مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۰۴-۹۴
DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

ایجاد مقاومت به ویروس Y سیب زمینی PVY با استفاده از سازه سنجاق‌سری حاوی ژن پروتئین پوششی

Induction of Resistance to Potato Virus Y (PVY) Using Hairpin Construct of Coat Protein

حسن رهنما[۱*]، مرضیه قنبری جهرمی[۲]، امیر موسوی[۳]، سعید سهیلی‌وند[۱]، رضا پوررحیم[۴]

Hassan Rahnama[1*], Marzie Ghanbari[2], Amir Mousavi[3], Saeed Soheilivand[1], Reza Pourrahim[4]

۱- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- دانش آموخته دکتری علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران
٤- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

1-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2-PhD student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3-National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4-Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۰)

چکیده

یکی از بیماری‌های مهمی که سالانه خسارت‌های اقتصادی بسیاری به کشاورزان کشور وارد می‌کند و باعث افت عملکرد و کیفیت محصول می‌شود، ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) است. امروزه استفاده از سازوکارهای ایجاد مقاومت ناشی از پاتوژن افق‌های جدیدی در راستای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به ویروس گشوده است. در این پژوهش از روش خاموشی ژن برای ایجاد مقاومت بر علیه PVY استفاده شده است. برای این منظور از یک سازه ژنی RNAi برگرفته از بخش پروتئین پوششی (CP) ژنوم PVY استفاده شد. سازه با استفاده از اگروباکتریوم به ریزنمونه‌های میانگره و برگ گیاه سیب‌زمینی انتقال داده شد. درصد نوساقه‌های تولید شده در محیط انتخابی حاوی علف‌کش فسفینوتریسین پس از رشد و تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت. تراریختی بوته‌ها و بررسی بیان ژن در گیاهان تراریخته با استفاده از آزمون زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و RT-PCR بررسی شد. بر اساس نتایج ٤٢ درصد گیاهان باززا شده تراریخته بودند. بیان ژن CP نیز در اغلب لاین‌ها به اثبات رسید. به منظور تعیین مقاومت گیاهان تراریخته در برابر آلودگی PVY، آزمون زیست‌سنجی صورت گرفت. نتایج حاصله نشان داد که حدود ۸۲ درصد گیاهان سیب‌زمینی تراریخت نسبت به آلودگی PVY مقاوم هستند.

واژه‌های کلیدی

پروتئین پوششی،
خاموشی ژن،
سیب‌زمینی،
مقاومت به ویروس،
PVY،
RNAi

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به علت دارا بودن نشاسته، محتوای ویتامینی و پروتئینی زیاد و نیز عملکرد بالا به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع غذایی در دنیا مطرح است. ایران با سطح زیرکشت ۱۵۳۰۰۰ هکتار، عملکرد ۳۰۳۹۲۲ کیلوگرم در هر هکتار و با تولید سالانه ٤٦٥٠٠٠٠ تن یکی از بزرگترین تولیدکنندگان سیب‌زمینی در دنیا به شمار می‌آید (FAOSTAT, 2013). یکی از بیماری‌های مهمی که سالانه خسارت شدیدی به محصول سیب‌زمینی وارد می‌کند بیماری ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) است. میزان خسارت این بیماری بسته به رقم، سال و مکان بین ۱۰-۹۰٪ گزارش شده است (Valkonen, 2007). تنها راه حل این مشکل در کشور تولید یا واردات بذور سیب‌زمینی عاری از ویروس است که هزینه‌های سنگینی شامل هزینه نیروی متخصص، امکانات و فضای کشت بافتی، گلخانه‌ها یا مزارع بزرگ ایزوله و نیز آزمون‌های شناسایی بذور آلوده از سالم به همراه دارد. بنابراین، با توجه به عدم وجود منابع مقاومت در ارقام سیب‌زمینی، تلاش در جهت ایجاد ارقام مقاوم تراریخته می‌تواند بسیار سودبخش باشد. امروزه در دنیا از فن‌آوری‌های نوینی همانند خاموشی ژن با روش RNA مداخله‌گر (RNA interference: RNAi) جهت رفع مشکلاتی از این نوع استفاده می‌شود. در این روش با بهره‌گیری از سازوکار خاموشی پس از رونویسی (PTGS) با طراحی سازه ژنی دارای قطعات سنس و آنتی‌سنس مشابه با بخشی از ژنوم خود ویروس که پس از رونویسی حالت سنجاق‌سری به خود می‌گیرند، می‌توان ویروس را در سطح رونویسی خاموش و کنترل کرد (Gaba *et al*., 2010). در این راستا پژوهش‌های متعددی در رابطه با ایجاد مقاومت به ویروس انجام شده است. پوررحیم و همکاران (۱۳۸٤) با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی، ژن پروتئین پوششی سویه نکروتیک ویروس Y سیب‌زمینی را همسانه سازی کردند و با استفاده از پیشبر CaMV 35S، به کمک حامل ژنی pBin19 و استفاده از *Agrobacterium tumefaciens*، به گیاهان توتون انتقال دادند. آزمون رونوشت برداری برگردان (RT-PCR)، وجود رونوشت RNA از تراژن را در لاین‌های تراریخت تأیید کرد. نیازی و همکاران (۱۳۸٤) با بهره‌گیری از روش‌های مختلف خاموشی ژن در جهت ایجاد مقاومت به ویروس زرد نکروتیک رگبرگ چغندرقند (BNYVV) با استفاده از ژن رمزکننده پروتئین پوششی (CP) ویروس موفق به ایجاد مقاومت در گیاهان حاصل شدند. همچنین استفاده از قطعات پروتئین پوششی ویروس X سیب زمینی (PVX) در سازه RNAi منجر به ایجاد مقاومت به ویروس PVX در ارقام تراریخت سیب‌زمینی شده است (فاطری رضوانی و همکاران، ۱۳۹۵).

میسیو و همکاران (۲۰۰٤) با کاربرد dsRNA گرفته شده از بخش انتهایی ′3 توالی ژن پروتئین پوششی (CP) ویروس PVY موفق به ایجاد مقاومت به PVY در رقم تجاری سیب‌زمینی 'Spunta' شدند (Missiou *et al*. 2004). گیاهان تراریخت حاصل مقاومت بالایی به سه نژاد PVY (PVY^N، PVY^O و PVY^{NTN}) نشان دادند.گزارش‌های متعددی در زمینه ایجاد مقاومت به PVY با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و بویژه RNAi وجود دارد که موفق به ایجاد مقاومت به PVY در گیاهان شده‌اند (Smith *et al*. 2000، Valkama *et al*., 2000، Maki-Valkama *et al*. 2000، Di Nicola-Negri *et al*. 2005، Gaba *et al*., 2010; Ganbari-Jahromi *et al*., 2015). اخیراً، با بیان نواحی تلفیقی پروتئین‌های پوششی سه نوع ویروس PVY, PVX, PVS در ساختار RNAi محققان توانسته‌اند گیاهان سیب‌زمینی را در مقابل این سه نوع ویروس مقاوم نمایند (Hameed *et al*., 2017). همچنین با خاموش‌سازی فاکتورهای شروع ترجمه یوکاریوتی (eIF) در گیاهان سیب‌زمینی با استفاده از سازه‌های RNAi مقاومت گیاه سیب‌زمینی در مقابل ویروس PVY افزایش یافته است (Miroshnichenko *et al*., 2020).

با ابداع فن‌آوری‌های جدیدتر مانند ویرایش ژنی بویژه CRISPR/Cas9، امیدهای فراوانی برای ایجاد مقاومت به ویروس‌ها در گیاهان بوجود آمده است (Borrelli *et al*., 2018). به عنوان مثال، با طراحی sgRNA هایی که مناطق حفاظت شده ویروس (مانند P3, CI, Nib, CP) را هدف گیری می‌کنند، محققان توانسته‌اند با روش ویرایش ژنی لاین‌های سیب‌زمینی مقاوم به طیف وسیعی از ویروس‌ها را ایجاد نمایند (Zhang *et al*., 2019).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی امکان ایجاد مقاومت به PVY در گیاه سیب‌زمینی با استفاده از سازه خاموشی ژن (سنجاق‌سری) طراحی شده از بخش ژن پروتئین پوششی ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و محیط کشت: گیاهان درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی رقم مارفونا از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. کشت ریزنمونه‌های تک یا دو گرهی در محیط تکثیر حاوی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) به علاوه ۳ درصد ساکارز، pH ۵/۷، در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت ٤۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی تکثیر شدند. پس از گذشت ۳ الی ٤ هفته گیاهان مناسب جهت تهیه ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات ریزنمونه میانگره به طول ٤ تا ٦ میلی‌متر و قطعات ریزنمونه برگ با ابعاد تقریبی ۵×۵ میلی‌متر پس از جداسازی به مدت سه روز در محیط القای کالوس پیش‌کشت شدند (جدول ۱). کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۲-۲٤ درجه‌سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت زیر نور لامپ‌های فلورسنت سفید (با شدت ٤۰۰۰ لوکس) نگهداری شدند.

سویه اگروباکتریوم و ناقل پلاسمیدی: در این پژوهش از سازه خاموشی ژن RNAi با هدف ایجاد مقاومت به PVY طراحی شده توسط سهیلی‌وند و همکاران (۱۳۸۹) استفاده شد. در این سازه بخشی از توالی کدکننده پروتئین پوششی PVY (CP) به طول ۳۲۰ جفت باز به صورت سنس و آنتی‌سنس در دو طرف یک قطعه اینترون (۳۸۹ جفت باز) در یک ناقل پلاسمیدی ویژه RNAi (pGSA1252) قرار داده شد. سپس قطعه مورد نظر با آنزیم *Pst*I هضم شده و در پلاسمید pCAMBIA3300 حاوی ژن نشانگر انتخابی *bar* همسان‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب به اگروباکتریوم سویه AGL1 با روش انجماد و ذوب (Sambrook and Russell, 2001) منتقل شد. این پلاسمید حاوی ژن *bar* کدکننده آنزیم فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (PAT)، پیشبر و پایانبر ویروس موزاییک کلم (CaMV 35S) می‌باشد (شکل ۱).

تراریختی و باززایی: همزمان با پیش‌کشت ریزنمونه‌ها، در روز دوم یک تک کلونی از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pCAMRNAiCP حامل ساختار سنجاق‌سری CP و ژن *bar* در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین (از هر کدام ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری به‌صورت شبانه کشت شد. کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه تا زمانی که OD_{600} باکتری به ۰/٦ تا ۰/۸ برسد، قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. روشناور حذف شد و رسوب باکتری در مایه تلقیح (حاوی محیط MS بدون هورمون، سوکروز ۳ درصد، مانیتول ۲ درصد و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون) با pH ۵/٤ حل گردید. ریزنمونه‌ها از محیط القای کالوس به یک پتری‌دیش انتقال داده شد تا با باکتری آماده شده به مدت ۱۰ دقیقه تلقیح شوند. بعد از انجام تلقیح ریزنمونه‌ها دوباره به محیط القای کالوس به مدت دو روز با شرایط قبلی و سپس به محیط انتخاب و باززایی منتقل شدند.

به منظور انتقال ژن به سیب‌زمینی با کارایی بالا در کوتاه‌ترین زمان ممکن سه دستورالعمل پایه و رایج باززایی (Beaujean *et al.*, 1998، Visser *et al.*, 1998 و Banerjee *et al.*, 2006) مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۱). هورمون‌های گیاهی مورد ارزیابی شامل سیتوکینین‌های زآتین رایبوزاید (Z.R) و بنزیل آمینوپورین (BAP) در ترکیب با دیگر هورمون‌ها (2,4-D، GA3 و NAA) بودند (جدول ۲). پس از مقایسه آن‌ها مناسب‌ترین روش با اعمال تغییراتی با هدف انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. تعداد برابری از هر دو ریزنمونه (۱۰۰ عدد) در سه محیط پایه و رایج باززایی سیب‌زمینی کشت شدند. پس از ظهور نوساقه‌های تراریخت احتمالی، طول دوره باززایی و تراریختی در هر تیمار ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS به کمک آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گیاهچه‌های باززا شده پس از جداسازی از ریزنمونه به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (جدول۱). در نهایت پس از تکثیر، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان و گلخانه انتقال یافتند.

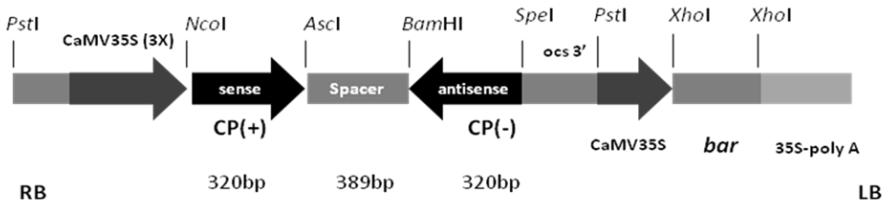
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

جدول ۱- محیط کشت‌های مورد استفاده در کشت بافت و تراریختی سیب‌زمینی به کمک اگروباکتریوم

Table 1. Culture media used in tissue culture and Agrobacterium mediated transformation of potato plants.

	Plant growth regulators (mg/l)			Antibiotic (mg/l)	Selection agent (mg/l)
Media	BAP	2,4-D	NAA	Cefotaxime	PPT
Callus induction	2	2		-	-
Rooting	-	-	0.02	250	1.5
Propagation	-	-	-	100	-

در تمام محیط‌ها، نمک‌ها و ویتامین‌های محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار گیاهی و pH ۵/۷ به عنوان محیط پایه‌استفاده شد. Culture medias contain MS based culture medium containing 30 g/l sucrose, 7 g/l plant agar and pH 5.7.



شکل ۱- قطعه T-DNA در پلاسمید pCAMRNAiCP. توالی‌های مرزی سمت راست (RB)، توالی‌های مرزی سمت چپ (LB)، ژن فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (*bar*)، پیشبر CaMV 35S (3X)، قطعه سنس و آنتی‌سنس PVY CP، اینترون SPS (Spacer)، پایان‌دهنده اکتوپین سینتاز (OCS3′)، *PstI*، *NcoI*، *AscI*، *BamHI*، *SpeI* و *XhoI* آنزیم‌های برشی.

Figure 1: T-DNA construct of pCAMRNAiCP. RB, LB, Right and Left border, respectively; bar, Phosphinotricin acetyl transferase gene; CaMV35s, Cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter; CP, sense and antisense of PVY coat protein; Spacer, SPS; Intron; OCS3′, Octopine synthase terminator; *XhoI*; *SpeI*, *BamHI*, *AscI*, *NcoI*, *PstI*, restriction enzymes.

جدول ۲- سه دستورالعمل پایه مورد استفاده برای باززایی سیب‌زمینی رقم مارفونا

Table 2. Three basal protocol used for potato regeneration

نوع محیط	تنظیم کننده رشد	منبع
M1	Z.R (0.8 mg /1) + GA3 (2 mg /1)	Beaujean *et al*., 1998
M2	BAP (2.25 mg/1) + GA3 (5 mg/1)	Visser *et al*., 1998
M3	Z.R (2.2 mg/1) + GA3 (0.15 mg/1) + NAA (0.02 mg/1)	Banerjee *et al*., 2006

ZR= Zeatin riboside، GA3= Gibberellic acid،BAP= 6-Benzyulamino-purine 2,4-D= 2,4-Dichlorophenoxy

جدول ۳- آغازگرهای اختصاصی ژن bar، قطعه سنس و آنتی‌سنس ژن CP، قطعه اینترون یا spacer و ژن Tubulin به عنوان کنترل داخلی (Housekeeping gene)

Table 3. Specific primers for CP, SPS, bar gene and Tubulin as an internal control (Housekeeping gene).

اسم آغازگر	ناحیه تکثیرشونده		توالی نوکلئوتیدی
CP PVY (sense)	Coat protein	F	5'- CCATGGAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAG -3'
		R	5'- GGCGCGCCAATGCACCAAACCATAAGCCCATG -3'
CP PVY (antisense)	Coat protein	F	5'- ACTAGTAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAG -3'
		R	5'- GGATCCAATGCACCAAACCATAAGCCCATG -3'
SPS	Spacer	F	5'-GGTGACCATGGGGCGCGCCCAATCGATGATTTTAAAT-3'
		R	5'-CGCGAGGTCACCACTAGTTAATTAAGCTGAGG-3'
bar	Selectable marker	F	5'-CTCGGAGTCAAATCTCGGTGACGGG-3'
		R	5'-CGAGTCTACCATGAGCCCAGAACG-3'
Tubulin	Housekeeping gene	F	5'-GCTTTCAACACCTTCCTTCAG-3'
		R	5'-GGGGCGTAGGAGGAAAGC-3'

آزمون گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): پس از استخراج DNA از گیاهان تراریخت احتمالی، به منظور بررسی اولیه و انتخاب لاین‌های تراریخته واکنش PCR با استفاده از سه جفت آغازگر اختصاصی از بخش‌های سنس و آنتی‌سنس سازه کدکننده پروتئین پوششی ویروس PVY-CP، بخش اینترون (SPS) بین قطعه سنس و آنتی‌سنس و ژن نشانگر انتخابی *bar* انجام شد (جدول ۳).

بیان ژن در سطح RNA: به منظور بررسی بیان ژن در سطح RNA آزمون Reverse Transcription PCR (RT-PCR) بعد از استخراج RNA کل از گیاهان سیب‌زمینی با استفاده از روش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

ترایزول (GibcoBRL, Carlsbad, California) انجام شد. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (Roche, Mannheim, Germany) و آغازگر oligo $(dT)_{15}$ انجام گردید. پس از ساخت cDNA واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه اینترون (SPS) و ژن توبولین (tubulin) به عنوان کنترل داخلی گیاه به منظور کنترل کیفی و کمی نمونه‌های RNA استخراجی انجام گردید.

زیست‌سنجی مقاومت به PVY: در این پژوهش از گیاهچه توتون آلوده به PVY نژاد N در بخش ویروس شناسی موسسه گیاهپزشکی، پس از تأیید با آزمون الیزا استفاده شد. به منظور تهیه مایه ویروس، برگ‌های توتون آلوده به ویروس در مقداری بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH ۷ به همراه ۰/۱ درصد مرکاپتواتانول و کاربوراندوم ۲ درصد در یک هاون از قبل خنک شده خمیر گردید و سپس به نسبت ۱۰/۲ (جرم/حجم) حل شد. عصاره به دست آمده بر روی برگ لاین‌های سیب‌زمینی تراریخت مایه‌زنی گردید. گیاهان در دو نوبت به فاصله ۱۵ روز با ویروس مایه‌زنی شدند. غلظت ویروس با استفاده از آزمون الیزا با آنتی بادی‌های پلی‌کلونال اختصاصی PVY خریداری شده از شرکت BIOREBA (Reinach, Switzerland) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

بازیابی و تراریختی سیب‌زمینی: بررسی دستورالعمل‌های مختلف باززایی سیب‌زمینی در رقم مارفونا نشان داد که بیشترین درصد باززایی مربوط به محیط M3 با کمترین طول دوره تراریختی (۲۵ روز) بود. راندمان تراریختی در این محیط بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن SPS ٤٢ درصد به دست آمد که در مقایسه با دو محیط دیگر M1 (١٤ درصد) و M2 (۲۲ درصد) بیشترین درصد تراریختی را به خود اختصاص داد (جدول ٤). راندمان تراریختی در رقم آندیجنا سیب‌زمینی با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* در حدود ۳۵ درصد با طول دوره ۲۸ روز گزارش شده است (Banerjee *et al*., 2006). نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج پژوهش ما تا حدودی مطابقت دارد. البته تفاوت در مقادیر به دست آمده می‌تواند ناشی از تفاوت ژنوتیپ‌ها و یا شرایط آزمایش باشد. به طور کلی، ارقام مختلف سیب‌زمینی از نظر قدرت باززایی متفاوت بوده و نسبت به ترکیبات مختلف هورمونی واکنش متفاوت نشان می‌دهند. از آنجایی که کارایی تراریختی بسیار وابسته به ژنوتیپ است به همین دلیل تاکنون دستورالعمل‌های مختلفی در این زمینه منتشر شده است. به نظر می‌رسد محیط M3 محیط مناسبی برای رقم مارفونا باشد. در آزمایش‌های بعدی، این محیط در ترکیب با دستورالعمل رهنما و همکاران (۱۳۹۱) و با اعمال تغییراتی راندمان تراریختی را تا ٤٥ درصد افزایش داد. طول دوره تراریختی در پژوهش‌های اخیر انتقال ژن به سیب‌زمینی حدود ۷ تا ۱۰ هفته در ارقام سوپریر، بینتجی، شپودی و راست بربانک (Chakravarty, & Wang-Pruski, 2010) و ۹ هفته در رقم مارفونا (Kashani *et al*., 2012) گزارش شده است.

تأیید تراریختی گیاهچه‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA گیاهان تراریخت با جفت آغازگرهای قطعه سنس و ژن نشانگر انتخابی *bar*، قطعاتی با اندازه‌های ۳۲۰ و ۵۲۰ (شکل ۲) جفت بازی تکثیر نمود (شکل ۱). این در حالی بود که این قطعه‌ها در گیاهان غیرتراریخت تکثیر نشدند. گزارش‌های مشابهی مبنی بر موفقیت کاربرد تکنیک RNAi در تولید لاین‌های تراریخت توتون مقاوم به PVY (Smith *et al*. 2000) و ویروس موزاییک خیار (CMV) (Schwach *et al*., 2005، Kalantidis *et al*., 2000) وجود دارند.

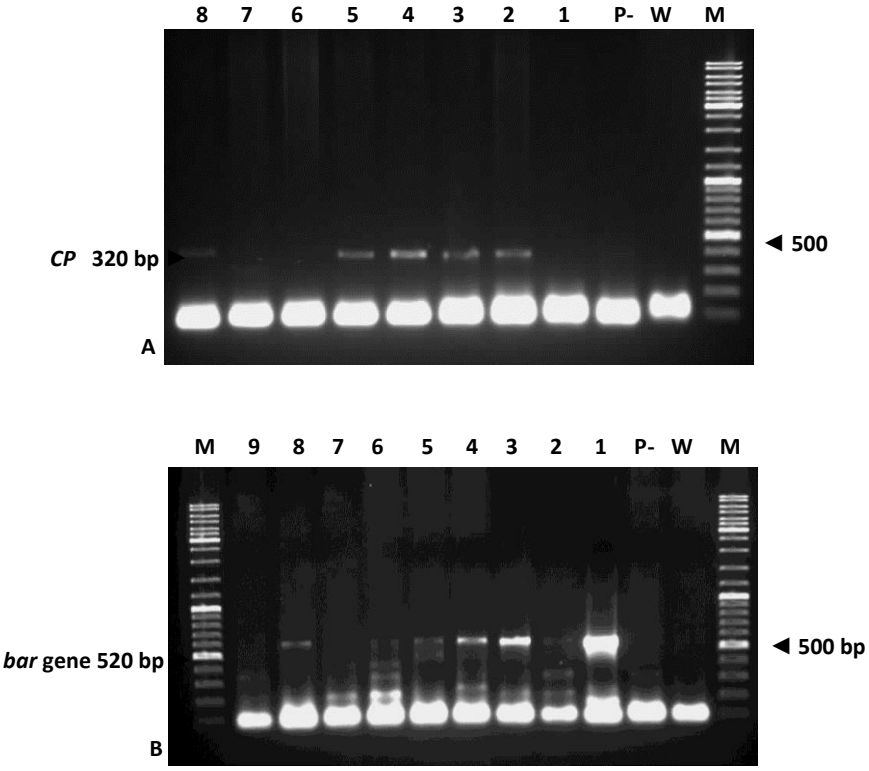
بیان ژن با استفاده از آزمون RT-PCR : نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن SPS اینترون بین قطعه سنس و آنتی‌سنس CP در اغلب لاین‌ها موفقیت‌آمیز بود (شکل ۳). در برخی موارد علت کارایی پایین RT-PCR بی‌ثباتی ساختار dsRNA و تخریب سریع آن گزارش شده است (Missiou *et al*., 2004). به منظور بررسی و مقایسه میزان بیان ژن هدف در لاین‌های مختلف (به صورت نیمه کمی) پس از استخراج RNA، غلظت‌سنجی و یکسان‌سازی نمونه‌های RNA مورد استفاده در واکنش RT-PCR انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

جدول ٤- مقایسه درصد باززایی و راندمان تراریختی در سه نوع محیط کشت مختلف در گیاه سیب‌زمینی

Table 3. Comparation of regeneration (%) and transformation (%) of potato plants in three different media

محیط کشت	باززایی (٪)	مدت زمان باززایی (روز)	گیاهان تراریخت PCR^+ (٪)
M1	30^c	33^a	14^c
M2	35^b	32^a	22^b
M3	43^a	25^c	42^a



شکل ۲- نتایج آزمون PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان سیب‌زمینی تراریخت احتمالی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن PVY CP (A) و *bar* (B)؛ M، نشانگر DNA ladder mix (شرکت Roche). W، آب (به عنوان کنترل منفی)، -P، گیاه غیرتراریخته، چاهک ۱ تا ۹ گیاهان سیب‌زمینی تراریخت.

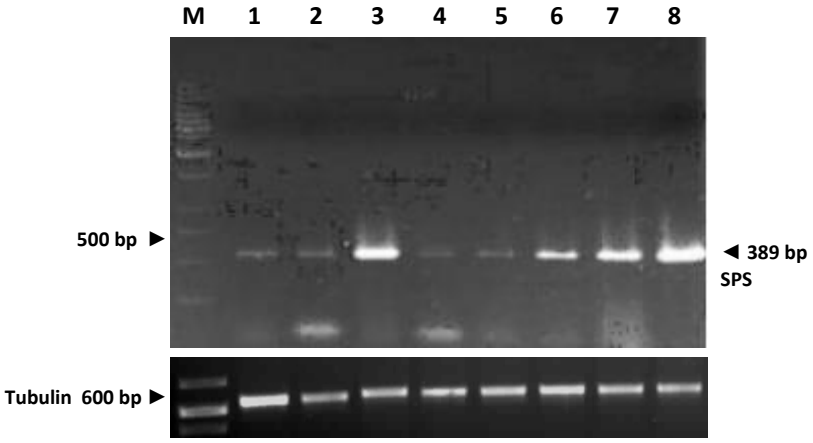
Figure 2: PCR analysis of putative transgenic potato plants using specific primers CP (A) and bar (B). M, molecular ladder; W, water (as negative control), 1-9, putative transgenic plants.

نتایج RT-PCR با ژن کنترل داخلی توبولین درستی استخراج RNA و یکسان‌سازی صحیح غلظت نمونه‌های RNA مورد استفاده در واکنش RT-PCR را تأیید کرد (شکل ۳).

زیست‌سنجی مقاومت به ویروس: زیست‌سنجی مقاومت به PVY گیاهان تراریخت سیب‌زمینی نشان داد که حدود ۸۲ درصد گیاهان با نتیجه PCR مثبت با آغازگرهای ژن PVY CP و *bar* نسبت به آلودگی PVY با کمترین مقدار غلظت آلودگی (خوانش الیزا ۰/۱۹ در طول موج ٤٠٥) مقاومت نشان دادند (جدول ٥). هیچ نوع علائم ظاهری ناشی از آلودگی ویروسی در برگ‌های این گیاهان در سه زمان (١٤، ٢١ و ٣٥ روز پس از آلودگی) مشاهده نشد (شکل ٤). ٦ درصد گیاهان تراریخت نسبت به آلودگی ویروسی واکنش بهبودی نشان دادند. به این صورت که بر اساس آزمون الیزا این گیاهان در اولین خوانش با مقدار ۰/۷۸ تا حدودی آلودگی داشتند. در حالی‌که در خوانش‌های بعدی ۲۱ و ۳۵ روز پس از آلودگی غلظت آلودگی کاهش یافت. ۱۲ درصد گیاهان تراریخت نسبت به PVY حساسیت نشان دادند. این نتایج در مقایسه با دیگر پژوهش‌ها نسبتا چشمگیر و ارزنده به نظر می‌رسد. میسویی و همکاران (٢٠٠٤) نیز با تولید سیب‌زمینی تراریخت مقاوم به PVY با استفاده از روش خاموشی RNA گزارش کردند

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

که از ۱۵ لاین تراریخت حدود ۱۲ لاین به PVY مقاومت نشان دادند (Missiou *et al*.2004.) نتایج این پژوهش با Missiou *et al*. (۲۰۰٤) تقریبا همخوانی دارد. در حالی‌که در مقایسه با استفاده از دیگر روش‌های ایجاد مقاومت به PVY درصد مقاومت لاین‌های تراریخت بسیار پایین‌تر گزارش شده است. برای مثال پوررحیم و همکاران (۱۳۸٤) تعداد گیاهان تراریخت مقاوم به ویروس را ۵ لاین از ۳۰ لاین (۱۷٪) گزارش کردند. کاووسی‌پور و همکاران (۱۳۹۱) با القای مقاومت به ویروس موزاییک خیار (CMV) با استفاده از سازه سنجاق‌سری در لاین‌های توتون نشان دادند که بر اساس نتایج آزمون الیزا و علایم ظاهری حدود ۳۳ و ۳۰ درصد لاین‌ها به ویروس مقاوم بوده و یا در بروز علایم و آلودگی تأخیر نشان دادند.



شکل ۳- آزمون RT-PCR نیمه‌کمی بیان ژن SPS اینترون بین قطعه سنس و آنتی‌سنس. الکتروفورز محصول واکنش RT-PCR بر روی RNA هشت گیاه سیب‌زمینی تراریخت شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن SPS (A). M: DNA ladder mix (شرکت Roche)، عکس B، الکتروفورز محصول RT-PCR با آغازگر اختصاصی ژن توبولین به عنوان کنترل داخلی به منظور کنترل کمی و کیفی RNA نمونه‌های لاین‌های مختلف سیب‌زمینی.

Figure 3: Semi- quantitative RT-PCR analysis of SPS intron. Electrophoresis of RT-PCR products of the transgenic potato plants (1-8) (A); RT-PCR products of tubulin gene as control (B)

جدول ۵- واکنش گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نسبت به PVY سویه N بر اساس علایم، آزمون PCR و آزمون ELISA

Table 5. Reaction of transgenic and non-transgenic plants to PVY^N based on Signs, PCR and ELISA analysis.

	Response to PVY inoculation (strain N)	Total transgenic plants	Positive PCR			Mean of ELISA value		
				bar	CP	Inoculated leaves	upper leaves	
Transformed plants		Number	%	%	%	14dpi	21dpi	35dpi
	Resistance	29	80	40	38	0.19	0.20	0.24
	Recovered	17	6	15	14	0.78	0.30	0.35
	Susceptible	44	12	38	38	0.85	0.92	0.99
Control	Susceptible	-	-	-	-	1.11	1.35	1.23

Resistance: مقاومت کامل، Recovered: برگ‌ها ۱۹ روز پس از آلودگی (dpi) علائم بیماری نشان دادند ولی در مراحل بعدی آلودگی کاهش پیدا کرد، Susceptible: گیاهان نسبت به آلودگی ویروسی حساسیت نشان دادند. خوانش الیزا در طول موج ٤۰۵ نانومتر در سه دوره زمانی ١٤، ۲۱ و ۳۵ روز ارزیابی گردید. Control: گیاهان سیب‌زمینی غیر تراریخت (کنترل).

استفاده از خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) به طور موفقیت‌آمیزی به منظور ایجاد مقاومت به ویروس در گونه‌های مختلف گیاهی به کار گرفته شده است (Kalantidis *et al*. 2002; Liu *et al*. 2002; Missiou *et al*. 2004; Zhang *et al*. 2005; Krubphachaya *et al*. 2007; Patil *et al*. 2011; Yadav *et al*. 2011; McCue, *et al*., 2012). با توجه به اینکه سیب‌زمینی یک محصول مهم اقتصادی است و PVY سالانه خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند، تولید سیب‌زمینی تراریخت با مقاومت بالا از مهم‌ترین اهداف این پژوهش می‌باشد. پژوهش‌های مختلف بر روی توتون تراریخت مقاوم به CMV (Kalantidis *et al*., 2000) و سیب‌زمینی تراریخت مقاوم به PVY (Missiou *et al*.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

2004؛ McCue, *et al*., 2012؛Gaba, *et al*. 2010) انجام شده است. آن‌ها با مطالعه تعامل ویروس و میزبان با تولید siRNA در مداخله با ویروس توانستند در اغلب موارد مقاومتی کارآمد ایجاد کنند.

شکل٤- زیست‌سنجی مقاومت به PVY در لاین‌های تراریخت سیب‌زمینی. I: لاین تراریخت سیب‌زمینی با واکنش بهبودی نسبت به PVY. II: گیاه سیب‌زمینی غیرتراریخت به عنوان کنترل. III: گیاه سیب‌زمینی تراریخت با مقاومت کامل به PVY.

Figure 4: Resistance of transgenic potato plants to PVY. I, Transgenic line with recovered resistance; II, Non-transgenic control plant; III, Transgenic line with high resistance.

مهندسی محصولات تراریخت مقاوم به ویروس از طریق خاموشی RNA در حقیقت نوعی الگو گرفتن از سازوکار دفاعی گیاهان بر علیه ویروس می‌باشد (Waterhouse *et al*., 2001؛ Vance and Vaucheret 2001؛ Baulcombe 2001). سازوکار RNAi به طور مشابه در گیاهان وحشی نیز اتفاق می‌افتد. اما دو عامل سیستم دفاعی گیاه را محدود می‌کند. اول- اینکه فرایند خاموشی بعد از وارد شدن ویروس به گیاه فعال می‌شود. دوم اینکه در بیشتر موارد (نه همه موارد) RNA ویروس‌های گیاهی پروتئین‌هایی تولید می‌کنند، که به عنوان سرکوبگرها (suppressors) شناخته شده‌اند، که منجر به اختلال در فرایند خاموشی می‌گردد. در مورد PVY پروتئین Helper (Hc-Pro) component proteinase) نقش سرکوبگر بازی می‌کند (Mallory *et al*., 2001؛ Anandalakshmi *et al*., 1998).

یکی از جنبه‌های مهم کاربرد PTGS در مهندسی، ایجاد گیاهان مقاوم به ویروس این است که علاوه بر کارایی بسیار بالای آن، از لحاظ ایمنی زیستی نیز حائز اهمیت می‌باشد. چرا که توالی تراژن ویروسی ترجمه نمی‌شود. همچنین نسخه‌های رونویسی شده بلافاصله بعد از تولید به قطعات کوچک‌تر تجزیه می‌شوند. این ویژگی‌ها امکان کاهش خطرهای زیست‌محیطی مثل پوشش‌گذاری نامتشابه و نوترکیبی تراژن با ویروس مهاجم کاهش می‌دهد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که سیستم RNAi مبتنی بر پروتئین پوششی ویروس باعث ایجاد مقاومت موثر در گیاهان سیب‌زمینی می‌شود. گام مهم بعدی در این پژوهش بررسی تأثیر آلودگی دیگر ویروس‌های مهم سیب‌زمینی مثل PVX، PVS، PLRV و PVA در لاین‌های تراریخت سیب‌زمینی با هدف این که آیا این ویروس‌ها می‌توانند در مقاومت به PVY مداخله ایجاد کنند یا خیر؟.

منابع

Anandalakshim R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9522: 13079–84.

Banerjee AK, Prat S, Hannapel, DJ. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Science, 170: 732-738.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

Baulcombe D. 2001. RNA silencing. Diced defence. Nature 409: 295–6.

Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. Nature, 431:356–63.

Beujean A, Sangwan R, Lecardonnel A, Sangwan-Norreel B. 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): 1589-9.

Borrelli VMG, Brambilla V, Rogowsky P, Marocco A, Lanubile A. 2018. The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. Plant Science 9:1245. doi: 10.3389/fpls.2018.01245

Chakravarty B, Wang-Pruski G. 2010. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing Agrobacterium-mediated transformation. Advances in Bioscience and Biotechnology 1: 409-416.

FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. FAO Statistics Division 05 December. 2013. <http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>.

Fateri Rezvani S, Pazhouhandeh M, Shirzad A, Lotfi S. 2016. Production of Potato Resistant Plant to PVX using an RNA Silencing Mechanism. Genetic Engineering and Biosafety Journal 5: 1-14. (In Persian with English Abstract).

Gaba V, Rosner A, Maslenin L, Leibman D, Singer S, Kukurt E, Shiboleti YM, Gal-On A. 2010. Hairpin-based virus resistance depends on the sequence similarity between challenge virus and discrete, highly accumulating siRNA species. European Journal of Plant Pathology 128:153–164.

Ghanbari Jahromi M, Rahnama H, Mousavi A, Safarnejad MR, Kalatejari S, Soheilivand S. 2015. Transient expression of coding and non-coding regions of PVY confer resistance to virus infection. Progress in Biological Sciences 5: 19-31.

Hameed A, Tahir MN, Asad S, Bilal R, Van Eck J, Jander G, Mansoor S. 2017. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato. Molecular Biotechnology, DOI 10.1007/s12033-017-9995-9

Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsargris M. 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. Molecular Plant Microbe Interaction 15: 826–33.

Kavosipour S, Niazi A, Izadpanah K, Afsharifar A, Yasaie M. 2012. Induction of resistance to cucumber mosaic virus (CMV) using hairpin construct of 2B gene. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 209-219. (In Persian with English Abstract).

Krubphachaya P, Juricek M, Kertbundit S. 2007. Induction of RNA-mediated resistance to papaya ringspot virus type W. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 40:404–411.

Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2002. Virus induced gene silencing in tomato. Plant Journal 31:777–786.

Maki-Valkama T, Pehu T, Santala A, Valkonen JPT, Koivu K, Lehto K, Pehno E. 2000. High level of resistance to potato virus Y by expressing P1 sequence in antisense orientation in transgenic potato. Molecular Breeding 6(1): 95-104.

Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance VB. 2001. HC-Pro Suppression of Transgene Silencing Eliminates the Small RNAs but Not Transgene Methylation or the Mobile Signal. Plant Cell 13: 571–83.

Mccue KF, Ponciano G, Rockhold DR, Whitworth JL, Gray SM, Fofanov Y, Belknap WR. 2012. Generation of PVY coat protein siRNAs in transgenic potatoes resistant to PVY. American Journal of Potato Research 89:374–383.

Miroshnichenko D, Timerbaev V, Okuneva A, Klementyeva A, Sidorova T, Pushin A, Dolgov S. 2020. Enhancement of resistance to PVY in intragenic marker‐free potato plants by RNAi‐mediated silencing of eIF4E translation initiation factors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 140:691–705. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01746-9

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

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

Niazi A, Malbobi MA, Moini A, Jalali Javaran M, Lohrasbi T. 2005. Transient expression of gene silencing constructs in Beta Vulgaris for the study of resistance to BNYVV. Fourth national Biotechnology congress of Islamic Republic of Iran, Tehran. (In Persian with English Abstract).

Nicola-Negri DE, Brtti 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: 989–94.

Patil BL, Ogwok E, Wagaba H, Mohammed I, Yadav SJ, Bagewadi B, Taylor NJ, Kreuze JF, Maruthi MN, Alical T, Fauqet CM. 2011. RNAi-mediated resistance to diverse isolates belonging to two virus species involved in cassava brown streak disease. Molecular Plant Pathology 12:31–41.

Porrahim R, Ahoonmanesh A, Hashemi H, Zeinaliu S, Farzadfar S. 2005. The resistance of transgenic tobacco plant (*Nicotiana tabacum*) to three Iranian PVY. Plant Pests and Diseases 73: 17-37. In Persian.

Rahnama H, Kohsari MS, Naderi H, Fahimi H. 2011. High frequency plant regeneration from leaf, internode and microtuber explants of potato (*Solanum tuberosum* L.). Iranian Journal of Plant Biology 25: 120-129. (in Persian with English abstract).

Rakosy-Tican E, Aurori A, Dijkstra C, Maior MC. 2010. Generating marker free transgenic potato cultivars with a hairpin construct of PVY coat protein. Romanian Biotechnological Letters 15: 63-71.

Sambrook KJ, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schwach F, Fabian EV, Louise J, Baulcombe DC. 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *potato virus* X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. Plant Physiology, 138: 1842–1852.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stotjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407: 319–20.

Sohilivand S, Salehi Jouzani GR, Hormozi M. 2010. The silencing of PVY genes using RNAi. Final Report. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. In Persian with English Abstract.

Valkonen JPT. 2007. Potato viruses: economic losses and biotechnological potential. In Potato Biology and Biotechnology (Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C. and Glovers, F. *et al*. eds), pp. 619–641. The Netherlands: Elsvier.

Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM. 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate *potato virus* X/potyviral synergistic disease in transgenic plants. Virology 206:583-590.

Visser R, Jacobsen E, Hesseling-Meinders A, Schans M, Witholt B, Feenstra W. 1998. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. Plant Molecular Biology 12:329-37.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. Nature, 411: 834–842.

Yadav SJ, Ogwok E, Wagaba H, Patil BL, Bagewadi B, Alicia T, Gaintan-Solis E, Talaylor NJ, Fauquest CM. 2011. RNAi mediated resistance to *cassava brown streak Uganda virus* in transgenic cassava. Moleculat Plant Pathology 12: 677–687.

Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock R, Nie B, Zhang J. 2019. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. Plant Biotechnology Journal 17: 1814–1822.

Zhang P, Vanderschuren H, Futterer J, Grussem W. 2005. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. Plant Biotechnology Journal 3: 385–397.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Induction of Resistance to Potato Virus Y (PVY) Using Hairpin Construct of Coat Protein

Hassan Rahnama[1*], Marzie Ghanbari[2], Amir Mousavi[3], Saeed Soheilivand[1], Reza Pourrahim[4]

1- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- PhD student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Associate professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iran

*Corresponding Author, Email: hrahnama@abrii.ac.ir

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.2.7]

Abstract

Potato virus Y (PVY) is one of the most damaging viruses of potato plants which infects most cultivars and causes a significant decrease in yield products quality and also economical losses annually. Recently, the application of pathogen derived resistance mechanisms has opened new horizons for the development of virus-resistant transgenic plants. This research was carried out to study RNA silencing to engineered potato plants that are resistant to potato virus Y (PVY). RNAi construct was designed from coat protein (CP) segment of PVY. Potato explants were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 with pCAMRNAiCP containing *bar* selectable gene. The rate of regenerated plants was evaluated in the selected medium containing the herbicide phosphinotricin after growth and propagation. Transgenic plants and their gene expression were investigated using polymerase chain reaction (PCR) and RT-PCR. Results showed that 42 percent of regenerated plants were transformed. The expression of CP hairpin construct was determined by RT-PCR analysis in most of the lines. PVY resistance bioassay showed that 82 percent of transgenic potato plants were resistance to PVY.

Key word: gene silencing, potato, PVY, RNAi, virus resistance