

ناپایداری ساختارهای ساقه - حلقه در جلوگیری از بیان ژنهای مسئول مقاومت در برابر آلودگیهای ویروسی در توتونهای تراریخت

فرشاد رخشنده رو^{۱،۲*}، پیتر پالوکایتیس^۲ و مسعود شمس بخش^{۲،۳}

۱ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی

۲ اسکاتلند، اینورگوری، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی مرکز تحقیقات زراعی

۳ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

چکیده

بیان ساختارهای ساقه - حلقه در گیاهان تراریخت موجب تحریک چرخه خاموشی ژن با استفاده از مولکولهای dsRNA دارای مشابهت در توالی با mRNA موجود در گیاه می‌شود. در این پژوهش با استفاده از گیاهان توتون تراریخت (*N. tabacum* cv. Samsun, NN) که ژن *RDR1* (RNA-Directed-RNA Polymerase-1) آنها توسط ساختارهای ساقه-حلقه دارای مشابهت ژنتیکی با ژن *RDR1* با اندازه‌های متفاوتی خاموش شده بود میزان پایداری خاموشی ژن بررسی شد. به منظور بررسی پایداری خاموشی ژن، میزان حساسیت به آلودگی سیستمیک ویروس^o PVY (Potato virus Y strain o) و نیز میزان بیان ژن *RDR1* بررسی شد. توسط آزمون RT-PCR نیمه کمی (semi-quantitative RT-PCR) میزان بیان ژنهای دخیل در مقاومت گیاهان به آلودگیهای ویروسی شامل ژنهای *IVR*، *AOX1*، *ERF5* و نیز *RDR6* یک هفته پس از مایه زنی نسلهای دوم (T2) و سوم (T3) توتونهای تراریخت که ژن *RDR1* در آنها خاموش شده بود با ویروس^o PVY بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد نسل دوم توتونهای تراریخت نسبت به نسل بعدی از میزان بیان کمتر ژن *RDR1* و سایر ژنهای دخیل در مقاومت برخوردار می‌باشد. همچنین لاین‌های نسل دوم (T2) توتونهای تراریخت در مقایسه با نسل سوم (T3) از حساسیت بیشتر به ویروس^o PVY برخوردار بوده و میزان بیان ژن *RDR1* در نسل سوم معادل با توتون غیر تراریخت بود. نتایج نشان داد کارایی ساختار ساقه - حلقه در خاموشی ژن *RDR1* در نسل بعد کاهش یافته است. از آنجایی که ژن *RDR6* تحت تأثیر ژن *RDR1* بوده و برای انتقال پیام خاموشی در طول گیاه و افزایش مقاومت گیاهان به آلودگی ویروسی لازم می‌باشد، پیشنهاد می‌کنیم که سرکوب ژن *RDR1* در توتونهای تراریخت موجب جلوگیری از بیان ژن *RDR6* و در نهایت موجب کاهش انتقال عمودی ساختارهای ساقه - حلقه خاموش کننده به نسل بعد شده است.

واژه‌های کلیدی: خاموشی RNA، ساختمان ساقه - حلقه، *RDR1*، PVY^o

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۷۸۶۶۸۷، پست الکترونیکی: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

مقدمه

موجودات یوکاریوتیک و همچنین، هنگام مواجهه با قطعات نوکلئوتیدی خارجی ویروسها و ترانسپوزون‌ها، در جهت ایجاد مقاومت در سلولهای موجودات فعال می‌شود (۲) و (۳). این فرآیند بیوشیمیایی با حضور قطعات نوکلئوتیدی از

خاموشی RNA (RNA Silencing) پدیده ایست ژنتیکی که در طی آن تنظیم بیان ژنها از طریق توالی ویژه ای از RNA، غیر از mRNA، tRNA و یا rRNA، در سلول صورت می‌پذیرد (۱). خاموشی جهت تنظیم بیان ژنهای

هدف می‌شود (۸). از این طریق می‌توان قطعه‌ای به طول ۵۰ جفت باز یا بیشتر که از لحاظ ژنتیکی با ژن هدف مشابه باشد را جهت خاموش نمودن ژن مذکور در گیاهان مورد بررسی بیان نمود. هم‌اکنون محصولات تراریخته شده با استفاده از مکانیسم خاموشی RNA تولید شده و بصورت تجارتي تنها در استرالیا مورد استفاده قرار می‌گیرند و در آنها برای خاموش نمودن ژن هدف از ناقل‌های بیان‌کننده ساختارهای ژنتیکی ساقه-حلقه استفاده می‌شود (۱ و ۱۶). در این پژوهش برای بررسی عملکرد ژن *RDR1* در ایجاد مقاومت توتون به آلودگی ویروس Y سیب زمینی (*Potato virus Y (PVY)* از لاین‌های توتون سامسون تراریخته‌ای استفاده شد که با نسبت‌های متفاوتی در مقایسه با گیاه توتون غیر تراریخت mRNA ژن *RDR1* در آنها کاهش پیدا کرده بود. برای کاهش میزان mRNA ژن *RDR1* قسمتی از ژن مذکور با استفاده از ناقل RNAi بصورت ساختار ساقه و حلقه و بصورت dsRNA در سلول توتون‌های تراریخت بیان می‌شد که موجب فعال شدن فرآیند خاموشی ژن بر علیه ژن *RDR1* و هضم آنژیمی ژن مذکور در توتون‌های تراریخت می‌شد. لاین‌های مورد بررسی از این ویژگی برخوردار بودند که مربوط به نسل‌های مختلف دوم و سوم بودند. همچنین با مقایسه میزان مقاومت به آلودگی ویروسی در نسل‌های مختلف توتون‌های تراریخته، پایداری انتقال و حفظ ویژگی ساختارهای ساقه - حلقه خاموش‌کننده ژن *RDR1* در نسل‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیقی که به تازگی انجام پذیرفت نشان داد که ژن *RDR1* در افزایش دفاع فوق حساسیت در برابر آلودگی‌های ویروسی علاوه بر دفاع از طریق فرآیند خاموشی ژن نقش دارد (۱۳) و (۲۱). از این رو در این پژوهش از ویروس TMV که در توتون سامسون غیر تراریخت پاسخ فوق حساسیت را ایجاد می‌نمود استفاده شد تا علاوه بر بررسی تأثیر بیان ژن *RDR1* در تولید نسخه‌های mRNA مربوط به مهم‌ترین ژن‌های مقاومت درگیر در پاسخ فوق حساسیت در کنار

نوع RNA دو رشته‌ای (dsRNA) با توالی مشابه با قسمتی از ژنوم گیاه یا جانور میزبان صورت می‌پذیرد (۱). در نتیجه برش این توالی‌های مهاجم با آنزیم ریونوکلئاز نوع ۳ با نام (Dicer like) قطعات کوچک RNA به طول ۲۴-۲۱ نوکلئوتید ایجاد می‌شود و از این طریق یک دفاع ژنتیکی طبیعی علیه توالی‌های پارازیت مهاجم در سلول حاصل می‌شود (۲ و ۳). خاموشی RNA می‌تواند در هسته یا در سیتوپلاسم سلول اتفاق بیافتد. در حالت دوم آن را خاموشی ژن پس از نسخه برداری [Post transcriptional Gene Silencing (PTGS)] می‌نامند (۱). آنزیم‌های مختلفی از جمله RNA پلیمراز وابسته به [RNA Directed RNA polymerase (RDRs)] در این مسیر شرکت می‌کنند. این آنزیم با تکثیر RNA های تک رشته‌ای و تبدیل آن به فرم دو رشته‌ای (dsRNA)، در تکثیر سیگنال هدف و فعالیت بیشتر اجزای خاموشی RNA نقش بسیار مهمی را عهده دار می‌باشد (۲۷). تا کنون ۶ نوع آنزیم RDR در سلول‌های گونه‌های مختلف گیاه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis sp.*) شناخته شده است که نوع اول آن با نام مخفف *RDR1*، آنژیمی کلیدی در فرآیند PTGS بوده و در ایجاد مقاومت پایه (Basal-defense) در یوکاریوت‌ها، در برابر آلودگی‌های پاتوژنیک نقش دارد (۹). واترهوس (Waterhouse) و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند هرگاه ردیف‌های نوکلئوتیدی دارای مشابهت با توالی ژنتیکی هدف در ساقه ساختار ساقه - حلقه در سلول گیاهان به فرم RNA دولا بیان شوند این توالی‌ها می‌توانند موجب خاموشی ژن هدف در گیاه شوند (۲۸). بر این مبنای محققین تا کنون دستورالعمل‌های متفاوتی را برای ساخت ناقل‌های استاندارد خاموشی ژن ارائه کرده‌اند که ناقل pHANNIBAL از جمله آنهاست (۱۰ و ۲۰). ویژگی این ناقلها آن است که توالی ژن مورد بررسی که باید خاموش شود را بصورت توالی تکراری معکوس به فرم RNA دولا در سیستم تراریخته بیان می‌نماید. توالی سنتز شده RNA دو لا (dsRNA) در ساقه موجب خاموش شدن کامل ژن

Kerschen و همکاران وارد شدند (۸). ناقل دوتایی از pFGC5941 (GenBank Accession No. AY310901) ۱۱۴۰۶ جفت باز تشکیل شده و دارای ایترون ژن سنتز کالکون A (ChsA) و دو جایگاه ورود برای وارد کردن توالیهای مکمل معکوس از ژن مورد بررسی بود (شکل ۱). از ناقل ذکر شده برای تولید قطعه های dsRNA به فرم ساقه و حلقه از ژن *RDR1* به منظور کاهش میزان بیان آن در توتونهای تراریخت استفاده شد (جدول ۲). برای تراریختی گیاهان توتون *Nicotiana tabacum* cv Samsun, NN از باکتری آگروباکتریوم (LBA4404) *Agrobacterium tumefaciens* دارای ناقل دوتایی حاوی توالی مکمل معکوس از ژن *RDR1* توتون استفاده شد. باکتری آگروباکتریوم با استفاده از روش تزریق زیر پوستی Clough و Bent به گیاهان توتون تزریق شد (۶). انتظار می رفت که به دلیل حضور تعداد نسخه های زیاد از ساختارهای ساقه-حلقه خاموش کننده ژن *RDR1* در لاین های R-5-1 و R-5-1-1 بیان ژن *RDR1* در آنها نسبت به گیاه غیر تراریخت بسیار کمتر باشد. لاین های R-14-1 و R-14-1-1 تعداد نسخه های خاموش کننده ژن *RDR1* کمتری را نسبت به لاین های R-5-1 و R-5-1-1 دریافت کرده بودند. به منظور تهیه cDNA از توالی *RDR1* توتون Xanthai از جفت آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر دو ناحیه از ژن *RDR1* استفاده شد (جدول ۱).

آزمونهای ارزیابی حساسیت توتونهای تراریخت به آلودگی ویروسی: جهت بررسی میزان حساسیت در لاین های تراریخت توتون، بیانهای ژنهای دخیل در مقاومت شامل *RDR1*، *ERF5*، *AOX1*، *IVR* و نیز ژن مربوط به پروتئین پوششی ویروس PVY از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد (جدول ۳). آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo6 (Molecular biology, Insights, Inc, U.S.A) طراحی شدند. بررسی میزان بیان ژنها حضور نسخه های mRNA برای هر ژن با استفاده از آزمون RT-

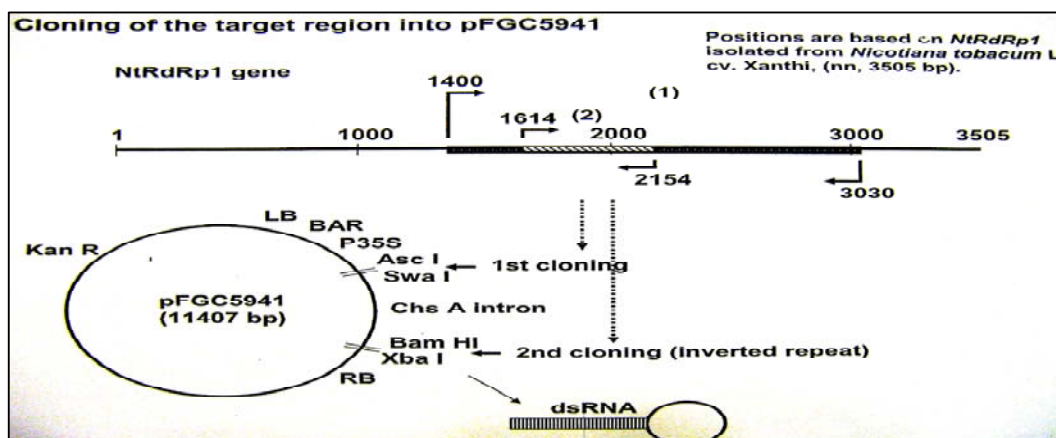
ژنهای مسئول فرآیند خاموشی ژن امکان پایداری تأثیر احتمالی آن در نسلهای مختلف در توتونهای تراریخت نیز بررسی شود.

مواد و روشها

منابع گیاهی و ویروسی و روش آلوده سازی: در این پژوهش از کلنهای بیماریزا (Infectious clone) نژاد O ویروس Y سیب زمینی (*Potato virus Y strain O (PVY^O)*) برای مایه زنی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از کلنهای بیماریزا استرین U1 ویروس موزاییک توتون (*Tobacco mosaic virus (TMV)*) که در توتون Samsun, NN (*N. tabacum* cv. NN) ایجاد لکه موضعی و پاسخ فوق حساسیت می نمود نیز برای ارزیابی و مقایسه میزان بیان ژنها استفاده شد. عوامل ویروسی مذکور توسط بخش ویروس شناسی گیاهی مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (SCRI) در اختیار این تحقیق قرار گرفت. مایه زنی مکانیکی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH= 7.5 انجام شد. برای این منظور به میزان ۰/۵ گرم بافت پهنک برگ در ۴ میلی لیتر از بافر مخصوص مایه زنی در هاون چینی سرد، خرد و یکنواخت شد. مایه زنی در مرحله ۴ برگی توتونهای تراریخت و غیر تراریخت سامسون انجام شد. نمونه برداریها از برگهای فوقانی و یک هفته پس از مایه زنی، صورت پذیرفت. در این تحقیق از لاین های متفاوت توتون *N. tabacum* cv Samsun, NN دارای ژن مقاومت N استفاده شد. برای بررسی نقش ژن *RDR1* در مقاومت در برابر ویروس Y سیب زمینی از ۴ رقم مختلف توتون سامسون *N. tabacum* cv Samsun, NN استفاده شد (جدول ۲).

چگونگی تهیه کاستهای ژنی: در این بررسی از همسانه های ژن *RDR1* توتون *N. tabacum* cv Xanthi nn به اندازه های ۱۶۳۰ و ۵۴۲ جفت باز استفاده شد (جدول ۱). همسانه های مذکور در ناقل دوتایی (Binary vector) ، pFGC5941(Chrom DB. U.S.A) مطابق روش

PCR نیمه کمی مطابق روش مارون و همکاران در ۳ تکرار (۱۲).
و در هر تکرار با ۳ تکرار برای هر نمونه گیاهی انجام شد



شکل ۱- ساختار ناقل RNAi (pFGC5941) و روش تغییر ساختار ناقل برای بیان قسمتی از ژن *RDR1* توتون *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nn. مشخصات ژن *RDR1* توتون *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nn و کاست ژنی مورد استفاده برای ایجاد خاموشی ژن *RDR1* در سلول لاین‌های تراریخت *Nicotiana tabacum* cv Samsun, NN در شکل مشخص شده است. در جایگاه‌های تکثیر (1) توالی به طول ۱۶۳۰ جفت باز در حدفاصل بین توالی ۱۴۰۰ و (۲) توالی به طول ۵۴۰ جفت باز در حدفاصل بین توالی‌های ۲۱۵۵-۱۶۱۴ از ژن *RDR1* در ناقل وارد شدند.

جدول ۱- مشخصات آغازگرها و جایگاه‌های برشی برای همسانه سازی قطعات مربوط به ژن *RDR1* (a) باندازه ۱۶۳۱ جفت باز در حدفاصل بین نوکلئوتیدهای ۳۰۳ و ۱۴۰۰ (b) باندازه ۵۴۲ جفت باز در حدفاصل بین نوکلئوتیدهای ۲۱۵۴ و ۱۶۱۴ از طول ژن که برای تکثیر در درون ناقل pFGC5941 مورد استفاده قرار گرفت. مکان برش توسط آنزیم در پایین هر توالی آغازگر مشخص شده است.

نام لاین‌های مورد ارزیابی	R-5-1-1	R-14-1-1	R-5-1	R-14-1
ویژگی لاین‌های مورد ارزیابی	نسل سوم	نسل سوم	نسل دوم	نسل دوم
تعداد نسخه‌های ساختار ساقه و حلقه وارد شده در لاین توتون مورد ارزیابی	۳۰ تا ۵۰ نسخه خاموش کننده ژن	۲ تا ۵ نسخه خاموش کننده ژن <i>RDR1</i>	۳۰ تا ۵۰ نسخه خاموش کننده ژن	۲ تا ۵ نسخه خاموش کننده ژن <i>RDR1</i>

جدول ۲- خصوصیات لاین‌های توتون مورد ارزیابی. در این تحقیق از لاین‌های متفاوت توتون *Nicotiana tabacum* cv Samsun, NN استفاده شد که بیان ژن *RDR1* در آنها توسط سازه‌های ژنی دارای توالی ژنی مشابه با فرم ساقه - حلقه، با درجات مختلف کاهش یافته بود. برخی از لاین‌ها مربوط به نسل دوم و برخی دیگر متعلق به نسل سوم بودند.

اندازه تولیدات (bp)	توالی آغازگر	جهت توسعه آغازگر	نام ژن
1631	5'-AAAGAATTCGCATCAAGACCTGGCCTTAC-3' <i>Eco</i> RI	Sense	RDR1-1 ^a
	5'-AAAAGCGGCCCACTAAGTATTTTCAGCCTCAG-3' <i>Not</i> I	Antisense	RDR1-2 ^a
542	5'-AAATCTAGAGGCGCGCCAAATATCTGCTGACTTTG-3' <i>Xba</i> I	Sense	RDR1-3 ^b
	5'-AAAAGGATCCATTTAAATCTGGATTCATCCAAGCAT-3' <i>Bam</i> HI	Antisense	RDR1-4 ^b

۳۵ و ۴۰ چرخه تکثیر شدند. همچنین از ژنهای *Tubulin* -*Myb* و *B* به عنوان کنترل داخلی و برای نرمال سازی بیان ژنها برای این آزمون استفاده شد.

آزمون Si-Blotting (Small RNA Blotting) (interfering RNA -Blotting) روش تغییر یافته Northern Blot است و از آن برای ردیابی قطعات RNA با اندازه های کوچک کمتر از ۳۰ نوکلئوتید مطابق روش کانتو و همکاران استفاده شد (۵). تکنیک مذکور مطابق روش ونی تارانی و همکاران انجام پذیرفت (۲۶). برای انجام این آزمون ابتدا RNA تام از برگ توتونهای مورد ارزیابی استخراج شد. ابتدا میزان ۳ گرم از بافت برگ در ۴ میلی لیتر بافر کلرید لیتیم (۰/۱ مولار LiCl، ۰/۱ مولار Tris-HCl با اسیدیته ۸، ۰/۱ مولار EDTA با اسیدیته ۸، ۱ درصد SDS، ۵ درصد ماده PVP-24000 و ۲ درصد Na_2SO_3) و ۴ میلی لیتر مخلوط فنل-کلروفرم-ایزو آمیل الکل به نسبت (۲۵-۲۴-۱) به طور کامل ادغام شد. مخلوط واکنش در دمای اتاق برای مدت ۱ ساعت با چرخش ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. روئشین به دست آمده با ۴/۵ میلی لیتر لیتیم کلراید ۴ مولار و ۵۰۰ ماکرولیتر استات پتاسیم ۳ مولار با اسیدیته ۸ ترکیب شد و برای مدت ۳ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس مخلوط واکنش در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ دقیقه با چرخش ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با اتانل ۷۰ درصد شستسو داده شد و در ۵۰۰ ماکرولیتر آب مقطر استریل دوبار تقطیر شده حل شد. RNA کل استخراج شده روی ژل پلی آکریل آماید ۲۰ درصد در بافر TBE با ولتاژ ۲۸۰ میلی آمپر الکتروفورز شد. ژلها در محلول اتیدیم بروماید جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده رنگ آمیزی شدند. RNA موجود در ژل پلی آکریل آماید توسط دستگاه Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-۱۰۰ Rad, U.S.A) پس از یک ساعت با شدت جریان ۱۰۰ ولت به غشاهای نیتروسولوزی انتقال پیدا کرد. غشاء پس از

RNA کل بافت توتونهای تراریخت و غیر تراریخت در حالت سالم و یا یک هفته پس از مایه زنی با ویروس PVY^o و همزمان با بروز علائم موزاییک سیستمیک از برگها استخراج شد. برای این منظور از ستونهای کوچک استخراج RNA RNeasy Plant Mini (Qiagen, USA) kit استفاده شد. غلظت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجش شد. با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) و آغازگر Oligo dT مطابق دستورالعمل شرکت (Promega, Wisconsin, USA) برای ساخت cDNA تک رشته ای اقدام شد. به این ترتیب که به ازای ۱۰ نانوگرم از RNA استخراج شده از ۵۰ پیکومول Oligo dT استفاده شد و با آب DEPC حجم محلول واکنش به ۷ میکرولیتر رسید. محلول ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از زمان مذکور محلول به سرعت بر روی یخ سرد شد. سپس محلول زیر (1mM dNTP، 4 μl بافر (5X)، 10 μM) dTT، (IU) آنزیم (RT) نوع M-MuLV، تهیه شد و حجم نهایی با آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسید. محلول فوق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و ۱۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ساخت cDNA تک رشته ای، از آن به عنوان الگو برای ساخت cDNA دو رشته ای و تکثیر آنها توسط PCR استفاده شد. آزمون RT-PCR نیمه کمی با حضور ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده در حجم ۲۴ میکرولیتر از واکنشگرها شامل (۲ میلی مولار MgCl_2 ، ۰/۴ میلی مولار 4dNTP-Mix، ۰/۶ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase* (۲۰۰ واحد در میکرولیتر)، ۰/۴ میکرومولار از آغازگرها، ۵ میکرولیتر PCR Buffer (10X) و تا حجم ۲۴ میکرولیتر آب مقطر استریل) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. نمونه ها با واکنش حرارتی (۲ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد) برای ۲۵، ۳۰،

RDR1 در لاین‌های تراریخت متعلق به نسل دوم در مقایسه با شاهد تیپ وحشی غیر تراریخت کاهش پیدا کرده است (شکل‌های ۲ و ۳).

بیشترین میزان کاهش mRNA ژن *RDR1* در لاین R-5-1 با تعداد زیاد ساختارهای ساقه-حلقه خاموش کننده مشاهده شد (شکل ۲). کاهش میزان mRNA ژن *RDR1* در لاین‌های توتون تراریخت R-5-1 و R-14-1 سالم و آلوده به ویروس PVY^o مشاهده شد. با این وجود میزان بیان ژن مذکور تا یک هفته پس از مایه زنی توتونهای تراریخت و غیر تراریخت در مقایسه با توتونهای مایه زنی نشده افزایش نشان داد (شکل ۲). بیشترین میزان افزایش mRNA ژن *RDR1* در توتون غیر تراریخت تیپ وحشی تا ۳ روز پس از مایه زنی با ویروس TMV و همزمان با بروز پاسخ فوق حساسیت مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳). همچنین ارزیابی میزان بیان ژن *RDR1* در توتون غیر تراریخت در حالت سالم و یک هفته بعد از مایه زنی با ویروس PVY^o و یا ۳ روز بعد از مایه زنی با ویروس TMV نشان داد ویروس TMV در مقایسه با PVY^o از توان بیشتری در افزایش بیان ژن *RDR1* برخوردار بوده است (شکل ۳). اگرچه در توتون غیر تراریخت در مقایسه با لاین‌های تراریخت تا یک هفته پس از مایه زنی با ویروس PVY^o میزان نسخه‌های mRNA بیشتری از ژن *RDR1* در سلول تجمع پیدا نمود (شکل ۲) با این وجود نتایج فوق برای لاین‌های توتون تراریخت R-5-1-1 و R-14-1-1 که متعلق به نسل سوم بودند مانند نتایج مشاهده شده برای نسل دوم نبود و بر خلاف نسل دوم، میزان mRNA ژن *RDR1* در نسل سوم افزایش نشان داد (شکل ۳). همچنین نتایج آزمون Sq-RT-PCR نشان داد بیشترین میزان تجمع پروتئین پوششی ویروس PVY^o در لاین تراریخت (R-5-1) با میزان کم mRNA ژن *RDR1* صورت پذیرفته است (شکل ۴). در این آزمون میزان بیان ژن پروتئین پوششی ویروس (PVY^o) در چرخه‌های ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ آزمون RT-PCR مورد

بلوکه شدن در محلول بلوکه کننده شامل (IX Roche Blocking Reagent, 0.15M NaCl, 0.1 M Maleic acid) با کاوشگر اختصاصی برای قطعات RNA ژن *RDR1* ردیابی شد. برای این منظور از کاوشگر غیر رادیواکتیو Dioxygenin-Labeled (Roche, Germany) استفاده شد. اتصال کاوشگر به RNA برای مدت یک شب در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد و ردیابی تولیدات توسط Anti-dioxygenin در سوبسترای (CSPD) (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan-4-yl] phenylphosphate) انجام پذیرفت. برای تهیه کاوشگر از ناقل بیان کننده ژن (pLF103) استفاده شد. ناقل مذکور حاوی توالی ژن *RDR1* توتون Xanthi بود و پس از رونویسی توسط دو پرموتر T3 و T7 تولید پروب Sense RNA برای انجام نوردن بلات می نمود. برای تهیه کاوشگر از توالی cDNA به طول ۵۴۰ جفت باز از ژن *RDR1* توتون Xanthi در حد فاصل بین توالیهای ۲۱۵۴-۱۶۱۴ استفاده شد (شکل ۱). در نهایت لاین‌هایی که برای ژن *RDR1* خاموش شده بودند باند پر رنگی را باندازه ۲۴-۲۱ نوکلئوتید نشان دادند. شدت باندها بیانگر میزان خاموش شدن و هضم آنزیمی ژن *RDR1* و تبدیل آن به قطعه‌های کوچک RNA در لاین‌ها بود.

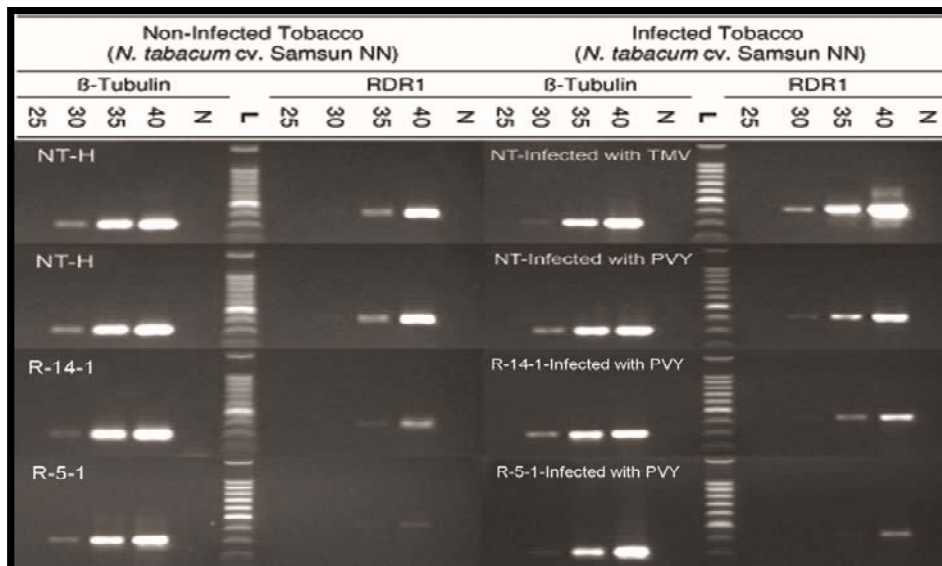
نتایج

ارزیابی عملکرد کاست های ژنی در توتونهای تراریخت: ارزیابی میزان بیان ژن *RDR1* در حالت سالم و یک هفته بعد از مایه زنی با ویروس PVY در توتونهای غیر تراریخت و نسل‌های دوم و سوم توتونهای تراریخت (اشکال ۲ و ۳) با استفاده از RT-PCR نیمه کمی با ۲۵ تا ۴۰ چرخه PCR انجام پذیرفت. میزان بیان ژن *RDR1* در مقایسه با میزان بیان ژن کنترل داخلی β -Tubulin، ارزیابی شد. اندازه تولیدات حاصل از تکثیر ژنهای *RDR1* و β -Tubulin بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مطابق با اندازه‌های اشاره شده در (جدول ۳) برای هر ژن بود. نتایج آزمون Semi-quantitative-RT-PCR نشان داد میزان mRNA ژن

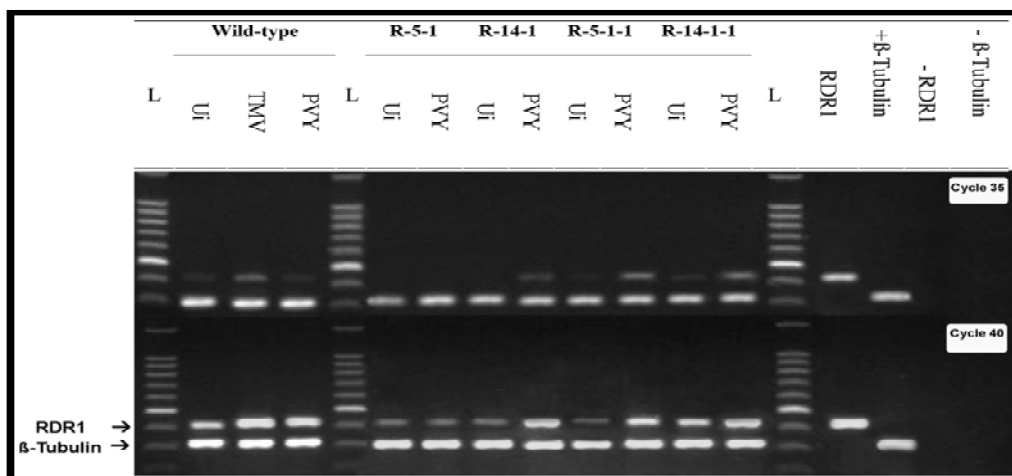
وحشی غیر تراریخت بیشتر حمایت نمودند که این امر بیانگر افزایش حساسیت به آلودگی ویروسی در اثر کاهش حضور ژن *RDR1* در لاین‌های تراریخت می‌باشد (شکل ۴). نتایج همچنین حاکی از آن بود که میزان توان تهاجمی ویروس *PVY^o* در لاین‌های تراریخت R-5-1 و R-14-1-1 mRNA 1-1 متعلق به نسل سوم همزمان با افزایش میزان ژن *RDR1* افزایش پیدا کرده است (شکل ۴).

جدول ۳- مشخصات آغازگرها جهت تکثیر ژنهای مقاومت در توتونهای تراریخت و غیر تراریخت. قطعه‌های حاصل از تکثیر ژنها مربوط به چرخه‌های مختلف آزمون PCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد تفکیک شدند. برای هر ژن از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده شده و تمام آزمونها با ۴ تکرار انجام شدند. برای کنترل منفی از مخلوط واکنش بدون الگو (cDNA) استفاده شد. برای کنترل مثبت از ناقل pTZ57 R/T (Fermentaz, Germany) دارای هر یک از ژن اشاره شده در جدول زیر استفاده شد.

نام ژن	جهت توسعه آغازگر	توالی	اندازه تولیدات
RDR1	Foreward Primer	CAGGCTAGCTCCATCGCGAC	430bp
	Reverse Primer	CATACTAGTGGTCATAAACACA	
IVR	Foreward Primer	ATCGTTAACAATCGACCTGAAGCTGCT	581bp
	Reverse Primer	ATGGGATCCTCATAAAAAGCTCAGCCTCT	
ERF ₅	Foreward Primer	ATGTCAAGTAACTCAAGCCCA	780bp
	Reverse Primer	TCAGTCCCTTCGACACGAATG	
AOX1	Foreward Primer	GATGACACGTGGAGCGACAAGG	620bp
	Reverse Primer	CCACTCTGTTCGAATCGCCTAAG	
β-tubulin	Foreward Primer	CTTGCAATGGTACACAGG	300bp
	Reverse Primer	CACTCTCCAGCATTTCATCC	
RDR6	Foreward Primer	TCCATGCCGAAGTACAGTGCT	350bp
	Reverse Primer	TCCATGCCGAAGTACAGTGCT	
Myb	Foreward Primer	CATTCCCAAAGTACCAAGAAG	330bp
	Reverse Primer	GGACTGGTGGTACCTGTGC	
Potato virus Y Coat Protein	Foreward Primer	ATGCCAACTGTGATGAAT	200bp
	Reverse Primer	ACTCGGCCCGAAGGTGACGCATTCT	

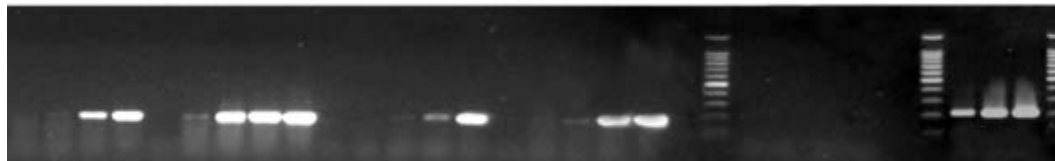


شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن *RDR1* لاین‌های توتون تراریخت *R-5-1* و *R-14-1* و توتون غیر تراریخت در ژل آگاروز ۲/۵ درصد (L) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Promega, USA). اعداد به ترتیب بیانگر چرخه ای از واکنش PCR می باشد که محصول تکثیر جمع آوری شده است. NT-H: توتون غیر تراریخت مایه زنی نشده. NT-PVY: توتون غیر تراریخت مایه زنی شده با ویروس PVY. R-14-1: توتون غیر تراریخت مایه زنی شده با ویروس PVY. R-5-1: توتون غیر تراریخت مایه زنی شده با ویروس PVY. NT-TMV: توتون غیر تراریخت مایه زنی شده با ویروس TMV. N: کنترل منفی (به جای DNA از آب در مخلوط واکنش PCR استفاده شد).



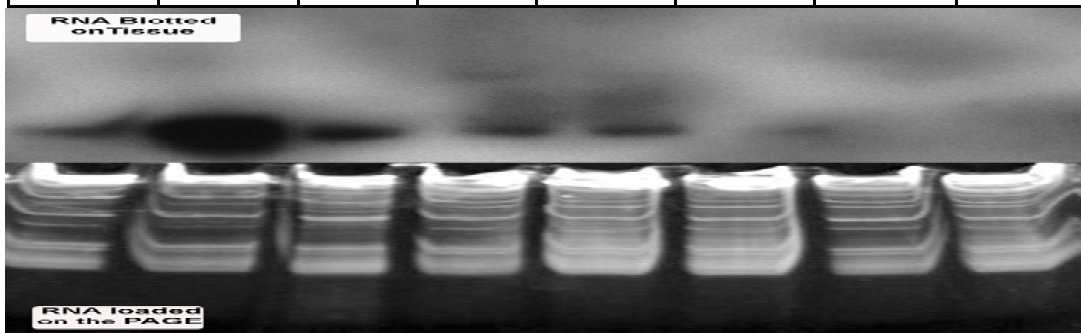
شکل ۳- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن *RDR1* در لاین‌های توتون تراریخت *R-5-1*، *R-14-1-1*، *R-5-1-1* و توتون غیر تراریخت. (L) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Promega, USA). U: نمونه سالم. PVY: نمونه‌های توتون غیر تراریخت و تراریخت مایه زنی شده با ویروس TMV. PVY: نمونه‌های توتون غیر تراریخت و تراریخت مایه زنی شده با ویروس TMV. +β-Tubulin: شاهد مثبت برای ژن مورد بررسی. -β-Tubulin: شاهد منفی برای ژن مورد بررسی. RDR1+ شاهد مثبت برای ژن مورد بررسی. RDR1- شاهد منفی برای ژن مورد بررسی.

R-14-1					R-5-1					R-14-1-1					R-5-1-1					NTRH					NTRI									
2	3	3	4	N	2	3	3	4	N	2	3	3	4	N	2	3	3	4	N	2	3	3	4	N	L	3	3	4	L					
5	0	5	0		5	0	5	0		5	0	5	0		5	0	5	0		5	0	5	0											

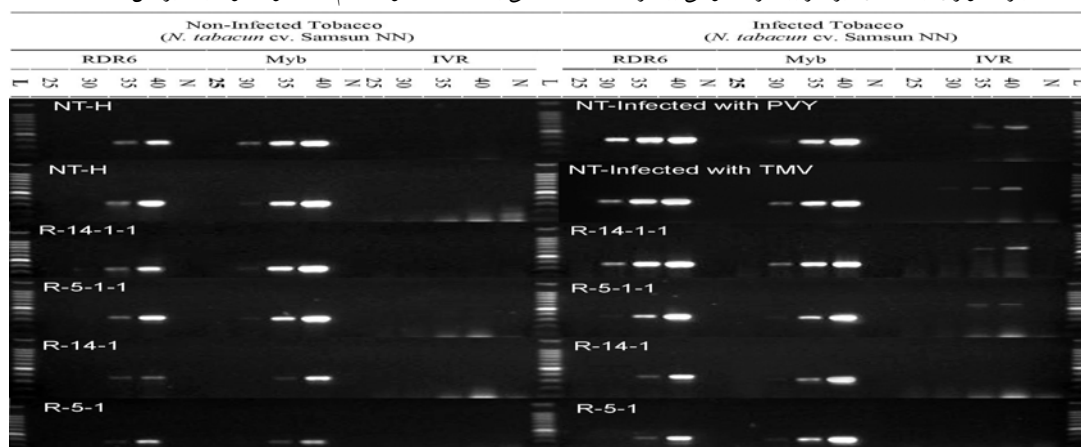


شکل ۴- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس *Potato virus Y* (PVY^o) در لاین های توتون تراریخت R-14-1، R-5-1، R-14-1-1، R-5-1-1 و توتون غیر تراریخت. L: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Promega, USA). N: کنترل منفی (از آب به جای DNA الگو در نمونه کنترل منفی استفاده شد). NTRH: نمونه مربوط به گیاه توتون غیر تراریخت سالم. NTRI: نمونه مربوط به گیاه غیر تراریخت آلوده به ویروس PVY^o.

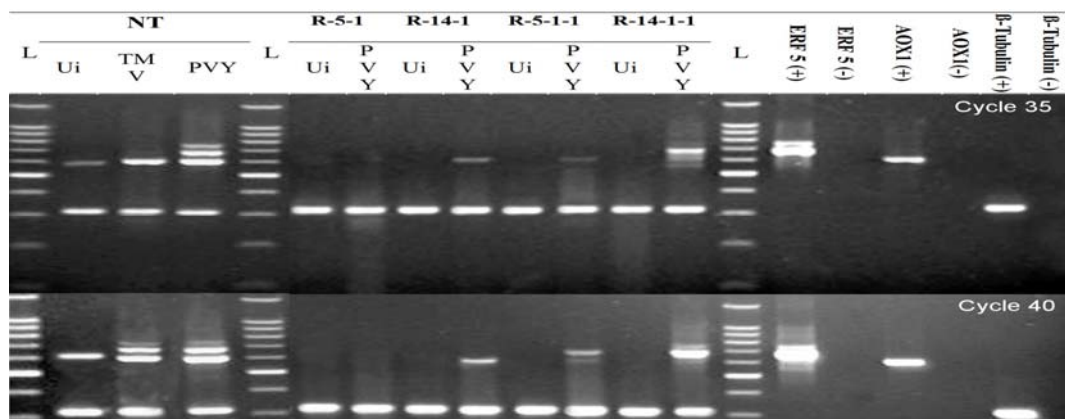
R-5-1 (Ui)	R-5-1 (I)	R-14-1 (Ui)	R-14-1 (I)	R-5-1-1 (Ui)	R-5-1-1 (I)	R-14-1-1 (Ui)	R-14-1-1 (I)
------------	-----------	-------------	------------	--------------	-------------	---------------	--------------



شکل ۵- الگوی باندهای قطعات ۲۴-۲۱ نوکلئوتیدی RNA نمونه های مختلف توتون پس از لکه گذاری و آشکارسازی توسط کاوشگر بر روی غشاء نیتروسلولوزی. باندهای تیره تر بیانگر خاموشی بیشتر ژن *RDR1* می باشد. Ui: نمونه سالم. I: نمونه آلوده به ویروس PVY.



شکل ۶- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژنهای *RDR6* و *IVR* در لاین های توتون تراریخت R-14-1، R-5-1، R-14-1، R-5-1-1، R-14-1-1 و توتون غیر تراریخت. L: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Promega, USA). N: کنترل منفی (از آب به جای DNA الگو در نمونه کنترل منفی استفاده شد). NT-H: نمونه مربوط به گیاه توتون غیر تراریخت سالم. NT-PVY: نمونه مربوط به گیاه غیر تراریخت آلوده به ویروس PVY^o. اعداد به ترتیب بیانگر چرخه ای از واکنش PCR می باشد که محصول تکثیر جمع آوری شده است.



شکل ۷- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژنهای *ERF5* و *AOX1* در لاین‌های توتون تراریخت **R-14-1-1**، **R-5-1**، **R-14-1**، **R-5-1-1**، و توتون غیر تراریخت. (L) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Promega, USA). Uv: نمونه سالم تلقیح نشده. PVY: نمونه آلوده و مایه زنی شده با ویروس PVY، یک هفته پس از مایه زنی. + β -Tubulin: شاهد مثبت برای ژن مورد بررسی. - β -Tubulin: شاهد منفی برای ژن مورد نظر. $ERF5+$: شاهد مثبت برای ژن مورد نظر. $ERF5-$: شاهد منفی برای ژن مورد نظر. $AOX1+$: شاهد مثبت برای ژن مورد نظر. $AOX1-$: شاهد منفی برای ژن مورد نظر. NT: توتون تیپ وحشی غیر تراریخت.

ارزیابی حساسیت توتونهای تراریخت به آلودگی ویروسی: بررسی نتایج کمی سنجی نسبی میزان رونوشت‌های mRNA مربوط به ژنهای دخیل در مقاومت پایه گیاهان به آلودگیهای ویروسی شامل *AOX1*، *IVR*، *RDR6* و *ERF5* در این پژوهش نشان داد که ژنهای مذکور به میزان زیادی در پاسخ فوق حساسیت تا ۳ روز پس از مایه زنی ویروس TMV در توتون سامسون غیر تراریخت دارای ژن مقاومت N بیان می‌شوند (شکل‌های ۶ و ۷). همچنین افزایش بیان ژنهای مذکور تا یک هفته بعد از مایه کوبی با ویروس^۰ PVY در لاین‌های توتون غیر تراریخت مورد آزمون نیز مشاهده شد. با این وجود بیان ژنهای دخیل در مقاومت بعد از مایه کوبی با ویروس TMV در توتونهای غیر تراریخت بیشتر از ویروس^۰ PVY افزایش پیدا کرد. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش حساسیت به آلودگی ویروسی^۰ PVY در لاین‌های توتون تراریخت دارای تعداد نسخه‌های کم ژن *RDR1*، میزان بیان ژنهای مقاومت در آنها نیز کاهش می‌یابد (شکل‌های ۶ و ۷). میزان نسخه‌های mRNA مربوط به ژنهای *RDR6* و *IVR* در حالت سالم و یک هفته بعد از مایه زنی با ویروس^۰ PVY در توتونهای تراریخت و غیر تراریخت و یا

نتایج آزمون si-Blotting نشان داد توتونهای تراریخت دارای قطعه‌های کوچک siRNA به اندازه ۲۴ تا ۲۲ نوکلئوتید می‌باشند (شکل ۵). به این معنی که در آنها خاموشی ژن اتفاق افتاده است. همچنین مشخص شد که نسل دوم لاین‌های تراریخت R-5-1 و R-14-1 به میزان بیشتری نسبت به نسل‌های بعدی آنها یعنی R-5-1-1 و R-14-1-1 خاموش شده‌اند (شکل ۵). همچنین نتایج این آزمون نشان داد لاین‌هایی که تعداد ساختارهای ساقه و حلقه خاموش‌کننده ژن *RDR1* بیشتری را دریافت داشته‌اند مانند R-5-1 و R-5-1-1، باند مربوط به قطعات بسیار کوچک RNA (siRNA) برای آنها پررنگ‌تر از لاین‌هایی می‌باشد که تعداد نسخه‌های ژنی خاموش‌کننده کمتری را دریافت داشته‌اند (R-14-1 و R-14-1-1) (شکل ۵). مقایسه الگوی باندهای نمونه آلوده به ویروس هر لاین با نمونه عاری از ویروس همان نمونه نشان داد که میزان siRNA بیشتری در تمام لاین‌ها پس از آلودگی به ویروس PVY در مقایسه با شاهد تولید می‌شود. همچنین در این آزمون از توتونهای غیر تراریخت نیز به عنوان شاهد استفاده شد. نمونه توتون غیر تراریخت هیچگونه باندهای نشان‌ندادند (شکل ۵).

کم نسخه‌های mRNA از ژن *RDR1* در مقایسه با توتون غیر تراریخت از حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی ویروس *PVY⁰* برخوردار بودند و توان تهاجمی ویروس مذکور در نسل سوم نسبت به دوم کاهش پیدا کرده بود (شکل‌های ۲ و ۴). به طوری که توتون لاین R-5-1 که دارای نسخه‌های بسیار کم mRNA از ژن *RDR1* در سلولها بود میزان بیشتری از پروتئین پوششی ویروس *PVY⁰* را در مقایسه با توتونهای غیر تراریخت در خود تکثیر نمود (شکل ۴). این نتایج نشان می‌دهد که حضور بیشتر نسخه‌های mRNA از ژن *RDR1* در سیتوپلاسم سلول احتمالاً می‌تواند موجب کنترل بیشتر آلودگی سیستمیک ویروس *PVY⁰* در توتون (N. *tabaccum cv Samsun*) شود. در گذشته نیز نقش ژنهای *RDR1* و *RDR6* در دفاع پایه و ذاتی گیاهان بر علیه عوامل ویروسی ثابت شده بود (۲۱ و ۲۲ و ۲۳). با وجود بررسی نقش ژن *RDR1* در افزایش توان مقاومت گیاهان توتون و آراییدوپسیس نسبت به آلودگیهای ویروسی در گذشته (۲۴، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲) تا کنون گزارشی از نقش ژن *RDR1* در مقاومت بر علیه آلودگی سیستمیک ویروس *PVY⁰* وجود ندارد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که بیان ژنهای مسئول ایجاد مقاومت در برابر آلودگیهای ویروسی مانند *AOXI*، *ERF5* و *IVR* به موازات کاهش بیان ژن *RDR1* و افزایش حساسیت در توتونهای تراریخته کاهش پیدا می‌کند (شکل ۶). کاهش فاکتورهای مقاومت در لاین‌های تراریخته می‌تواند به دلیل نقش تنظیمی مثبت آنزیم RDR-1 در بیان آنها باشد (۲۱). بنابراین این احتمال وجود دارد که نقش ژن *RDR1* در دفاع پایه میزبان در برابر آلودگیهای پاتوژنیک تنها از طریق کمک به فرآیند خاموشی ژن نبوده و این آنزیم موجب تشدید سیگنال و انتقال مولکولهای پیامبر درون سلولی و عوامل دفاعی در میزبان گردد (۲۱ و ۲۲). به تازگی چنین نقشی برای دفاع توتون در برابر حمله حشرات به اثبات رسیده است (۷ و ۱۰). آنزیم *RDR1* توتون (*N. attenuate*) در بیان متابولیت‌های

۳ روز بعد از مایه زنی با ویروس TMV در توتون غیر تراریخت با استفاده از RT-PCR نیمه کمی با ۲۵ تا ۴۰ چرخه PCR ارزیابی شد. اندازه تولیدات حاصل از تکثیر ژنهای *IVR*، *RDR6* و *Myb* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مطابق با اندازه‌های اشاره شده در (جدول ۳) برای هر ژن بود. نتایج نشان داد میزان نسخه‌های mRNA ژنهای دخیل در مقاومت میزبان شامل *IVR* (Inhibitor of virus replication) و نیز-*RNA-Directed RNA Polymerase* (*RDR6* (6) با کاهش میزان نسخه‌های mRNA ژن *RDR1* در توتونهای تراریخت کاهش یافته است (شکل ۶). میزان بیان ژنهای *AOXI* و *ERF5* (Ethylene response factor 5) در توتونهای سالم و آلوده یک هفته بعد از مایه زنی با هر یک از ویروسهای TMV و *PVY⁰* ارزیابی شد. میزان نسخه‌های mRNA ژنهای دخیل در مقاومت میزبان (*AOXI* و *ERF5*) با کاهش نسخه‌های mRNA ژن *RDR1* در توتونهای تراریخت کاهش یافت (شکل ۷).

بحث

در این تحقیق از نسل‌های ۲ و ۳ توتونهای تراریخت استفاده شد به این دلیل که کاهش عملکرد خاموشی ساختارهای ساقه و حلقه از نسل دوم به سوم بیشتر از آن چیزی بود که از نسل اول به دوم مشاهده می‌شد. پژوهشهای گذشته بر روی لاین‌های متعلق به نسل اول توتونهای تراریختی که در این تحقیق از آنها استفاده شد، نشان داده بود که ساختارهای ساقه - حلقه مورد استفاده با توان بسیار بالایی موجب خاموشی ژن *RDR1* توتونهای تراریخت در نسل اول می‌شوند (۲۲). از این رو از نسل‌های دوم و سوم توتونهای مذکور برای این بررسی استفاده شد تا کارایی ساختارهای ساقه و حلقه در خاموشی ژن در نسل‌های بعدی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج آزمونهای Sq-RT-PCR پروتئین پوششی ویروس *PVY⁰* و نیز ژن *RDR1* در توتونهای مورد بررسی حکایت از آن داشت که لاین‌های تراریخت دارای تعداد

کاهش تولید siRNA و در نتیجه کاهش متیلاسیون DNA در هسته و افزایش عمومی بیان ژنها و کاهش میزان تکثیر ویروس در لاین‌های توتون نسل سوم شده باشد (شکل‌های ۶ و ۷). از طرفی دیگر تحریک فرآیند خاموشی RNA در میزبان می‌تواند موجب متیله شدن پروموتور 35S یا ناحیه‌ای از توالی RNA در ساختمان ناقل بیان شونده شده باشد که در این صورت از طریق بیان نسخه‌های کم ساختارهای ساقه-حلقه راندمان ایجاد خاموشی RNA نیز می‌توانسته کاهش یابد. از طرفی نتایج پژوهش‌های گذشته توسط وایستیز و جونز نشان داد که ژن *RDR6* می‌تواند در انتقال قطعات کوچک siRNA در طول گیاه نقش داشته باشد و از این طریق موجب افزایش کارایی دفاع خاموشی ژن بر علیه عوامل ویروسی می‌شود (۲۵). همچنین توسط گوو و همکاران نیز اثبات شده است که بیان ژن *RDR6* متأثر از بیان ژن *RDR1* در سلول می‌باشد (۲۱). در این پژوهش نیز مشاهده شد که با کاهش بیان ژن *RDR1* بیان ژن *RDR6* نیز در نسل دوم توتون‌های مورد بررسی کاهش می‌یابد (شکل‌های ۲ و ۶). این احتمال وجود دارد که کاهش میزان خاموشی ژن *RDR1* توسط ساختارهای ساقه-حلقه موجب افزایش بیان ژن *RDR6* و افزایش مقاومت به آلودگی ویروسی در نسل سوم توتون‌های مورد بررسی شده باشد. لازم به ذکر می‌باشد که نتایج این پژوهش بصورت پایه کارایی ساختارهای ساقه-حلقه را در نسل‌های مختلف توتون‌های تراریخت مورد بررسی قرار داد و فاکتورهای ژنی مورد ارزیابی از نظر میزان حضور mRNA آنها در سیتوپلاسم بررسی شدند. توصیه می‌شود تا برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر در تحقیقات تکمیلی میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش بصورت کمی از سطح هسته تا سیتوپلاسم مورد بررسی قرار گیرد و حضور نسخه‌های خاموش‌کننده در لاین‌ها و نسل‌های مختلف از لحاظ فرکانس انتقال با روش‌های جدید مولکولی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین از آنجا که امروزه از این ساختارها برای تولید گیاهان تراریخت گوناگون در

ثانویه و ترکیبات آروماتیک دافع حشرات نقش دارد (۱۷)، (۱۸ و ۱۹). نتایج این بررسی نشان داد که میزان خاموشی ژن *RDR1* در نسل سوم در مقایسه با نسل قبل از آن کاهش پیدا کرده است (شکل ۳). همچنین نشان داده شد که میزان قطعات کوچک siRNA به طول ۲۴-۲۱ نوکلئوتید در لاین‌های تراریخت *R-14-1-1* و *R-5-1-1* در مقایسه با لاین‌های *R-5-1* و *R-14-1* کاهش پیدا کرده است (شکل ۵). داده‌های حاصل از بررسی فاکتورهای مقاومت نیز نشان داده است که بیان این فاکتورها در نسل سوم در مقایسه با نسل دوم افزایش پیدا کرده است (شکل ۶). در گذشته اثبات شده بود کارایی ساختار ساقه-حلقه در تنظیم منفی بیان ژن هدف به زیگوسیتی (*Zygoty*) لوکوس القاء‌کننده خاموشی و همچنین لوکوس ژن هدف بستگی دارد (۴، ۱۴ و ۱۵). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که نسل‌های مختلف از لحاظ بیان ساختارهای خاموش‌کننده و میزان خاموشی متفاوت می‌باشند (شکل ۵). که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت زیگوسیتی در نسل‌های مختلف لاین‌های توتون تراریخت باشد. از طرفی نتایج بررسی‌های قبل مشخص ساخت که کارایی ساختارهای ساقه و حلقه در خاموشی ژن با توجه به تفاوت در میزان بیان ژن هدف می‌تواند تغییر کند (۱۱). این احتمال نیز وجود دارد که در نسل دوم توتون‌های تراریخت، عملکرد بالای ساختارهای ساقه-حلقه در تحریک فرآیند خاموشی ژن پس از رونوشت برداری در سیتوپلاسم (PTGS) موجب القاء فرآیند خاموشی ژن در سطح رونوشت برداری (TGS) و متیله شدن DNA در هسته شده باشد و در نتیجه موجب کاهش میزان بیان عمومی ژن‌های گیاه از جمله ژن‌های ارزیابی شده در این تحقیق باشد و از این طریق دفاع پایه گیاه به آلودگی ویروسی کاهش پیدا کرده است (شکل ۴). از طرفی این امکان نیز وجود دارد که کاهش کارایی ساختارهای ساقه-حلقه در القاء فرآیند خاموشی ژن احتمالاً به دلیل انتقال کم نسخه‌های خاموش‌کننده ژن هدف به نسل سوم باشد که موجب کاهش خاموشی ژن و

زحمات دکتر Canto Tomas و خانم دکتر Bung Num ، محققین مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند قدردانی و تشکر می‌شود. همچنین از آقای دکتر Minuru Takeshi مدیر گروه تحقیقات مولکولی دانشگاه توکیو ژاپن و نیز پروفیسور Jun Peter Carr مدیر گروه بیوتکنولوژی دانشگاه کمبریج ، به خاطر همکاری ایشان با این تحقیق قدردانی و تشکر می‌شود.

بیوتکنولوژی استفاده می‌شود بنابراین توصیه می‌شود که میزان پایداری انتقال و نیز کارایی خاموشی ژن‌ها از طریق چنین ساختارهایی در سیستمهای مختلف گیاهی مورد ارزیابی دقیق تر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از کمکها و راهنماییهای خانم دکتر Julie Squires محقق بخش تحقیقات ویروس شناسی مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (SCRI) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. از

منابع

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 657-685.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Baulcombe, D. 2005. RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30: 290-293.
- Bleys, A., Vermeersch, L., Van Houdt, H., and Depicker, A. 2006. The frequency and efficiency of endogene suppression by transitive silencing signals is influenced by the length of sequence homology. *Plant Physiology* 142: 788-796.
- Canto, T., Cillo, F., and Palukaitis, P. 2002. Generation of siRNAs by T-DNA sequences does not require active transcription or homology to sequences in the plant. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1137-1146.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method of transferring genes into plants. *Science* 279: 1486-1487.
- Kerschen, A., Napoli, C. A., Jorgensen, R. A., and Muller, A. E. 2004. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letters.* 566: 223-228.
- Loebenstein, G., and Akad, F. 2006. The local lesion response. Pages 99-124 In: *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses.* Loebenstein, G., and Carr J.P., (eds). Springer, The Netherlands. PP. 99-124.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I., and Baulcombe, D. C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30 : 296-303 .
- Marjanac, G., Karimi, M., Naudts, M., Beeckman, T., Depicker, A., and De Buck, S. 2009. Gene silencing induced by hairpin or inverted repeated sense transgenes varies among promoters and cell types. *New Phytologist.* 184: 851-864.
- Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D., Pierelli, L., and Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online.* 3: 19-25.
- Mayers, C. N., Lee, K. C., Moore, C. A., Wong, S. K., and Carr, J. P. 2005. Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: Contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 18: 428-434.
- Mittelsten Scheid, O., Afsar, K., and Paszkowski, J. 2003. Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 34: 450-454.
- Mittelsten Scheid, O., Jakovleva, L., Afsar, K., Maluszynska, J., and Paszkowski, J. A. 1996. Change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7114-7119.
- Palukaitis, P., and Carr, J. P. 2008. Plant resistance to viruses. *J. Plant Pathol.* 90: 153-171.
- Pandey, S. P., Priyanka, P., Gase, K., and Baldwin, I.T. 2008. Herbivory-induced changes

- in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuata*. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 4559-4564.
18. Pandey, S. P., and Baldwin, I. T. 2007. RNA-directed RNA polymerase 1 (*RDR1*) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. Plant J. 50:40-53.
 19. Pandey, S. P., Gaquerel, E., Gase, K., and Baldwin, I. T. 2008. *RNA-directed RNA Polymerase3* from *Nicotiana attenuata* is required for competitive growth in natural environments. Plant Physiol. 147: 1212-1224.
 20. Peart, J. R., Cook, G., Feys, B. J., Parker, J. E., and Baulcombe, D. C. 2002. Implication of SDE-1 gene in plant resistance to viruses. Plant J. 29: 569-579.
 21. Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T. E., and Morris, T. J. 2005. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. J. Virol. 79: 15209-15217.
 22. Rakhshandehroo, F., Takeshita, M., Squires, J., and Palukaitis, P. 2009. The influence of RNA-dependent RNA polymerase 1 on potato virus Y infection and on other antiviral response genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 22: 1312-1318.
 23. Ribeiro, S.G., Lohuis, H., Goldbach, R., and Prins, M. 2007. Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. J. Virol. 81: 1563-1573.
 24. Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., and Baulcombe, D. C. 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 Physiol. 138: 1842-1852.
 25. Vaistij, F. E., and Jones, L. 2009. Compromised Virus-Induced Gene Silencing in RDR6-Deficient Plants. Plant Physiology. 149: 1399-1407.
 26. Vanitharani, R., Chellappan, P., and Fauquet, C. M. 2003. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 9632-9636.
 27. Wassenegger, M., and Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. Trends Plant Sci. 11: 142-151.
 28. Waterhouse, P. M., Graham, M. W., and Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13959-13964.
 29. Xie, Z., Fan, B., Chen, C., and Chen, Z. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 6516-6521.
 30. Yang, S. J., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H., and Nelson, R. S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 6297-6302.
 31. Ying, X. B., Dong, L., Zhu, h., Duan, C. G., Du, Q. S., Lv, D. Q., Fang, Y. Y., Garcia, J.A., Xiang Fang, R., and Guo, H. S. 2010. RNA-Dependent RNA Polymerase 1 from *Nicotiana tabacum* Suppresses RNA Silencing and Enhances Viral Infection in *Nicotiana benthamiana*. The plant cell. 17: 2-15.
 32. Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S. A., and Chen, Z. 2003. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. Mol. Plant-Microbe Interact. 16: 206-216.

The instability of the inhibition of the expression of genes involved in resistance to virus infection in transgenic plants using hairpin constructs

Rakhshandehroo F.^{1,2}, Palukaitis P.² and Shams-Bakhsh M.^{2,3}.

¹ Plant Pathology Dept., College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

² Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, UK

³ Plant Pathology Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Transgenic expression of hairpins can induce RNA silencing pathways by means of dsRNA with sequence homology to a plant mRNA. Using transgenic tobacco plants (*N. tabacum* cv. Samsun NN) in which the *RDR1* gene was silenced to different extents by a hairpin structure homologous to the tobacco *RDR1* gene, we evaluated the stability of gene silencing, by analyzing the *RDR1* gene expression levels and the plant susceptibility to systemic infection by PVY°. The second (T2) and third (T3) generations of *RDR1* silenced transgenic lines were tested by semi-quantitative RT-PCR to evaluate the expression levels of defense-related genes including *IVR*, *ERF5*, *AOXI*, and *RDR6*, one week after PVY° infection. The results showed that T2 transgenic tobacco lines transcribed the *RDR1* and the other defense-related genes to a lower level than the corresponding T3 transgenic lines. The T2 lines were more susceptible to PVY° infection than the T3 lines and the *RDR1* gene was expressed to the same level in the T3 lines as in non-transformed tobacco. The efficiency of hairpin structure-mediated silencing of the *RDR1* gene decreased through different generations. As the *RDR1*-regulated *RDR6* is required for the spreading of silencing throughout the plant, we propose that suppressing *RDR1* leads to inhibition of *RDR6*, which then leads to loss of silencing by the *RDR1* hairpin transgene after vertical gene transmission.

Keywords : RNA silencing, stem-loop structure, (*RDR1*), PVY°