مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۴-۱

ایجاد گیاه سیب‌زمینی مقاوم به ویروس PVX با استفاده از مکانیسم RNA Silencing

شهلاسادات فاطری رضوانی[۱]، مقصود پژوهنده[۲*]، اکبر شیرزاد[۳] و سکینه لطفی[۴]

Production of potato resistant plant to PVX using an RNA silencing mechanism

ShahlaSadat Fateri Rezvani, Maghsoud Pazhouhandeh*, Akbar Shirzad, and Sakineh Lotfi

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی
۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، ۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی
دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Department of Biotechnology,Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۴)

چکیده

یکی از عوامل اصلی کاهش محصول سیب‌زمینی ویروسها هستند. ویروس X سیب‌زمینی (Potato X Potexvirus: PVX) از مهمترین ویروسهای این گیاه می‌باشد و عمده‌ترین روش مبارزه با آن استفاده از ارقام مقاوم است. در این تحقیق سعی شد با بهره‌گیری از تکنیک RNA silencing گیاهان سیب‌زمینی مقاوم به این ویروس تولید شود. برای این‌کار ابتدا با دو همسانه‌سازی متوالی یک سازه سنجاق‌سری برای انتهای ژن *P25* ویروس PVX در ناقل pFGC5941 تحت پیشبر CaMV 35S ساخته شد. پروتئین P25 نقش ممانعت از RNA Silencing را در میزبان ویروس به عهده دارد. ناقل نوترکیب حاصل پس از تایید، به آگروباکتریوم منتقل شده و قطعات برگ و میانگره سیب‌زمینی رقم آگریا به‌وسیله آگروباکتریوم سویه LBA4404 تراریزش شدند. پس از کالوس‌زایی، جوانه‌زنی و ریشه‌زایی، گیاهان تراریخته انتخاب و تکثیر شدند. بررسی مولکولی با PCR روی DNA گیاهان، با RT-PCR روی RNA آنها وجود تراژن و بیان شدن آن را تایید کرد. گیاهان تراریخته تکثیر شده و در گلخانه به روش مکانیکی با PVX تلقیح شدند. نتایج ELISA با آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX مقاومت دو لاین تراریخته را نشان داد. تایید مولکولی این دو لاین مقاوم سیب زمینی به PVX با RT-PCR روی RNA گیاهان به‌کمک آغازگرهای ژن پروتئین پوششی ویروس انجام شد. نتیجه این تحقیق منجر به تولید دو لاین مستقل سیب‌زمینی مقاوم به PVX گردید که بررسی مقاومت و این همانی آنها در شرایط مزرعه بایستی انجام پذیرد و مینی تیوبرهای آنها جهت تکثیر تولید شود.

واژه‌های کلیدی

سیب‌زمینی
PVX
مقاومت
تراریخته
خاموشی ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

مقدمه

ویروس X سیب‌زمینی (PVX: *Potato X Potexvirus*) از مهمترین ویروس‌های این گیاه می‌باشد که باعث کاهش قابل توجه عملکرد آن می‌شود. این ویروس در سال ۱۹۳۱ توسط اسمیت توصیف شد. این ویروس از خانواده Flexiviridae و از جنس Potexvirus با پیکره نخی شکل خمش پذیر، با ژنوم ssRNA+ و اندازه ذرات حدود ۱۲×۵۵۰ نانومتر است. میزان خسارت این ویروس بسته به نژاد و رقم سیب‌زمینی بین ۱۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده است. آلودگی توام این ویروس با ویروس-های PVY و PVA باعث ایجاد خسارت بیشتر می‌شود. این ویروس به‌آسانی از طریق مکانیکی، پیوند و غده منتقل می‌شود ولی انتقال از طریق بذر و شته گزارش نشده است (Beemster & de Bokx, 1987; Salazar, 1996; Verchot-Lubicz *et al*., 2007). در ایران این ویروس از اکثر مناطق کشور و گروه‌های نژادی یک و سه آن از استان‌های خراسان و اردبیل گزارش شده است (Foroutani *et al*., 2004). ویروسها باعث کاهش عملکرد سیب‌زمینی از سالی به سال دیگر بخاطر تکثیر رویشی آن می-شوند و در بین عوامل بیماریزای این گیاه اهمیت بسزایی داشته و روش درمان موثری برای آنها وجود ندارد. از این رو تنها راه رهایی از خسارت آنها استفاده از ارقام مقاوم، بذر عاری از ویروس و کنترل ناقلین در مزرعه می‌باشد. ژنهای مقاومتی مثل Rx در سیب‌زمینی در مقابل ویروس‌ها شناسایی شده است (Kohm *et al*., 1993; Verchot-Lubicz *et al*., 2007)، تاکنون چندین مطالعه منجر به گزارش گیاهان مقاوم به ویروس به کمک انتقال ژنهای ویروسی به میزبان شده‌اند. در تحقیقی نشان دادند که بیان پروتئین پوششی PVX در سیب زمینی باعث ایجاد مقاومت به این ویروس گردید (Bai *et al*., 2009) و یا در تحقیقی دیگر نشان دادند که بیان ژن رپلیکاز PVX در سیب‌زمینی مقاومت خوبی به PVX نتیجه داد (Longstaff *et al*., 1993). همچنین در تحقیقی مشابه P25 ویروس PVX در توتون بیان شد و مقاومت خوبی به PVX، TMV و سایر توبامووویروسها ایجاد نمود. در گیاهان توتون تراریخت دو ویروس مذکور هیچ علایمی نشان نداده و نتوانستند تکثیر شوند (Ares *et al*., 1998).

یکی از مکانیسم‌های جدید ایجاد مقاومت به ویروس که امروزه کاربرد فراوانی دارد RNA Silencing می‌باشد (Duan *et al*., 2012). RNA Silencing فرایند دفاعی قدرتمندی در یوکاریوتهاست که سبب تجزیه RNA ویروس و ممانعت از همانند سازی آن می‌شود. اما بسیاری از ویروس‌ها می‌توانند این فرایند را مختل کنند. این ویروسها پروتئین‌های سرکوب کننده‌ای بنام Silencing Suppressors Protein (SSP) را بیان می‌کنند که RNA Silencing را سرکوب و باعث تکثیر ویروس می‌شود (Pazhouhandeh, 2009). این پروتئین‌ها بدون هومولوژی توالی با اجزاء مختلفی در مسیر RNA Silencing تداخل دارند. در مورد ویروس PVX پروتئین P25 به عنوان ممانعت کننده RNA Silencing شناخته شده است که با چسبیدن به پروتئین آرگونات در کمپلکس RISC و با تجزیه کردن آن از طریق پروتئازوم باعث سرکوب RNA Silencing در سلول می‌شود تا ویروس به راحتی تکثیر پیدا کند (Chiu *et al*., 2010).

اخیرا تحقیقاتی برای ایجاد مقاومت به ویروس از طریق RNA silencing انجام شده است که یا به‌کمک طراحی سازه‌های سنجاق سری تکرار معکوس و یا به‌کمک سازه‌های تولید کننده microRNA بوده است (Duan *et al*., 2012). در این تحقیق سعی شده با بهره‌گیری از تکنیک RNA silencing و تراریزش گیاهان سیب‌زمینی بوسیله سازه سنجاق سری طراحی شده برای انتهای ژن P25 گیاهان مقاوم به این ویروس ایجاد شود.

مواد و روشها

تهیه گیاه آلوده به ویروس PVX و استخراج RNA از برگهای سیب‌زمینی آلوده: از گیاه آلوده سیب زمینی (جداسازی شده از اطراف تبریز) که با ELISA و آنتی بادی اختصاصی PVX شناسایی شده بود، استخراج RNA با بافر Trizol به روش توصیف شده انجام شد (Chomczynski & Sacchi, 1987).

سنتز cDNA و تکثیر قطعه‌ای از ژن *P25* ویروس PVX: با ۴ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت SuperscriptIII (Invitrogen) سنتز cDNA انجام و به کمک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

آغازگرهای اختصاصی دارای سایت‌های برشی P25Fint (AAtctagactcgagATACCAGGCACTTTTTGCTGAC) به‌عنوان آغازگر رو به جلو و P25R (AAggatccccatggCTATGTCCCTGCGCGGACATA) به‌عنوان آغازگر برگشتی با واکنش PCR قطعه ۴۰۰ جفت بازی انتهای *P25* تکثیر شد.

همسانه سازی قطعه ژن *P25* در وکتور pFGC5941: قطعه ژن ۴۰۰ نوکلئوتیدی *P25* (Gene Bank: GQ863228.1) ویروس X سیب‌زمینی (PVX) ابتدا در بالادست اینترون Chalcone Synthase (CHSA) وکتور pFGC5941 (11407 bp) (Pazhouhandeh *et al*., 2006) به کمک آنزیمهای برشی *Nco*I و *Xho*I و واکنش الحاق با *T4* DNA Ligase (Fermentase) در جهت sense قرار داده شد و وکتور حاصل پس از تایید برای همسانه سازی دوم بکار رفت (شکل ۱ه). این بار قطعه فوق در پائین‌دست اینترون به کمک آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Xba*I و لیگاسیون قطعات برش یافته در جهت antisense به‌منظور تهیه سازه سنجاق سری *P25* همسانه سازی شد. تایید کلون‌های ایجاد شده با PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی وکتور pFGC5941 Fext (AATCCCACTACCTTCGCAAGACC) به‌عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rint (CTTTCTACCTTCCCACAATTCG) به‌عنوان آغازگر برگشتی برای همسانه سازی اول در جهت sense و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pFGC5941 Fint (CAGACAGATGTTTCCCAGCGAA) به‌عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rext (AAACCGGCGGTAAGGATCTGAG) به عنوان آغازگر برگشتی جهت تایید همسانه سازی دوم در جهت antisense انجام شد.

تکثیر وکتور pFGC5941 نوترکیب و انتقال آن به آگروباکتریوم: از باکتری *Escherichia coli* نژاد Top10 برای انجام مراحل همسانه سازی قطعه ژن *P25* استفاده شد. بعد از تهیه سلول‌های شایسته باکتری تراریزش باکتری به روش الکتروپوراسیون توسط دستگاه Multiporator (Eppendorf) با ولتاژ ۲/۵ کیلوولت به مدت پنج میلی‌ثانیه انجام شد. برای گزینش کلنی‌های مثبت بعد از تراریزش، با توجه به ساختار وکتور و وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین روی وکتور، از محیط LB حاوی کانامایسین ۵۰ µg/ml استفاده شد. استخراج پلاسمید به روش mini prep (Sambrook *et al*., 1989) انجام گردید. به‌منظور تائید بیشتر، وکتورهای نوترکیب، چهار وکتور نوترکیب برای توالی‌یابی به مرکز توالی یابی IBMP-CNRS فرانسه ارسال گردید. یکی از وکتورهای تایید شده به روش الکتروپوراسیون به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 منتقل شد. برای گزینش، کلنی‌های مثبت روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین و ریفامپیسین ۱۰۰µg/ml به مدّت دو شب در انکوباتور ۲۸°C کشت شدند. سلول‌های آگروباکتریوم حامل وکتور نوترکیب pFGC5941 در محیط LB مایع دارای کانامایسین و ریفامپیسین تکثیر یافتند تا OD_{600} آن به ۰/۷ تا ۱ رسید. بعد از حذف محیط کشت، ته‌نشست سلول‌های باکتری با محیط MS مایع مخلوط شد.

تراریزش گیاه سیب‌زمینی: گیاهان درون شیشه‌ای سیب‌زمینی رقم آگریا برای اطمینان کامل از عاری بودن از ویروس PVX، با آزمون DAS-ELISA و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از محیط MS (Murashige and skoog 1962) درون شیشه‌های کشت تکثیر شدند. قطعات نیم تا یک سانتی‌متری میانگره ساقه گیاهان سیب‌زمینی تکثیر یافته برای انجام تراریزش استفاده شدند. کشت همزمان قطعات گیاه با سلول های شایسته آگروباکتریوم در دمای ۲۰°C به مدت یک ساعت، روی شیکر با سرعت ۵۰ rpm و در تاریکی درون ۲۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع با نصف غلظت بدون آنتی‌بیوتیک انجام شد. ریزنمونه‌های گیاهی سپس به محیط MS غنی شده با (mg/l ۰/۰۲) GA3 ، (mg/l ۰/۲) NAA و (mg/l ۰/۳) TDZ، ساکارز ۲/۵٪ و آگار ۸٪ حاوی آنتی‌بیوتیک Cefotaxime (350 mg/l) برای حذف آگروباکتریوم انتقال داده شده و در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند تا کالوس‌زایی صورت گیرد. در این تحقیق از ۱۲۰ ریزنمونه برای تراریزش استفاده گردید. در ادامه کالوس های ایجاد شده به محیط کشت جدید حاوی Cefotaxime و Phosphinothricin (PPT: 10

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

(mg/l) برای گزینش نمونه‌های تراریخت منتقل شدند. کالوس زایی ادامه یافت و جوانه‌زنی آغاز شد. فقط گیاهان تراریخت با T-DNA مورد نظر که ژن مقاومت به PPT را دریافت کرده بودند، در این مرحله به رشد ادامه دادند. کالوسهای گزینش شده پس از ریشه زایی به محیط جدید حاوی (۰/۰۲ mg/l) GA3 ، (mg/l ۰/۰۲) NAA و (۰/۳ mg/l) TDZ منتقل شدند تا جوانه زنی صورت گیرد. گیاهان کامل به‌دست آمده به صورت مستقل نامگذاری و برای تائید تراریخت بودن مجددا به مدت دو هفته دیگر در شرایط گزینش واکشت شدند.

روش‌های مولکولی تائید تراریخت بودن گیاهان و بررسی انتقال و رونویسی ژن هدف: استخراج DNA ژنومی از سه گیاه تراریخت به روش CTAB صورت گرفت (Doyle & Doyle, 1987). برای تایید وجود T-DNA در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده *P25* و همچنین آغازگرهای مربوط به وکتور استفاده شد. پس از تکثیر گیاهان تراریخت، استخراج RNA به روش Trizol انجام شد (Chomczynski & Sacchi, 1987). سپس cDNA با کیت SuperscriptIII (Invitrogen) سنتز و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه ژن *P25* جهت بررسی وجود mRNA انجام گردید.

بررسی مقاومت گیاهان تراریخت به PVX: گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تراریخت تکثیر یافته به‌همراه گیاهان غیرتراریخت به بستر کشت حاوی پرلیت ۲۰٪، کوکوپیت ۲۰٪ و خاک ۶۰٪ منتقل و پس از دو هفته آبیاری با محلول MS نصف غلظت به محیط خاک سازگاری یافتند. ویروس PVX پس از تکثیر در گیاه توتون و تایید آلودگی از طریق آزمون ELISA به کمک آنتی‌بادی-های اختصاصی پروتئین پوششی ویروس، برای تلقیح به روش مکانیکی روی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت استفاده گردید. دو هفته پس از تلقیح، RNA گیاهان از برگهای جدید تلقیح نشده بالایی استخراج و سنتز cDNA انجام گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس PVX (PVXCPF: aaGGATCCatgtcagcaccagctagcaca آغازگر رو به جلو و PVXCPR: aaGAATTCttatggtggtgggagagtgac آغازگر برگشتی) واکنش PCR برای بررسی تکثیر یا عدم تکثیر ویروس انجام شد.

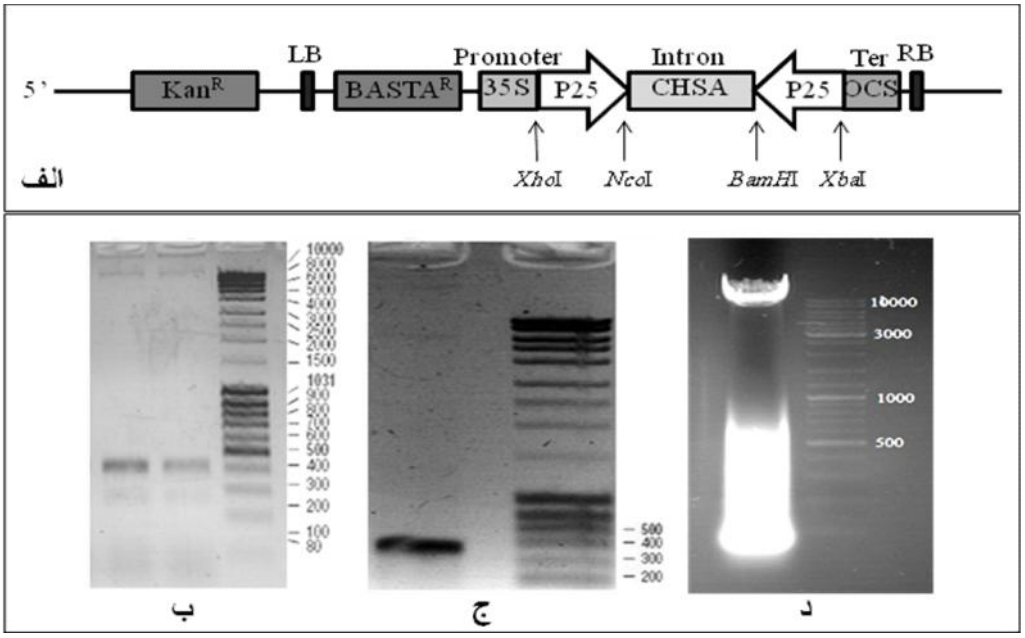
نتایج

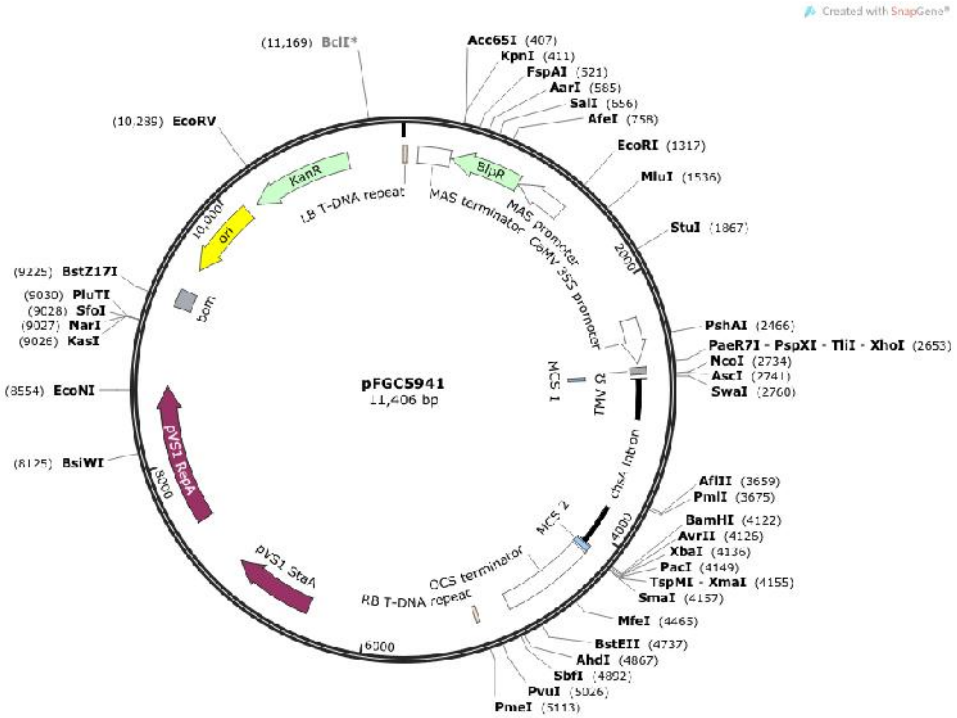
همسانه سازی قطعه ژن *P25* ویروس PVX در وکتور pFGC5941: در این تحقیق برای ایجاد مقاومت به PVX، خاموش کردن ژن *P25* از ژنوم PVX مورد نظر می‌باشد. بدین منظور سازه سنجاق سری تکرار معکوس قطعه انتهایی ژن *P25* در وکتور pFGC5941 مطابق شکل (۱- الف) طراحی و ساخته شد تا به گیاه سیب‌زمینی منتقل شود. پس از بدست آوردن ویروس از روی نمونه های سیب‌زمینی و استخراج RNA و سنتز cDNA واکنش PCR برای تکثیر قطعه ژن با آغازگرهای اختصاصی (P25Fint, P25R) حاوی سایت‌های برشی انجام شد (شکل ۱- ب). پس از تایید محصول ۴۰۰ جفت بازی PCR روی ژل آگارز الکتروفورز، خالص سازی آن و برش آنزیمی ابتدا با آنزیمهای *Xho*I و *Nco*I انجام گردید. برش آنزیمی همزمان روی وکتور خالی نیز صورت گرفت. پس از برش آنزیمی، قطعات مورد نیاز از روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (LMP) جداسازی و خالص سازی شد. با توجه به اینکه در آغازگرهای P25Fint و P25R، به ترتیب مکان آنزیم‌های *Xho*I و *Nco*I تعبیه شده است، از واکنش برش آنزیمی محصول PCR باند ۴۰۰ bp بدست آمد (شکل۱- ج). از برش آنزیمی وکتور خالی بخاطر نزدیک بودن دو سایت برشی با حذف تقریباً ۸۰ bp وکتور به شکل خطی درآمد (شکل ۱- د).

بعد از انجام واکنش لیگاسیون بین محصول PCR و وکتور برش یافته و خالص‌سازی آن، محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* منتقل و از کلنی‌هایی که بر روی محیط حاوی کانامایسین (ژن مقاومت در وکتور pFGC5941) رشد کرده بودند، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور pFGC5941 در جهت sense (Fext و Rint) انجام شد (شکل ۲- الف).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]



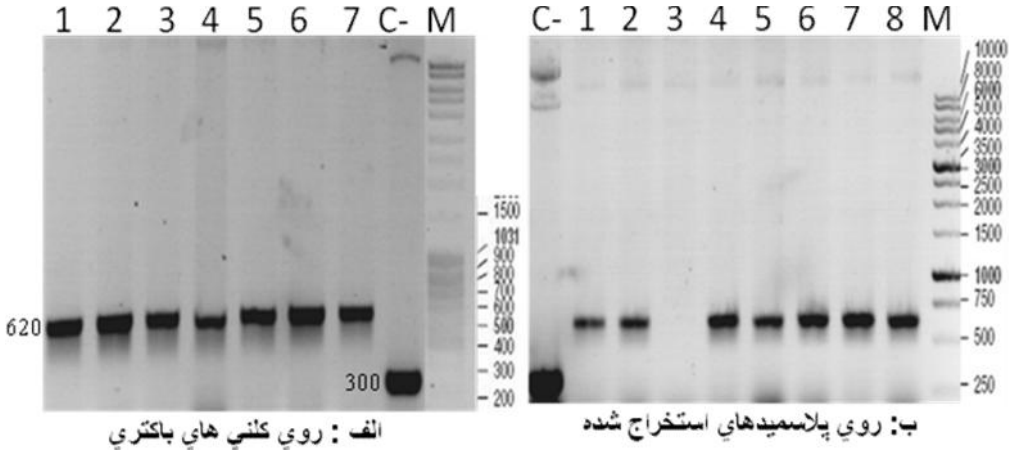


ه

شکل ۱– همسانه سازی P25 در وکتور pFGC5941: الف) نقشه خلاصه شده وکتور و استراتژی همسانه سازی قطعه‌ای از ژن *P25* در جهت sense و antisense. از چپ به راست شامل کاست ژن مقاومت به کانامایسین خارج از T-DNA، حاشیه چپ (LB)، کاست ژن مقاومت به بستا داخل T-DNA، پروموتور CaMV-35S، محل ورود ژن در جهت sense، اینترون ژن *Chalcone Synthase A* محل ورود ژن در جهت antisense، ترمیناتور ژن *Octopine Synthase* و حاشیه راست (RB) می‌باشد. محل سایت برشی آنزیم‌ها مشخص شده است ب) محصول PCR قطعه ژن P25 روی cDNA ویروس PVX با آغازگرهای اختصاصی P25Fint و P25R روی ژل آگارز الکتروفورز. هر دو لاین دارای باند ۴۰۰ جفت بازی می باشند. ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR پس از برش آنزیمی با *Xho*I و *Nco*I روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. د) نتیجه الکتروفورز وکتور خالی pFGC5941 با اندازه ۱۱۴۰۷ جفت باز پس از برش آنزیمی با *Xho*I و *Nco*I روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. ه) نقشه وکتور pFGC5941

Fig1. Cloning of PVX P25 in pFGC5941 plasmid (sense).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]



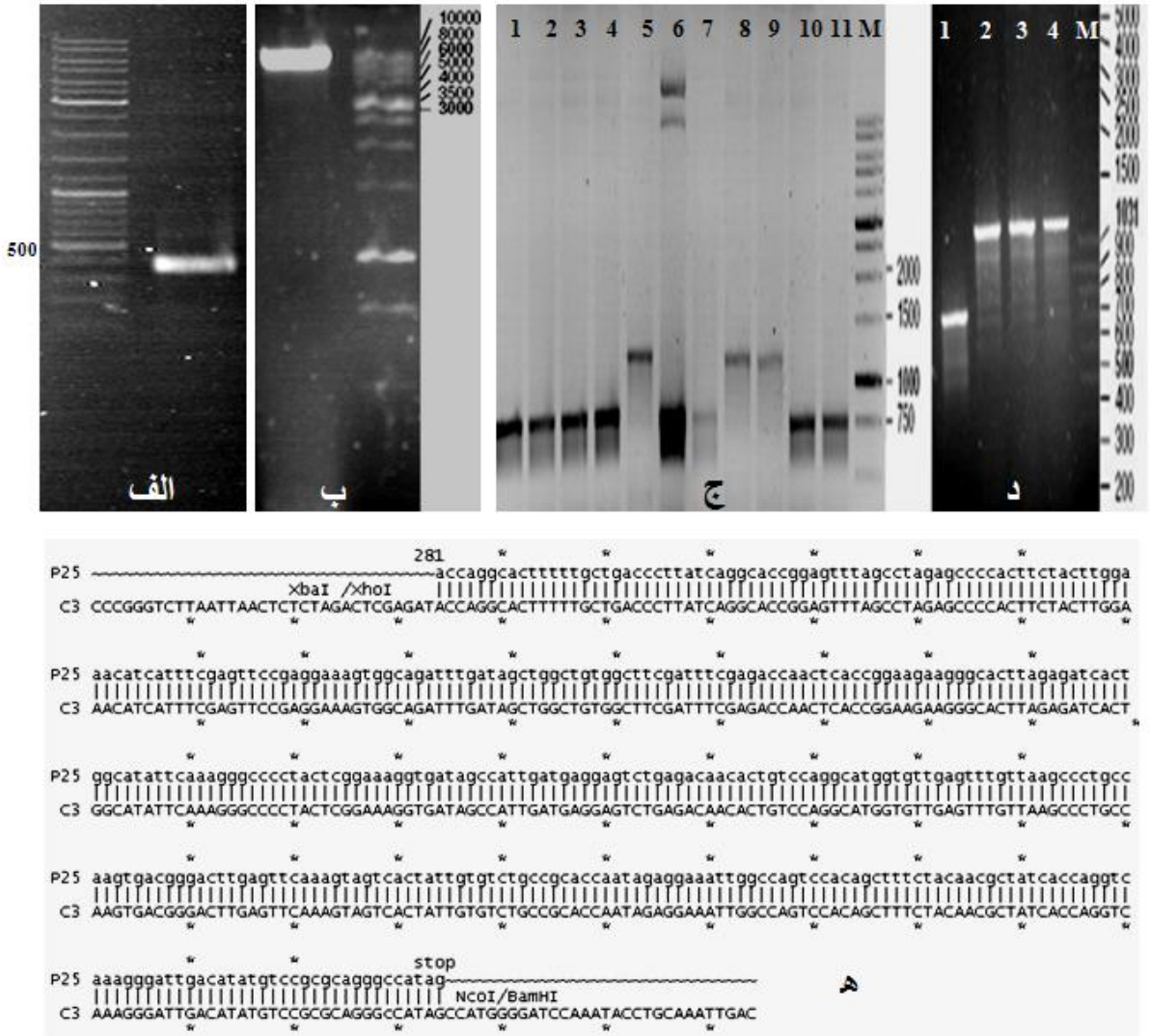
شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Fext و Rint) روی کلنی‌های باکتری (الف) و روی پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری (ب) حاوی وکتور نوترکیب pFGC5941 محصول همسانه‌سازی اول قطعه ژن *P25* در جهت sense. الف) در هفت ستون ۷-۱ باند ۶۲۰ جفت بازی دیده می‌شود. در ستون آخر (-C) باند تقریبا ۳۰۰ جفت بازی نتیجه PCR روی وکتور خالی به عنوان کنترل می‌باشد که در آن فاصله این دو آغازگر ۳۰۰ جفت باز است. ب) در ستون اول (-C) باند ۳۰۰ جفت بازی مربوط به کنترل منفی (وکتور خالی) و در بقیه ستون‌ها باند ۶۲۰ جفت بازی قابل مشاهده است. (در ستون ۳ بخاطر مشکل در PCR باندی مشاهده نمی شود)

Fig2. The Electrophoresis of PCR products on bacterial (a) and Plasmid DNA (b) with plasmid primers

وکتور نوترکیب جدید بایستی باندی معادل bp ۶۲۰ (۸۰-۳۰۰+۴۰۰) می‌داد که در شکل مشخص می‌باشد. bp ۴۰۰ اندازه قطعه ژن *P25* وارد شده و bp ۳۰۰ فاصله پرایمرها روی وکتور خالی و bp ۸۰ قطعه افتاده از وکتور در برش آنزیمی می‌باشد. تقریباً تمام کلنی‌هایی که روی محیط انتخابی رشد کرده بودند، باند درستی را نشان دادند که در شکل (۲-الف) نتیجه PCR روی هفت کلنی آورده شده است. جهت تائید نهایی کلنی‌های مثبت، پلاسمیدهای آن‌ها استخراج و از آن‌ها نیز PCR با شرایط فوق انجام شد (شکل ۲-ب). از یکی از آن‌ها برای شروع همسانه سازی دوم در جهت antisense استفاده شد.

به منظور قرارگیری قطعه *P25* در جهت antisense در وکتور pFGC5941 بار دیگر واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه ژن *P25* (P25Fint و P25R) انجام و قطعه bp ۴۰۰ تکثیر شد (شکل ۳- الف). پس از تایید نتیجه، بقیه محصول PCR مانند قبل خالص‌سازی و برای برش آنزیمی، این بار از دو آنزیم *Xba*I و *Bam*HI استفاده شد. وکتور محصول همسانه سازی اول نیز همزمان با این دو آنزیم برش یافت (شکل ۳- ب). قطعات مطلوب پس از برش آنزیمی روی ژل آگارز LMP جداسازی و خالص سازی شد و واکنش لیگاسیون بین آنها صورت پذیرفت. پس از انتقال به باکتری و گزینش کلنی‌ها، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Fint و Rext) روی کلنی‌ها انجام و از کلنی‌های مثبت حاوی قطعه ژن، باند تقریباً bp ۱۱۷۲ به دست آمد (شکل۳-ج). آغازگر Rext از نوکلئوتید ۴۲۹۱ و آغازگر Fint از نوکلئوتید ۳۵۰۵ به وکتور pFGC5941 اتصال پیدا می‌کنند، لذا باند حاصله روی وکتور خالی باید دارای bp ۷۸۶ باشد (شکل ۳-ج)، و در صورت داشتن قطعه P25 در جهت آنتی‌سنس با افتادن bp ۱۴ هنگام برش بایستی باند bp ۱۱۷۲(۱۴-۴۰۰+۷۸۶) بدست آید. سه کلنی گزینش شده چنین باندی را نشان دادند (شکل۳-ج) از این سه کلنی، استخراج پلاسمید صورت گرفت و برای تائید آن‌ها واکنش PCR دوباره انجام یافت (شکل۳-د). برای تائید بیشتر پلاسمیدهای نوترکیب حاصل، این سه وکتور نهائی برای توالی-یابی ارسال گردید. توالی یکی از این وکتورها برای هر چهار آغازگر روی وکتور pFGC5941 با توالی P25 چاپ شده در NCBI به‌شماره GQ863228 بررسی و به‌خوبی تایید شد (شکل ۳-ه) که از آن برای ادامه کار استفاده گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]



شکل ۳- همسانه سازی قطعه ژن *P25* در جهت آنتی‌سنس در وکتور pFGC5941: الف) نتیجه الکتروفورز محصول PCR قطعه ژن *P25* ۴۰۰ جفت باز پس از برش آنزیمی با *Bam*HI و *Xba*I روی ژل آگارز LMP. ب) نتیجه الکتروفورز وکتور نوترکیب pFGC5941-*P25* محصول همسانه‌سازی اول پس از برش آنزیمی با آنزیمهای فوق. ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای تائید همسانه‌سازی دوم قطعه ژن *P25* در جهت آنتی‌سنس روی کلنی های گزینش شده در محیط انتخابی با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Fint و Rext). در ستون‌های ۵، ۸ و ۹ دارای باند ۱۱۷۲ جفت بازی و بقیه فاقد *P25* هستند. ستون ۶ باند ۷۸۶ جفت بازی نتیجه PCR روی وکتور خالی به‌عنوان کنترل است. د) نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای تائید مجدد همسانه‌سازی دوم قطعه ژن *P25* در جهت آنتی‌سنس روی سه پلاسمید استخراج شده از کلنی‌های مثبت که باند با اندازه ۱۱۷۲ جفت باز دارند و ستون اول نتیجه PCR روی وکتور خالی به‌عنوان کنترل است. M: مارکر اندازه DNA. ه) همردیفی نتیجه توالی-یابی یکی از سه پلاسمید مثبتpFGC5941 دارای قطعه ژن *P25* در هر دو جهت سنس و آنتی‌سنس با چهار آغازگر وکتور و مقایسه قطعه ژن *P25* جهت آنتی سنس موجود در آن با توالی ثبت شده *P25* در NCBI، به کمک نرم افزار APE.

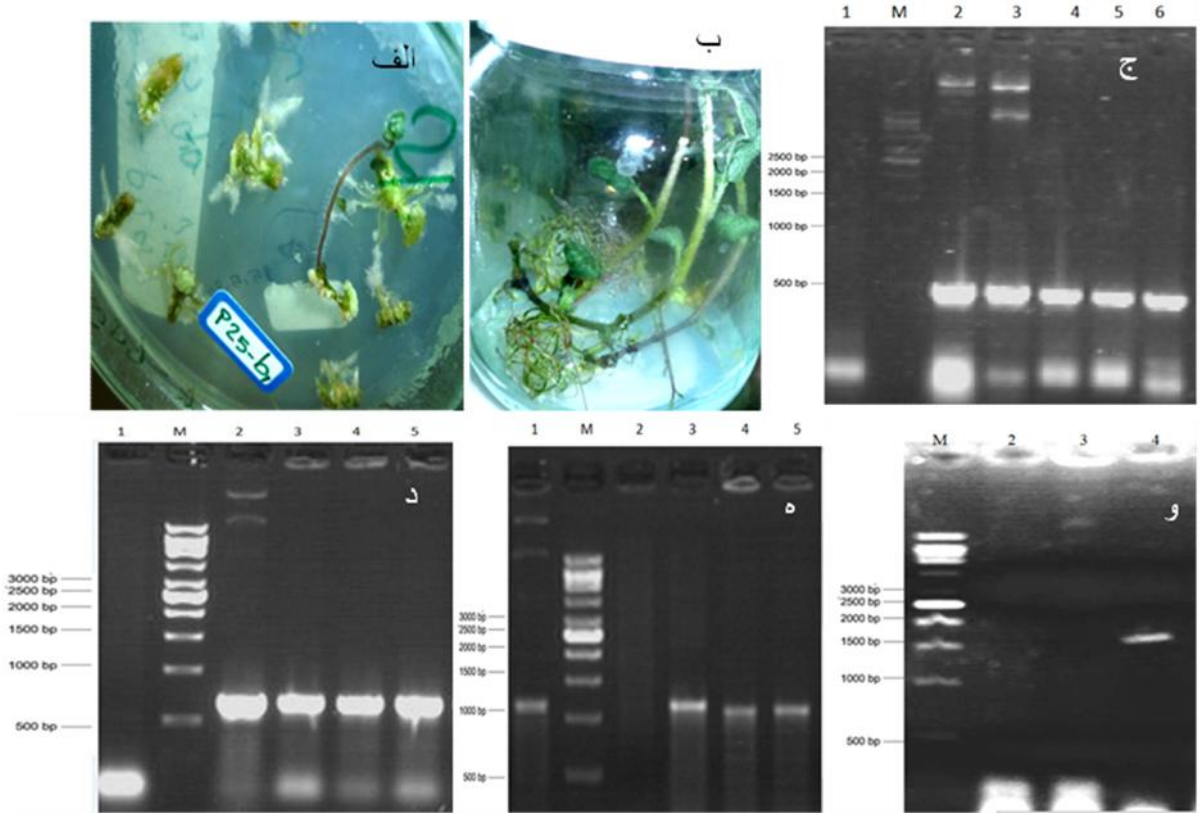
Fig3. Cloning of PVX P25 in pFGC5941 plasmid (antisense).

تراریزش گیاه سیب‌زمینی با وکتور نوترکیب pFGC5941 تولید کننده سازه سنجاق‌سری P25 ویروس PVX به کمک آگروباکتریوم: ناقل نوترکیب pFGC5941 بعد از اینکه در هر دو جهت سنس و آنتی‌سنس توسط توالی‌یابی تائید شد، به سلول‌های آگروباکتریوم منتقل و وجود این پلاسمید در آن‌ها با PCR تایید شد. این کلنی تکثیر و برای تراریزش گیاهان سیب‌زمینی در ادامه کار استفاده شد. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سیب‌زمینی رقم آگریا در محیط MS تکثیر شده و قبل از شروع از جهت وجود

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

چند ویروس مهم با ELISA تست شدند. سپس، میانگره‌های آنها به طول نیم تا یک سانتی‌متر تهیه و جهت همکشتی با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pFGC5941 استفاده شد. نمونه ها بعد از یک ساعت هم کشتی در محیط کالوس‌زایی حاوی آنتی بیوتیک Cefotaxime برای حذف اگروباکتریوم قرار داده شدند و تقریباً بعد از ۱۴ روز کالوس‌ها تشکیل یافتند. سپس گیاهان به مدت ۴ هفته در محیط جوانه‌زنی حاوی عامل انتخاب-گر روی T-DNA، یعنی PPT و همچنین Cefotaxime برای اطمینان از عدم رشد آگروباکتریوم‌های باقیمانده برده شدند و جوانه زنی گیاهانی که در برابر PPT مقاوم بودند آغاز شد. در هر ظرف کشت تنها یک گیاه حاصل از تراریزش قرار گرفت و نامگذاری مستقل شده و تکثیر یافت. این گیاهان در سن چهار هفتگی برای آنالیزهای مولکولی استفاده شدند.

بررسی وجود تراژن در DNA گیاهان تراریخت: DNA ژنومی سه گیاه از بین گیاهان حاصل از محیط انتخابگر استخراج شد. برای تائید وجود T-DNA در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده در وکتور استفاده شد. بدین منظور سه نوع PCR مختلف بصورت زیر انجام پذیرفت.

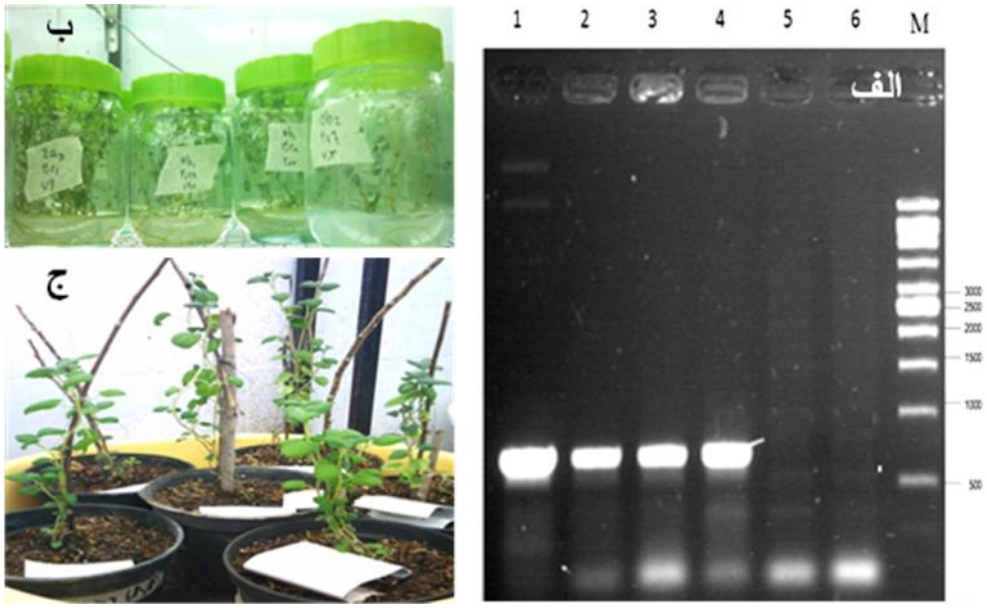


شکل ۴- تایید وجود تراژن در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی: الف) کالوس‌زایی و جوانه‌زنی ریزنمونه‌های تراریخت سیب‌زمینی با سازه سنجاق‌سری P25 ویروس PVX. ب) جداسازی جوانه‌ها و ریشه‌زایی و بازکشت گیاهان سیب‌زمینی تراریخت. ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای P25 Fint و P25 R روی DNA ژنومی گیاهان سیب‌زمینی تراریخت (ستون‌های ۴، ۵ و ۶ مربوط به سه گیاه حاوی باند bp ۴۰۰)، ستون ۱ مربوط به کنترل منفی روی DNA گیاه سیب‌زمینی غیرتراریخت انجام شده است. ستون ۲ و ۳ محصول PCR به ترتیب روی وکتور pFGC5941 نوترکیب و وکتور pPVX به عنوان کنترل مثبت. د) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint، روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت، باند موجود در ستون های۳، ۴ و ۵، ۶۲۰ جفت باز است که این باند با PCR کنترل مثبت که روی وکتور pFGC5941 نوترکیب انجام شده (ستون ۲) برابری می‌کند. ستون ۱، کنترل منفی روی گیاه غیرتراریخت. ه) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext، روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت، باند موجود در ستون‌های ۳ تا ۵، ۱۱۷۲ جفت باز بوده و با باند کنترل مثبت که روی وکتور pFGC5941 نوترکیب انجام شده (ستون ۱) برابر است، ستون ۲ نتیجه PCR کنترل منفی روی گیاه غیرتراریخت. و) نتیجه الکتروفورز محصول RT-PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rext، روی cDNAهای سنتز شده از RNAهای گیاهان تراریخت. از دو گیاه تراریخت باندی رویت نشد

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

ولی در ستون شماره چهار که مربوط به گیاه سوم بود باند دیده می‌شود. با در نظر گرفتن حذف توالی اینترون در cDNA، با حذف ۱۳۵۲ جفت باز طول اینترون CHAS باندی در محدوده ۲۰۰۰-۱۵۰۰جفت باز حاصل خواهد شد که باند ستون ۳ در این محدوده قرار گرفت.

Fig4. Confirmation of transgene presence in transgenic potato plants (DNA and PCR).



شکل ۵- الف) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint روی cDNAهای سنتز شده از RNAهای استخراج شده از گیاهان تراریخت. باند ۶۲۰ جفت بازی در ستون های ۲، ۳ و ۴ که با اندازه باند کنترل مثبت در ستون ۱، یعنی pFGC5941 نوترکیب برابری می‌کند. دو ستون آخر، نتیجه PCR روی cDNA گیاه غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی می‌باشد. ب) تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان تراریخت سیب‌زمینی در لاین های مستقل. ج) انتقال و سازگاری گیاهان تراریخت سیب زمینی به گلدان.

Fig5. Confirmation of transgene expression (RNA and RT-PCR) in transgenic potato plants.

الف) PCR با آغازگرهای P25 Fint و P25 R روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت: نتیجه این PCR برای هر سه DNA ژنومی مثبت بود. از وکتورهای pFGC5941 نوترکیب و PVX به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۴). ستون‌های ۳، ۴ و ۵ از روی DNA سه گیاه مختلف حاصل از محیط انتخابگر انجام شد. بدین ترتیب وجود تراژن در این گیاهان تایید گردید.

ب) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint: PCR با آغازگرهای مربوط به وکتور در ناحیه بالادست و پایین دست محل ورود قطعه P25 در جهت سنس یعنی pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint انجام شد. باند موجود در ژنوم گیاه، با نتیجه حاصل از وکتور pFGC5941 نوترکیب در جهت سنس مطابقت داشت (شکل ۴-ب).

ج) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext: این PCR با جفت آغازگرهای دو طرف محل ورود قطعه P25 در جهت آنتی‌سنس انجام شد. نتیجه این PCR نشان داد **که قطعه** ژن P25 در جهت آنتی‌سنس هم به DNA ژنومی هر سه گیاه تراریخت وارد شده است (شکل۴-ج). **بررسی بیان تراژن در گیاهان تراریخت با RT-PCR:** از سه لاین انتخاب شده از گیاهان تراریخت پس از تکثیر و تایید حضور تراژن در درون DNA ژنومی آنها، استخراج RNA با استفاده از روش مبتنی بر Trizol صورت گرفت و سپس تیمار DNase انجام شد. پاسخ منفی PCR اولیه روی RNA ها پس از تیمار DNase نشان داد که آلودگی DNA وجود ندارد. آنگاه از روی RNAها، cDNA سنتز شده و با استفاده از آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rext واکنش PCR انجام شد. هدف از این کار، بررسی حضور

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

mRNAهای حاصل از رونویسی سازه سنجاق سری بود (شکل ۴-و). فقط در cDNA سنتز شده از RNA گیاه سوم باندی در محدوده ۲۰۰۰ جفت باز دیده شد که می‌تواند تائید حضور P25 dsRNA در رونوشت‌های کل این گیاه باشد. در مورد گیاهان ۱ و ۲ احتمالا dsRNAهای این گیاهان در مکانیسم RNA Silencing قرار گرفته‌اند و به siRNAهای ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتیدی تبدیل شده‌اند. برای اطمینان از بیان شدن تراژن در گیاهان تراریخت روی cDNA آنها واکنش PCR به کمک آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint، (مخصوص تایید جهت سنس) انجام شد و در هر سه گیاه وجود باند ۶۲۰ جفت بازی همچون کنترل مثبت که روی وکتور انجام شد مشاهده گردید (شکل۵- الف).

بررسی مقاومت گیاهان تراریخت به ویروس PVX با ELISA: پس از تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان تراریخت (شکل ۵- ب) و انتقال آنها به گلدانهای حاوی پرلیت و کوکوپیت، سازگار کردن آنها با آبیاری با محیط کشت MS مایع یک پنجم غلظت صورت گرفت (شکل ۵- ج). عصاره ویروس PVX تکثیر شده در آزمایشگاه به صورت مکانیکی به این گیاهان تراریخت و همچنین گیاهان غیرتراریخت به عنوان کنترل که در موازات تراریخت‌ها کشت شده بودند، تلقیح شد. تلقیح به روش مکانیکی روی دو برگ میانی گیاهان انجام شد. بعد از گذشت دو هفته برگ‌های بالایی گیاهان برای عصاره گیری تست ELISA و استخراج RNA استفاده شد. نتایج ELISA با آنتی بادی اختصاصی کت پروتئین PVX نشان داد که از سه لاین انتخاب شده تراریخت، دو لاین مقاومت به PVX را دریافت کرده اند (شکل ۶-الف).

تایید مقاومت گیاهان تراریخت به ویروس PVX با RT-PCR: RNA استخراج شده از گیاهان دو لاین تراریخت و همچنین گیاهان غیرتراریخت پس از تیمار با DNase و اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA با PCR کنترل، برای سنتز cDNA استفاده شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده و درستی سنتز cDNA ابتدا یک واکنش PCR با آغازگرهای 18SrRNA مربوط به توتون انجام شد (شکل۶- ب پایین) و نتیجه الکتروفورز آنها نشان داد که سنتز cDNA در همه نمونه‌ها تقریبا بصورت یکسان به خوبی انجام شده است. آنگاه واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی CP-PVX صورت گرفت. نتیجه الکتروفورز محصول PCR نشان داد که گیاهان تراریخت لاین اول و دوم مقاوم به PVX هستند (شکل ۶- ب). اندازه باند محصول PCR ژن پروتئین پوششی ۷۱۴ جفت باز است که در کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخت دیده شد اما در تکرارهای دو لاین تراریخت مشاهده نشد. بدین وسیله نتیجه ELISA با RT-PCR تایید شد.

نتایج مجموعا نشان داد که دو لاین از رقم آگریا سیب‌زمینی تراریخت شده‌اند و حاوی سازه سنجاق‌سری قطعه‌ای از ژن *P25* ویروس PVX که ممانعت‌کننده از RNA Silencing در میزبان است بوده و مقاومت به این ویروس را دریافت کرده‌اند و تاکنون تغییر ریختی ناهنجاری در گیاهان تراریخت مشاهده نشده است. در ادامه بایستی گیاهان این دو لاین تکثیر شده و ضمن کشت در گلخانه و بررسی مرفولوژی آنها به تولید مینی‌تیوبر اقدام و میزان تولید آنها با گیاهان غیرتراریخت مقایسه شود.

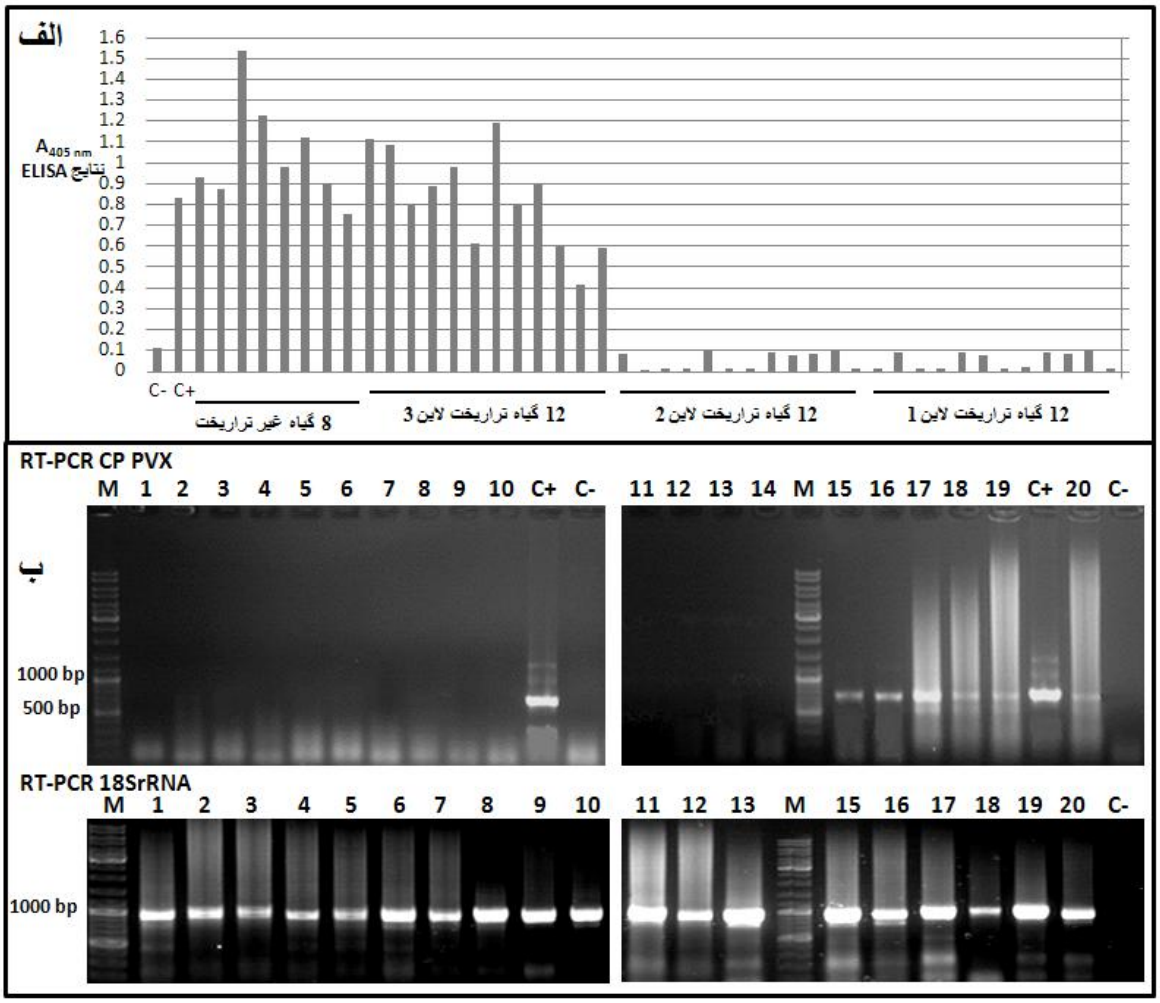
بحث و نتیجه گیری

ویروس‌ها برای ایجاد بیماری در میزبان و جهت همانندسازی و تکثیر خود نیازمند غلبه بر RNA Silencingمیزبان هستند. در طول زمان و در تکامل با میزبان ویروس‌ها پروتئین هایی در ساختار خود تعبیه کردند که ازRNA Silencing در میزبان ممانعت می‌کند. چنین پروتئین‌هایی بنام Suppressor of Silencing یا ممانعت کننده از RNA silencing مشهور هستند که کم و بیش در تمام جنس‌های ویروسی شناسایی شده‌اند یا در حال شناسائی می‌باشند (Pazhouhandeh, 2009; Moissiard & Voinnet, 2004). این پروتئین‌ها، با توالی‌های مختلف هر کدام بطور مستقل و اختصاصی، بخشی از مکانیسم RNA Silencing را از کار می‌اندازند (Voinent, 2001). P25 یکی از پروتئین‌هایی است که از ژنوم PVX کد می‌شود و دارای چند وظیفه مهم مثل ممانعت کننده از RNA Silencing و پروتئین حرکتی ویروس می‌باشد (Chiu *et al.*, 2010). در سال ۲۰۱۰ توسط گروه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

تحقیقاتی Baulcombe ، تاثیر P25 بر AGO1 در گیاه آرابیدوپسیس بررسی شده و نشان دادند که P25 و AGO1 دارای میانکنش مولکولی قوی بوده و میزان AGO1 در حضور P25 کاهش می‌یابد که وابسته به فعالیت پروتئازوم است. AGO1 مهمترین آرگونات در مسیر RNA Silencing در گیاه آرابیدوپسیس است که بدون وجود آن حیات گیاه به مخاطره می‌افتد (Chiu *et al*., 2010).



شکل ۶- بررسی و تایید مقاومت گیاهان تراریخت سیب زمینی به PVX: الف) نتیجه تست ELISA با آنتی بادی پروتئین پوششی ویروس PVX. هر ستون نمایشگر میانگین سه چاهک تکرار برای هر گیاه است. -C و +C به ترتیب کنترل منفی فاقد عصاره گیاهی و کنترل مثبت می‌باشند. حد آلودگی در این تست ۰/۱۳۵ بود. هر دوازده گیاه تلقیح شده و تست شده لاین یک و دو گیاهان تراریخت به ویروس مقاومت نشان دادند اما لاین سوم مثل گیاهان غیرتراریخت به ویروس آلوده شد. ب) نتیجه الکتروفورز محصول RT-PCR روی دو لاین تراریخت که در تست ELISA مقاومت نشان دادند. پایین با آغازگرهای اختصاصی 18SrRNA مربوط به توتون به اندازه تقریبا ۱۰۰۰ bp برای اطمینان از درستی cDNAها. بالا با آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس PVX به اندازه ۷۱۴ bp. M مارکر اندازه DNA، ۱ تا ۱۰ مربوط به ده گیاه لاین اول و ۱۱ تا ۱۴ مربوط به چهار گیاه لاین دوم تراریخت، ۱۵ تا ۲۰ مربوط به شش گیاه غیرتراریخت سیب‌زمینی، +C کنترل مثبت روی DNA وکتور pPVX و -C کنترل منفی فاقد cDNA.

Fig6. Resistance assay of potato transgenic plants to PVX by ELISA and RT-PCR.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

بیشتر کارهای مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به ویروسهای گیاهی که بر اساس پاتوژن طراحی شده بود و مقاومتهای کم و بیشی ایجاد کرده بود با کشف مکانیسم RNA Silencing از سال ۲۰۰۰ میلادی جهت‌دهی دقیق شد. تمام تلاش‌های انجام یافته تا آن زمان برای ساخت گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس، بخاطر متوقف شدن RNA silencing توسط پروتئین‌های ویروسی ممانعت کننده از RNA Silencing میزبان، بی ثمر بوده و انتظار مقاومت کامل در این گیاهان بیهوده است. چون با حمله ویروس سیستم دفاعی القا شده در گیاه، دیگر قادر به حفظ گیاه از آثار مخرب ویروس نیست. اما هدف قراردادن پروتئین‌های ویروسی ممانعت‌کننده ازRNA Silencing در ایجاد مقاومت می‌تواند موثرتر باشد. مهمترین برتری و تفاوت این تحقیق با کارهای مشابه قبلی هدف قراردادن و متوقف کردن بیان پروتئین P25 ویروس PVX در گیاه است. سازه سنجاق سری ایجاد شده در گیاه برای P25، میزبان را به تولید دائمی siRNAهای P25 وادار می‌کند تا به محض حمله ویروس RNAهای آن را از محل P25 مورد حمله قرار دهد. با این روش، دیگر ویروس قادر به خاموش کردن و از کار انداختن سیستم RNA Silencingدر میزبان نخواهد بود و توسط همین مکانیسم از بین خواهد رفت. در تحقیقی مشابه P25 ویروس PVX در توتون بیان شد و مقاومت خوبی به PVX، TMV و سایر توباموویروسها ایجاد کرد. در گیاهان توتون تراریخت دو ویروس مذکور هیچ علایمی نشان نداده و نتوانستند تکثیر شوند (Ares *et al.*, 1998).

برای خاموش کردن یک ژن در گیاه می‌توان از دو ابزار استفاده کرد که یکی قرار دادن بخشی از آن بصورت تکرار معکوس در سازه سنجاق‌سری است و دیگری هدف قرار دادن آن با یک microRNA مصنوعی و استفاده از سازه‌های آماده تولید کننده microRNA است. به عنوان مثال گزارش شده که با استفاده از miR159a ، miR171a و miR167b از گیاه *Arabidopsis thaliana*و طراحی دو نوع miRNA توانستند توالی‌هایmRNA ژن P25 ویروس PVX و ژن HCPro ویروس PVY را در گیاهان توتون تراریخت آلوده به این دو ویروس مورد هدف قرار دهند و بدین ترتیب مقاومت بسیار بالایی در برابر این دو ویروس در گیاهان هدف گزارش کردند (Ai *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگر با استفاده از قطعاتی از ویروس تریستزای مرکبات در گیاه توتون مقاومت به این ویروس بر مبنای RNA Silencing ایجاد شد (Roy *et al.*, 2006). به‌کمک همین فرایند گیاه مقاوم سیب زمینی شیرین در مقابل ویروسهای SPFMV, SPCSV, SPVG و SPMMV ایجاد شده است (Sivparsad & Gubba, 2014).

روش ایجاد مقاومت در این تحقیق مبتنی بر ساختن سازه سنجاق‌سری قطعه‌ای به طول ۴۰۰ باز از ژن P25 ویروس PVX بود. هرچه طول این قطعه بیشتر باشد امکان خاموش کردن ژن افزایش می‌یابد اما امکان غیر اختصاصی عمل کردن و هدف قراردادن ژنهای دیگر در گیاه نیز بیشتر می‌شود. در این خصوص از قطعه‌ای از P25 استفاده شد (Gene Bank: GQ863228.1) که هیچ شباهتی در ژنوم سیب زمینی و گیاهان دیگر نداشته باشد و بدین منظور هنگام انتخاب قطعه از طریق Blast در بانک‌های اطلاعاتی بررسی عمیق گردید. با توجه به اطلاعات موجود و طبیعی بودن مرفولوژی و فیزیولوژی گیاهان تراریخت حاصل، به نظر نمی‌رسد که ژنی از میزبان با این سازه سنجاق‌سری مورد هدف قرار گرفته باشد. بررسی‌های بیشتر مرفولوژیکی روی گیاهان تراریخت در گلخانه و مزرعه لازم است تا گیاهان مقاوم حاصل هم از لحاظ ریخت شناسی و هم میزان تولید محصول تایید شوند. در این مطالعه گیاهان تراریخت به صورت مکانیکی با ویروس PVX تلقیح شده و بعد از تکثیر و گسترش ویروس داخل گیاهان آزمایشات ELISA و RT-PCR روی آنها انجام شد که نتایج همدیگر را ثابت نمودند. نتایج PCR روی cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده از گیاهان، نشان می‌دهد که احتمالا قطعه ژن P25 در گیاهان تراریخت به صورت hairpin بیان شده و با RNA Silencing مانع از همانندسازی و تکثیر ویروس در این گیاهان شد. بررسی siRNA ها با نورترن بلات این احتمال را می‌تواند ثابت نماید. عدم وجود باند مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس در گیاهان تراریخت شاید این احتمال را بوجود آورد که سنتز cDNA و استخراج RNA در آنها به خوبی انجام نشده است اما انجام PCR برای یک ژن خانه‌دار در این نمونه‌ها و مشاهده باند مربوطه این احتمال را خنثی می‌کند. سنتز cDNA روی RNA گیاهان در این تحقیق دو بار انجام گرفت و نتایج

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

PCR تقریبا برای هر دو cDNA مطابق هم بود. بطور کلی ویروس در گیاهان غیرتراریخت همانندسازی کرده است اما قادر به همانندسازی در گیاهان تراریخت لاین اول و دوم نبوده است و مقاومت آنها با این تحقیق به ویروسPVX ثابت می‌شود. تولید گیاهان سیب‌زمینی با چنین روش تراریزش مبتنی بر تکنولوژی RNA Silencing از روشهای جدیدی است که در آن هیچ ژنی یا پروتئینی برای مقاومت بیان نمی‌شود و فقط ابزاری بصورت دائمی در گیاه ایجاد می‌شود که بتواند ویروس را خنثی نماید. از سوی دیگر بخاطر استفاده از پروموتور CaMV 35S برای بیان و تولید سازه سنجاق‌سری مربوطه، مقاومت بصورت دائمی در گیاه و در تمامی بافتهای آن ایجاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت مالی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و همکاری مرکز توالی یابی انستیتو IBMP استراسبورگ فرانسه جهت توالی‌یابی وکتور های نوترکیب. این مقاله نتیجه تحقیقات دو پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و بیماری شناسی گیاهی در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان می‌باشد.

منابع

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*, 13,304-16.

Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N. & Mentaberry, A. (1998). Transgenic Plants Expressing Potato Virus X ORF2 Protein (P24) Are Resistant to Tobacco Mosaic Virus and other Tobamoviruses. *Journal of Virology*, 72,731-738.

Bai, Y., Guo, Z., Wang, X., Bai, D. & Zhang, W. (2009). Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Progress in Natural Science*, 19,543-548.

Beemster, A.B.R. & de Bokx, J. A. (1987). Survey of properties and symptoms. In: de Bokx, J.A. and van der Want, J.P.H. (eds) Viruses of Potato and Seed Potato Production. eds Pudoc. Wageningen, Netherlands.

Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C. & 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*, 11,641-9.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162,156-9.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19,11-15.

Duan CG, Wang CH, & Guo HS. 2012. Application of RNA silencing to plant disease resistance. Silence. 3:5. doi:10.1186/1758-907X-3-5

Forootani, S., Jafarpour, B., Falahati Rastegar, M., & Beigzadeh, N. (2004). Identification of races 1 and 3 of PVX in Khorasan and Ardebil Provinces. *Proceedings of the 16th. Iranian Plant Protection Congress*,Vol. II. Plant Diseases. Tabriz University, Tabriz, Iran. p222 (in Farsi).

Kohm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A. & Baulcombe, D.C. (1993). A Potato Virus X Resistance Gene Mediates an Induced, Nonspecific Resistance in Protoplasts. *Plant Cell*, 5,913-920.

Longstaff. M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. & Baulcombe, D. (1993). Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO Journal*, 12,379-86.

Moissiard, G. & Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathology*, 5, 71-82.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15,473-497.

Pazhouhandeh, M. (2009). Virus and RNA Silencing. Lambert Academic Publishing (LAP), Germany.

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. *PNAS*, 103,1994-1999.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

Roy, G., Sudarshana, M.R., Ullman, D.E., Ding, S.W., Dandekar, A.M. & Falk, B.W. (2006). Chimeric cDNA Sequences from Citrus tristeza virus Confer RNA Silencing-Mediated Resistance in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plants. *Phytopathology*. 96,819-27.

Salazar, L.F. (1996). Potato Viruses and Their Control. International Potato Center. Peru. 214 pp.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sivparsad, B.J. & Gubba, A. (2014). Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA). *Transgenic Research*, 23,377-88.

Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M. & Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of Potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88,1643-55.

Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, 17, 449-459.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol5, Number1, Spring and summer 2016, Bi-seasonal

Production of Potato Resistant Plant to PVX using an RNA Silencing Mechanism

ShahlaSadat Fateri Rezvani, Maghsoud Pazhouhandeh*, Akbar Shirzad, and Sakineh Lotfi

Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@azaruniv.edu , pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Viruses are the main causes of potato yield loss. Potato X Potexvirus (PVX) is one of the most important potato viruses and the use of resistant varieties is the principal way to control it. In this study, we tried to produce potato plants resistant to this virus using an RNA silencing technique. To this end, a hairpin construct of P25 of PVX was made in pFGC5941 under control of the CaMV 35S promoter with two consecutive cloning steps. The P25 protein is a suppressor of RNA Silencing in viral host plants. The recombinant vector was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain. Leaf and internode pieces of potato (Agria variety) were transformed by Agrobacterium. Following induction of callus, shoot and root, regenerated transgenic plants were selected and micro-propagated. Molecular analysis by PCR on DNA of plants and by RT-PCR on their RNA confirmed the presence and the expression of the transgene. Transgenic plants were propagated and then inoculated mechanically by PVX in the greenhouse. ELISA results using PVX-coat protein antibody showed resistance of two transgenic lines to PVX. Molecular confirmation of these potato lines was performed using PVX coat protein primers by RT-PCR on plant RNAs. The results of this research have led to the production of two independent lines of potato that are resistant to PVX and future work will involve analysis of resistance in field conditions and the production of their mini-tuber.

Key Words

Potato, PVX, Resistance, Transgenic Plant, RNA Silencing

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.7.2]