مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره دوم،
پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۴۴-۱۳۵

روش ارزیابی فعالیت مهارکننده‌های خاموشی ژن در گیاه با استفاده از دو پروتئین از ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV)

A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using two Proteins of *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV)

سمیرا پاکباز[۱]، مقصود پژوهنده*[۲] و امید عینی گندمانی[۳]

Pakbaz S.[1], Pazhouhandeh M.*[2] and Eini Gandomani O.[3]

۱- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۳- استادیارگروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

1. PhD student of Plant Virology, Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Tabriz.
2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Fac., Azarbaijan Shahid Madani University.
3. Assistant Prof., Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Zanjan. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۵)

چکیده

مهارکننده‌های RNA Silencing در گیاهان، جانوران و بیشتر ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند و نیز شیوه شناسایی فعالیت مهارکنندگی خاموشی ژن یک پروتئین در سیستم گیاهی راه اندازی شده است. ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) *Grapevine fanleaf virus* یکی از شایع‌ترین ویروس‌های شناخته شده مو در سراسر دنیا است که تا ۸۰ درصد خسارت می‌زند. این ویروس دوپیکره‌ای با ژنوم RNA تک رشته‌ای در جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* قرار دارد. ژن مهارکننده خاموشی در نپوویروس‌ها هنوز شناسایی نشده است و دانش ما از تعیین کننده‌های علایم و مهارکننده‌های خاموشی ویروس‌های این جنس خیلی محدود است. در این پژوهش ژن GFP در گیاهان *Nicotiana benthamiana* تراریخته با GFP خاموش شد و سپس توانایی پروتئین‌های پلیمراز (RdRp) و حرکتی GFLV در مهار سازوکار RNA Silencing ارزیابی شد. عملکرد این دو پروتئین با شاهدهای مثبت و منفی به کاربرده شده مقایسه شد و نتایج نشان داد که اگرچه این دو پروتئین در بروز علایم و سیستمیک شدن بیماری نقش دارند اما کارایی لازم را جهت مهارکنندگی خاموشی ندارند. این پژوهش مدل بررسی فعالیت ممانعت کنندگی از RNA Silencing را بیان می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

RNA Silencing
مهار خاموشی ژن
ویروس برگ بادبزنی مو

مقدمه

سیستم بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است و برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش برخلاف روش بیان دایم که زمان‌بر و مستلزم کار زیاد می‌باشد، روشی سریع، انعطاف پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت بافت و در بافت‌های گیاهی به طوز کامل تمایز یافته مانند برگ‌ها قابل اجرا می‌باشد. از بیان موقت بیشتر برای تأیید تراریختی و اثبات تولید پروتئین نوترکیب و تجزیه و تحلیل پیش‌برهای گیاهی استفاده می شود. این روش مستقل از موقعیت استقرار ژن در کروموزوم است (Fischer *et al*., 1999) که در آن پروتئین موردنظر در سطح بالایی بیان و در کوتاه‌ترین زمان ممکن تولید می‌شود (Yang *et al*. 2000; Goodin *et al*. 2002). روش بیان موقت بر پایه آگروباکتریوم جایگزین مناسبی برای روش‌های انتقال مستقیم DNAمانند بمباران ژنی و القاء پروتوپلاست‌ها برای مطالعات اولیه بوده و بر خلاف آن‌ها که ژن مورد نظر را در تعداد کمی از سلول‌ها بیان می کنند، تلقیح (اینفیلتراسیون) آگروباکتریوم به داخل بافت-های گیاهی، باعث بیان ژن در بیشتر سلول‌های گیاهی می‌شود (Kapila *et al*. 1997). به علاوه در اینفیلتراسیون مکانیکی تعداد نمونه‌هایی که به طور همزمان مطالعه می شوند، افزایش یافته و بافت مورد مطالعه می‌تواند بصورت فعال به گیاه متصل باقی بماند، در نتیجه در مواردی مانند تجزیه و تحلیل پیش‌برهای گیاهی، تیمارها بر روی بافت متصل به گیاه اعمال می‌شود (Cazzonelli and Velten, 2006). بیان موقت در چندین گونه گیاهی به کار گرفته شده است ولی از بین آنها بیشترین گزارش‌ها در گیاه توتون *N. benthamiana* بوده است (Chakrabarty *et al*. 2007; Mokrzycki-.Issartel *et al*. 2003,). مزیت‌های استفاده از *N. benthamiana* برای بیان موقت پروتئین شامل موارد زیر است: اول اینکه یک گیاه مدل بوده و معمولاً در تمام آزمایشگاه‌های پژوهش‌های گیاهی به کار می‌رود و دوم اینکه پروتئین به راحتی در سطح بالا از طریق اگروانفیلتراسیون در برگ‌های این گیاه بیان می شود (Voinnet *et al*. 2003; Ma *et al*. 2008).

در بین ۶۴ گونه ویروسی آلوده کننده مو (Martelli, 2014)، ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) *Grapevine fanleaf virus* یکی از شایع‌ترین ویروس‌های شناخته شده مو در سراسر دنیا است که تا ۸۰ درصد خسارت می‌زند و کیفیت و طول عمر مو را در تاکستان‌ها کاهش می‌دهد (Andret-Link *et al*. 2004). ویروس GFLV یک عضو دو پیکره‌ای با ژنوم دو قسمتی از زیر گروه A جنس *Nepovirus* و در خانواده *Secoviridae* است (Sanfacon *et al*. 2009). ویریون‌های این ویروس ایزومتریک بوده و حدود ۳۰ نانومتر قطر دارند. ژنوم ویروس از دو قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت تشکیل شده است (+ssRNA) که در انتهای ’۵ دارای پروتئین متصل به ژنوم ویروسی (Viral Protein genome-linked, VPg) و در انتهای ’۳ به صورت پلی آدنینی (Poly A) هستند. هر قطعه محتوی یک چارچوب خواندنی باز است که یک پلی‌پروتئین را رمز می‌کند (P1 و P2). هر پلی‌پروتئین توسط پروتئینازی که توسط RNA1 رمز می‌شود، به پروتئین‌های کوچکتری شکسته می‌شود (Pinck *et al*. 1988). پلی‌پروتئین رمزشونده توسط RNA1 (P1)، به پنج پروتئین شکسته می‌شود که اجزاء تکثیر ویروس هستند و از انتهای آمینی به کربوکسیلی شامل یک کوفاکتور پروتئیناز فرضی، هلیکاز فرضی، پروتئین متصل به ژنوم ویروس، پروتئیناز سیستئین و RNA پلیمراز وابسته به RNA (RNA dependent RNA Polymerase, RdRp) است (Naraghi- Arani *et al*. 2001; Andret-Link *et al*. 2004). قطعه RNA2 پلی‌پروتئین P2 را رمز می‌کند که از انتهای آمینی به کربوکسیلی با فعالیت پروتئولیتیکی به ترتیب به سه پروتئین شامل $(2A)^{HP}$ که برای تکثیر RNA2 مورد نیاز است و می‌تواند به عنوان پروتئین خانگی عمل کند (Gaire *et al*. 1999)، پروتئین حرکتی $(2B)^{MP}$ که پروتئین اصلی مشاهده شده در پلاسمودسماتاست (Ritzenthaler *et al*. 1995) و پروتئین پوششی $(2c)^{CP}$ (Serghini *et al*. 1990) شکسته می-شود. هر دو RNA ژنومی برای آلودگی سیستمیک گیاه ضروری هستند (Viry *et al*. 1993).

اگرچه در چندین ویروس گیاهی پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در شناسایی سازوکارهای بیان علایم به دنبال اثر متقابل گیاه– ویروس به دست آمده است، اما این سازوکارها هنوز به طور ناچیزی شناخته شده‌اند (Culver and Padmanabhan, 2007). چندین پروتئین ویروسی مثل پروتئین حرکتی (Lewsey *et al*.

2009)، پروتئین جزء کمکی پروتئیناز (Shibolet *et al*. 2007)، RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) (Kagiwada *et al*. 2005)، پروتئین پوششی (Heaton *et al*. 1991) و پروتئین بیماری‌زایی (Jupin *et al*. 1992) به عنوان تعیین کننده‌های علایم شناسایی شده‌اند. تعدادی از پروتئین‌های ویروسی درگیر در بیان علایم شبیه HC-Pro در جنس *Potyvirus*، ژن 2b در *Cucumovirus*، P19 در *Tombusvirus*، P0 در *Polerovirus*، پروتئین ۱۳۰K در *Tobamovirus* و پروتئین پوششی جنس *Carmovirus*، مهارکننده‌های ویروسی خاموشی RNA (Viral suppressors of RNA silencing, VSRs) هستند (Voinnet *et al*. 2005)، اما دانش ما از تعیین کننده‌های علایم و مهارکننده‌های خاموشی ویروس‌های جنس نپوویروس از خانواده *Secoviridae* خیلی محدود است و با اینکه مهارکننده‌های خاموشی (VSRs) در بیشتر ویروس‌های گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند، اما در نپوویروس‌ها هنوز ناشناخته مانده‌اند (Vigne *et al*. 2013). پدیده بهبود که به موجب آن تضعیف یا عدم بروز علایم در برگ‌های نوظهور به دنبال آلودگی و ظهور علایم بیماری اتفاق می افتد، ۸۷ سال پیش برای اولین بار در یک نپوویروس توصیف شد (Wingard, 1928) و خاموشی ژن که یک واکنش دفاعی طبیعی گیاه است با این پدیده همراه است (Jovel *et al*. 2007). تعیین کننده هایی که تاکنون در مورد اعضاء *Secoviridae* شناسایی شده و سبب بروز علایم می‌شدند، پروتئین‌های درگیر در تکثیر و پلی‌پروتئین بالغ مثل هلیکاز نوع III و پروتئیناز سیستئین شبه 3C بودند (Fan *et al*. 2011; Gu and Ghabrial, 2005). پروتئین کامل $1E)^{Pol}$ نژاد مجارستانی GHu ویروس GFLV بین ۳۹-۸۴ درصد با RdRp چندین ویروس در خانواده *Secoviridae* شباهت دارد. هفت موتیف حفاظت شده در RdRp به طور معمول برای ویروس‌های گیاهی توصیف شده است (Chisholm *et al*. 2007) که در بالادست ۱۳۶ اسیدآمینه انتهایی پروتئین $1E)^{Pol}$ نژاد GHu ویروس GFLV قرار می‌گیرد (Letunic *et al*. 2012). وجود دومین‌های اختصاصی نژاد، روی ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) ویروس GFLV تأیید و مشخص شده است که این دومین‌ها وظیفه تنظیم عوامل تعیین-کننده علایم را دارند. هر دو نژاد GHu و F13 این ویروس روی *N. benthamiana* و *N. clevelandii* آلودگی سیستمیک ایجاد می‌کنند، به طوری که حضور ویروس در برگ‌های تلقیح نشده بالایی توسط آزمون الایزا-Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) ردیابی شده است. نژاد GHu شش روز بعد از مایه‌زنی روی *N. benthamiana* زردی خفیف رگبرگ و به دنبال آن زردی نسبی برگ و پیسه‌ای شدن را نشان داد، همچنین شش روز بعد از مایه-زنی در*N. clevelandii* لکه‌های کلروز مشاهده شد که حداقل بیش از بیست روز پایدار بودند. در مقایسه، نژاد F13 هیچ‌گونه علایمی روی *N. benthamiana* و *N. clevelandii* ایجاد نکرد. تجزیه و تحلیل‌های نیمه‌کمی، هیچ‌گونه تمایز قابل ملاحظه‌ای در غلظت ویروس بین گیاهان آلوده شده با نوترکیب‌های مختلف که علایم ایجاد کردند و گیاهانی که فاقد علایم بودند، نشان ندادند (Vigne *et al*. 2013). در این پژوهش ضمن معرفی و راه‌اندازی یک سیستم جهت بررسی فعالیت ممانعت کنندگی از RNA Silencing، به بررسی این فعالیت در دو پروتئین از GFLV پرداخته می شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتریایی و وکتورها

در پژوهش حاضر، از لاین 16c گیاهان تراریخته *N. benthamiana* که بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز (Green Florescent Protein, GFP) هستند، استفاده شد. همچنین از ویروس جغجغه‌ای توتون (*Tobacco Rattle Virus*, TRV) که به RNA2 آن (Enhanced-GFP, EGFP) افزوده شده است، به عنوان القاءکننده خاموشی ژن GFP استفاده شد (Ratcliff *et al*. 2001). RNA1 و RNA2 این ویروس به طور جداگانه به ناقل همسانه‌سازی pEPT8 و سپس ناقل بیان pGA482G منتقل شده و سلول‌های مستعد سویه GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* با این ناقل نوترکیب تراریخت شدند (Larsen and Curtis, 2012). همچنین ژن‌های پروتئین حرکتی ^{MP} (2B) و پلیمراز $1E)^{Pol}$ ویروس GFLV و نیز ژن p24 از *Grapevine leafroll- associated Virus 2*, GLRaV-2) (Chiba *et al*. 2006) در ناقل نام‌برده همسانه‌سازی و سپس به سویه GV3101

باکتری*A. tumefaciens* انتقال داده شدند. جدایه‌های مربوط به ویروس‌های GFLV و GLRaV-2 توسط آزمایشگاه ویروس-شناسی دانشگاه کرنل امریکا در اختیار این پژوهش قرار گرفت.

بیان موقت با استفاده از روش تزریق آگروباکتریوم

جهت انتقال سازه القاءکننده خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز به گیاهان تراریخت لاین 16c، از آزمایش بیان موقت به روش تزریق آگروباکتریوم استفاده شد (Vaghchhipawala *et al.* 2010). بدین منظور سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pGA482G-TRV_{RNA1} در ۵ میلی‌لیتر از محیط (LB) Luria Bertani حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) و ریفامپیسین (۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و سلول-های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pGA482G-$TRV_{RNA2.EGFP}$ در ۵ میلی‌لیتر از محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شدند. جهت افزایش حجم سوسپانسیون باکتری، از محیط القاء حاوی یک میلی‌لیتر N-morpholino Ethane Sulfonic Acid (MES) نیم‌مولار (غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار) و ۴۴ میلی‌لیتر محیط LB تازه استفاده شد. همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها با غلظت‌های مناسب افزوده و سوسپانسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد و با نیروی ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شد. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه در دمای اتاق رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، رسوب صورتی رنگ باکتری در ۱۰۰ میلی-لیتر محیط اینفیلتراسیون حاوی MES ۱۰ میلی‌مولار و $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار معلق شد و به مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شد. سوسپانسیون باکتری با استفاده از محیط اینفیلتراسیون تا غلظت ۱-۰/۸ :$_{600}$ Optical Density رقیق شد. سپس سلول‌های آگروباکتریوم حاوی TRV_{RNA1} و $TRV_{RNA2.EGFP}$ با حجم یکسان با هم مخلوط شدند. سوسپانسیون باکتری با استفاده از سرنگ پلاستیکی سه میلی‌لیتری درون فضای میان سلولی برگ های سالم و متصل به گیاهان تراریخته *N. benthamiana* تزریق شد. تزریق در زمانی انجام شد که این گیاهان در مرحله چهار برگی بودند و حداقل یک هفته از نشاء آن‌ها گذشته بود. گیاهان پس از تزریق در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و ۷۰٪ رطوبت نگهداری شدند.

بررسی تأثیر ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) در مهار خاموشی ژن

جهت مشاهده روند مهار بیان ژن GFP، گیاهان از روز سوم پس از تزریق به طور روزانه در زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. پس از مشاهده تغییر رنگ سیستمیک گیاهان تراریخته از رنگ سبز به قرمز و اطمینان از وقوع خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز، گیاهان تیمار شده در روز هفتم پس از تزریق، به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه با برگ‌های *Chenopodium quinoa* آلوده به نژاد GFLV-F13 و یک گروه با نژاد GFLV-GHu به طور مکانیکی مایه‌زنی شدند. در گروه سوم مایه‌زنی با GFLV انجام نشد و به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. از روز سوم پس از مایه-زنی، همه گیاهان زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. جهت تأیید حضور GFLV، یک هفته پس از مایه‌زنی استخراج RNA از برگ‌های نوظهور نمونه‌های مورد آزمایش انجام و سپس آزمون RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر مربوط به RNA1 با توالی‌های Forward: 5' ARA GCC TCA AGA GTA AAG CTA G 3' (نوکلئوتیدهای ۱۷۶۵-۱۷۴۴) و Reverse: 5' GCC CTC CTG TTA TAA AAT GAC G 3' (نوکلئوتیدهای ۲۹۴۴-۲۹۲۳) صورت گرفت.

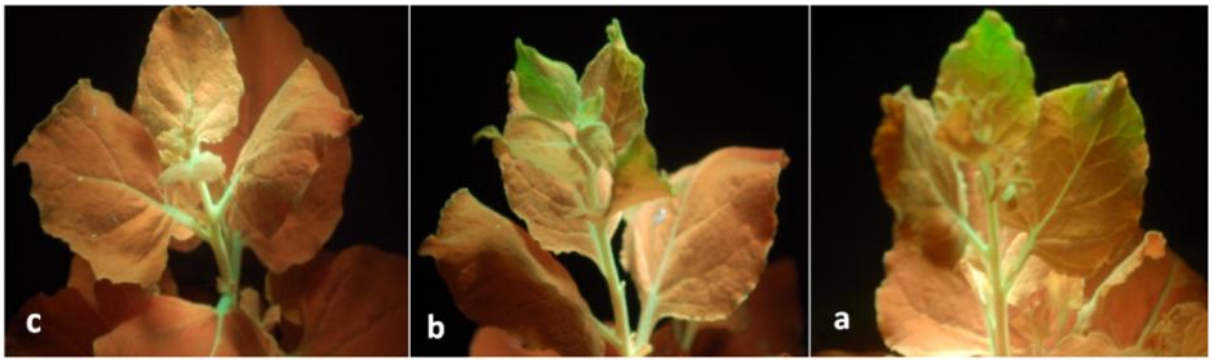
بررسی تأثیر ژن پروتئین حرکتی و پلیمراز ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) در مهار خاموشی ژن

بر اساس نتایج آزمایش قبل، آزمایش دیگری جهت بررسی میزان عملکرد پروتئین دو ژن پلیمراز $(1E)^{Pol}$ و پروتئین حرکتی $(2B)^{MP}$ ویروس GFLV در مهار خاموشی ژن انجام شد. در این پژوهش لاین 16c گیاهان تراریخت یک هفته پس از نشاء و در مرحله ۵-۴ برگی مشابه آزمایش قبل توسط سلول‌های آگروباکتریوم حاوی سازه القاءکننده خاموشی TRV تیمار شدند. هشت روز پس از اگروانفیلتراسیون با TRV، یک گروه از این گیاهان با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی pGA482G-$(1E)^{Pol}$ و

گروه دیگر با pGA482G-(2B)[MP] اگروواینفیلتراسیون شدند. همچنین یک گروه از گیاهان با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pGA482G- p24، تیمار و به عنوان شاهد مثبت استفاده شدند. روی تعدادی از گیاهان تراریخت و تیمار شده با pTRV، تیمار دیگری انجام نشد و از این گیاهان به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از رقم وحشی گیاهان *N. benthamiana* بدون انجام هیچ‌گونه تیماری، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از روز سوم تا هشتم پس از اگروواینفیلتراسیون دوم، همه گیاهان زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. علاوه بر این در روزهای سوم و چهارم جهت تعیین میزان سطح فلورسنت، نمونه-های برگی یک سانتیمتر مربعی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نواحی اگرواینفیلتر شده و ترجیحاً از ناحیه سالم و خسارت ندیده در اثر انجام اگرواینفیلتراسیون انتخاب شدند. عصاره‌گیری نمونه‌ها با استفاده از بافر استخراج حاوی توئین ۲۰ انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه همراه با تکرار به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. سطح فلورسنت با استفاده از دستگاه Synergy2 Microplate Reader (BioTek) و نشر در ۵۰۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. میانگین داده‌های به دست آمده برای هر تیمار توسط روش آماری ANOVA در نرم افزار SPSS مقایسه شد ($P < 0.05$).

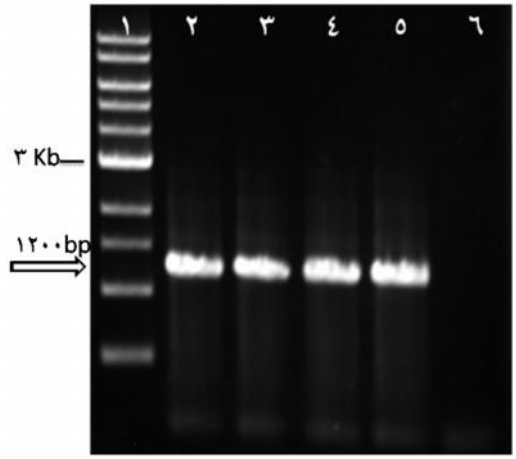
نتایج و بحث

جهت انتقال سازه القاءکننده خاموشی ژن GFP به لاین 16c گیاهان تراریخت و همچنین بررسی فعالیت مهارکنندگی از خاموشی ژن، از آزمایش بیان موقت به روش تزریق آگروباکتریوم استفاده شد. پس از تیمار گیاهان تراریخت 16c با ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV) حاوی سازه القاءکننده خاموشی ژن GFP، تغییر رنگ این گیاهان زیر نور ماوراء بنفش هر روز مشهودتر می‌شد. به طوری که پس از یک هفته، برگ‌ها به طور کامل به رنگ قرمز دیده می‌شدند و رنگ سبز تنها محدود به ساقه‌ها بود (شکل c -۱). این تغییر رنگ نشان دهنده وقوع خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز است که در اثر مشابهت در توالی‌های ژن داخلی گیاه تراریخته (GFP) و ژن بیگانه که به طور موقت بیان شده، حاصل شده است و در نتیجه رنگ سبز فلورسنت پس از چند روز جای خود را به رنگ قرمز می‌دهد. در بررسی این گیاهان در روز سوم پس از مایه‌زنی با ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) زیر نور ماوراء بنفش، تغییر رنگ به طور موضعی در برگ‌های مایه‌زنی شده دیده شد. از روز چهارم تا هشتم، تغییر رنگ از قرمز به سبز به طور سیستمیک در برگ‌های انتهایی گیاهان تراریخت نمایان شد و تا روز هشتم، هر روز به تعداد برگ‌های تغییر رنگ یافته در این گیاهان افزوده شد. این تغییر رنگ مجدد گیاه به سبز در برگ‌های نوظهور که نشان دهنده حضور سیستمیک GFLV در گیاه و نیز مهار خاموشی ژن بود، در گیاهان مایه‌زنی شده با هر دو نژاد F13 و GHu ویروس نمایان شد (شکل a, b –۱). این تغییر رنگ حاکی از عملکرد یک یا چند ژن از ویروس برگ بادبزنی مو است که به عنوان مهارکننده خاموشی ژن در این ویروس عمل می‌کنند و توانسته‌اند خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز را مهار کنند. همچنین نتایج آزمون RT-PCR، حضور GFLV را یک هفته پس از مایه‌زنی در این گیاهان تأیید کرد و آغازگرها توانستند قطعه‌ای به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز از RNA1 این ویروس تکثیر کنند (شکل ۲).



شکل ۱- مایه‌زنی GFLV روی گیاهان تراریخته *N. benthamiana* و تیمار شده با ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV). a) مایه‌زنی با نژاد GFLV-F13. b) مایه‌زنی با نژاد GFLV-GHu. c) گیاه تراریخته *N. benthamiana* و تیمار شده با pTRV بدون مایه زنی با GFLV به عنوان کنترل.

Figure 1- GFLV inoculation on transgenic *N. benthamiana* and treated with pTRV. a) GFLV-F13 inoculation. b) GFLV-GHu inoculation. c) Transgenic *N. benthamiana* and treated with pTRV without GFLV inoculation as control.



شکل ۲- تجزیه و تحلیل RT-PCR گیاهان تراریخته تیمار شده با pTRV و مایه‌زنی شده با ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از آغازگرهای اختصاصی GFLV. ۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی .۲- ۳- قطعه تکثیر شده ۱۲۰۰ جفت بازی در گیاهان مایه‌زنی شده با نژاد F13. ۴- ۵- قطعه تکثیر شده ۱۲۰۰ جفت بازی در گیاهان مایه‌زنی شده با نژاد GHu . ۶- گیاه تیمار شده با TRV و بدون مایه‌زنی با GFLV به عنوان کنترل منفی.

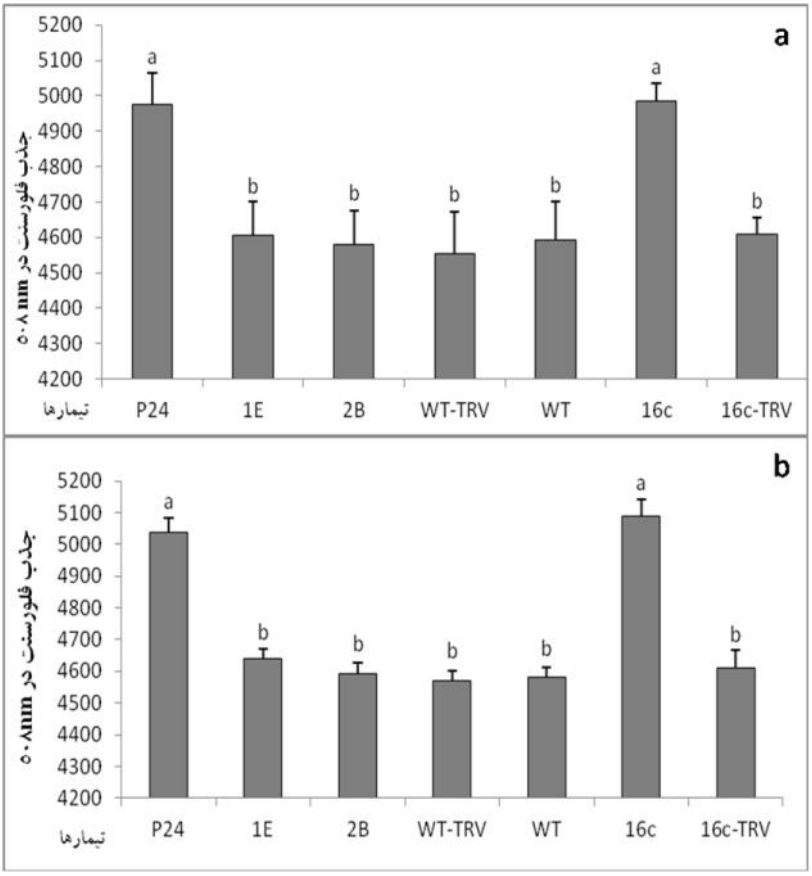
Figure 2- RT-PCR analysis of treated transgenic plants with pTRV and inoculated by GFLV specific primers. 1-1kb DNA ladder. 2- 3- GFLV-F13 Inoculation. 4- 5- GFLV-GHu Inoculation. 6- Treated plant with TRV and without GFLV inoculation as negative control.

در بررسی گیاهان 16c اگروواینفیلتر شده با سازه القاءکننده خاموشی و متعاقباً با سازه‌های حامل ژن‌های $(1E)^{Pol}$ و $(2B)^{MP}$ زیر نور ماوراءبنفش، هیچ‌گونه تغییر رنگی در ناحیه اگروواینفیلتراسیون شده در گیاهان مورد مطالعه مشاهده نشد (شکل ۳- c, d). در حالی که در گیاهان اگروواینفیلتراسیون شده با ژن p24، تغییر رنگ قابل ملاحظه‌ای نمایان شد و همه نواحی تیمار شده به طور واضح از رنگ قرمز به سبز تغییر رنگ دادند (شکل ۳- b). واضح است که هیچ‌گونه تغییر رنگی هم از رقم وحشی (شکل ۳- f) و نیز گیاه تراریخته *N. benthamiana* که با pTRV اگروواینفیلتر شده بودند (شکل ۳- a) انتظار نمی‌رفت. بررسی همه گیاهان از روز سوم تا هشتم پس از اگروواینفیلتراسیون زیر نور UV ادامه داشت ولی تغییر قابل ملاحظه‌ای ایجاد نشد.

همچنین نتایج سنجش میزان فلورسنت با نتایج چشمی مطابقت داشت. این سنجش که در روزهای سوم و چهارم بعد از اگروواینفیلتراسیون با ژن‌های GFLV انجام شد، در هر دو روز متوالی نتایج یکسانی را در برداشت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح احتمال ۵٪ نشان داد که میزان جذب فلورسنت در نمونه‌های اگروواینفیلتر شده با ژن p24، مشابه نمونه-های گیاهان تراریخت بیان کننده GFP (16c) بود و تفاوت معنی-داری بین نمونه‌های این دو گروه وجود نداشت. در حالی که این دو گروه، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های $(1E)^{Pol}$، $(2B)^{MP}$، نمونه-های تراریخت و تیمار شده با pTRV (16c-pTRV)، گیاهان وحشی(WT) و نیز گیاهان وحشی تیمار شده با pTRV (WT-pTRV) نشان دادند (شکل ۴- a, b).

شکل۳- تیمار با سازه‌های حامل ژن‌های GFLV روی گیاهان تراریخته *N. benthamiana* (16c) و تیمار شده با pTRV. عکس‌ها در زیر نور ماوراء بنفش گرفته شده است. a) گیاه 16c تیمار شده با pTRV و بدون تیمار با ژن‌های GFLV. b) تیمار با سازه حامل p24 به عنوان کنترل مثبت. c) GFLV-$(1E)^{Pol}$. d) GFLV-$(2B)^{MP}$. e) گیاه 16c بدون تیمار به عنوان کنترل. f) گیاه وحشی تیمار شده با pTRV به عنوان کنترل (کاملاً مشابه با گیاه وحشی بدون تیمار).

Figure 3- Agroinfiltration with the constructs including GFLV genes on treated transgenic *N. benthamiana* with pTRV. Photographed under UV light. a) Treated 16c with pTRV and without treatment with GFLV genes. b) Treated with p24 as positive control. c) GFLV-$(1E)^{Pol}$. d) GFLV-$(2B)^{MP}$. e) The 16c plant without any treatment. e) The treated wild type plant with pTRV as control (The same with WT plant without treatment).



شکل ۴- سنجش سطح فلورسنت در گیاهان تراریخته 16c و تیمار شده با pTRV و سپس با ژن‌های GFLV. حروف یکسان در نمودار نشان می‌دهد که تفاوت معنی-داری در میزان جذب فلورسنت وجود ندارد ($P<0.05$). a) روز سوم پس از اگروایانفیلتراسیون با GLRaV-2 -p24 و سازه‌های GFLV. b) روز چهارم پس از اگروایانفیلتراسیون با GLRaV-2 -p24 و سازه‌های GFLV.

Figure 4- The evaluation of the fluorescence level in the treated 16c plants with pTRV and subsequently GFLV genes. The same letters within a graph represent no significant difference in fluorescence ($P<0.05$). a) 3 days post Agroinfiltration with GLRaV-2 -p24 and GFIV constructs. b) 4 days post Agroinfiltration with GLRaV-2 -p24 and GFIV constructs.

از آنجا که ژن‌های $1E^{Pol}$ و $2B^{MP}$ برخلاف p24 نتوانستند افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح فلورسنت در گیاهان تراریخت 16c که ژن GFP در آن‌ها خاموش شده بود، ایجاد کنند و عملکرد آن‌ها مشابه گیاهانی بود که به عنوان شاهد منفی در این تحقیق استفاده شدند، می‌توان گفت که ژن مهارکننده خاموشی در ویروس برگ بادبزنی مو هنوز ناشناخته بوده و مطالعات و آزمایشات بیشتری جهت تعیین ناحیه‌ای از ژنوم GFLV با این عملکرد نیاز است. این نتایج با نتایج Vigne و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت. Vigne برای شناسایی تعیین‌کننده‌های علایم، کلون‌های عفونی cDNA مربوط به RNA1 و RNA2 نژاد GHu و F13 ویروس GFLV را تهیه و با استفاده از رویکرد ژنتیک معکوس نشان داد که در نژاد GHu، تعیین‌کننده‌های علایم روی RNA1 خصوصاً در ۴۰۸ نوکلئوتید انتهای '۳ ژن پلیمراز (RdRp) قرار دارند، اما به نظر نمی‌رسد این ژن به عنوان مهارکننده خاموشی عمل کند. آزمایش دیگری با استفاده از رقم وحشی *N. benthamiana* انجام شد، اما پروتئین $1E^{Pol}$ در هیچ-کدام از دو نژاد F13 و GHu برخلاف CMV-2b قادر به افزایش بیان GFP نبود. این در حالی بود که پروتئین $1E^{Pol}$ در قسمت-های اگروایانفیلتر شده به آسانی توسط آزمون وسترن بلاتینگ ردیابی شد. نتایج این آزمایشات، هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی

خاموشی قابل ردیابی در ارتباط با پروتئین $1E)^{Pol}$ دو نژاد GHu و F13 ویروس GFLV نشان نداد (Vigne *et al*. 2013). همچنین نتایج به دست آمده با نتایج مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۹ مطابقت داشت که در آن یک سازه سنجاق‌سری حاوی توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی GFLV به گیاه مدل *N. benthamiana* معرفی شد. گیاهان تراریخت به دست آمده، واکنش‌های متفاوتی به مایه‌زنی ویروسی با GFLV نشان دادند که شامل مقاومت، تأخیر در آلودگی، بهبود علایم و حساسیت بود. اگرچه هیچ‌گونه آلودگی تا روز هفتم پس از مایه‌زنی در لاین های تراریخته مشاهده نشد، اما دو هفته پس از مایه زنی، آلودگی به طور واضحی در این گیاهان مشاهده می‌شد. به عبارت دیگر سازه حاوی ژن پروتئین حرکتی نتوانست مقاومت کاملی در این گیاهان ایجاد کند و تنها سبب تأخیر در آلودگی شد که ناشی از حضور و فعالیت RNA دو رشته‌ای است که سازوکار خاموشی ژن را پس از نسخه‌برداری در گیاه القاء می‌کند (Jardak- Jamoussi *et al*. 2009). این آزمایشات نشان می‌دهد که حضور ژن مهارکننده خاموشی ناشناخته در ژنوم GFLV توانسته است بر مقاومت القاء شده توسط سازه سنجاق سری مبتنی بر ژن پروتئین حرکتی غلبه کند که این به معنی مهار سازوکار خاموشی ژن می‌باشد. دلیل شکسته شدن مقاومت این است که سازه القاءکننده بر اساس ژن مهار کننده خاموشی این ویروس ساخته نشده است و در نتیجه پس از مایه‌زنی گیاه تراریخت شده با این سازه، ژن مهار کننده خاموشی ویروس، هدف اصلی RNA های دو رشته‌ای نخواهد بود و در نتیجه مقاومت نیز به طور کامل القاء نخواهد شد. روش به کاربرده شده در این پژوهش جهت تعیین و ارزیابی فعالیت مهارکنندگی خاموشی ژن ها، می‌تواند به عنوان روشی مناسب و قابل اعتماد برای یافتن ژن مهارکننده خاموشی در اعضاء جنس *Nepovirus* و سایر ویروس‌ها به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از آقای دکتر مارک فیوکس به خاطر در اختیار گذاشتن مواد و امکانات مورد نیاز جهت انجام این پژوهش در آزمایشگاه ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه کرنل آمریکا (ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی در ایالت نیویورک) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Andert-Link P, Laporte C, Valat L, Ritzenthaler C, Demangeat G, Ving E, Laval V, Pfeiffer P, Stussi-Garaud C, Fuchs M. 2004. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. Journal of Plant Pathology 86: 183- 195.

Cazzonelli CI, Velten J. 2006. An in vivo, luciferase-based, Agrobacterium-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. Planta, 224: 582-597.

Chakrabarty R, Banerjee R, Chung SM, Farman M, Citovsky V, Hogenhout SA, Tzfira T, Goodin M. 2007. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing Nicotiana benthamiana-virus interactions. Mol. Plant Microbe Interact. 20: 740–750.

Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, Carrington JC. Dolja VV. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. Virology 346: 7–14.

Chisholm J, Zhang G, Wang A. Sanfacon H. 2007. Peripheral association of a polyprotein precursor form of the RNA-dependent RNA polymerase of Tomato ringspot virus with the membrane-bound viral replication complex. Virology 368: 133–144.

Culver JN, Padmanabhan MS. 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. Annu Rev Phytopathol 45: 221–243.

Fan Q, Niroula M, Feldstein PA. Bruening G. 2011. Participation of the Cowpea mosaic virus protease in eliciting extreme resistance. Virology 417: 71–78.

Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U. 1999. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. Biotechnology and applied biochemistry, 30: 113-116.

Gaire F, Schmitt C, Stussi-Garaud C, Pinck L, Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of Grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. Virology 264: 25–36.

Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO. 2002. pgd vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. Plant J. 31: 375–383.

Gu H, Ghabrial SA. 2005. The Bean pod mottle virus proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. Virology 333: 271–283.

Heaton LA, Lee TC, Wei N, Morris TJ. 1991. Point mutations in the turnip crinkle virus capsid protein affect the symptoms

expressed by *Nicotiana benthamiana* .Virology 183: 143–150.

Jardak-Jamoussi R, Winterhagen P, Bouamama B, Dubois C, Mliki A, Wetzel T, Ghorbel A, Reustle G. 2009. Development and evaluation of a GFLV inverted repeat constructfor genetic transformation of grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 187–196.

Jovel J, Walker M, Sanfacon H. 2007. Recovery of Nicotiana benthamiana plants from a necrotic response induced by a nepovirusis associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. Journal of Virology 81: 12285–12297.

Jupin I, Guilley H, Richards KE. Jonard G. 1992. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. EMBO J 11: 479–488.

Kagiwada S, Yamaji Y, Komatsu K, Takahashi S, Mori T, Hirata H, Suzuki M, Ugaki M, Namba S. 2005. A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the Potato virus X genome determines the symptoms in Nicotiana plants. Virus Res 110: 177–182.

Kapila J, derycke R, vanmontagu M, Angenon G. 1997. An Agrobacterium- mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 122: 101–108.

Larsen JS, Curtis WR. 2012. RNA viral vectors for improved Agrobacterium- mediated transient expression of heterologous proteins in Nicotiana benthamiana cell suspensions and hairy roots. BMC Biotechnology 12: 21–21.

Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res 40 (Database issue): 302–305.

Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell, H, Choi SH, Ryu KH, Canto T, Palukaitis P, Payne T. 2009. The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. Mol Plant Microbe Interact 22: 642–654.

Ma P, Liu J, He H, Yang M, Li M, Zhu X, Wang X. 2008. A viral suppressor P1/HC-Pro increases the GFP Gene expression in Agrobacterium- mediated transient assay. Appl. Biochem. Biotechnology 158: 243–252.

Martelli GP. 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology 96 (1S): 1-4.

Mokrzycki-Issartel N, Bouchon B, Farrer S, Berland P, Laparra H, Madelmont JC, Theisen M. 2003. A transient tobacco expression system coupled to MALDITOF- MS allows validation of the impact of differential targeting on structure and activity of a recombinant therapeutic glycoprotein produced in plants. FEBS Lett 552: 170– 176.

Naraghi-Arani P, Duabert S, Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. Journal of General Virology 82: 1791- 1795.

Pinck L, Fuchs M, Pinck M, Ravelonandro M, Walter B. 1988. A satellite RNA in Grapevine fanleaf virus strain F13. Journal of General Virology 69: 233–239.

Ratcliff F, Martin-Hernandez AM. Baulcombe DC. 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. Plant J 25: 237–245.

Ritzenthaler C, Pink M, Pink L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo. Journal of General Virology 76: 907-15.

Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, Vlugt van der R, Wetzel T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines thefamilies Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus andSadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. Archives of Virology 154: 899-907.

Serghini MA, Fuchs M, Pinck M, Reinbolt J, Walter B, Pinck L. 1990. RNA2 of Grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. Journal of General Virology71: 1433–1441.

Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham S. A, Gaba V. Gal-On A. 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. Journal of General Virology 81: 13135–13148.

Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS. 2010. Agroinoculation and agroinfiltration: Simple tools for complex gene function analyses. Methods in Molecular Biology. A. Pereira, ed. Humana Press, Totowa, NJ. 65-76.

Vigne E, Gottula J, Schmitt-Keichinger C, Komar V, Ackerer L, Belval L, Rakotomalala L, Lemaire O, Ritzenthaler C, Fuchs M. 2013. A strain specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in Nicotiana species. Journal of General Virology 94: 2803–2813.

Viry M, Serghini MA, Hans F, Ritzenthaler C, Pinck M, Pinck L. 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine nepovirus RNAs. Journal of General Virology 74: 169-174.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant Journal. 33: 949-956.

Voinnet O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. Nat Rev Genet 6: 206–220.

Wingard SA. 1928. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. J Agric Res 37, 127–153.

Yang Y. N, Li R. G, Qi M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. Plant Journal 22: 543–551.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using two Proteins of *Grapevine Fanleaf Virus*

Pakbaz S.[1], Pazhouhandeh M.*[2] and Eini Gandomani O.[3]

1. PhD student of Plant Virology, Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Tabriz.
2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Fac., Azarbaijan Shahid Madani University.
3. Assistant Prof., Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Zanjan. Iran

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

A B S T R A C T

Suppressor proteins of RNA Silencing have been well described in most genera of plant viruses. The methodology for identifying gene silencing suppressor activity of a protein in a plant system has proven to be an important tool. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is one of the most common viral diseases in grapevines worldwide and can cause up to 80% crop losses. GFLV is a bipartite member of the *Nepovirus* subgroup A in the family *Secoviridae* and has a single-stranded positive-sense RNA genome. A viral suppressor of RNA silencing (VSR) in Nepoviruses has not yet been described and our knowledge of symptom determinant genes in nepeoviruses is very limited. In this study, a transgenic GFP gene was silenced in transgenic *Nicotiana benthamiana* line 16c, and then the ability of GFLV polymerase and movement proteins to suppress gene silencing was evaluated. The efficiency of these two proteins was compared with positive and negative controls. The results showed that neither protein had the ability to suppress gene silencing. However, these proteins are involved in symptom production and systemic infection. This study demonstrates a model method for evaluation of suppressor activity of RNA Silencing.

Key Words

GFLV, RNA Silencing, Suppressor of Gene Silencing