرایمرهای گزارش‌شده تکثیر شد (Liu & Page, 2008). محصول PCR درون ناقل pTRV2 همسانه‌سازی شد سپس ناقل‌های نوترکیب تایید شده، به روش شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌ی GV3101 منتقل شدند. آماده‌سازی و تزریق باکتری‌ها به گیاهان بر اساس روش Senthil-Kumar و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت (Senthil-Kumar & Mysore, 2014)

تیمارهای در نظر گرفته‌شده شامل بافر تزریق[8] (IB) بدون هیچ باکتری به عنوان شاهد، pTRV1:pTRV2-empty به عنوان کنترل منفی و pTRV1:pTRV2-*PDS* به عنوان کنترل مثبت بودند که در هر تیمار، pTRV1 و pTRV2 با نسبت ۱:۱ مخلوط شده بودند. مخلوط حاصل بوسیله‌ی سرنگ‌های یک میلی‌لیتری استریل بدون سوزن به دو برگ حقیقی گیاهان ۲۱ روزه (مرحله‌ی ۴ برگی) تزریق شدند. سپس گیاهان در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگه‌داری شدند.

بررسی بیان نسبی ژن *PDS* با روش Real-Time PCR انجام گرفت و میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta C$ محاسبه گردید. در این روش همه دادها با ژن خانه‌دار[9] (در این مطالعه ژن *rbcL*) به عنوان کنترل داخلی نرمال شدند؛ سپس میزان تغییرات بیان ژن در تیمارهای مختلف نسبت به تیمار شاهد سنجیده شد (شکل ۲).

نتایج و بحث

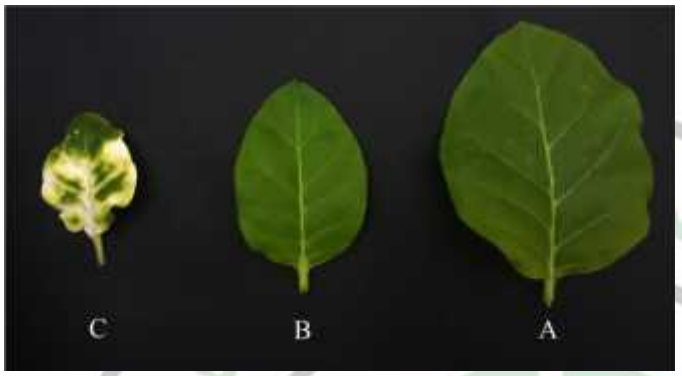
گیاهان تنباکوی زینتی که با اگروباکتریوم‌های دارای ناقل تراریخت pTRV2 تیمار شده بودند، حدود ۱۲روز بعد از تزریق سازه‌های خاموشی، علایم سفیدشدگی نوری را در برگ‌هایی که به تازگی شروع به رشد کرده بودند نمایان ساختند (شکل ۱) و این در حالی است که در مورد تیمارهای شاهد و کنترل منفی، هیچگونه علائم ظاهری مرتبط با خاموشی ژن *PDS* مشاهده نشد (شکل۲). سفیدشدگی نوری به علت فقدان کاروتنوئیدها و تخریب کلروفیل در نتیجه‌ی اکسیداسیون نوری ایجاد می‌شود (Zhang et al., 2010). در تیمار pTRV2-*PDS* نسبت به تیمارهای شاهد، کاهش معنی‌دار بیان ژن *PDS* (نسبت به ژن *rbcL*) مشاهده شد (شکل ۳). گیاهان تنباکوی زینتی که دارای فنوتیپ سفیدشدگی نوری بودند به طور متوسط ۳/۵ برابر کاهش سطوح رونوشت‌های

[5] Phytoene desaturase
[6] Photobleaching
[7] Ornamental tobacco
[8] Infiltration buffer
[9] Housekeeping gene

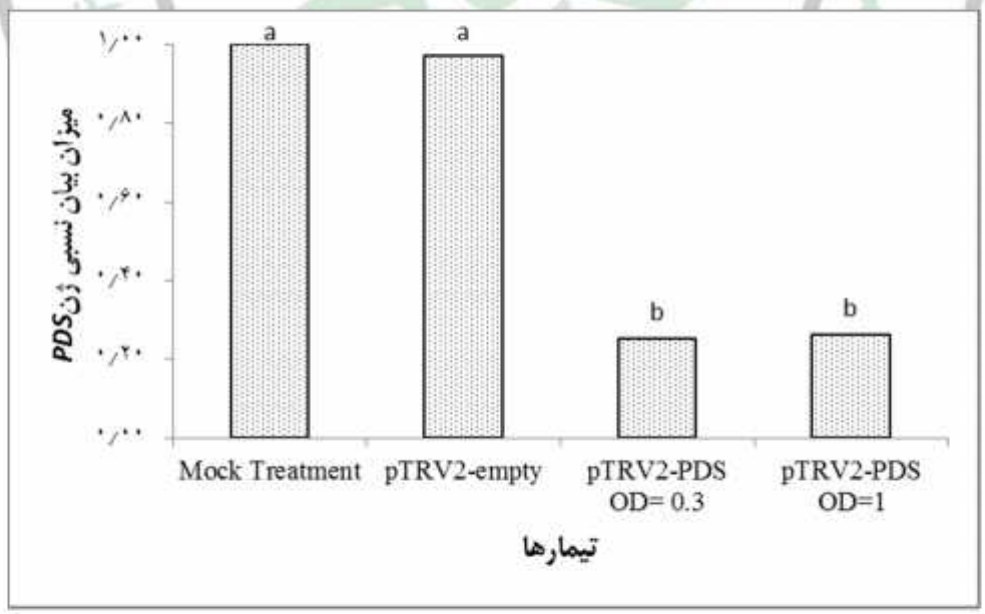
mRNA در مقایسه با گیاهان شاهد را نشان دادند که حاکی از صحت خاموشی ژن *PDS* در این گیاه است. در تحقیق مشابهی در مورد گیاه گلایول، در گیاهان دارای فنوتیپ سفیدشدگی نوری نسبت به گیاهان شاهد، به طور متوسط ۲/۵ برابر کاهش بیان ژن *PDS* مشاهده شده است(Zhong et al., 2014).

نتایج ما برای اولین‌بار نشان داد که VIGS در گیاه تنباکوی زینتی امکان‌پذیر بوده و می‌توان از این روش برای بررسی ژن‌های دخیل در مسیرهای متابولیسمی و نیز ژن‌های دخیل در ویژگی‌های تجاری این گیاه به عنوان یک گیاه زینتی، استفاده کرد.

شکل ۱- بروز علائم سفید شدگی نوری در گیاه تنباکوی زینتی (عکس‌برداری در هفته‌ی سوم پس از تزریق).



شکل۲- تیمارهای مختلف اعمال شده بر گیاه تنباکوی زینتی. A: Mock treatment (IB)، B:pTRV2-empty، C: pTRV2-*PDS*.



شکل۳- بررسی بیان نسبی ژن *PDS* در گیاه تنباکوی زینتی. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح ۵٪ انجام گرفته است. حروف غیر مشترک نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

منابع

1. Goodspeed, T. 1945. Cytotaxonomy of *Nicotiana*. The Botanical Review. 11(10):533-592.
2. Liu, E., and Page, J. E. 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. Plant methods. 4(5): 1-13.
3. Senthil-Kumar, M., Anand, A., Uppalapati, S. R., and Mysore, K. S. 2008. Virus-induced gene silencing and its applications. CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources. 3:1-18.
4. Senthil-Kumar, M., and Mysore, K. S. 2014. Tobacco rattle virus–based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. Nature protocols. 9(7): 1549-1562.
5. Waterhouse, P. M., Wang, M.-B., and Lough, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature. 411: 834-842.
6. Zhang, L., Gase, K., Baldwin, I. T., and Galis, I. 2010. Enhanced fluorescence imaging in chlorophyll-suppressed tobacco tissues using virus-induced gene silencing of the phytoene desaturase gene. Biotechnique. 48(2): 125-129.
7. Zhong, X., Yuan, X., Wu, Z., Khan, M. A., Chen, J., Li, X., Gong, B., Zhao, Y., Wu, J., and Wu, C. 2014. Virus-induced gene silencing for comparative functional studies in *Gladiolus hybridus*. Plant cell reports. 33(2): 301-312.

Study the possibility of *PDS* gene silencing using VIGS method in ornamental tobacco

A.Taheri Dehkordi[1*], A. Khandan-Mirkohi[2], M.Kafi[3], S. A. Salami[4]

1-M.Sc. of biotechnology and molecular genetics of horticultural crops. College of Agriculture & Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran. 2,4- Assistant professor, Dep. Of Horticultural science & landscape, College of Agriculture & Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran. 3- Professor, Dep. Of Horticultural science & landscape, College of Agriculture & Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran.

* Corresponding author: ayat.taheri@ut.ac.ir

Abstract

Virus-indeced gene silencing (VIGS) is a PTGS method used by plants as a defense mechanism against invading viruses. This plant defense strategy has been exploited to develop a method for silencing endogenous target genes in plants. To silence a specific plant gene, a fragment of the target gene is cloned into a modified virus vector and delivered into the plant. Phytoene desaturase (*PDS*) gene encode an important rate-limiting enzyme in the carotenoid biosynthetic pathway. Therefore, the silencing of *PDS* gene and a reduced expression level of the gene can significantly affect the carotenoid content of the plant and finally lead to obvious photobleaching phenotype. In this research, to study the possibility of VIGS for silencing of *PDS* (as a marker gene), homologous silencing technology was used. Plants were injected by silencing constructs, started to show photobleaching phenotype 10 to 12 days after injection. The results showed decreases in the *PDS* gene relative expression levels and the amount of chlorophyll and carotenoids in the leaves of ornamental tobacco have significantly reduced compared to those control plants. This is the first report on silencing of a gene in ornamental tobacco using VIGS and could be used as a powerful approach for silencing and functional analysis of the target genes.

Key words: TRV virus vector, *Agrobacterium tumefaciens*, gene coloning, Relative gene expression, Real-time PCR