ایجاد گیاهان سیب‌زمینی حاوی سازه کایمری القای خاموشی RNA ویروس Y

محمدباقر هزاره[۱]، محمدصادق ثابت[۲*]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[۲*] عضو هیأت علمی گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*نویسنده مسئول: ms.sabet@modares.ac.ir

چکیده

سیب‌زمینی چهارمین محصول غذایی با ارزش جهان می‌باشد. تکثیر غیرجنسی این محصول سبب انتقال آلودگی آن به انواع بیماری‌ها نظیر ویروس می‌شود. یکی از مهم‌ترین ویروس‌ها ویروس Y سیب‌زمینی متعلق به خانواده پوتی ویروس می‌باشد که قریب به ۷۰٪ خسارت وارد می‌کند. تولید واریته‌های مقاوم بهترین راهکار مقابله با ویروس به حساب می‌آید که موفقیت‌آمیز بوده است. استفاده از مکانیسم خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) از جمله راهکارهای موفق محسوب می‌شود. در این تحقیق از سازه‌ی سنجاق‌سری کایمری متشکل از توالی چهار ژن مهم RNA ویروس شامل CI، CP، NIb و HC Pro استفاده شده است. این سازه با استفاده از اگروباکتریوم به گیاه سیب‌زمینی رقم دزیره منتقل گردید. جهت باززایی از سه سطح هورمون زآتین ریبوزاید استفاده گردید نتایج حاصل نشان داد که بین غلظت‌های $3\ mg\ l^{-1}$ و $3/5\ mg\ l^{-1}$ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و غلظت $3\ mg\ l^{-1}$ به عنوان سطح بهینه برای باززایی استفاده گردید. گیاهان سیب‌زمینی تراریخت با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی سازه تأیید گردید.

کلمات کلیدی: **سیب‌زمینی، ویروس Y سیب‌زمینی، PTGS، سازه کایمری**

مقدمه

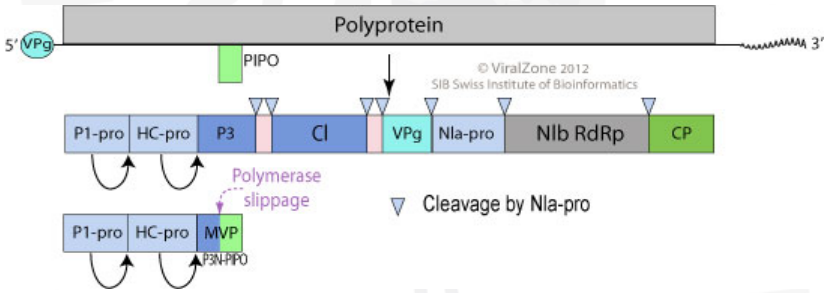
سیب‌زمینی با تولید سالانه بیش از ۳۰۰t میلیون پس از برنج، گندم و ذرت چهارمین محصول غذایی مهم در جهان محسوب می‌شود (Anonymous, 2014). در سال ۲۰۱۴ سطح زیر کشت سیب‌زمینی در ایران حدود ha ۱۶۰۴۳۰ با میزان تولید t ۴۶۴۲۲۴۰ و متوسط عملکرد $29/56\ t\ ha^{-1}$ برآورد شده است که بیشترین میزان تولید این محصول را نسبت به سایر کشورهای منطقه دارا می‌باشد. این در حالی است که متوسط عملکرد این محصول در کشورهای توسعه‌یافته‌ای چون آمریکا در سال ۲۰۱۴ بیش از $47\ t\ ha^{-1}$ گزارش شده است (Anonymous, 2014). سیب‌زمینی معمولاً از طریق غیرجنسی و توسط غده‌های بذری تکثیر می‌گردد (Akita and Takayama, 1994). این روش سبب انتقال انواع بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های ویروسی، قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها می‌شود. به‌علاوه تعداد زیادی از حشرات با تغذیه مستقیم و یا انتقال ویروس‌های بیماری‌زا، سیب‌زمینی را آلوده می‌کنند. ویروس‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا هستند که تولید سیب‌زمینی را در سطح جهانی مورد تهدید قرار می‌دهند. بر اساس گزارش‌ها، سیب‌زمینی به ۴۰ ویروس و دو ویروئید حساس می‌باشد (Jeffries *et al.*, 2005). به‌طور مثال PLRV[۱] می‌تواند عملکرد سیب‌زمینی را تا ۹۰٪ کاهش دهد. سایر بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در مناطق مختلف جهان پخش شده‌اند و توانایی کاهش عملکرد تا بیش از ۴۰٪ توسط PVX، PVV، PMTV[۲]، ۲۰٪ توسط PVS، PVP، AMV[۳] و ۱۰٪ توسط CMV[۴] گزارش شده است (Fuentes and Salazar, 2003). در میان ویروس‌ها

[1] Potato Leaf-Roll Virus; PLRV
[2] Potato Mop-Top Virus; PMTV
[3] Alfalfa Mosaic Virus; AMV
[4] Cucumber Mosaic Virus; CMV

ویروس Y سیب‌زمینی (PVY[5]) به‌عنوان دومین ویروس بااهمیت در سیب‌زمینی پس از PLRV شناخته شده است (Solomon-Blackburn and Barker, 2001) و باوجوداینکه به‌صورت مکانیکی منتقل می‌شود ولی ناقل اصلی آن شته‌ها می‌باشد. در ایران ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) به‌عنوان یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های سیب‌زمینی است که باعث کاهش عملکرد سیب‌زمینی تا ۷۰٪ می‌شود (Pourrahim *et al.*, 2007). علائم بیماری ویروس Y سیب‌زمینی با توجه به نوع ایزوله و واریته سیب‌زمینی بسیار متفاوت است و می‌تواند تحت تأثیر دما و سایر شرایط محیطی متغیر باشد. از علائم معمول می‌توان به موزاییک ملایم در برگ‌ها و نکروزه شدن رگبرگ‌ها و غده‌ها اشاره کرد.

راه‌های کنترل جهت پیشگیری از کاهش عملکرد ناشی از خسارت ویروس‌ها بسیار محدود و هزینه‌بر می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد تولید ارقام مقاوم به‌عنوان اقتصادی‌ترین راهکار جهت کنترل بیماری‌های ویروسی در سیب‌زمینی باشد که از دیدگاه محیط زیست نیز مورد تأیید است (Solomon-Blackburn and Barker, 2001).

ویروس Y سیب‌زمینی با RNA تک رشته مثبت (ssRNA+[6]) از خانواده Potyvirus می‌باشد که همانند همه‌ی RNA ویروس‌های گیاهی از طریق RNA دورشته‌ای تکثیر می‌گردد (Missiou *et al.*,2004). ایزوله‌های مختلفی از این ویروس شناسایی شده است که شامل PVY^{O}، PVY^{N}، PVY^{NTN} و $PVY^{N}W$ می‌باشد (Glais *et al.*,2002). RNA تک‌رشته‌ای ویروس از ۹۷۰۴ نوکلئوتید تشکیل شده است و دارای یک چارچوب قرائت بزرگ می‌باشد که پلی‌پروتئینی با ۱۰ پروتئین عملکردی تولید می‌کند (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) (شکل ۱) که از این بین CI، CP، NIb و HC Pro ژن‌هایی مهم از لحاظ عملکرد هستند و دارای حفاظت‌شدگی بین سویه‌های مختلف می‌باشند (khazaee et al., 2016).



شکل ۱- پلی‌پروتئین حاصل از بیان RNA ویروس Y سیب‌زمینی (Anonymous 2012)

بیان توالی سنس و آنتی‌سنس گرفته شده از ویروس که مسیر خاموشی ژن پس از رونویسی یا PTGS[7] می‌باشد توسط RNA دو رشته‌ای القا می‌شود (Vaucheret *et al.*, 2001). مسیر PTGS یا همان خاموشی RNA یک مکانیسم تخریب توالی mRNA خاص در گیاهان می‌باشد که اثری بر رونویسی ندارد. این‌گونه گمان می‌رود که این مسیر جهت مقاومت در برابر ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها تکامل یافته است (Voinnet, 2001).

تکثیر ویروس از طریق dsRNA سبب فعال شدن مسیر خاموشی به‌صورت سیستمیک در گیاه میزبان می‌شود. هم‌چنین پاسخ میزبان می‌تواند به سبب siRNAهایی باشد که ناشی از بیان توالی‌های dsRNA هستند که به نحوی مکمل هستند (Missiou *et al.*, 2004). بااین‌وجود پروتئین‌های خاصی توسط ویروس رمز می‌شوند و سیستم ضدویروسی گیاه را تضعیف می‌کنند. برخلاف پاسخ ناشی از آلودگی ویروسی، این مسیر تحت تأثیر پروتئین‌های تضعیف‌کننده ویروس که سیستم ضدویروسی گیاه را مورد هدف قرار می‌دهند، قرار نمی‌گیرد. چنانچه ویروس پس از

[5] Potato virus Y; PVY
[6] Positive Single strand RNA; ssRNA
[7] Post Transcription Gene Silencing

فعال شدن مسیر PTGS وارد میزبان شود سریعاً توسط RISC مورد هجوم قرار می‌گیرد. بنابراین بیان dsRNA در مقایسه با بیان رشته سنس یا آنتی‌سنس پاتوژن به‌صورت منفرد اثرگذارتر می‌باشد (Missiou *et al.*, 2004).

در این پژوهش، از سازه سنجاق‌سری کایمری طراحی شده در گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که از مناطق حفاظت‌شده چهار ژن CI، CP، NIb و HC Pro در راستای ایجاد گیاهان سیب‌زمینی مقاوم به سویه‌های مختلف ویروس Y تهیه شده است، استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tubersum* L.) رقم دزیره تهیه شده از موسسه تهیه و اصلاح نهال بذر کرج استفاده شد. رقم دزیره یکی از ارقام مدل سیب‌زمینی و از نخستین ارقامی است که تراریخت شد و دارای زمان باززایی کوتاه می‌باشد. این رقم به بیماری‌های خاص نظیر لکه برگی[8] فوزاریوم مقاومت نشان می‌دهد و علی‌رغم مقاومت نسبی به ویروس‌های مهمی چون PVY، PVX و PVA علائمی از ویروس در آن مشاهده نمی‌شود و به بیماری اسکاب سیب‌زمینی و ویروس PLRV حساس می‌باشد (Anonymous, 2016).

جوانه‌های برگی گیاهان سه تا چهار هفته‌ای حاصل از کشت غده پس از استریل شدن درون لوله آزمایش حاوی محیط جامد و مایع پایه MS (استفاده از پل کاغذی) رشد داده شدند. جهت بستن درب لوله‌ها از پنبه استریل استفاده گردید. پس از گذشت سه تا چهار هفته میانگره‌های گیاهان جهت تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند.

به‌منظور تراریخت نمودن میانگره‌های سیب‌زمینی از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA4404* و *GV3101* استفاده گردید. سازه‌ی کایمری القای خاموشی (FCFP[9]) درون ناقل pART27 تحت راه‌انداز 35S و خاتمه‌دهنده OCS و ژن گزینش‌گر مقاومت به کانامایسین *npt*II از گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس دریافت شد.

جهت دست‌یابی به سطح بهینه هورمون زآتین ریبوزاید (ZR) به‌عنوان یکی از سیتوکنین‌های مهم در باززایی ریزنمونه‌های سیب‌زمینی از سه غلظت ۲/۵ mg l^{-1} و ۳ mg l^{-1} و ۳/۵ mg l^{-1} در محیط باززایی استفاده گردید. تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA[10]) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح هورمونی و دو تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار[11](LSD) بین سطوح هورمون زآتین ریبوزاید در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام گردید.

جهت تراریخت نمودن میانگره‌های سیب‌زمینی، کشت شبانه اگروباکتریوم حاوی ناقل pART27 دارای سازه FCFP درون محیط YEB[12] حاوی ۱۰۰ mg l^{-1} ریفامپیسین و ۵۰ mg l^{-1} کانامایسین، دارای OD_{600} = ۰/۴ -۰/۶ رسوب داده شد. مقدار هم‌حجم محیط القا (محیط MS مایع بدون نمک‌های ماکرو و حاوی استوسرینگون ۲۰ mM) اضافه گردید و به مدت ۱/۵ h در دمای ۲۸ °C و دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت. سپس قطعات میانگره درون محیط القا غوطه‌ور شده و به مدت ۳۰ min در دمای ۲۸ °C و دور ۹۰ rpm قرار گرفت و بعد از تلقیح بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند و پس از انتقال به محیط هم‌کشتی به مدت ۷۲ h در تاریکی و دمای ۲۴ °C قرار داده شدند. قطعات میانگره تلقیح شده از محیط هم‌کشتی خارج و پس از آبشویی با محیط MS مایع حاوی ۲۵۰ mg l^{-1} سفوتاکسیم (جهت حذف تعلیق اگروباکتریوم) و خشک کردن بر روی کاغذ صافی استریل به درون محیط باززایی منتقل و در دمای °C

[8] Leaf Skin
[9] Full Chimeric Fragment of PVY
[10] Analysis of variance
[11] The Least Significant Difference; LSD
[12] Yeast Extract Broth; YEB

۲۴ و دوره نوری ۱۶ h روشنایی و ۸ h تاریکی قرار گرفتند. پس از تعویض محیط باززایی به فاصله هر ۱۴-۱۰ روز، گیاهان باززا شده به درون محیط طویل سازی[1] و ریشه‌دهی منتقل شدند (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب‌های محیط‌های کشت مورد استفاده

Components	Co-Culture	Regeneration	Elongation and Rooting
MS Salts	1X	1X	1X
B5 Vitamins	1X	1X	1X
Adenine Sulphate	40 mg l^{-1}	40 mg l^{-1}	-
Glucose	20 g l^{-1}	20 g l^{-1}	-
Mannitol	20 g l^{-1}	20 g l^{-1}	-
Sucrose	-	-	30 g l^{-1}
GA3	0.05 mg l^{-1}	0.05 mg l^{-1}	-
NAA	0.02 mg l^{-1}	0.02 mg l^{-1}	0.05 mg l^{-1}
ZR	3 mg l^{-1}	3 mg l^{-1}	-
Agar	7.5 g l^{-1}	7.5 g l^{-1}	7.5 g l^{-1}
Cefotaxime	-	500 mg l^{-1}	500 mg l^{-1}
Kanamycin	-	50 mg l^{-1}	-

پس از تهیه محیط pH بر روی ۵/۸ تنظیم شد.

گیاهان پس از ریشه‌دار شدن به درون خاک استریل حاوی پیت ماس و پرلیت با نسبت ۳ : ۱ منتقل شدند و جهت سازگار شدن زیر پوشش نایلونی قرار گرفتند و سپس به‌تدریج جهت سازگاری از زیر پوشش نایلونی خارج شدند.

جهت تأیید تراریختی از برگ‌های بالایی گیاهان باززا شده پنج‌برگی جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای Spro F 5′-TCT GCC GAC AGT GGT CCC AA-3′ که بر روی راه‌انداز 35S قرار دارد و PI-R 5’ TCG TCT TAC ACA TCA CTT GTC ATA TTT TTT TAC ATT ACT ATG TTG 3’ که بر روی اینترون سازه pART27 قرار دارد، انجام شد (جدول ۲)

جدول ۲– برنامه PCR

چرخه	زمان	دما (^oC)	مراحل
۱	۴ min	۹۴	واسرشته‌سازی اولیه
۳۵	۴۵ S	۹۴	واسرشته‌سازی
	۳۰ S	۶۰	اتصال
	۱ min	۷۲	بسط
۱	۱۰	۷۲	بسط نهایی

[1] Elongation [3]

نتایج و بحث

آزمون باززایی

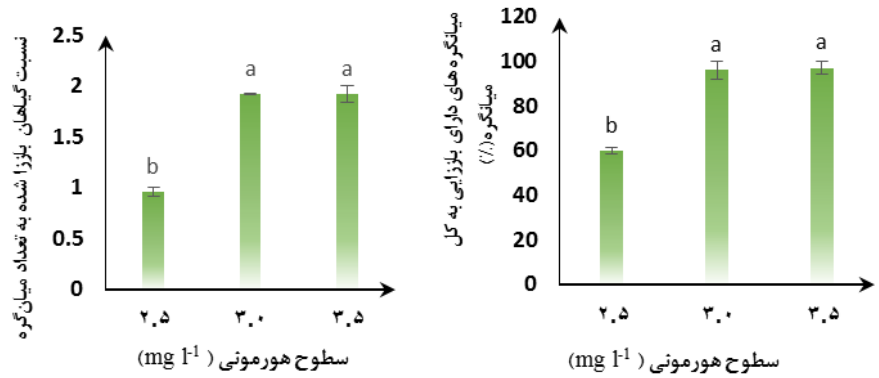
جهت تعیین بهترین غلظت هورمون زآتین ریبوزاید در باززایی میان‌گره‌ها بین سه غلظت استفاده شده (۲/۵، ۳ و ۳/۵ mg l^{-1}) تجزیه واریانس انجام گردید که بین سطوح هورمونی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۳).

جدول۳- تجزیه واریانس سطوح هورمونی زآتین ریبوزاید در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		نسبت میان‌گره‌های باززا شده به تعداد میان‌گره‌ها	نسبت گیاهان باززا شده به کل میان‌گره
سطوح هورمون	۲	۰/۰۸۷۶**	۰/۶۱۴۰**
خطا	۳	۰/۰۰۵۸	۰/۰۰۲۱

** معنی‌دار در سطح ۱٪

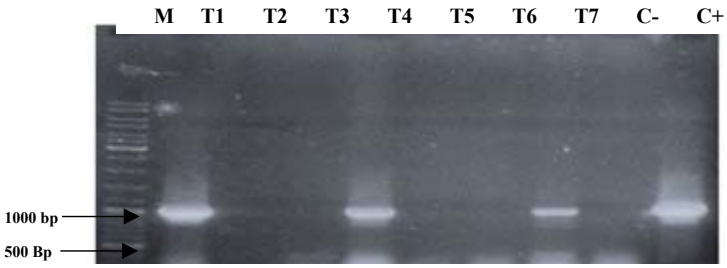
نتایج حاصل از مقایسه میانگین بین سطوح هورمون زآتین ریبوزاید نشان داد که در محیط باززایی غلظت mg l^{-1} ۳ و ۳/۵ mg l^{-1} دارای بیش‌ترین نسبت میان‌گره‌های دارای باززایی به کل میان‌گره‌ها و هم‌چنین بیش‌ترین نسبت گیاهان باززا شده به تعداد میان‌گره بود و از آنجا که بین غلظت ۳ mg l^{-1} و ۳/۵ mg l^{-1} تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد از غلظت ۳ mg l^{-1} به‌عنوان غلظت بهینه استفاده گردید (شکل ۲)



شکل ۲- مقایسه اثر سطوح مختلف هورمونی بر نسبت تعداد میانگره باززا شده به کل میانگره‌ها (سمت چپ) و نسبت گیاهان باززا شده به کل میان‌گره‌ها (سمت راست)

تأیید تراریختی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی گیاهان باززا شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از روی سازه انجام شد و قطعه ۹۴۰ bp مورد انتظار در گیاهان باززا شده تکثیر شد به طوری‌که گیاهان غیرتراریخت فاقد قطعه مذکور بودند و تراریخت بودن گیاهان باززا شده تأیید شد (شکل ۳). در مجموع تعداد پنج گیاه تراریخت حاوی سازه FCFP بدست آمد که در واکنش PCR تأیید گردیدند.



شکل ۳- قطعه حاصل از تکثیر PCR گیاهچه‌های باززا شده ، M نشانگر وزن مولکولی DNA شرکت Fermentas (Ladder Mix)، -C و +C به ترتیب گیاه غیرتراریخت و ناقل pART27 حاوی سازه FCFP، T1-T7 گیاهچه‌های باززا شده

برای انتقال ژن به گیاه سیب‌زمینی در اکثر موارد از ریزنمونه‌های برگ و میان گره استفاده می‌شود و استفاده از ریزنمونه‌های میان‌گرهی آسان‌تر از برگ است چرا که ریزنمونه‌های میان‌گرهی به زخمی شدن طی مراحل مختلف کار حساسیت کمتری نشان می‌دهند (Beajean *et al*., 1998). علاوه بر این، تنوع در میان‌گره‌ها در مقایسه با برگ‌ها از اهمیت کمتری برخوردار است و برگ‌های مسن دور از رأس ساقه نسبت به برگ‌های جوان، کمتر به کشت بافت درون شیشه پاسخ نشان می‌دهند (Beajean *et al*., 1998).

جذب نمک‌ها و سایر مواد موجود توسط ریز نمونه‌ها در محیط کشت مایع نسبت به جامد بهتر انجام می‌شود (Mbiyu *et al*., 2012)، بدین ترتیب در تحقیق حاضر از محیط کشت مایع MS به‌منظور رشد بهتر جوانه‌های گرهی استفاده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از سرعت رشد بیش‌تر ریزنمونه‌ها در محیط مایع نسبت به محیط MS جامد بود. همچنین برای محیط طویل سازی و ریشه دهی نیز از محیط کشت مایع استفاده گردید و ریشه دهی نیز در محیط مایع سریع‌تر انجام شد. جهت بهبود ریشه‌دهی نوساقه‌های گیاهان باززا شده انتهای ساقه درون محیط با فویل آلومینیوم پوشیده شد که سبب تاریک شدن و تحریک بیشتر ریشه دهی شد.

وجود گازهای بازدارنده نظیر اتیلن سبب نکروزه شدن مریستم انتهایی[۴]و در نهایت منجر به توقف رشد طولی شده و تحریک به رشد جوانه‌های جانبی خواهد شد که ضعیف شدن گیاه را به دنبال دارد (Vinterhalter *et al.*, 2008) و نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از پنبه بجای درب و پارافیلم علاوه بر کاهش تعریق درون لوله‌های کشت و خروج گازهای بازدارنده از توقف رشد و ضعیف شدن گیاه جلوگیری می‌نماید.

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که مدت زمان تلقیح میانگره‌های سیب‌زمینی با اگروباکتریوم و همچنین OD رشد اگروباکتریوم استفاده شده رابطه مستقیم با میزان آلودگی باقی‌مانده در محیط در مراحل بعد دارد. بدین منظور از زمان ۳۰ min برای تلقیح و ۰/۶ – ۰/۴ = OD استفاده گردید. همچنین نوع سویه استفاده شده باکتری اگروباکتریوم در تلقیح بر شدت آلودگی‌های مراحل بعد مؤثر بود. باتوجه به این‌که کنترل آلودگی سویه *GV3101* نسبت به *LBA4404* در مراحل بعد دشوارتر بود زمان و OD محیط تلقیح نسبت به سویه *LBA4404* پایین‌تر در نظر گرفته شد که این نتایج با برخی از نتایج پیشین مشابهت داشت (Arifi *et al*., 2009; Millam, 2006).

از آنجا که قندهای منوساکارید نظیر گلوکز می‌تواند سبب تحریک T-DNA توسط اگروباکتریوم شود، در محیط‌های القاء، هم‌کشتی و باززایی این تحقیق از قند گلوکز استفاده گردید. آدنین سولفات سبب تحریک نوساقه و جلوگیری از نکروزه شدن مریستم رأسی را سبب می‌شود (Naaz *et al*., 2014)، از این‌رو به‌منظور تحریک تقسیم سلولی، از برهم‌کنش بین قند مانیتول و آدنین سولفات استفاده شد.

[1] Apex Meristem

منابع

Akita, M. and Takayama, S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. Plant Cell Reports; 13(34): 184-187.

Anonymous. 2012. ExPASy Bioinformatics Resource Portal (SIB), ViralZone Potyvirus. Available online at: http://viralzone.expasy.org/; Last Access: December 2016.

Anonymous. 2014. Food and Agriculture Organization (FAO), Statistical databases FAOSTAT. Available online at: http://www.fao.org/faostat; Last Access: December 2016.

Anonymous. 2016. Directorate, Government of Canada,Canadian Food Inspection Agency,Plant Health and Biosecurity. "Desiree". www.inspection.gc.ca; Retrieved 2016-12-02

Arifi, M., Thoma, P. E., M., C. J. and Brown, C. R. 2009. Agrobacterium- mediated transformation of potato using PLRV-RE and PVY CP genes and assessment of replicase mediated resistance against natural infection of PLRV. Pakistan Journal of Botany; 41: 1477-1488.

Beaujean, A., Sangwan, R. S., Lecardonnel, A. and Sangwan-Norreel, B. S. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany; 49(326): 1589-1595.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature; 409(6818): 363-366.

Chetty, V. J., Narváez-Vásquez, J. and Orozco-Cárdenas, M. L. 2015. Agrobacterium Protocols. New York . Springer; pp. 85-96.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. Genes and Development; 15(2): 188-200.

Fuentes, S. and Salazar, L. 2003. First report of Sweet potato leaf curl virus in Peru. Plant Disease; 87(1): 98-98.

Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. Archives of Virology; 147(2): 363-378.

Jeffries, C., Barker, H. and Khurana, S. 2005. Potato viruses (and viroids) and their management. Potato production, improvement and post-harvest management. The Haworth's Food Products Press; New York.

Khazaee, S., Sabet, MS. and Shams-Bakhsh, M. 2016. Multi-Gene Silencing: an Effective Approach in Resistance Engineering against Potato Virus Y, Submitted in Molecular Breeding 2016.

Mbiyu, M., Muthoni, J., Kabira, J., Muchira, Ch., Pwaipwai, P., Ngaruiya, J., Onditi, J. and Otieno, S. (2012) "Comparing liquid and solid media on the growth of plantlets from three Kenyan potato cultivars." American Journal of Experimental Agriculture **2**(1), 81-86

Millam, S. 2006. Potato (*Solanum tuberosum* L.). In K. wang (Ed.), Methods in Molecular Biology. **2**: 25-35

Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. and Tsagris, M. (2004). Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. Molecular Breeding; 14(2): 185-197.

Naaz, A., Shahzad, A. and Anis, M. 2014. Effect of Adenine Sulphate Interaction on Growth and Development of Shoot Regeneration and Inhibition of Shoot Tip Necrosis Under In Vitro Condition in Adult *Syzygium cumini* L. a Multipurpose Tree. Applied Biochemistry and Biotechnology; 173(1), 90-102.

Pourrahim, R., Farzadfar, S., Golnaraghi, A. and Ahoonmanesh, A. 2007. Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. Plant Disease; 91(5): 609-615.

Solomon-Blackburn, R.M. and Barker, H. 2001. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. Heredity; 86(1): 8-16.

Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. and Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research; 74(1): 157-175.

Vaucheret, H., Béclin, C. and Fagard, M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. Journal of Cell Science; 114(17), 3083-3091.

Vinterhalter, D., Dragicevic, I. and Vinterhalter, B. 2008. Potato *in vitro* culture techniques and biotechnology. Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology; 22(1): 16-45.

Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. TRENDS in Genetics; 17(8): 449-459.

Generation of Potato Plants Contain Chimeric-Gene Construct Inducing Silencing Against Virus Y

Mohammad Bagher Hezareh[1], Mohammad Sadegh Sabet[2]*
[1] Department of Plant Breeding Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2*] Department of Plant Breeding Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
*Corresponding Author: ms.sabet@modares.ac.ir

Abstract

Potato is the world's fourth most important food crop. The asexual propagation of this crop causes transmission of disease such as virus infection. PVY is one of the most important viruses belongs to Potyvirus family and causes nearby 70% reduction in potato yield. Generation of resistant varieties is the best strategy to overcome viral infections. Post transcriptional gene silencing (PTGS) is a natural defense mechanism against viruses. In this study, we used the chimeric-genes hairpin construct consist PVY sequences of four key genes CI, CP, NIb and HC Pro. The construct was transformed to potato genome var. Desiree via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Three levels of Zeatin Riboside (ZR) were examined to obtain the most explant regeneration rate. Our results showed no significant difference between 3 and 3.5 mg l^{-1} of ZR, so 3 mg l^{-1} of this hormone was used for explants regeneration and further study. The presence of RNA silencing construct was confirmed in regenerated plants using PCR with specific primers.

***Keywords*: Potato, PVY, PTGS, Chimeric-gene**