مطالعه کارایی سازه‌ی کایمری القای خاموشی RNA بر میزان تکثیر ویروس Y سیب‌زمینی از طریق بیان موقت

محمدباقر هزاره[۱]، محمدصادق ثابت*[۲]

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

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

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

چکیده

ویروس Y سیب‌زمینی دومین ویروس مهم سیب‌زمینی پس از ویروس PLRV می‌باشد. مقاومت برگرفته‌شده از پاتوژن (PDR) رویکردی نوین جهت ایجاد گیاهان مقاوم در برابر ویروس‌ها می‌باشد. مسیر خاموشی RNA یا همان خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) راهکاری جهت مقابله با ویروس است. ویروس Y سیب‌زمینی یکی از مهم‌ترین ویروس‌های سیب‌زمینی و از جنس Potyvirus می‌باشد. در این تحقیق از یک سازه سنجاق‌سری چندژنی (FCFP) استفاده شده است. به‌منظور ارزیابی اولیه کارایی سازه در خاموشی RNA ویروسی، این سازه به‌صورت موقت با استفاده از اگروباکتریوم در گیاه توتون بیان شد. پس از گذشت چهار روز از تزریق سازه‌ی FCFP، مایه‌زنی با ویروس Y سیب‌زمینی انجام گردید. شش روز پس از مایه‌زنی با ویروس نمونه‌برداری جهت آنالیز مقاومت صورت گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های بیانی، حاکی از کاهش معنی‌دار حضور و تکثیر ویروس در گیاهان آلوده به ویروس تحت تیمار سازه FCFP نسبت به گیاهان شاهد بود.

واژگان کلیدی: **مقاومت مشتق شده از پاتوژن، PTGS، ویروس Y سیب‌زمینی، سازه کایمری، بیان موقت و توتون**

مقدمه

ویروس Y سیب‌زمینی[۱] متعلق به جنس Potyvirus و خانواده Potyviridae دومین ویروس مهم در سیب‌زمینی پس از PLRV و با خسارتی معادل ۷۰ ٪ است. این ویروس برای اولین بار توسط Smith در سال 1931 گزارش شد (Petrov *et al.*, 2015). ویروس Y سیب‌زمینی با RNA تک رشته مثبت (ssRNA+)[۲] همانند همه‌ی RNA ویروس‌های گیاهی از طریق RNA دورشته‌ای (dsRNA) تکثیر می‌گردد (Missiou et *al.*,2004). سویه‌های 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 تک رشته‌ای این 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).

مقاومت مشتق شده از پاتوژن (PDR)[۳] رویکرد جدیدی برای تولید گیاهان مقاوم به ویروس حاصل آورده است که با استفاده از عناصر ژنتیکی نظیر عناصر رمز شونده و غیر رمز شونده‌ی پاتوژن سبب ایجاد مقاومت در گیاهان حساس می‌شود (Gottula and Fuchs, 2009). یکی از راهکارهای مؤثر گیاهان از آن در جهت حفظ خود در برابر حملات ویروسی استفاده از مسیر خاموشی RNA می‌باشد که نوعی خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS)[۴] است. در

[1] Potato Virus Y; PVY
[2] Positive Single strand RNA; ssRNA
[3] Pathogen-Derived Resistance; PDR
[4] Post Transcrtiptional Gene Silencing; PTGS

هنگام تکثیر ویروس با استفاده از آنزیم RdRP حاصل از بیان ژن NIb RdRP ژنوم ویروس و برخی از اجزای ماشین رونویسی میزبان (Anonymous, 2008)، سیستم خاموشی گیاه RNA دو رشته‌ای ویروس را شناسایی کرده و سبب تجزیه آن می‌شود و گیاه از آلودگی ویروس در امان می‌ماند. پژوهشگران بیوتکنولوژی بر پایه این مکانیسم توانسته‌اند مقاومت به ویروس را در محصولات کشاورزی ایجاد کنند. گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که سازه‌هایی با توالی معکوس که RNA مکمل خود (RNA سنجاق سری) را رمز می‌کند قادرند مسیر خاموشی RNA را به‌طور مؤثر القا کنند. مسیر PTGS یک مکانیسم تخریب توالی mRNA اختصاصی در گیاهان می‌باشد که اثری بر فرآیند رونویسی ندارد. به نظر می‌رسد این مسیر جهت مقاومت در برابر ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها تکامل یافته است (Voinnet, 2001).

در پژوهش حاضر، از سازه سنجاق سری کایمری طراحی شده در گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که از توالی چهار ژن CI، CP، NIb و HC Pro به‌منظور القای مقاومت به ویروس Y طراحی شده است، استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی و ارزیابی میزان مقاومت القایی توسط سازه خاموشی FCFP[5] از گیاه توتون (*Nicotiana Benthamiana*) استفاده شد. این رقم میزبان مناسبی جهت مطالعه‌ی پاسخ گیاه-پاتوژن بوده و به‌طور گسترده در پژوهش‌های ویروس شناسی مورد استفاده قرار گرفته است. این رقم به بسیاری از پاتوژن‌های دیگر گیاهی حساس بوده و قابلیت تراریختی بالایی دارد (Goodin *et al.*, 2015).

بذور گیاه توتون درون خاک با بافت نرم کشت شد و پس از سه روز قرار دادن در دمای ۴ °C به اتاق رشد با دمای ۲۴ °C و دوره نوری ۱۶ h روشنایی و ۸ h تاریکی قرار داده شد.

به‌منظور بیان موقت سازه خاموشی FCFP از روش Agroinfilteration و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه *GV3101* استفاده گردید. سازه‌ی خاموشی FCFP در ناقل pART27 تحت راه‌انداز CaMV 35S و خاتمه‌دهنده OCS و ژن گزینش‌گر مقاومت به کانامایسین *npt*II از گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس دریافت شد. برای کنترل نیز از ناقل خالی pART27 استفاده گردید.

جهت Agroinfilteration گیاهان توتون، کشت شبانه اگتروباکتریوم حاوی ناقل pART27 دارای سازه FCFP و هم چنین اگروباکتریوم حاوی ناقل pART27 بدون سازه FCFP در محیط YEB[6] حاوی ۱۰۰ mg l^{-1} ریفامپیسین و ۵۰mg l^{-1} کانامایسین با OD_{600} = ۰/۲ رسوب داده شد. مقدار هم‌حجم از بافر تزریق (جدول ۱) همراه با استوسیرینگون ۲۰ mM به رسوب اضافه گردید و به مدت ۲ h در دمای ۲۸ °C و دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت.

جدول ۱- ترکیبات بافر تزریق

غلظت	ترکیبات
۱۰ mM	$MgCl_2$
۱۰ mM	MES[7]
۳۰ ml	حجم کل

[5] Full Chimeric Fragment of PVY; FCFP
[6] Yeast Extract Broth; YEB
[7] 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate

تعداد نه گیاه توتون که به سن پنج‌برگی کامل رسیده بودند جهت تیمار با ناقل pART27+FCFP مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی اثر ناقل تعداد پنج گیاه توسط اگروباکتریوم حاوی ناقل pART27 تیمار شدند. هم‌چنین تعداد دو گیاه توسط بافر تزریق به‌تنهایی تیمار گردیدند و یک گیاه بدون تزریق به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. هم‌چنین Agroinfilteration توسط سرنگ انسولین بدون سوزن در پشت دومین برگ کامل از طوقه گیاهان انجام گرفت.

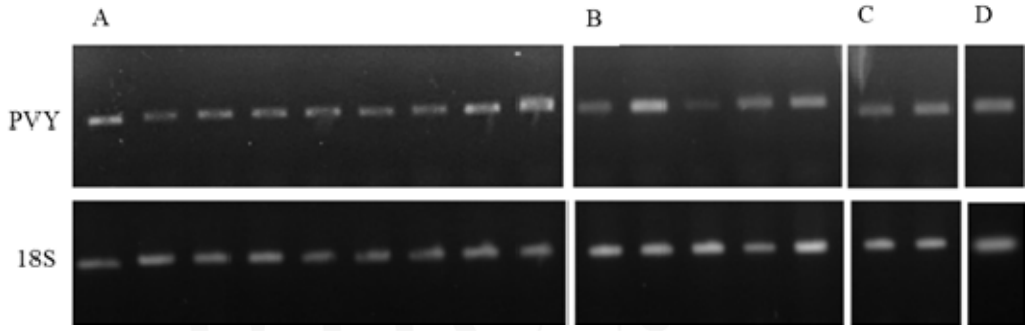
پس از گذشت چهار روز از تیمار، مایه‌زنی با ویروس PVY به برگ تیمار شده با استفاده از بافر فسفات و پودر کاربراندوم انجام شد. پس از گذشت شش روز از مایه‌زنی نمونه‌برداری از برگ بالایی با موقعیت یکسان در تمامی نمونه‌ها انجام گرفت.

استخراج RNA از نمونه‌های برگی و با استفاده از کیت Topaz انجام شد. بر روی RNA استخراجی تیمار *DNase* I انجام شد و سپس سنتز cDNA با استفاده از آنزیم شرکت سیناکلون و آغازگرهای تصادفی Hexamer انجام شد.

جهت بررسی میزان حضور ویروس از واکنش RT-PCR نیمه کمی[8]با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ویروس PVY و آغازگرهای ژن 18S به‌عنوان ژن رفرنس انجام شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Total Lab کمی‌سازی شدند. سنجش میزان حضور و تکثیر RNA ژنومی PVY در نمونه‌ها نسبت به ژن RNA ریبوزومی 18S صورت گرفت. تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل (CRD[9]) انجام گرفت و مقایسات میانگین با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < 0.01$ انجام شد.

نتایج و بحث

به‌منظور تشخیص غلظت cDNA سنتز شده واکنش PCR با آغازگرهای 18S انجام شد. cDNA تمامی نمونه‌ها بر اساس شدت باند 18S نرمال‌سازی و هم‌غلظت گردیدند. بر اساس نتایج نرمال‌سازی ژن رفرنس 18S واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس PVY انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱- RT-PCR نیمه کمی گیاهان توتون آلوده به PVY با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس PVY و 18S: (A) گیاهان توتون حاوی سازه pART27+FCFP، (B) گیاهان توتون حاوی ناقل pART27 بدون سازه FCFP، (C) گیاهان توتون حاوی بافر تزریق، (D) گیاهان توتون آلوده به ویروس PVY (شاهد)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین میزان حضور و تکثیر ویروس PVY در تیمارهای گیاه توتون حاوی سازه FCFP آلوده شده با ویروس PVY و شاهدهای مختلف بود (جدول ۳).

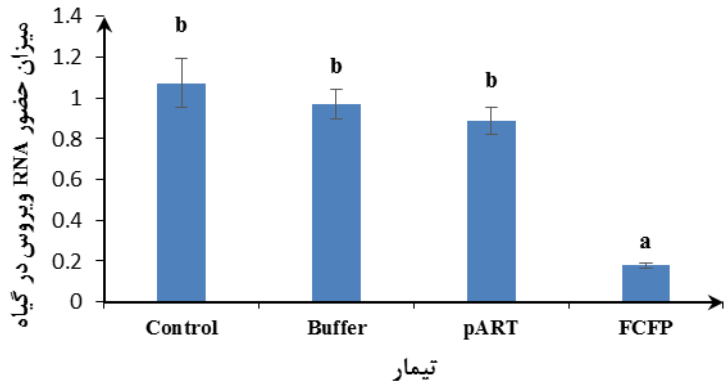
[8] Semi Quantitative RT PCR
[9] Completely Randomized Design; CRD

جدول ۳- تجزیه واریانس بین تیمارهای مختلف حاوی سازه FCFP و بدون سازه (شاهد)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۰/۴۰۶**
خطا	۴	۰/۰۰۸

** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱

نتایج حاصل از مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف به روشنی حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمار گیاه توتون حاوی سازه FCFP و دیگر گروه تیماری (شاهد) مشاهده بود (شکل ۲).



شکل ۲- میزان حضور ویروس در گیاهان توتون تحت تیمار: گیاهان توتون آلوده به ویروس PVY (Control)، آلوده به PVY در تیمار با بافر تزریق بدون سازه FCFP (Buffer)، آلوده به PVY در تیمار با pART27+FCFP (pART) و آلوده به PVY در تیمار با سازه pART27+FCFP

نتایج حاصل از مقایسه میانگین کاهش چشمگیر میزان ویروس در تیمار حاوی pART27+FCFP را نشان داد که حاکی از بیان سازه خاموشی FCFP و عملکرد siRNAهای حاصل از بیان این سازه می‌باشد. بیان سازه در تیمار FCFP گیاهان توتون سبب کاهش حدود ۸۰ ٪ تکثیر ویروس PVY نسبت به میزبان گردید.

در پژوهش حاصل از Jiang و همکاران (2011) که با استفاده از ۱۶ سازه طراحی شده از مناطق مختلف ژن پروتئین پوششی ویروس (CP) انجام شد، نشان داد که siRNAهای با منشأ مختلف تأثیر بسزایی در فعال بودن آن‌ها دارد. در این پژوهش با استفاده از سازه طراحی شده از ناحیه نزدیک به انتهای ´3 ژن CP مقاومتی نزدیک به ۷۸ ٪ القا گردید (Jiang *et al*, 2011).

استفاده از RNA دو رشته‌ای با منشأ ویروس قادر به القای مقاومت نسبت به آلودگی‌های ویروسی از طریق مکانیسم خاموشی RNA می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Bai و همکاران (2009) انجام گرفت با استفاده از سازه خاموشی ترکیبی حاصل از توالی ژن پروتئین پوششی ویروس PVX و توالی ژن NIb ویروس PVY گیاهان سیب‌زمینی مقاوم به دو ویروس PVX و PVY تولید شد که مقاومت کاملی در مقابل دو ویروس از خود نشان دادند (Bai *et al.*, 2008).

منابع

Anonymous. 2008. ExPASy Bioinformatics Resource Portal (SIB), ViralZone Potyvirus. Available online at: http://viralzone.expasy.org/ Last Access: December 2016.

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(5): 543-548.

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 PVYO and PVYN isolates. Archives of Virology; 147(2): 363-378

Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. and Lommel, S. A. 2015. Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. Molecular plant-microbe interactions: MPMI; 91 (1): 28.

Gottula, J. and Fuchs, M. 2009. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. Advances In Virus Research; 75**:** 161-183.

Jiang, F., Wu, B., Zhang, C., Song, Y., An, H., Zhu, C. and Wen, F. 2011. Special origin of stem sequence influence the resistance of hairpin expressing plants against PVY. Biologia Plantarum; 55(3): 528-535.

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.

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.

Petrov, N., Stoyanova, M., Andonova, R. and Teneva, A. 2015. Induction of resistance to potato virus Y strain NTN in potato plants through RNAi. Biotechnology and Biotechnological Equipment; 29(1): 21-26.

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

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

Efficiency of Chimeric Construct Inducing RNA Silencing against Potato Virus Y through Transient Expression

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 virus Y (PVY) belongs to Potyvirus genus is the most important virus in *Solanacea* family after PLRV. Pathogen derived resistant (PDR) is a new approach to generate resistant plants against viruses. The RNA silencing pathway, termed post-transcriptional gene silencing (PTGS) is the plant strategy to overcome viruses.. In this study, a hairpin construct contain multi-gene fragments (FCFP) was used and expressed transiently in *Nicotiana Benthamiana* using *A. tumefaciens* to estimate construct efficiency. The plants were inoculated by PVY after 4 days of Agroinfiltration. The inoculated leaves were sampled after six days. Our results showed a significant reduction of PVY RNA in plants treated by FCFP construct versus other control plants.
***Keywords*: PDR, PTGS, PVY, Chimeric Construct, Transient Expression and Tobacco**