Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 2, Summer 2022 (351-369)
DOI: 10.22059/ijhs.2021.298680.1775

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۳، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۴۰۱ (ص ۳۶۹-۳۵۱)

نشریه پژوهشی:

تهیه سازه برای ایجاد مقاومت همزمان به سه ویروس PLRV، PVX و CMV در سیب‌زمینی از طریق RNA Silencing

مونا بردبار[۱]، رضا درویش‌زاده[۲*] و مقصود پژوهنده[۳]
۱ و ۲. کارشناسی ارشد و استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۳)

چکیده
سیب‌زمینی در جهان از نظر تولید پس از گندم، برنج و ذرت در جایگاه چهارم اهمیت قرار دارد. به دلیل تکثیر رویشی، ویروس‌ها از عوامل بیماریزای مهم در سیب‌زمینی محسوب می‌شوند. در گیاهان، خاموشی RNA یک ساز و کار دفاعی علیه ویروس‌هاست. تحقیقات زیادی برای ایجاد مقاومت به ویروس‌ها با خاموش کردن ژن‌های خاص آنها صورت گرفته است، اما در نهایت به خاطر فعالیتِ پروتئین‌های ویروسیِ ممانعت کننده از خاموشیِ RNA، مقاومت گیاه شکسته شده و ویروس قادر به تکثیر و ایجاد خسارت می‌شود. هدف از این تحقیق ایجاد مقاومت هم‌زمان برای سه ویروس مهم PLRV، PVX و CMV در سیب‌زمینی است. قطعاتی از ژن‌های پروتئین‌های سرکوبگر خاموشی RNA در ویروس‌های فوق، به ترتیب *P0*، *P25* و *2b* به کمک PCR با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و به هم متصل شدند. قطعه نوترکیب ساخته شده در داخل پلاسمید pFGC5941 در جهت سنس و آنتی‌سنس در دو طرف اینترون تحت پروموتر 35S بصورت تولید کننده RNA با ساختار سنجاق‌سری قرار گرفت. قسمت T-DNA پلاسمید حاصل به کمک آگروباکتریوم به سیب‌زمینی رقم آگریا انتقال یافت. لاین‌های تراریخته به‌دست‌آمده به‌منظور تأیید حضور ترانس‌ژن، توسط PCR بررسی شدند و لاین‌های تراریخته انتخاب و تکثیر یافتند. در ادامه تحقیق قرار است مقاومت لاین‌های منتخبِ تراریخته به سه ویروس سنجیده شود.

واژه‌های کلیدی: **خاموشی ژن، گیاهان تراریخته، همسانه‌سازی، مقاومت به بیماری، ویروس‌های گیاهی.**

Preparation of a construct to establish simultaneous resistance against three PLRV, PVX and CMV viruses in potato by RNA silencing method

Mona Bordbar[1], Reza Darvishzadeh[2*] and Maghsoud Pazhouhandeh[3]
1, 2. M. Sc. and Professor, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahid Madani University, Tabriz, Iran
(Received: Mar. 11, 2020- Accepted: Oct. 25, 2021)

ABSTRACT
Potato is the world's fourth-largest food crop after maize, wheat, and rice. Potato is seriously affected by both single and mixed viral infections because of vegetative propagation. In plants, RNA silencing is a protective mechanism against viral infections. Some researchers have been used RNA silencing technique to silence viral genes, but ultimately, due to the activity of viral RNA silencing-suppressor proteins, the resistance of plants is broken down and the virus can replicate and make the damage. The purpose of this study was to provide simultaneous resistance to three important viruses including Potato X Virus, Potato Leafroll Virus, and Cucumber Mosaic Virus. From genes corresponding to proteins of suppressoer of RNA silencing in these viruses (*P0*, *P25* and *2b*, respectively), a fragment was amplified with specific primers by PCR and ligtaed to each other. The recombinant final fragment was cloned in the form of sense and antisense orientations with an intron between them, in pFGC5941 plasmid under 35S promoter to produce a hairpin RNA after transcription in plant. The T-DNA of recombinant hairpin vector was transformed into potato (cv. Agria) genome by *Agrobacterium*. The obtained transgenic plants were screened by PCR to confirm the presence of the transgenes. The resistance of selected tansgenic lines will be assessed against three viruses.

Keywords: Cloning, disease resistance, gene silencing, plant virus, transgenic plants.

* Corresponding author E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

در بین تهدیدهای نوظهور برای تولید محصولات کشاورزی در جهان، ویروس‌ها جایگاه ویژه و مهمی دارند. سیب‌زمینی به خاطر تکثیر رویشی، مستعد حمله و انباشت بیش از ۴۰ گونه ویروس مختلف و دو ویروئید هست (Jeffries *et al.,* 2006)، که از ناحیه‌ای به ناحیه دیگر یا از کشوری به کشور دیگر اهمیت اقتصادی آنها متفاوت‌اند. کاهش محصول در سیب‌زمینی در اثر ابتلا به بیماری‌های ویروسی مختلف بین ۱۰ تا ۶۰٪ تخمین زده می‌شود (Chaube *et al.,* 2005). در کل ویروس‌های RNAدار مثل ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV: Potato leafroll virus، جنس *Polerovirus*)، ویروس X سیب‌زمینی (PVX: Potato virus X، جنس *Potexvirus*) و ویروس موزاییک خیار (CMV: Cucumber mosaic virus، جنس *Cucumovirus*) خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی روی سیب‌زمینی ایجاد می‌کنند (Fletcher, 2012; Hameed *et al.,* 2014). ویروس‌های سیب‌زمینی هم به‌صورت تکی و هم گروهی باعث ایجاد خسارت می‌شوند (Hameed *et al.,* 2014). وقتی گیاه به‌صورت گروهی مورد هجوم ویروس‌ها قرار می‌گیرد شاخص و شدت بیماری بسیار بیشتر دیده می‌شود (Syller, 2012). به‌عنوان نمونه در صورت آلودگی تنها با PVX، کاهش محصول بین ۱۵-۳۰٪ ولی در صورت آلودگی با چندگونه ویروس، مثلاً ویروس‌های X و Y سیب‌زمینی (PVY: Potato virus Y) خسارت تا ۵۵٪ افزایش می‌یابد (Gonzalez-Jara *et al.,* 2004; Mascia *et al.,* 2010; Bortolamiol *et al.,* 2007; Srinivasan & Alvarez, 2007; Tollenaere *et al.,* 2016).

تاکنون در گیاهان زیادی از جمله گیاه توتون ژن CMV 2b (Koizumi *et al.,* 2017)، ژن‌های ۱a، ۲a، ۲b، ۳a و CMV CP (Miao *et al.,* 2016)، ژن 2b CMV و ژن‌های AC2، AC4 و AV2 Tomatobegomo viruses (Sharma *et al.,* 2015)، ژن‌های CP و CMV 2b و ژن‌های CP و HC-Pro ویروس Y سیب‌زمینی (Xie *et al.,* 2014)، ژن CP Watermelon silver mottle virus (WSMOV)، CMV و WMV Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) (Lin *et al.,* 2012)، ژن رپلیکاز CMV و ژن پروتئین حرکتی TMV (Hu *et al.,* 2011)، ژن 2b/2a و ناحیه ۳′ CMV UTR (Zhang *et al.,* 2011)، ژن CMV CP در گیاه فلفل (Lee *et al.,* 2011)، ژن‌های P3، HC-Pro، P1، NIb، NIa، Vpg، CIو CP ویروس Y سیب‌زمینی (Chen *et al.,* 2010)، ژن پروتئین 126KDa ویروس موزاییک توتون (TMV) (Zhao *et al.,* 2006)، ژن‌های P1 و HC-Pro ویروس آبله آلو (Di Nicola-Negri *et al.,* 2005)، بخشی از ژن کدکننده پوشش پروتئینی ویروس CTV (Rezazadeh *et al.*, 2017) برای ایجاد مقاومت استفاده شده است.

گیاهان به‌طور طبیعی دارای سازوکار خاموشی ژن هستند که برای دفاع علیه ویروس‌ها استفاده می‌کنند (Moissiard & Voinnet, 2004). در مقابل، بسیاری از ویروس‌های گیاهی با بیان پروتئین هایِ سرکوبگرِ خاموشی ژن سیستم دفاعی گیاه را سرکوب می‌کنند (Matzke *et al.,* 2001). مولکول القاء کننده خاموشی ژن، یک RNA دو رشته‌ای است که برای تهیه این القاگر با ساختار سنجاق‌سر (hpRNA: Hairpin RNA) می‌توان از رشته‌های سنس (Sense) و یا آنتی سنس (Antisense) ژنوم ویروس استفاده کرد. در مکانیسم خاموشی RNA (RNA silencing)، RNA دو رشته‌ای توسط آنزیم Dicer، به RNAهای دو رشته‌ای کوچک نام siRNA (Short interference RNA) می‌شکند. siRNAها داخل کمپلکس چند پروتئینی RISC (RNA-induced silencing complex) قرار می گیرند. سپس رشته آنتی سنس siRNAها، این کمپلکس را به سمت RNA ویروسیِ مکمل با آن هدایت می‌کنند. در این صورت آنزیم Argonaut که عضوی از کمپلکس RISC است سبب شکست در RNA ویروسی می‌گردد و بدین ترتیب از تکثیر و توسعه ویروس جلوگیری می‌شود.

از آنجایی که سمّی برای مقابله با ویروس‌های گیاهی وجود ندارد، تولید ارقام مقاوم یکی از بهترین راهکارها برای پیشگیری از توسعه بیماری‌های ویروسی است. در مطالعات قبلی از سال ۱۹۸۵ تاکنون، غالباً با بیان قطعه کامل cDNA (Complementary DNA) یکی از

پروتئین‌های ویروس در گیاه میزبان، سعی بر ایجاد گیاه مقاوم به ویروس شده است (Lecoq *et al.,* 1991)، اما فناوری خاموشی ژن بعد از نسخه‌برداری (PTGS: Post transcriptional gene silencing) و کشف RNAهای دو رشته‌ای در گیاهان (Moissiard & Voinnet, 2004)، این امکان را به محققان داده است که به‌جای بیان یک پروتئین جدید به خاموشی بیان ژن مورد نظر در میزبان بپردازند (Zaitlin, 1976; Covey *et al.,* 1997; Ratcliff *et al.,* 1997; Ratcliff *et al.,* 1999; Lin *et al.,* 2007). خاموش کردن ژن از طریق القای تولید RNA سنجاق سر (Hairpin RNA) در سلول‌ها نسبت به روش حفاظت تقاطعی، که دارای معایبی همچون تولید نژاد بیماری‌زا در اثر جهش نژاد ضعیف می‌باشد، قطعاً بهتر و کم‌خطرتر هست و همچنین در این روش مشکلات تولید پروتئین‌های تراریخت در گیاهان (مانند پروتئین پوششی) نیز وجود نخواهد داشت. اخیراً از روش‌های فیزیکی مثل استفاده از نانوذره‌ها یا پپتیدهای حامل برای انتقال dsRNA به داخل سلول استفاده می‌شود که کارایی بالایی در تحریک مکانیسم RNAi در گیاهان بر علیه ویروس‌ها، ویریون‌ها، نماتدها، قارچ‌ها و حشرات دارد (Dalakouras *et al.,* 2020). به عنوان مثال از نانوساختارهای DNA مانند 3D tetrahedron و دم سنجاق سری 1D و 1D nanostring برای تسهیل تحویل و عملکرد بیولوژیکی siRNAهای ۲۱ نوکلئوتیدی GFP در برگ‌های *Nicotiana benthamiana* استفاده شده است (Zhang *et al.,* 2019). در این مطالعه سعی شده است که با تولید ساختار RNA سنجاق سری از ژن‌های سرکوبگر خاموشی ویروس‌های PLRV، PVX و CMV یعنی *P0* (Pazhouhandeh *et al.,* 2007)، *P25* (Baulcombe *et al.,* 2010) و *2b* (Gellért *et al.,* 2012) بتوان مقاومت همزمان در سیب‌زمینی علیه این سه ویروس ایجاد نمود. اکثر ویروس‌های گیاهی از جمله PLRV، PVX و CMV ویروس‌های RNAدار تک رشته‌ای مثبت هستند.

مواد و روش‌ها

تکثیر قطعات مورد نیاز از ژن‌های *P0*، *P25* و *2b*

با انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase chain reaction: PCR) با آغازگرهای هم پوشان (Overlap) اختصاصی (جدول۱)، قطعه‌ای از هر یک از ژن‌های؛ Po در ویروس PLRV، *P25* در ویروس PVX و *2b* در ویروس CMV به ترتیب بطول ۳۳۰، ۱۷۰ و ۲۷۴ جفت باز تکثیر شدند. آغازگر Forward external *P0* XbaI/XhoI به عنوان آغازگر رو به جلو (Forward) و Revers overlap *P25 P0* به عنوان آغازگر رو به عقب (Reverse) برای ژن *P0* و آغازگر Forward overlap *P0 P25* به عنوان آغازگر رو به جلو و Revers overlap *2b P25* به عنوان آغازگر رو به عقب برای ژن *P25* و Forward overlap *P25 2b* به عنوان آغازگر رو به جلو و Revers external *2b* NcoI/BamHI به عنوان آغازگر رو به عقب برای ژن *2b* استفاده شدند.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. The sequences of primers used in the present study.

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Primer name	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
P0	Forward: AATCTAGACTCGAGCAGGATTTCAACATCCG Reverse: ATGTAGGGTGTCTGAGGATCTGCTGATAATTGCCCATAA	Forward external P0 *XbaI*/*Xho*I Reverse Overlap P25 P0	61	330
P25	Forward: TTATGGGCAATTATCAGCAGATCCTCAGACACCCTACAT Reverse: TCATTGCACCTACGTTCAATTCAAAAAGTGCCTGGTATGT	Forward Overlap P0 P25 Reverse Overlap 2b P25	63	170
2b	Forward: TCATACCAGGCACTTTTTGAATTGAACGTAGGTGCAATGA Reverse: AAGGATCCATGGATGGTCTTCCGCCGATAAC	Forward Overlap P25 2b Reverse external 2b *Nco*I/*Bam*HI	62	274
P0+P25+2b (Sense)	Forward: AATCCCACTATCCTTCGCAAGACC Reverse: CTTTCTACCTTCCCACAATTCGTCG	pFGC5941 Fext pFGC5941 Rint	56	995
2b+P25+P0 (Antisense)	Forward: CAGACAGATGTTTCCCAGCGAG Reverse: AAACCGGCGGTAAGGATCTGAG	pFGC5941 Fint pFGC5941 Rext	54	1547

bp: base pair.

پلاسمید pGBKT7-*P0* جهت تکثیر قطعه‌ی ۳۳۰ جفت بازی از ژن *P0* و پلاسمید pPVX جهت تکثیر قطعه ۱۷۰ جفت بازی از ژن *P25* به‌عنوان الگوی PCR استفاده شدند (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). برای جداسازی ژن سرکوبگرِ خاموشی متعلق به ویروس CMV از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده آلوده، استخراج RNA انجام گرفت. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت Superscript III انجام و با استفاده از آغازگرهای همپوشان قطعه‌ی *2b* تکثیر شد.

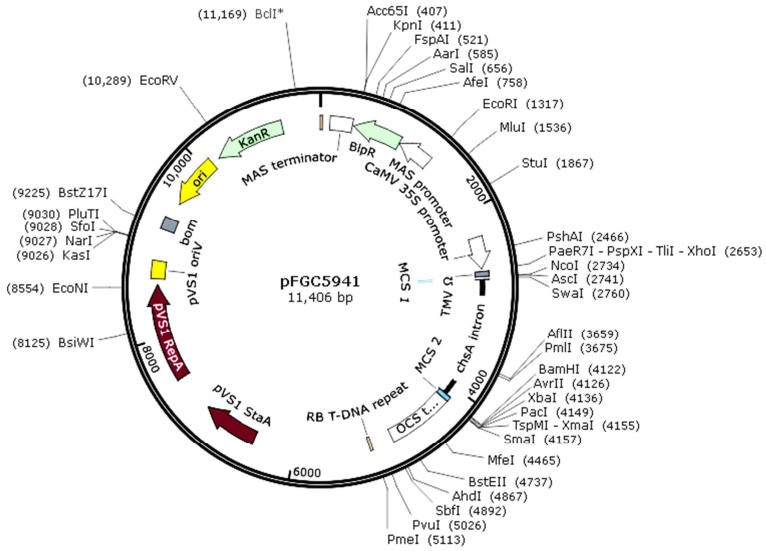
اتصال ژن‌های *P0*، *P25* و *2b* به همدیگر توسط Mega PCR

قطعات *P0*، *P25* و *2b* تکثیر شده در مرحله اول بعد از خالص‌سازی به روش فنل کلروفرم، با Mega PCR و با استفاده از آغازگرهای Overlap به همدیگر چسبانده شدند و سه قطعه به صورت یک قطعه واحد به طول ۷۷۵ جفت باز درآمد. آغازگرها طوری طراحی شده بودند که قطعه تکثیر شده مربوط به *P0* در انتهای '۵ رشته سنس خود دارای جایگاه برشی آنزیم‌های *Xba* I و *Xho* I و در انتهای '۵ رشته آنتی سنس دارای ۲۰ نوکلئوتید مکمل معکوس با اول ژن *P25* بود و *P25* تکثیر شده در انتهای '۵ رشته سنس خود دارای ۲۰ نوکلئوتید از آخر ژن *P0* و در انتهای '۵ رشته آنتی سنس دارای ۲۰ نوکلئوتید مکمل معکوس با اول ژن *2b* بود. *2b* تکثیر شده در انتهای '۵ رشته سنس خود دارای ۲۰ نوکلئوتید آخر ژن *P25* و در انتهای '۵ رشته آنتی سنس دارای جایگاه برشی آنزیم‌های *Nco* I و *BamH* I بود. این نواحی هم‌پوشان برای اتصال قطعات ژن‌ها با واکنش Mega PCR تعبیه شده است به‌طوری‌که در اتصال ژن *P25* به *P0* با واکنش Mega PCR، ۲۰ نوکلئوتید از انتهای '۵ رشته آنتی سنس ژن *P0* که مکمل معکوس با اول ژن *P25* است با اول رشته سنس ژن *P25* جفت شد و ۲۰ نوکلئوتید از انتهای '۵ رشته سنس ژن *P25* که دارای توالی آخر ژن *P0* است با رشته آنتی سنس *P0* جفت شد و طی PCR ژن P25+ P0 تکثیر پیدا کرد. در اتصال ژن P25+ P0 به ژن *2b* با واکنش Mega PCR، ۲۰ نوکلئوتید از انتهای '۵ رشته آنتی سنس ژن *P25* که مکمل معکوس با اول ژن *2b* است با اول رشته سنس ژن *2b* جفت شد و ۲۰ نوکلئوتید از انتهای '۵ رشته سنس ژن *2b* که دارای توالی آخر ژن *P25* است با رشته آنتی سنس *P25* جفت شد و طی PCR ژن P25+2b+ P0 تکثیر پیدا کرد.

همسانه‌سازی قطعه *P0+P25+2b* در پلاسمید pFGC5941

در این تحقیق پلاسمید pFGC5941 برای همسانه‌سازی قطعه *P0+P25+2b* استفاده شد. این پلاسمید مخصوص انجام RNAi (RNA interference) است. پلاسمید pFGC5941 با ۱۱۴۰۷ جفت باز طول، به دلیل داشتن یک توالی اینترونی CHSA بین دو جایگاه همسانه سازی چندگانه (Multiple cloning site) یک پلاسمید مناسب برای اهداف خاموشی RNA است. اطلاعات مربوط به ناقل در وب‌سایت http://www.chromdb.org/rnai/vector موجود است. بدین نحو که می‌توان با همسانه‌سازی یک قطعه ژنی در دو جهت سنس و آنتی‌سنس در بالادست و پایین‌دست این اینترون، یک سازه RNAi برای ژن موردنظر طراحی نمود. اینترون CHSA از ژن کدکننده آنزیم چالکون سینتاز (*Chalcone synthase*) گیاه اطلسی (*Petunia hybrid* L.) گرفته شده است. در این پلاسمید پروموتر CaMV 35S موجود است که از ویروس موزاییک گل‌کلم (Cauliflower Mosaic Virus) گرفته شده است. خاتمه‌دهنده رونویسی ژن در این پلاسمید هم OCS (Octopine synthase) است. این پلاسمید همچنین دارای ژن مقاومت به کانامایسین (Kanamycin resistance gene) خارج از T-DNA، برای انتخاب در محیط کشت *Escherichia coli* L. و ژن مقاومت به علف‌کش Basta (Basta resistance gene) داخل T-DNA برای انتخاب در محیط کشت گیاهی است (شکل ۱).

برای انجام همسانه‌سازی در جهت سنس، واکنش برش آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دو آنزیم *Xho*I و *Nco*I هم برای قطعه ۷۷۵ جفت بازی تکثیر شده و هم برای پلاسمید pFGC5941 جداگانه انجام شد.



شکل ۱. نقشه پلاسمید pFGC5941 که شامل جایگاه برش آنزیم *Eco*RI (1317)، راه‌انداز CaMV-35S، جایگاه‌های همسانه‌سازی (MCS)، دو جایگاه برش برای آنزیم *Hind*III (3388, 5229)، خاتمه دهنده OCS (Octopine synthase)، مرز سمت راست (RB) و مرز سمت چپ (LB) است.

Figure 1. PFGC5941 plasmid map containing *EcoRI* enzyme cleavage site (1317), CaMV-35S promoter, cloning site (MCS), two cleavage sites for *HindIII* enzyme (3388, 5229), OCS terminator (Octopine synthase), the right border (RB) and left border (LB).

پس از جداسازی باندها و تخلیص قطعات برش یافته از ژل، قطعه مورد نظر به داخل پلاسمید به کمک آنزیم *T4* DNA ligase (Fermentase) در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد در طول یک شب انتقال یافت. محصول لیگاسیون خالص‌سازی شد و پس از تایید پلاسمید نوترکیب با استفاده از PCR و برش آنزیمی، پلاسمید نوترکیب به روش الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* نژاد Top10 انتقال یافت. پس از تراریزش؛ برای گزینش کلنی‌های مثبت، از محیط انتخابی حاوی کانامایسین استفاده شد. استخراج پلاسمید به روش Mini prep (Sambrook *et al.,* 1989) انجام و کلنی های PCR مثبت در محیط LB کشت شدند. جهت تأیید پلاسمیدهای نوترکیب دوباره PCR انجام گرفت. از یکی از کلنی‌هایی که PCR مثبت بود برای انجام کلونینگ دوم جهت وارد کردن همان قطعه ۷۷۵ جفت بازی ولی این بار در جهت Antisense استفاده شد. در این مرحله ابتدا برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب به همراه همان قطعه ۷۷۵ جفت بازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با آنزیم‌های *Xba* I و *Bam*H I انجام گرفت. محصول این برش آنزیمی جهت انجام لیگاسیون استفاده شد. محصول لیگاسیون دوم با روش الکتروپوراسیون به *E. coli* فرستاده شده و کلنی‌های مثبت در محیط حاوی کانامایسین انتخاب گردیدند. تأیید کلون‌های نوترکیب با کمک PCR با آغازگرهای اختصاصی pFGC5941 Fext به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rint به عنوان آغازگر برگشتی برای تأیید همسانه‌سازی اول در جهت Sense و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pFGC5941 Fint به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rext به عنوان آغازگر برگشتی (جدول ۱) برای تأیید همسانه‌سازی دوم در جهت Antisense انجام گرفت.

تکثیر پلاسمید pFGC5941 نوترکیب و انتقال آن به آگروباکتریوم

از باکتری *E. coli* نژاد Top10 جهت تکثیر پلاسمید نوترکیب استفاده شد. پلاسمیدها به باکتری *E. coli* به روش الکتروپوراسیون توسط دستگاه Multiporator (Eppendorf) با ولتاژ ۲/۵ کیلو ولت به مدت پنج میلی ثانیه تراریزش شدند. برای گزینش کلنی‌های مثبت بعد از انتقال، از محیط انتخابی حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد.

سپس استخراج پلاسمید به روش Mini prep (Sambrook *et al.*, 1989) انجام شد. برای تأیید بیشتر، پلاسمیدهای نوترکیب حاصل برای توالی‌یابی به دانشگاه Lille فرانسه ارسال شدند. پلاسمید pFGC5941 بعد از اینکه در هر دو جهت Sense و Antisense توسط PCRها و توالی‌یابی تأیید شد، به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 منتقل شد و در محیط LB جامد همراه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (عامل مقاومت روی پلاسمید pFGC5941) و ریفامپیسین (عامل مقاومت خود آگروباکتریوم) (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رشد داده شدند. سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB مایع حاوی کانامایسین و ریفامپیسین تکثیر یافتند تا OD_{600} آنها به ۰/۷ تا ۱ رسید. بعد از حذف محیط کشت، سلول‌های حاصل در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) مایع سوسپانسیون شدند.

تراریختی گیاه سیب‌زمینی

جهت تراریختی گیاه سیب‌زمینی، هم‌کشتی ریزنمونه‌های حاصل از گیاهان کشت بافتی سیب‌زمینی رقم آگریا با سن شش هفته با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید مورد نظر انجام گرفت. ریزنمونه‌های مورد استفاده برای تراریزش میانگره‌های یک سانتی‌متری سیب‌زمینی با ضخامت دو تا سه میلی‌متر با سن شش هفته بودند. برای تراریختی از محیط کشت MS به عنوان محیط کامل و پایه، به همراه ویتامین‌ها (برای یک لیتر: ۲ میلی‌گرم گلایسین، ۰/۵ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم پیریدوکسین و ۰/۴ میلی‌گرم تیامین) با ۲۵ گرم ساکارز (w/v, pH ۵/۸ ٪۲/۵)، ۸ گرم در لیتر آگار و هورمون‌های باززایی و کالوس‌زایی استفاده شد. هم‌کشت‌ها به مدت ۲ شب در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس قطعات گیاهی به محیط باززایی MS غنی شده با (۰/۰۲ mg/l) GA3، (۰/۲ mg/l) NAA و (۰/۳ mg/l) TDZ که حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک Cefotaxime برای حذف آگروباکتریوم بود انتقال داده شدند و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. در این تحقیق از حدود ۱۰۰ ریزنمونه برای تراریختی استفاده شد. بعد از کالوس‌زایی، ریزنمونه‌ها به محیط جدید حاوی Cefotaxime و Phosphinothricine (PPT: 10 mg/l) برای گزینش نمونه‌های تراریخت انتقال داده شدند. بدین ترتیب کالوس زایی ادامه یافته و جوانه‌زنی آغاز شد. فقط گیاهان تراریخت که T-DNA موردنظر را در کنار ژن مقاومت به PPT دریافت کرده بودند، در این مرحله به رشد و جوانه‌زنی در محیط باززایی حاوی PPT ادامه دادند. سپس نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند و تا به دست آوردن گیاهان کامل کشت و واکشت در محیط MS شامل غلظت‌های هورمونی مطلوب (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین) انجام شد.

روش‌های مولکولی تأیید تراریخته بودن گیاهان و بررسی انتقال و رونویسی ژن هدف

استخراج DNA ژنومی از گیاهان حاصل از محیط انتخاب‌گر، به روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) انجام گرفت. برای تأیید وجود T-DNA در داخل ژنوم این گیاهان، PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده در پلاسمید انجام شد. بدین منظور پنج نوع PCR انجام گرفت. از گیاهانی که از نظر حضور ترانس ژن در درون DNA ژنومی با PCR تأیید شدند در چهارمین هفته قرارگیری در محیط انتخابی، استخراج RNA از برگ‌های جوان انجام گرفت و پس از تیمار با DNase I، سنتز cDNA و PCR روی آن انجام شد. هدف از این کار، بررسی حضور mRNAهای حاصل از رونویسی سازه سنجاق‌سری بود.

نتایج و بحث

در این تحقیق قطعه‌ای از ژن‌های *P0*، *P25* و *2b* ویروس‌های PLRV، PVX و CMV که مهارکننده خاموشی‌RNA میزبان هستند، برای ایجاد مقاومت استفاده شد. روش ایجاد مقاومت نیز ساختن سازه RNA سنجاق‌سری از اتصال سه قطعه *P0*، *P25* و *2b* و وادار کردن میزبان به تولید دائمی siRNAهای *P0*،

P25 و *2b* بود تا به‌محض حمله ویروس، RNAهای *P0*، *P25* و *2b* را مورد حمله قرار دهد. با این روش، دیگر ویروس قادر به خاموش کردن و از کار انداختن سیستم خاموشی RNA در میزبان نخواهد بود و توسط همین سیستم از بین خواهد رفت. نقش پروتئین‌های ممانعت کننده از RNA silencing شامل *P0*، *P25* و *2b* عبارت است از تجزیه پروتئین AGO1 (Argonate 1) از طریق یوبی‌کویتیناسیون (Ubiquitination) توسط *P0* به‌عنوان پروتئین F-box، تخریب پروتئین‌های AGO از طریق مسیر پروتئازوم، اتصال در سنتز siRNA و مسدود کردن فعالیت برشی آن. نقطه قوت این تحقیق هدف قراردادن ژنهای ویروسی است که مسئول خاموشی مقاومت مبتنی بر RNA silencing در میزبان هستند.

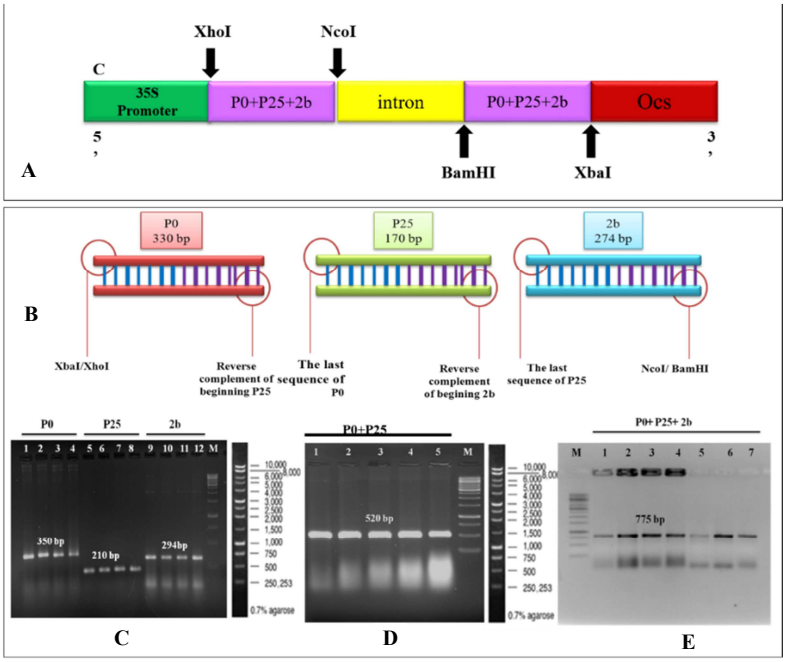
همسانه‌سازی قطعه *P0+P25+2b* در پلاسمید pFGC5941

برای ایجاد مقاومت همزمان علیه سه ویروس PLRV، PVX و CMV، ژن‌های *P0* و *2b* و *P25* به ترتیب از هر کدام از ویروس ها برای طراحی و ساخت سازه RNAi انتخاب شدند. ساختار سازه RNAi در شکل ۲-A نشان داده شده است که شامل راه‌انداز، قطعه *P0+P25+2b* در جهت Sense، توالی اینترون، قطعه *P0+P25+2b* در جهت Antisense و خاتمه دهنده است. نکته قابل توجه این است که نباید انتقال ژنِ کامل ممانعت کننده خاموشی RNA ویروس به میزبان صورت گیرد تا پروتئین ژن تولید نشود زیرا در صورت تحقق این امر، پروتئین حاصل سیستم خاموشی RNA در میزبان را از کار خواهد انداخت، لذا در این تحقیق فقط قطعه‌ای از هر کدام از ژن‌ها انتقال یافت. آنچه به‌عنوان مشکل در روش‌های خاموش کردن ژن‌ها در گیاهان و جانوران به‌صورت خاموشی RNA و RNA مداخله‌گر وجود دارد، تأثیرات غیر هدف است. به عبارت دیگر خاموش شدن ژن‌های دیگری که mRNAی آن‌ها با siRNAهایی که در سلول‌ها القاء شده‌اند مکمل باشد. بررسی اینکه چه ژن‌هایی در میزبان ممکن است در اثر تولید siRNA های القایی در کنار ژن مدنظر خاموش شوند مهم است. قطعاً این مشکل در مورد بیماری‌های ویروسی و غیر ویروسی انسان‌ها نسبت به گیاهان، حائز اهمیت بیشتری است؛ اما از آنجا که گیاه سیب‌زمینی نیز در رژیم غذایی انسان‌ها قرار دارد، جهت حذف تأثیرات off-target در مورد سازه تولیدکننده siRNAهای *P0*، *P25* و *2b* siRNAهای احتمالی و توالی mRNA *P0*، *P25* و *2b* با توالی‌های ثبت‌شده از ژن‌های گیاه سیب‌زمینی و همچنین توالی‌های سایر mRNAهای موجود در وب‌سایت NCBI تطابق و هم‌ردیفی داده‌ها انجام شد. نتیجه بررسی هم‌ردیفی نوکلئوتیدها نشان داد که هیچ توالی مهمی در سیب‌زمینی و آرابیدوپسیس، انسان و جانداران با توالی انتخابی از ژن‌های *P0*, *P25* و *2b* مشابه نبود و بنابراین وجود پدیده off-target بصورت نظری منتفی می‌باشد (شکل ۳-A, B, C).

برای ایجاد قطعه *P0+P25+2b*، ابتدا قطعات ژنی *P0*، *P25* و*2b* به کمک واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی هم‌پوشان تکثیر شدند (شکل ۲-B, C). برای اتصال ژن *P25* به *P0*، ابتدا کل حجم محصول PCR ژن‌های تکثیرشده *P25* و *P0* به روش فنل-کلروفرم خالص‌سازی شد. اتصال ژن *P0* و *P25* با استفاده از آغازگرهای Fext $P0^{PLRV}$ *Xba* I/*Xho* I و Revers overlap *2bP25* انجام گرفت (شکل ۲-D). برای اتصال ژن *P0 + P25* به *2b*، ابتدا کل حجم قطعات تکثیرشده *P0 + P25* و *2b* به روش فنل-کلروفرم خالص‌سازی شد. اتصال قطعات *P0 + P25* به 2b با استفاده از آغازگرهای Fext P0 *Xba* I/*Xho* I و Rext *2b Nco* I/*Bam*H I انجام گرفت (شکل ۲-E).

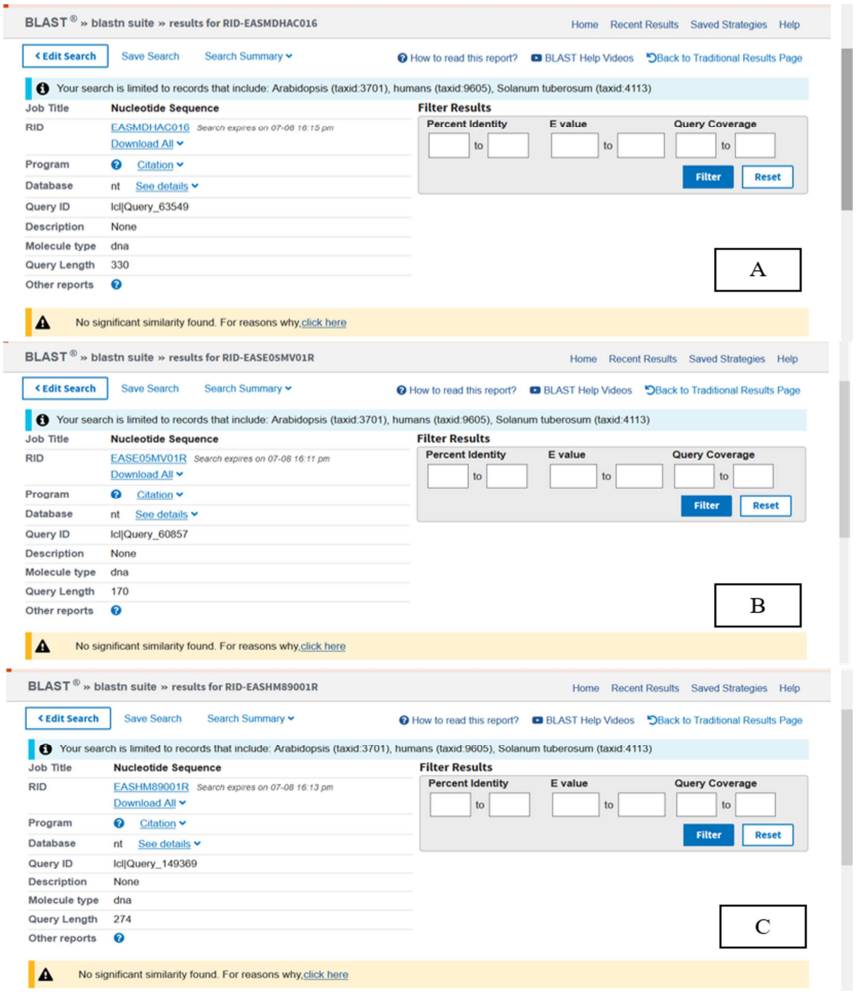
محصول نهایی آخرین PCR بعد از خالص‌سازی با فنل-کلروفرم با آنزیم‌های اندونوکلئاز *Nco*I و *Xho*I، برش یافت. محصول بعد از خالص‌سازیِ دوباره با فنل-کلروفرم، روی ژل آگارز LMP ۱/۵ درصد بارگذاری شد. آغازگرهای سنس می‌توانند به بالادست و پایین-دست محل درج قطعه سنس روی ناقل اتصال یابند (شکل۴- I و II) با توجه به اینکه در آغازگرهای Fext *P0 Xba*I/*Xho*I و Rext *2b Nco*I/*Bam*HI مکان آنزیم‌های برشی *Nco*I و *Xho*I قرار گرفته است، از واکنش برش آنزیمی قطعه‌ای با اندازه ۷۷۵ جفت باز به دست آمد. همزمان برش پلاسمید خالی

pFGC5941) حاوی ژن گزینش گر مقاوم به Kanamycin) با همان آنزیم‌های برشی انجام گرفت. با برش آنزیمی پلاسمید خالی، به دلیل نزدیک بودن سایت‌های برشی با حذف یک قطعه ۸۰ جفت بازی، پلاسمید به صورت خطی درآمد (شکل ۴-A, B). بعد از انجام واکنش لیگاسیون (لیگاسیون قطعه ۷۷۵ جفت بازی در داخل پلاسمید) و خالص‌سازی آن، محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* سویه Top10 به روش الکتروپوراسیون منتقل و از پرگنه‌های که روی محیط Kanamycin رشد کرده بودند، واکنش PCR با آغازگر-های اختصاصی در جهت Sense انجام شد (شکل ۴-C). پلاسمید نوترکیب جدید باید باندی معادل ۹۹۵ (۳۰۰ + ۷۷۵ – ۸۰) جفت باز می‌داد که در شکل ۴-D کاملاً مشخص است. در این رابطه، bp ۷۷۵ اندازه قطعه *P0+P25+2b*، ۳۰۰ bp فاصله آغازگرها روی پلاسمید خالی و ۸۰ bp اندازه قطعه حذف شده از پلاسمید حین برش آنزیمی می‌باشد. جهت تأیید بیشتر پرگنه‌های مثبت، پلاسمیدها از آن‌ها استخراج و PCR با شرایط فوق انجام گردید جهت تایید نهایی از یکی از پلاسمیدهایی که در PCR نتیجه مثبت داده بود برش آنزیمی با *XhoI* و *NcoI* انجام شد چون طبق استراتژی، این پلاسمیدها در جهت Sense قطعه *P0+P25+2b* را دریافت کرده بودند، از یکی از آن‌ها برای شروع کلونینگ دوم در جهت Antisense استفاده شد.



شکل ۲. A) سازه RNAi که شامل راه‌انداز، ژن در جهت Sense، Intron و ژن در جهت Antisense است. Ocs، توالی خاتمه دهنده ژن Octopine synthase است. B) شکل شماتیک ژن‌های P0, P25 و 2b. C) نتیجه تکثیر ژن‌های *P0*, *P25* و *2b* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ که چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مربوط به ژن *P0* با ۳۵۰ جفت باز است. چاهک‌های ۵، ۶، ۷، و ۸ مربوط به ژن *P25* با ۲۱۰ جفت باز است و چاهک‌های ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مربوط به ژن *2b* با ۲۹۴ جفت باز است. D) نتیجه تکثیر ژن *P25 +P0* با استفاده از آغازگرهای Fext *P0* XbaI/XhoI و Revers overlap *2b P25* که روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شده است. قطعه حاصل ۵۲۰ جفت باز است که در چاهک‌های ۱ تا ۵ مشاهده می‌شود. E) نتیجه تکثیر ژن *2b +P25+P0* با استفاده از آغازگرهای Fext *P0* XbaI/XhoI و Rext *2b* NcoI/BamHI که روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شده است. قطعه حاصل ۷۷۵ جفت باز است که در چاهک‌های ۱ تا ۷ مشاهده می‌شود. از نشانگر اندازه 1Kb استفاده شده است.

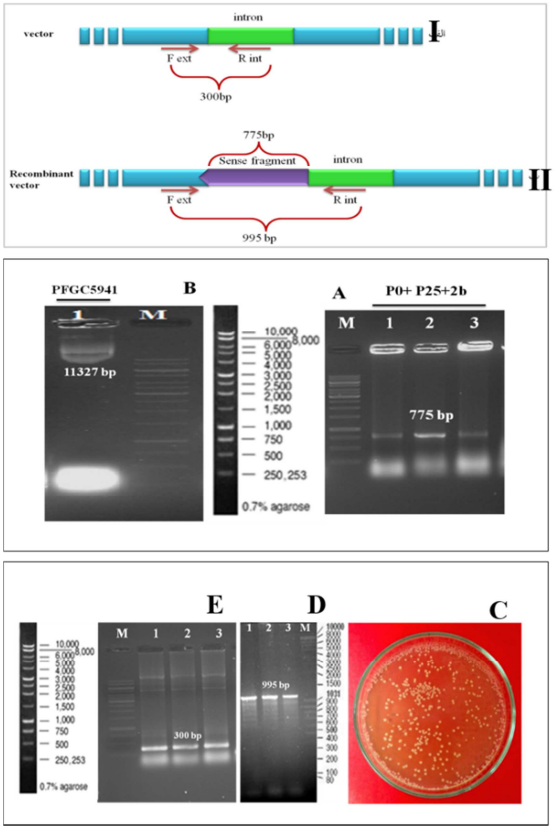
Figure 2. A: RNAi construct that include the promoter, the gene in sense direction, intron and the gene in antisense direction. Ocs is the terminator sequence of the Octopine synthase gene. B: Schematic of *P0*, *P25* and *2b* genes. C: The result of amplification of *P0*, *P25* and *2b* genes on 1.5% agarose gel; wells 1, 2, 3 and 4 relate to the *P0* gene with 350 bp. Wells 5, 6, 7, and 8 relate to the *P25* gene with 210 bp and wells 9, 10, 11 and 12 relate to the *2b* gene with 294 bp. D: The result of *P0 + P25* gene amplification using Fext P0 XbaI / XhoI primers and Revers overlap 2b P25 loaded on 1% agarose gel. The resulting fragment is 520 bp, that was seen in wells 1 to 5. E: Result of *P0 + P25 + 2b* gene amplification using Fext P0 XbaI / XhoI and Rext 2b NcoI / BamHI primers loaded on 1% agarose gel. The resulting fragment is 775 bp, that was seen in wells 1 to 7. The marker size of 1Kb was used.



شکل ۳. A) نتیجه همردیفی نوکلئوتیدی توالی انتخابی ژن *P0* با توالی‌های نوکلئوتیدی گیاه سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس و انسان. B) نتیجه همردیفی نوکلئوتیدی توالی انتخابی ژن *P25* با توالی‌های نوکلئوتیدی گیاه سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس و انسان. C) نتیجه همردیفی نوکلئوتیدی توالی انتخابی ژن *2b* با توالی‌های نوکلئوتیدی گیاه سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس و انسان. در هر سه مورد هیچ شباهتی با توالی‌های مورد نظر یافت نشد.

Figure 3. A) Nucleotide blast result of selective sequence of *P0* gene with nucleotide sequences of potato, *Arabidopsis* and human. B) Nucleotide blast result of selective sequence of *P25* gene with nucleotide sequences of potato, *Arabidopsis* and human. C) Nucleotide blast result of selective sequence of gene *2b* with nucleotide sequences of potato, *Arabidopsis* and human. In all three cases, no similarities were found with the desired sequences.

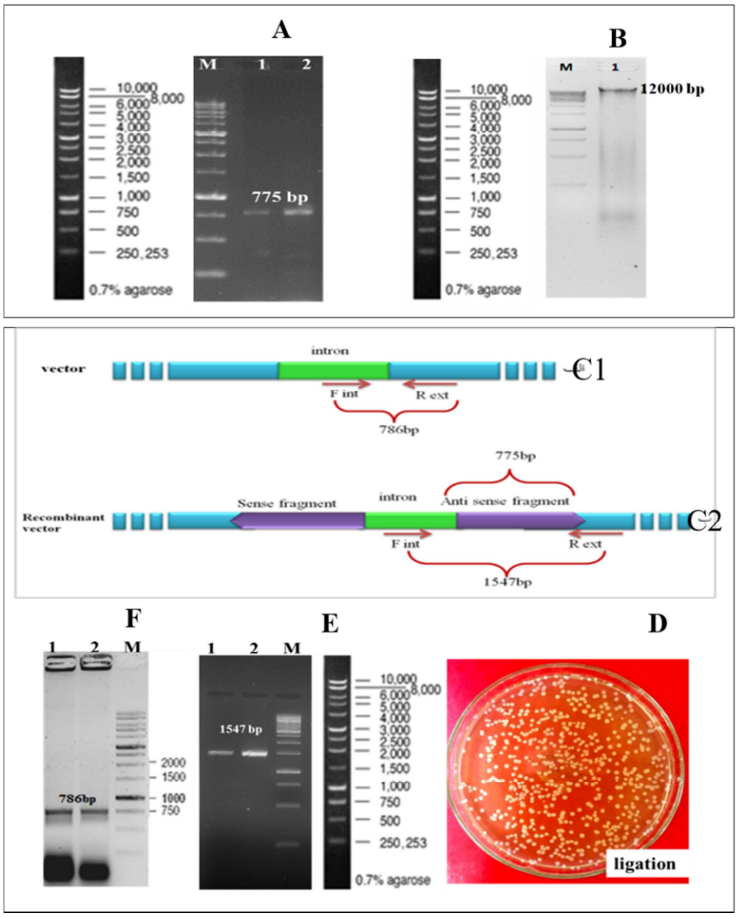
به‌منظور قرارگیری قطعه *P0+P25+2b* در جهت Antisense در پلاسمید pFGC5941، بار دیگر مراحل PCR با استفاده از آغازگرهای Fext *P0 Xba* I/*Xho* I و Rext *2b Nco* I/*Bam*H I انجام شد. با توجه به اینکه در آغازگرهای Fext *P0 Xba* I/*Xho* I و Rext *2b Nco* I/*Bam*H I، توالی‌های محل برش دو آنزیم *Xba* I و *Bam*H I، درج شده بود، محصول PCR پس از خالص‌سازی، در واکنش برش با دو آنزیم ذکرشده قرار گرفت (شکل ۵-A). پلاسمید محصول همسانه‌سازی اول نیز همزمان، با این دو آنزیم برش یافت (شکل ۵-B). قطعات موردنظر روی ژل آگارز LMP جداسازی و خالص‌سازی شدند. محصول واکنش لیگاسیون میان پلاسمید pFGC5941 و *P0+P25+2b* به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های مستعد *E. coli* منتقل شد و باکتری‌ها در محیط حاوی کانامایسین، انتخاب شدند. برای تأیید وجود قطعه Antisense در پلاسمید، روی تک پرگنه‌ها PCR با آغازگرهای اختصاصی در جهت Antisense یعنی pFGC5941 Fint و Rext انجام گرفت.



شکل ۴. چگونگی اتصال آغازگرهای سنس به ناقل خالی pFGC5941 (I وII) و تفاوت طول باند حاصل از آن‌ها طی PCR. A) نتیجه الکتروفورز برش آنزیمی محصول نهایی Mega PCR با آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده *Nco*I و *Xho*I جهت همسانه‌سازی Sense، که در چاهک‌های ۱ تا ۳ باندی با اندازه ۷۷۵ نوکلئوتید است (ژل LMP ۱/۵ درصد). B) نتیجه الکتروفورز واکنش برش آنزیمی pFGC5941 خالی با آنزیم های *Xho*I و *Nco*I جهت همسانه سازی Sense، که در چاهک باندی به اندازه ۱۱۳۲۷ جفت باز است. قطعه‌ای به اندازه ۸۰ نوکلئوتید از pFGC5941 در نتیجه برش حذف شده است (ژل LMP ۰/۸ درصد). C) تراریزش محصول اتصال به روش الکتروپوراسیون به باکتری. تصویر پرگنه‌های حاصل در محیط گزینشی کانامایسین‌دار. D) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint روی پرگنه‌های رشد کرده در محیط انتخابی بعد از اتصال اول در ژل آگارز ۰/۸ درصد که باند ۹۹۵ نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد (مربوط به کلونینگ در جهت Sense). E) نتیجه الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد محصول PCR روی پلاسمید pFGC5941 خالی به‌عنوان کنترل که باند ۳۰۰ نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.

Figure 4. How to connect the sense primers to the empty vector; pFGC5941 (I, II) and the difference in band length obtained from PCR. A: The result of electrophoresis of enzymatic cleavage of the final Mega PCR product with *NcoI* and *XhoI* restriction endonuclease enzymes for Sense cloning, which is band in the 1 to 3 wells with 775 nucleotides (1.5% LMP gel). B: Electrophoresis result of the digestion reaction of the empty pFGC5941 with *XhoI* and *NcoI* enzymes for Sense cloning, which is band in the well with 11327 bp. 80-nucleotide fragment of pFGC5941 was deleted as a result of cleavage (0.8% LMP gel). C: Transformation of the product by electroporation. Image of the resulting colonies in the Kanamycin selective medium. D: Electrophoresis results of PCR product with pFGC5941 Fext and pFGC5941 Rint primers on colonies grown in selected medium after first ligation in 0.8% agarose gel showing bands with 995 nucleotides (relating to cloning in Sense direction). E: Electrophoresis result of PCR product on empty pFGC5941 plasmid as control on 1.5% agarose gel showing band with 300 nucleotides.

در واکنش زنجیره ای پلی مراز pFGC5941 Rext از نوکلئوتید ۴۲۹۱ و pFGC5941 Fint از نوکلئوتید ۳۵۰۵ به pFGC5941 اتصال پیدا می‌کنند، لذا باندی که از این PCR باید دیده شود با افتادن ۱۴ bp هنگام برش دارای اندازه ۱۵۴۷ (۷۸۶+۱۴-۷۵۵) جفت باز است در حالی که باند حاصله روی پلاسمید خالی باید ۷۶۸ bp باشد (شکل۵-F-E-D-C). برای تأیید حضور پلاسمید نوترکیب در پرگنه‌های رشد یافته روی محیط گزینشی کانامایسین، استخراج پلاسمید انجام شد.

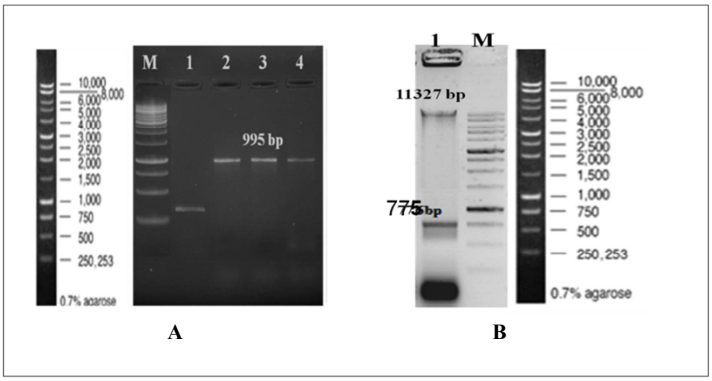


شکل ۵. A) الکتروفورز DNA PCRی ۷۷۵ جفت بازی؛ *P0+ P25+ 2b* پس از برش آنزیمی روی ژل LMP یک درصد. ستون ۱ تا ۳ در این ژل نمایانگر باند ۷۷۵ نوکلئوتیدی و محصول برش آنزیم‌های *Bam*HI و *Xba*I می‌باشد. B) الکتروفورز برش پلاسمید نوترکیب pFGC5941 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xba*I روی ژل LMP ۰/۸ درصد با اندازه باند حدود ۱۲۰۰۰ جفت باز. C2, C1) چگونگی اتصال آغازگرهای آنتی‌سنس به ناقل خالی و تفاوت طول باند حاصل از آن‌ها طی PCR. D) تصویر پرگنه‌های حاصل از تراریزش در محیط گزینشی کانامایسین‌دار. E) نتیجه الکتروفورز PCRها در ژل آگارز ۱/۵ درصد که برای تأیید همسانه‌سازی دوم در جهت Antisense انجام یافتند. در شکل F چاهک ۱ و ۲ باند ۱۵۴۷ جفت بازی و در شکل E چاهک ۱ و ۲ باند ۷۸۶ جفت بازی را نشان می دهد که به عنوان کنترل منفی روی پلاسمید خالی انجام شده بود. PCR با جفت آغازگرهای جهت Antisense یعنی pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext PCR انجام شده است.

Figure 5. A) The electrophoresis results of PCR on DNA with 775 bp lenght; *P0 + P25 + 2b* after digestion on 1% LMP gel. Columns 1 to 3 represent the band with 775 nucleotides and the product of digestion of *BamHI* and *XbaI* enzymes. B) The electrophoresis of recombinant plasmid (pFGC5941) cleavage with *BamHI* and *XbaI* enzymes on 0.8% LMP gel with a band size of about 12,000 bp. C1, C2) How to connect the antisense primers to the empty vector and the difference in band lenght obtained from PCR. D) Image of transgenic colonies in a selective Kanamycin medium. E) Electrophoresis result of PCRs in 1.5% agarose gel for confirmation of the second cloning in Antisense direction. Band with 1547 bp in wells of 1 and 2 in Figure F and with 786 bp in wells of 1 and 2 in Figure E represent the negative control as a result of PCR conducted on the empty plasmid. PCR was performed with the primers pair of Antisens direction; pFGC5941 Fint and pFGC5941 Rext.

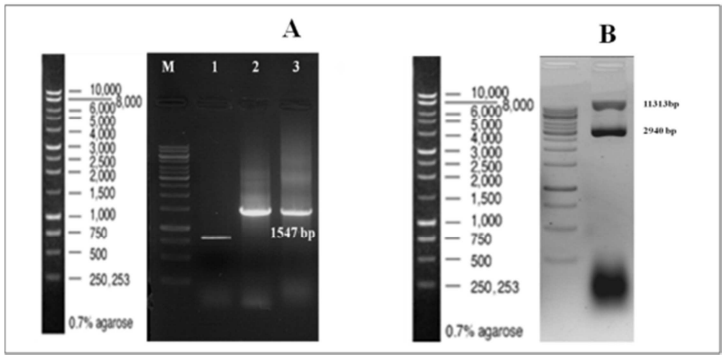
در مرحله بعد با انجام واکنش PCR با شرایط فوق روی پلاسمیدهای استخراج‌شده از پرگنه‌ها، صحت ساخت سازه نوترکیب تأیید شد (شکل۶). جهت تایید بیشتر از یکی از پلاسمیدهایی که در نتیجه PCR مثبت داده بود برش آنزیمی با آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I انجام گرفت. نتیجه حاصل از برش آنزیمی روی ژل ۱ درصد بارگزاری شد (شکل۷). همچنین برای تأیید بیشتر، پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از پلاسمید نهایی، برای توالی‌یابی ارسال گردید. نتیجه توالی‌یابی، برای هر ۴ آغازگر روی pFGC5941، به‌خوبی نوترکیب

بودن پلاسمید را تأیید نمود و بدین ترتیب از آن پلاسمید برای ادامه کارها استفاده گردید. نتیجه توالی‌یابی به‌صورت جمع‌آوری‌شده از روی چندین توالی یابی در جهت‌های مکمل هم با آغازگرهای pFGC5941 Fext جهت Sense و pFGC5941 Rext جهت Antisense در شکل ۸ آورده شده است.



شکل۶- الف) الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint روی پلاسمیدهای استخراج شده از پرگنه‌های مثبت (حاوی پلاسمیدهای نوترکیب) که چاهک‌های ۲ تا ۴ باندی به اندازه ۹۹۵ جفت باز را نشان می‌دهد (مربوط به کلونینگ جهت Sense). چاهک ۱ مربوط به پلاسمید خالی به عنوان کنترل منفی است که باندی به اندازه ۳۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. ب) نتیجه الکتروفورز برش آنزیمی جهت تایید نهایی همسانه سازی Sense؛ برش پلاسمید نوترکیب با آنزیم های *Xho*I و *Nco*I که در ستون باندی به اندازه ۷۷۵ نوکلئوتید مربوط به قطعه‌ی *2b+P0+P25* و باندی به اندازه ۱۱۳۲۷ جفت بازی مربوط به پلاسمید PFGC5941 را نشان می‌دهد. الکتروفورز روی ژل LMP ۱ درصد انجام شده است.

Figure 6. A) The electrophoresis of PCR product conducted with pFGC5941 Fext and pFGC5941 Rint primers on plasmids extracted from positive colonies (containing recombinant plasmids). The wells 2-4 show band with 995 bp that relate to the cloning in Sense direction. Well 1 relates to an empty plasmid as a negative control which represents a band with 300 bp. B) Electrophoresis results of digestion with *XhoI* and *NcoI* enzymes for final confirmation of Sense cloning of recombinant plasmid. The digestion resulted the band with 775 nucleotides that related to P0 + P25 + 2b fragment and band with 11327 bp that related to PFGC5941plasmid. Electrophoresis was performed on 1% LMP gel.



شکل۷- A: الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد PCRها که برای تأیید همسانه سازی دوم در جهت Antisense انجام شده است. باندهای موجود در ستون ۲ و ۳ مربوط به PCR با جفت آغازگر Antisense از پلاسمیدهای استخراج‌شده از پرگنه‌های مثبت بود که دارای اندازه ۱۵۴۷ جفت باز می‌باشند. ستون ۱ به عنوان کنترل منفی مربوط به PCR روی پلاسمیدی است که قطعه‌ی سنس را دریافت کرده است و باند ۷۸۶ جفت بازی را نشان می دهد. B: الکتروفورز روی ژل یک درصد LMP برش آنزیمی با *Xho*I و *Xba*I روی پلاسمید جهت تایید نهایی همسانه سازی Antisense. ستون ۱ دارای باند ۲۹۴۰ نوکلئوتید مربوط به مجموع قطعه‌ی سنس و آنتی‌سنس است و باند ۱۱۳۱۳ جفت بازی مربوط به پلاسمید PFGC5941 است.

Figure 7. A: Electrophoresis of PCRs products on 1% agarose gel. The PCRs were performed to confirm the second cloning in the Antisense direction. The bands with 1547 bp in columns 2 and 3 related to PCR with the Antisense primer pair from plasmids extracted from positive colonies. Column 1 with 786 bp band correspond to PCR product of the negative control realized on plasmid that received the Sense fragment and shows. B: Electrophoresis on 1% LMP gel of enzymatic cleavage of plasmid with *XhoI* and *XbaI* enzymes for final confirmation of Antisense cloning. Column 1 show a 2940-nucleotide band relating to the sum of the Sense and Antisense fragments and the 11313 bp band belongs to the PFGC5941 plasmid.

شکل ۸. نتایج توالی‌یابی جمع‌آوری‌شده از چندین توالی‌یابی در جهت‌های مکمل هم با آغازگرهای pFGC5941 Fext جهت Sense و هم با pFGC5941 Rext جهت Antisense.

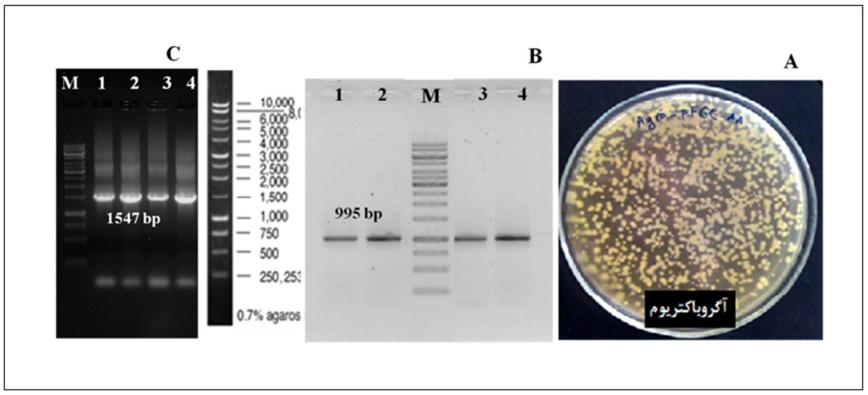
Figure 8. The collected sequencing results from several sequenceings conducted in complementary directions with both pFGC5941 Fext (in Sense direction) and pFGC5941 Rext (in Antisense direction) primers.

تراریزش سیب‌زمینی با پلاسمید نوترکیب pFGC5941 حاوی سازه سنجاق سری *P0*+*P25*+2b ویروس‌های PLRV، PVX و CMV به کمک آگروباکتریوم

پلاسمید pFGC5941 نوترکیب بعد از اینکه در هر دو جهت Sense و Antisense توسط PCRها و توالی‌یابی تأیید شد، به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های آگروباکتریوم منتقل شد. سلول‌های آگروباکتریوم حاصل در محیط LB جامد همراه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (عامل مقاومت روی پلاسمید pFGC5941) و ریفامپسین (عامل مقاومت خود آگروباکتریوم) رشد داده شدند. جهت تأیید نهایی حضور سازه RNAi در آگروباکتریوم ترانسفورم شده، برای چند پرگنه استخراج پلاسمید و سپس PCR انجام گرفت. برای PCR، از آغازگرهای جهت Sense و از آغازگرهای جهت Antisense استفاده شد (شکل ۹). یک پرگنه مثبت جهت ترانسفورماسیون گیاهان انتخاب شد. ساقه‌های دو سانتی‌متری به همراه یک گره از گیاهان سیب‌زمینی رقم آگریا در درون شیشه‌های کشت تکثیر شدند. سپس از قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتیمتری میانگره‌های ساقه گیاهان شش هفته‌ای که تقریباً دو تا سه میلی‌متر قطر داشتند جهت تلقیح با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pFGC5941 استفاده شد. تقریباً بعد از دو هفته تمام ریزنمونه‌ها تولید کالوس کردند (شکل A-۱۰). بعد از دو هفته قرارگیری در محیط کالوس‌زایی، گیاهان به مدت چهار هفته در محیط حاوی عامل انتخاب‌گر در T-DNA (Transfer DNA)، یعنی PPT و همچنین Cefotaxime برای اطمینان از عدم رشد آگروباکتریوم‌های باقیمانده بُرده شدند و جوانه‌زنی گیاهانی که در برابر PPT مقاوم بودند آغاز و ادامه یافت (شکل B-۱۰). به‌منظور بررسی تراریختی گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های تقلیح شده با آگروباکتریوم دو لاین از گیاهچه‌های حاصل از میان ۱۰ لاین بدست آمده، به طور تصادفی انتخاب و از این گیاهان در سن چهارهفته‌ای برای آنالیزهای مولکولی استفاده شدند.

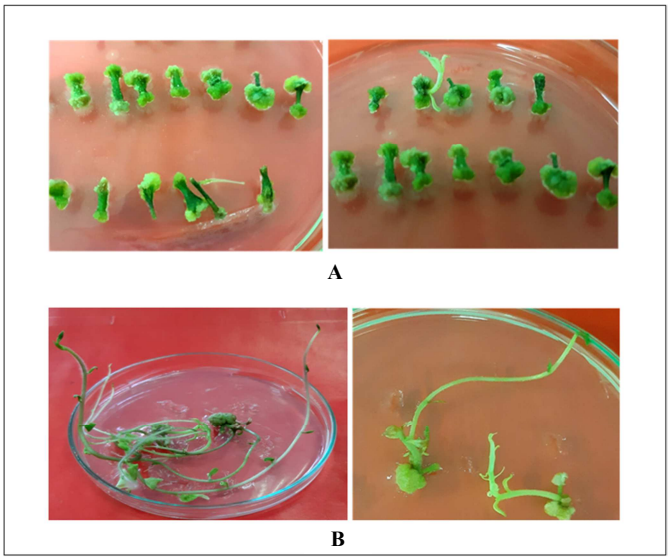
بررسی وجود ترانس ژن در DNA گیاهان حاصل

استخراج DNA ژنومی از دو گیاه حاصل از محیط انتخاب‌گر، به روش CTAB انجام گرفت. برای تأیید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده در پلاسمید استفاده شد. بدین منظور پنج نوع PCR به‌صورت زیر انجام پذیرفت: الف) PCR با آغازگرهای *P0* Fext و *P25P0* ROL برای تأیید وجود ژن *P0* از روی DNA ژنومی. نتیجه این PCR برای هر دو DNA ژنومی مثبت بود. بدین ترتیب وجود قطعه ژن *P0* در این گیاهان تأیید شد (شکل A-۱۱).



شکل ۹. A) رشد آگروباکتریوم‌های ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب. B) نتیجه الکتروفورز PCR کلنی‌های مثبت در محیط انتخاب‌گر حاوی Kanamycin در جهت Sense. C) نتیجه الکتروفورز PCR کلنی‌های مثبت در محیط انتخاب‌گر حاوی Kanamycin در جهت Antisense.

Figure 9. A) Growth of transformed Agrobacteria with recombinant plasmid. B) The electrophoresis results of PCR of positive colonies in a selective medium containing Kanamycin in Sense direction. C) The electrophoresis results of PCR of positive colonies in selective media containing Kanamycin in Antisense direction.



شکل ۱۰. A) کالوس‌زایی ۸ روز بعد از هم‌کشتی میانگره‌ها با آگروباکتریوم. بعد از قرارگیری ریزنمونه‌های میانگره (Internode explants)، با قطر دو تا سه میلی‌متر و طول ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر در محیط حاوی NAA (۰/۰۲ mg/l)، GA3 (۰/۰۳ mg/l)، TDZ (۰/۳ mg/l) و Cefotaxime (۳۵۰ mg/l)، برای کالوس‌زایی به مدت دو هفته در این محیط ماندند. B) قطعات میانگره که ۱۳ روز در محیط رشد حاوی Cefotaxime قرارگرفته بودند، به محیط MS که حاوی NAA (۰/۰۲ mg/l)، GA3 (۰/۰۳ mg/l) و TDZ (۰/۳ mg/l) و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر Cefotaxime و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر PPT بود، انتقال یافتند. این شکل، Shooting (جوانه‌زنی) ریزنمونه‌ها را در محیط مذکور بعد از ۱۰ روز نشان می‌دهد. در این محیط گیاهان تا دو هفته باقی ماندند و بعد برای انتخاب دوباره در همین محیط واکشت شدند. قاعدتاً، گیاهانی باید در محیط حاوی علف‌کش Basta (PPT) باید زنده بمانند که T-DNA پلاسمید pFGC5941 نوترکیب (دو جهت Sense و Antisense) را دریافت کرده‌اند.

Figure 10. A) Callogenesis post 8 days co-culturing of the internodes with Agrobacterium. After placement of internode explants, with 2 to 3 mm in diameter and 0.5 to 1 cm in length on medium containing GA3 (0.02 mg / l), GA3 (0.03 mg / l) TDZ (0.3 mg / l) and Cefotaxime (350 mg / l), they were maintained on this medium for two weeks. B) Internodes, exposed to Cefotaxime medium for 13 days, were transferred to MS medium containing (0.02 mg / l) NAA, (0.03 mg / l) GA3 and (0.3 mg / l) TDZ, and 350 mg / l Cefotaxime and 10 mg / l PPT. The figure shows the shooting of explants in the medium after 10 days. In this medium, the plants remained for two weeks and then were re-cultured for re-selection. As a rule, plants should survive in the medium containing Basta herbicide (PPT) that received the recombinant pFGC5941 T-DNA (both Sense and Antisense).

ب) PCR با آغازگرهای *P0P25* FOL و ROL 2b*P25* برای تأیید وجود ژن *P25* از روی DNA ژنومی. نتیجه این PCR نیز برای هر دو DNA ژنومی مثبت بود. بدین ترتیب وجود قطعه ژن *P25* در این گیاهان تأیید شد (شکل B-۱۱). ج) PCR با آغازگرهای *P252b* FOL و Rext *2b* برای تأیید وجود ژن *2b* از روی DNA ژنومی (شکل C-۱۱). نتیجه این PCR برای هر دو DNA ژنومی مثبت بود. بدین ترتیب وجود قطعه ژن *2b* در این گیاهان تأیید شد. د) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint. PCR با آغازگرهای مربوط به پلاسمید جهت تایید حضور قطعه Sense بود. الکتروفورز حضور قطعه Sense را تایید کرد (شکل D-۱۱). جهت تایید عدم حضور آگروباکتریوم در DNAی استخراجی از گیاهان تراریخته، PCR با آغازگر اختصاصی ژن VirB2 (Virulence) انجام شد. این ژن در خارج از T-DNA آگروباکتریوم قرار دارد. نتیجه الکتروفورز از گیاهان یک و دو به ترتیب در ستون‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که هیچ باندی برای ژن VirB2 در DNA استخراج شده از گیاهان مشاهده نشد. بدین صورت احتمال حضور آگروباکتریوم و خطای آزمایش رد شد. هـ) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext. PCR با جفت آغازگرهای دو طرف محل ورود قطعه *P0+P25*+2b در جهت Antisense انجام شد. نتیجه این PCR نیز نشان داد که قطعه Antisense به DNAی ژنومی هر دو گیاه وارد شده است (شکل E-۱۱).

بررسی بیان ترنسژن با RT-PCR

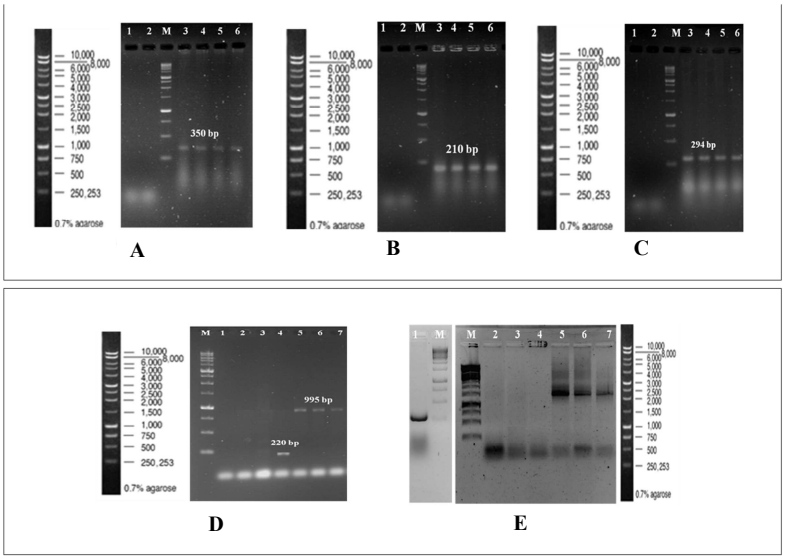
از گیاهانی که از نظر حضور ترانس ژن در درون DNA ژنومی تأیید شده بودند، استخراج RNA از بافت‌های تازه برگ‌های جوان انجام گرفت. پس از تیمار با DNase، سنتز cDNA صورت گرفت و روی آن‌ها PCR انجام شد. هدف از این کار، بررسی حضور mRNAهای حاصل از رونویسی سازه سنجاق‌سری بود.

PCR روی cDNA با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rext

با انجام PCR روی cDNAها با جفت آغازگرهای جهت Sense و Antisense روی پلاسمید pFGC5941، حضور رونوشت در گیاهان در دو جهت تأیید شد (شکل ۱۲). به لحاظ تیمار با DNase نتیجه این PCR حاکی از بیان شدن ترانس‌ژن در گیاهان است.

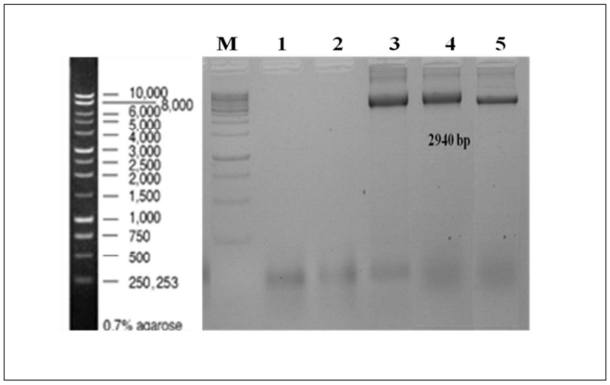
در این تحقیق برای ایجاد مقاومت در سیب‌زمینی علیه ویروس‌های PLRV، PVX و CMV از مکانیسم خاموشی RNA استفاده شد. خاموشی ژن بعد از رونویسی (PTGS: Post transcriptional gene silencing) و کشف RNAهای دو رشته‌ای در گیاهان (Bass, 2000) این امکان را به محققان داده است که به‌جای بیان یک پروتئین جدید، به کم کردن بیان پروتئین در میزبان روی بیاورند. نشان داده شده است که خاموشی RNA یک فنّاوری قوی برای تولید گیاهان مقاوم در برابر ویروس ها است (Sharma *et al.,* 2015). در مورد ایجاد مقاومت در گیاهان از طریق خاموشی RNA گزارش‌های زیادی وجود دارد؛ برای مثال در گیاهان تراریخته توتون که پروتئین پوششی ویروس PVX در آن‌ها بیان نمی‌شد، گیاهان به PVX مقاومت قابل ملاحظه ای نشان دادند (Feng *et al.,* 2003). در مطالعات دیگر به‌وسیله مکانیسم خاموشی ژن گیاهان سیب‌زمینی و توتون مقاوم به PVX ایجاد شده است (Fateri Rezvani *et al.,* 2016; Sajjadi Fard *et al.,* 2016). با این حال در ایجاد مقاومت به ویروس X از طریق خاموشی ژن تولید کننده پروتئین پوششی، نشان داده شده است که PTGS نتوانست مقاومت به ویروس ایجاد نماید که بدیهی است با وجود و مداخله پروتئین ویروسی ممانعت‌کننده از خاموشی RNA سیستم مقاومت گیاه شکسته شده و ویروس به راحتی تکثیر یافته است (Bazzini *et al.,* 2006).

برای مقایسه کارآمدی ساختار سنس و آنتی‌سنس و ساختار سنجاق‌سری تحقیقات زیادی انجام‌شده است. برای نمونه برای ایجاد مقاومت به CMV در توتون از ساختار سنجاق‌سر و توالی Sense ژن CMV 2b استفاده شد. نتایج نشان داد که siRNAهای حاصل از توالی Sense از بین می‌روند اما siRNAهای حاصل از سنجاق‌سر باقی می‌مانند.



شکل ۱۱. A) نتیجه PCR با آغازگرهای Fext *P0* و ROL *P25P0* از DNAی ژنومی گیاهان انتخاب شده با PPT. ستون ۱ و ۲ کنترل منفی است که به ترتیب DNAی گیاه تلقیح نشده با آگروباکتریوم و آب به جای DNAی الگو است. ستون ۳ و ۴ محصول همین PCR به ترتیب روی pFGC5941 نوترکیب و pPGBKT7 است (کنترل مثبت). باندهای موجود در ستون‌های ۵ و ۶ که مربوط به گیاهان ترانسژنیک هستند کاملاً برابر باند کنترل مثبت یعنی ۳۵۰ باز است. B) نتیجه PCR با آغازگرهای *P0 P25* FOL و *2bP25* ROL از DNAی ژنومی گیاهان انتخاب شده با PPT. ستون ۱ کنترل منفی است که DNAی گیاه تلقیح نشده با آگروباکتریوم و ستون ۲ استفاده از آب به جای DNAی الگو است. ستون ۳ و ۴ محصول همین PCR به ترتیب روی pPFGC5941 نوترکیب و pPVX است (کنترل مثبت). باندهای موجود در ستون‌های ۵ و ۶ که مربوط به گیاهان ترانسژنیک هستند کاملاً برابر باند کنترل مثبت یعنی ۲۱۰ باز است. C) نتیجه‌ی PCR با آغازگرهای *P252b* FOL و *2b* Rext روی DNAی ژنومی گیاهان انتخاب شده با PPT. ستون ۱ و ۲ کنترل منفی است که به ترتیب DNAی گیاه تلقیح نشده با آگروباکتریوم و آب به جای DNAی الگو است. ستون ۳ و ۴ محصول PCR به ترتیب روی pPFGC5941 نوترکیب و cDNA است که همسان با باندهای موجود در ستون‌های ۵ و ۶ به عنوان کنترل مثبت یعنی ۲۹۴ باز هستند. D) نتیجه PCR روی ژل آگارز، با جفت آغازگر pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint، روی DNA ژنومی استخراج‌شده از دو گیاه ترا-ریخت؛ باند موجود در ستون‌های ۶ و ۷ که حدود ۹۹۵ جفت باز است با باند PCR کنترل مثبت که روی پلاسمید pFGC5941 نوترکیب در جهت Sense انجام‌شده (ستون ۵) برابری می‌کند. ستون ۱، کنترل منفی است و روی گیاه تلقیح نشده با آگروباکتریوم، انجام شد و محصولی از آن رؤیت نشد. ستون ۲ و ۳ نیز مربوط به PCR روی ژن VirB2 است که به ترتیب از گیاهان یک و دو تراریخت است که نبودن باند دلیلی بر عدم وجود آگروباکتریوم در DNA استخراجی از گیاه است. ستون ۴ کنترل مثبت برای ژن VirB2 از روی پلاسمید آگروباکتریوم است. E) نتیجه PCR روی ژل آگارز، با جفت آغازگر pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext، روی DNA ژنومی استخراج‌شده از دو گیاه تراریخت؛ اندازه باند موجود در ستون‌های ۶ و ۷، ۱۵۴۷ جفت باز بوده و با باند کنترل مثبت (ستون ۵) برابر است، ستون ۴، کنترل منفی است و روی گیاه تلقیح نشده با آگروباکتریوم که به‌عنوان کنترل در PCR استفاده شد و محصولی از آن رؤیت نشد. ستون ۲ و ۳ مربوط به PCR روی ژن VirB2 است که به ترتیب از گیاهان یک و دو تراریخت است که نبودن باند دلیلی بر عدم وجود آگروباکتریوم در DNA استخراجی از گیاه است. ستون ۱ نتیجه PCR روی ژنVirB2 روی پلاسمید آگروباکتریوم به عنوان کنترل مثبت برای ژن VirB2 است.

Figure 11. A) PCR results with Fext P0 and ROL P25P0 primers on the genomic DNA of plants selected with PPT. Columns 1 and 2 are negative controls, which correspond to DNA of the plants not inoculated with Agrobacterium and water instead of the template DNA, respectively. Columns 3 and 4 are the products of PCR on the recombinant pFGC5941 and pPGBKT7 plasmids (as positive control), respectively. Bands in columns 5 and 6 correspond to reults of PCR on transgenic plants quite equal to band of the positive control (350 bp). B) PCR results with FOL P0 P25 and ROL 2bP25 primers on the genomic DNA of plants selected with PPT. Column 1 is the negative control which cprrespond to the DNA of the plant not inoculated with Agrobacterium and column 2 is the use of water instead of the template DNA. Columns 3 and 4 are the resuts of PCR on the recombinant pPFGC5941 and Ppvx (positive control), respectively. Bands in columns 5 and 6 correspond to reults of PCR on transgenic plants quite equal to band of the positive control (210 bp). C) PCR result with FOL P252b and Rext 2b primers on the genomic DNA of plants selected with PPT. Columns 1 and 2 are negative controls, which is respectively the DNA of the plant not inoculated with Agrobacterium and water instead of the template DNA. Columns 3 and 4 are the results of PCR on the recombinant pPFGC5941 and cDNA, respectively. which are identical to the bands in columns 5 and 6 as positive controls (294 bp). D) PCR results on agarose gel, with primers pair (pFGC5941 Fext and pFGC5941 Rint) on genomic DNA extracted from two transgenic plants; bands present in columns 6 and 7 of about 995 bp, is equal with band resulted from positive control PCR conducted on recombinant pFGC5941 plasmid in Sense direction (column 5). Column 1 was negative control and was performed on the plant not inoculated with Agrobacterium and any product was not observed. Columns 2 and 3 are also related to PCR on the VirB2 gene of transgenic plants with the code number of 1 and 2, so that the lack of bands is a reason for the absence of Agrobacterium in their extracted DNA. Column 4 is a positive control for the VirB2 gene from Agrobacterium plasmid. E) PCR result on agarose gel, with primers pair pFGC5941 Fint and pFGC5941 Rext, on genomic DNA extracted from two transgenic plants; band size in columns 6 and 7 is 1547 bp equall to band of positive control (column 5), column 4 is negative control correspond to plants not inoculated with Agrobacterium and any band was not visualized. Columns 2 and 3 related to the PCR on the VirB2 gene of transgenic plants with the code number of 1 and 2, so that the lack of bands is a reason for the absence of Agrobacterium in their extracted DNA. Column 1 is the result of PCR on the VirB2 gene on Agrobacterium plasmid as positive control for the VirB2 gene.



شکل ۱۲. نتیجه الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸٪، انجام یافته روی cDNAهای سنتز شده از RNAهای استخراج‌شده از گیاهان سیب‌زمینی تراریخت با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rext. باند موجود در ستون‌های ۴ و ۵، ۲۹۴۰ جفت باز است که با اندازه باند کنترل مثبت در ستون ۳، یعنی pFGC5941 نوترکیب در دو جهت Sense و Antisense برابری می‌کند. ستون ۱ و ۲، به ترتیب PCR با cDNAی گیاه کنترل منفی (تلقیح نشده با آگروباکتریوم) و آب به جای DNA ی الگو مربوط است.

Figure 12. Electrophoresis of PCR product on 0.8% agarose gel, performed with pFGC5941 Fext and pFGC5941 Rext primers on cDNAs synthesized from RNA extracted from transformed potato plants. The band in columns 4 and 5 is 2940 bp, which is similar in size to the positive control band in column 3 that related to the recombinant pFGC5941 in both Sense and Antisense directions. Columns 1 and 2 related to negative control PCR on cDNA of plant not inoculated with *Agrobacterium* or PCR with water instead of template DNA, respectively.

بنابراین می‌توان گفت که خاموشی از طریق ساختار سنجاق‌سر حفظ می‌شود و می‌تواند حتی از نسلی به نسل بعد منتقل شود (Koizumi *et al.,* 2017). در این راستا تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی نشان داده است که مقاومت به ویروس در گیاهان تراریخته از نسل اول به نسل‌های بعدی پایدار بوده و توارث‌پذیر است (Di Nicola-Negri *et al.,* 2005; Hu *et al.,* 2011; Lee *et al.,* 2011; Miao *et al.,* 2016; Xie *et al.,* 2014). در سازه سنجاق‌سر برای ایجاد خاموشی، رونویسی از ژن hpRNA (Hair pin RNA) به‌تنهایی کافی نیست و به محرک سیتوپلاسمی و RNAi هسته‌ای نیاز است. هر رونویسی hpRNA منجر به ایجاد RNAi نمی‌شود و پارامترهایی از جمله منبع ادغام ژن، پردازش متوسط آن و تعامل با پروتئین‌های مختلف ممکن است در تعیین سرنوشت رونوشت hpRNA و کارآمدی RNAi حیاتی باشد (Dalakouras *et al.,* 2011). با استفاده از miR159a (Micro RNA)، miR171a و miR167b از گیاه *Arabidopsis thaliana* و طراحی دو نوع amiRNA، توالی‌های *P25* mRNA PVX و HC-Pro PVY در گیاهان توتون تراریخت آلوده به این دو ویروس مورد هدف قرار داده شد و بدین ترتیب مقاومت بسیار بالایی در برابر این دو ویروس در گیاهان هدف مشاهده گردید (Ai *et al.*, 2011). با توجه به این تجربیات، خاموش کردن RNA پروتئین‌های *P0*، *P25* و *2b* ویروس‌های PLRV، PVX و CMV می‌تواند به‌عنوان روشی نوین، در دست یافتن به مقاومت کامل علیه این ویروس‌ها باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق برای اولین بار سازه سنجاق‌سر جهت استفاده در ایجاد مقاومت هم‌زمان علیه چند ویروس ساخته شد. این سازه با اتصال قسمت‌هایی از ژن‌های سرکوبگر خاموشی RNA سه ویروس PLRV، PVX و CMV تهیه شد. ایجاد مقاومت هم‌زمان علیه سه ویروس مهم سیب‌زمینی از طریق خاموش کردنِ ژن‌هایی که خود این ژن‌ها ممانعت کننده از دفاع طبیعی گیاه سیب-زمینی علیه سه ویروس یادشده هستند؛ با یک سازه و با یک انتقال ژن به گیاه، از نکات قوت و نوآوری این تحقیق هست که در موارد قبلی انجام نشده است. البته بررسی مقامت ایجاد شده در گیاهای حاصله از تراریختی با این سازه باید انجام شود تا نتایج حاصله مورد اطمینان قرار گیرد. از طرفی به خاطر اهمیت اقتصادی این سه ویروس و دامنه میزبانی بسیار وسیع آنها سازه ایجادشده می‌تواند به گیاهان میزبان دیگر برای ایجاد مقاومت انتقال یابد.

REFERENCES

1. Ai, T., Zhang, L., Gao, Z., Zhu, C. X. & Guo, X. (2011). Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology,* 13(2), 304-316.
2. Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 101(3), 235-238.
3. Baulcombe, D. C., CHIU, M. H., CHEN, I. H. & TSAI, C. H. (2010). The silencing suppressor P25 of Potato Virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 641-649.
4. Bazzini, A. A., Asurmendi, S., Hopp, H. E. & Beachy, R. N. (2006). Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively. *Journal of General Virology,* 87(4), 1005-1012.
5. Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F box protein *P0* targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology,* 17(18), 1615-1621.
6. Chaube, H. S. & Pundhir, V. S. (2005). *Crop diseases and their management*. PHI Learning Pvt. Ltd.
7. Chen, X., Liu, J., Xu, L., Jiang, F., Xie, X., Zhu, C. & Wen, F. (2010). Inhibiting virus infection by RNA interference of the eight functional genes of the potato virus Y genome. *Journal of Phytopathology*, 158(11-12), 776-784.
8. Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A. & Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature,* 385(6619), 781-782
9. Dalakouras, A., Tzanopoulou, M., Tsagris, M., Wassenegger, M. & Kalantidis, K. (2011). Hairpin transcription does not necessarily lead to efficient triggering of the RNAi pathway. *Transgenic Research,* 20(2), 293-304.
10. Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L. & Papadopoulou, K. (2020). Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology,* 182(1):38-50.
11. Di Nicola-Negri, E., Brunetti, A., Tavazza, M. & Ilardi, V. (2005). Hairpin RNA-mediated silencing of plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Research,* 14(6), 989-994.
12. Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin,* 19,11-15.
13. Fateri Rezvani, S., Pazhouhandeh, M., Shirzad, A. (2016). Production of potato resistant plant to PVX using an RNA silencing mechanism. *Genetic Engineering and Biosafety Journal,* 5(1), 1-14.
14. Feng, D., Liu, X., Meng, K., Liao, L., Wei, X., Xu, H. & Zhu, Z. (2003). Silencing of potato virus X coat protein gene in transgenic tobaccos by codon replacement that confers resistance to PVX infection. *Chinese Science Bulletin,* 48(15), 1592-1598.
15. Fletcher, J. D. (2012). A virus survey of New Zealand fresh process and seed potato crops during 201011. *New Zealand Plant Protection,* 65, 197-203.
16. Gellért, Á., Nemes, K., Kádár, K., Salánki, K. & Balázs, E. (2012). The C-terminal domain of the 2b protein of Cucumber mosaic virus is stabilized by divalent metal ion coordination. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 38, 446-454.
17. González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M. & Díaz-Ruíz, J. R. (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology,* 5(1), 29-35.
18. Hameed, A., Iqbal, Z., Asad, S. & Mansoor, S. (2014). Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *The Plant Pathology Journal,* 30(4), 407.
19. Hu, Q., Niu, Y., Zhang, K., Liu, Y. & Zhou, X. (2011). Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Virology Journal,* 8(1), 41.
20. Jeffries, C., Barker, H. & Khurana, S. M. P. (2006). Viruses and viroids. In: *Handbook of Potato Production, Improvement, and Postharvest Management*. Food Products Press, New York, USA, pp. 387-448.
21. Koizumi, M., Shimotori, Y., Saeki, Y., Hirai, S., Oka, S. I. & Kodama, H. (2017). Effects of the *2b* protein of cucumber mosaic virus subgroup IB strain IA on different transgene-induced RNA silencing pathways. *Plant Molecular Biology Reporter,* 35(2), 265-272.
22. Lecoq, H., Lemaire, J. M. & Wipf-Scheibel, C. (1991). Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. *Plant Disease,* 75(2), 208-211.

23. Lee, S. N., Choi, S. H., Ryu, K. B., Kim, H. H. & Ryu, K. H. (2011). Molecular and cytogenetic assessment of transgenic hot peppers resistant to cucumber mosaic virus. *Horticulture, Environment, and Biotechnology,* 52(2), 211-217.
24. Lin, C. Y., Ku, H. M., Chiang, Y. H., Ho, H. Y., Yu, T. A. & Jan, F. J. (2012). Development of transgenic watermelon resistant to cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic Research*, 21(5), 983-993.
25. Lin, S. S., Wu, H. W., Jan, F. J., Hou, R. F. & Yeh, S. D. (2007). Modifications of the HC-Pro of zucchini yellow mosaic potyvirus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology,* 97, 287-296.
26. Mascia, T., Cillo, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M. M., De Stradis, A., Palukaitis, P. & Gallitelli, D. (2010). Characterization of the interactions between cucumber mosaic virus and potato virus Y in mixed infections in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions,* 23(11), 1514-1524.
27. Matzke, M. A., Matzke, A. J., Pruss, G. J. & Vance, V. B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Current Opinion in Genetics & Development,* 11(2), 221-227.
28. Miao, B., Chen, W. T., Xie, B. Y. & Yang, G. S. (2016). A novel strategy to enhance resistance to cucumber mosaic virus in tomato by grafting to transgenic rootstocks. *Journal of Integrative Agriculture,* 15(9), 2040-2048.
29. Moissiard, G. & Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology,* 5(1), 71-82.
30. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum,* 15, 473-497.
31. Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P. & Ziegler-Graff V. (2006). F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 103(6):1994-1999.
32. Pazhouhandeh, M., Bortolamiol, D., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology*, 17(18), 1615-1621.
33. Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A. & Baulcombe, D. C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant Cell,* 11(7), 1207-1215.
34. Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science,* 276(5318), 1558-1560.
35. Rezazadeh, S., Sohani, M. M. & Rezadoost, M. H. (2017). Analysis of transgenic citrus (*Citrus aurantium* L.) plants expressing Citrus Tristeza Virus coat protein gene. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48, 79-91. (in Farsi).
36. Sajjadi Fard, M., Pazhouhandeh, M., Shirzad, A., Mohajjel Shoja, H. (2016). Production of tabacco plant resistant to PVX by RNA silencing mechanism. *Journal of Applied Researches in Plant Protection,* 5(1), 103-115
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
38. Sharma, V. K., Kushwaha, N., Basu, S., Singh, A. K. & Chakraborty, S. (2015). Identification of siRNA generating hot spots in multiple viral suppressors to generate broad-spectrum antiviral resistance in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants,* 21(1), 9-18.
39. Srinivasan, R. & Alvarez, J. M. (2007). Effect of mixed viral infections (potato virus Y–potato leafroll virus) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology,* 100(3), 646-655.
40. Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology,* 13(2), 204-216.
41. Tollenaere, C., Susi, H. & Laine, A. L. (2016). Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science,* 21(1), 80-90.
42. Xie, X., Song, Y., Liu, X., Wang, S., Zhu, C. & Wen, F. (2014). Different target genes and chimeric-gene hairpin structures affect virus resistance mediated by RNA silencing in transgenic tobacco. *Biologia Plantarum,* 58(3), 575-581.
43. Zaitlin, M. (1976). Viral cross-protection: More understanding is need. *Phytopathology,* 66, 382–383.
44. Zhang, H., Demirer, G. S., Zhang, H., Ye, T., Goh, N. S., Aditham, A. J. & Landry, M. P. (2019). DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 7543-7548.
45. Zhao, M. M., An, D. R., Zhao, J., Huang, G. H., He, Z. H. & Chen, J. Y. (2006). Transiently expressed short hairpin RNA targeting 126 kDa protein of tobacco mosaic virus interferes with virus infection. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(1), 22-28.