

کارایی بخشی از ژنوم ویروس موزاییک شلغم برای ایجاد مقاومت در کلزا

مجید جعفری^۱، احمد معینی^۲ و مسعود شمس بخش^{۳*}

۱. دانشجوی سابق دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۷)

چکیده

ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae*، یکی از ویروس‌های شایع مزرعه‌های کلزا در ایران است و تاکنون لاین یا رقم تجاری مقاومی به آن در کشور گزارش نشده است. در این پژوهش، امکان ایجاد مقاومت به TuMV در لاین کلزای تراریخته حاوی قطعه کوتاهی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس بررسی شد. بدین منظور توالی ۱۳۰ نوکلئوتیدی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی در حامل pFGC5941 در جهت‌های سنس و آنتی‌سنس به‌طور مستقل همسانه‌سازی شد و با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 به دم‌برگ کوتیلدونی لاین کلزای Hayola R-Line 401 منتقل شد. گزینش و تأیید گیاهان تراریخته T0 و T1 با استفاده از آزمون‌های PCR و مقاومت به علف‌کش گلو‌فوسینت آمونیوم (نشانگر) در شرایط گلخانه انجام شد. پس از مایه‌زنی ویروس به گیاهان لاین T1 ارزیابی واکنش با استفاده از سامانه نمره‌دهی انجام شد. نتایج نشان داد که تمام گیاهان تراریخته حاوی سازه سنس هیچ‌گونه مقاومتی را نشان ندادند درحالی‌که تعدادی از گیاهان تراریخته حاوی سازه آنتی‌سنس سطوح متفاوتی از مقاومت شامل تأخیر در ظهور علائم به همراه کاهش شدت علائم (۰ تا ۳۰ درصد نتاج نسل T1) و یا بهبودی (۱۰ تا ۶۶ درصد نتاج نسل T1) را نشان دادند. این اولین گزارش از افزایش مقاومت به TuMV از راه انتقال یک توالی کوتاه ویروسی در جهت آنتی‌سنس در کلزا است.

واژه‌های کلیدی: بهبودی، پوتی‌ویروس، توالی کوتاه، سامانه نمره‌دهی.

The efficiency of the partial genome of *Turnip mosaic virus* (TuMV) on resistance induction in canola

Majid Jafari¹, Ahmad Moieni² and Masoud Shams-bakhsh^{3*}

1. Former Ph. D. Student, Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: Nov. 24, 2017 - Accepted: Sep. 8, 2018)

ABSTRACT

Turnip mosaic virus (TuMV) a species of the genus *Potyvirus* in the family *Potyviridae*, is one of the most prevalent viruses of canola fields in Iran. So far, commercial resistant lines or varieties against TuMV have not been known in Iran. In this research, the possibility of inducing resistant to TuMV in transgenic canola lines carrying a short fragment of the coat protein gene of the virus was evaluated. Therefore, a 130 nucleotide fragment of TuMV coat protein gene, as sense or antisense orientations, were cloned in the pFGC5941 vector independently and then were transformed to canola cotyledonary (Hayola R-Line 401 variety) explants using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Selection and confirmation of transgenic T0 and T1 lines were carried out via PCR and glufosinate ammonium herbicide (selective marker) resistance assay under greenhouse conditions. After virus inoculation to T1 lines, resistance assay was done by the scoring system. The obtained results confirmed that transgenic lines with sense construction did not show any resistant. However, several transgenic lines with antisense construction showed a different level of resistant to TuMV including delay in symptoms appearance and a decrease in symptoms severity (0-30% of T1 progeny) or symptoms recovery (10-66% of T1 progeny). This is the first report of increased resistant against TuMV via transformation of a short viral fragment sequence with the antisense orientation in canola.

Keywords: *Potyvirus*, recovery, short sequence, scoring system.

* Corresponding author E-mail: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از منبع‌های اصلی تولید روغن گیاهی در دنیا محسوب می‌شود. روغن کلزا به دلیل بر خورداری از میزان پایین اوریک‌اسید به‌عنوان منبع ارزشمند روغن در تغذیه اهمیت دارد (Vollmann and Rajkan, 2009). بیماری‌گرهای بسیاری کلزا را آلوده می‌کنند و سبب خسارت به این محصول دانه روغنی می‌شوند. در ایران ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) از مزارع کلزا به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است (Farzadfar et al., 2005; Ghorbani et al., 2007; Shahraeen et al., 2003; Shahraeen, 2012; Sabokkhiz et al., 2012). بررسی‌های انجام‌شده در استان گلستان نشان داده که میزان آلودگی کلزا به TuMV در این استان نسبت به سایر ویروس‌های آلوده‌کننده این محصول بیشتر است (Zahedi et al., 2010). همچنین بررسی نمونه‌های کلزا با علائم ویروسی با استفاده از آزمون الیزا در استان خراسان رضوی نشان‌دهنده آلودگی ۲۶ درصدی آن به ویروس موزاییک شلغم است (Sabokkhiz et al., 2012).

از میان روش‌های کنترل بیماری‌های ناشی از ویروس‌های گیاهی، مقاومت برگرفته از بیمارگر^۱ در سه دهه گذشته گسترش بیشتری یافته است (Simon-Mateo & Garcia, 2011). مقاومت برگرفته از بیمارگر، ابتدا با بیان پروتئین‌های پوششی، حرکتی و پلی‌مراز ویروس‌های گیاهی به‌صورت عملکردی یا ناقص به‌کاربرده شد (Waterhouse & Upadhyaya, 1998)، سپس از ژنوم ویروس‌ها برای ایجاد مقاومت استفاده شد. روش اخیر القای خاموشی RNAi که با تولید RNAi دولای ویروسی در گیاه تحریک می‌شود به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید گیاهان مقاوم به تعدادی از ویروس‌های گیاهی به‌کار گرفته شده است (Hu et al., 2011). در روش خاموشی RNAi بخشی از توالی ویروس هدف به ژنوم گیاه ملحق می‌شود تا خاموشی RNAi ویروس در گیاه القاء شود و چرخه

زندگی ویروس مختل شود. در بیشتر مواقع این روش با موفقیت همراه بوده است (Goldbach et al., 2003; Prins et al., 2008). خاموشی RNAi واکنش دفاعی ذاتی گیاه علیه ویروس‌ها بر پایه تشخیص RNAi دولا است که توسط آنزیم DICER، کمپلکس پروتئینی موسوم به RNA inducing silencing complex (RISC) و تکثیر توسط آنزیم پلی‌مراز انجام می‌شود (Brodersen & Voinnet, 2006; Ding & Voinnet, 2007). در این روش توالی‌های هدف ویروسی می‌توانند شامل مناطق رمز شونده (ژن‌های پروتئین پوششی، رپلیکاز و یا مهارکننده‌های خاموشی) و مناطق غیر رمزکننده (مانند پروموتور) را شامل شوند. در تمام این مراحل siRNAهای اختصاصی ویروس در گیاهان تراریخته مقاوم ردیابی شده‌اند (Watson & Wang, 2012).

بیان RNA گرفته شده از ویروس در جهت سنس یا آنتی‌سنس در گیاهان تراریخته باعث ایجاد مقاومت برگرفته از RNA ویروس می‌شود که از راه القای نوعی از سازوکار خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری (PTGS) صورت می‌گیرد (Baulcombe, 1996; Stam, 1997). این سازوکار از طریق تجزیه RNA هدف با ویژگی اختصاصی بسیار بالا عمل می‌کند و می‌تواند علیه توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه یا مکمل توالی هدف به‌کار برده شود (Lindbo & Dougherty, 1992a; Lindbo & Dougherty, 1992b; Baulcombe, 1996; Stam et al., 1997). با استفاده از بیان توالی‌های سنس و آنتی‌سنس در یک سازه به صورت هم‌زمان، به‌گونه‌ای که RNA نسخه‌برداری شده بتواند بر روی توالی مکمل خود RNA دولا تشکیل دهد القای خاموشی RNA پس از نسخه‌برداری را ایجاد می‌کند (Waterhouse et al., 1998).

هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان القای خاموشی RNA نسبت به ویروس موزاییک شلغم با استفاده از یک توالی کوتاه از ژن رمزکننده پوشش پروتئینی این ویروس در جهت‌های سنس و آنتی‌سنس در کلزا است.

مواد و روش‌ها

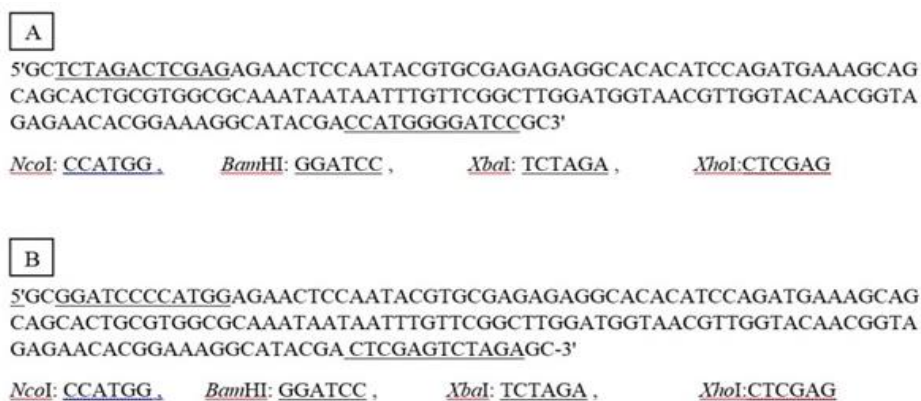
انتخاب ترادف و ویروسی

به منظور انتخاب ترادف مناسب برای القای خاموشی ترادف حفاظت شده ژن رمزکننده پروتئین پوششی به طول ۱۳۰ نوکلئوتید از نوکلئوتید شماره ۷۸۷ تا ۹۱۶ از یک جدایه ویروس موزاییک شلغم با رس شماره KU535893 انتخاب شد. به منظور بررسی عدم امکان خاموشی ژن‌های کلزا، توالی کاندیدا شده در سایت siRNAScan با استفاده از داده‌های موجود از این سایت مورد ارزیابی قرار گرفت.

ساخت سازه‌های سنس و آنتی‌سنس

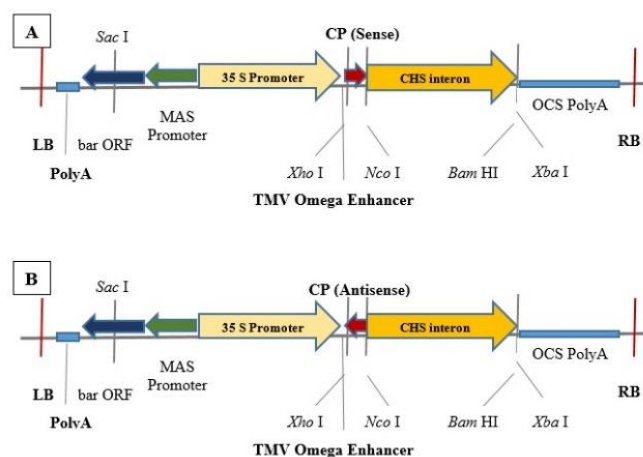
ترادف انتخابی ۱۳۰ نوکلئوتیدی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی TuMV به همراه الگوی متفاوت

سایت‌های آنزیم‌های برشی به شرکت Generay کشور چین جهت سنتز سازه‌های سنس و آنتی‌سنس ارسال شد. ترادف‌های سنتز شده در حامل pGH محدود به توالی آنزیم‌های برشی *XhoI* و *NcoI* همسانه‌سازی شده و تحت نام‌های pGH-TuMV-S و pGH-TuMV-AS (شکل ۱) نام‌گذاری شدند. دو همسان یادشده و حامل pFGC5941 با دو آنزیم یادشده بریده شد. سپس قطعات خارج شده از pGH-TuMV-S و pGH-TuMV-AS در حامل‌های برش خورده pFGC5941 به طور مستقل و جداگانه همسانه‌سازی شدند و محصولات حاصل تحت نام‌های pFGC-CP-S و pFGC-CP-AS نام‌گذاری شدند. همچنین شبیه‌سازی همسانه‌سازی با استفاده از برنامه Vector NTI ver 8.0 انجام شد (شکل ۲).



شکل ۱. ترادف‌های نوکلئوتیدی طراحی شده با جایگاه‌های برشی. A: سازه سنس B: سازه آنتی‌سنس

Figure 1. Designed nucleotide sequences with enzyme restriction sites. A: sense construction. B: Antisense construction



شکل ۲. ساختار حامل‌های همسانه‌سازی شده سنس و آنتی‌سنس. A: حامل pFGC-CP-S B: حامل pFGC-CP-AS

Figure 2. The map of the cloned sense and antisense constructs in the vector. A: pFGC-CP-S vector. B: pFGC-CP-AS vector

انجام شد. انتقال سازه‌ها به دم‌برگ و با استفاده از اگروباکتریوم انجام شد (Moloney *et al.*, 1989). ریز نمونه‌هایی که در محیط کشت انتخابی حاوی علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم در شرایط کشت بافت زنده باقی ماندند پس از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های حاوی ترکیب پیت، پرلیت و خاک به نسبت برابر منتقل شدند. گیاهان در شرایط زیر پلاستیک به مدت یک هفته در شرایط نور طبیعی گلخانه و دمای میانگین ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و به تدریج تا زمان انجام آزمایش‌های زیستی و بذریابی با شرایط محیطی سازگار شدند.

گزینش گیاهان تراریخته لاین T0

گیاهان انتقالی به گلخانه شامل گیاهانی بودند که در شرایط کشت بافت بر روی محیط‌های انتخابی حاوی علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم رشد کرده بودند. جهت اطمینان از گزینش این گیاهان تراریخته از گیاهان غیر تراریخته در شرایط گلخانه، ابتدا اقدام به شناسایی سازه‌های انتقالی به DNA گیاه با آزمون PCR و سپس گزینش انتخابی با علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم انجام شد.

استخراج DNA و آزمون PCR

استخراج DNA از گیاهان تراریخته و غیر تراریخته با استفاده از روش دلاپورتا انجام شد (Dellaporta *et al.*, 1983). به منظور شناسایی قطعه DNA وارد شده حاوی توالی سنس یا آنتی‌سنس اقدام به طراحی یک جفت آغازگر به نام‌های FGC-F (5'-ACAATCCCCTATCCTTCGCA-3') و FGC-R (5'-CGCATATCTCATTAAGCAGG-3') شد که بتواند منطقه‌ای از توالی اینترون حامل pFGC5941 را تکثیر نماید که شامل دو بخش خارجی از سایت‌های برشی مرتبط با سازه‌ها در حامل باشد. تفاوت محصول PCR در حامل‌های حاوی سازه سنس و یا آنتی‌سنس با حامل فاقد قطعه DNA وارد شده، تکثیر قطعه‌ای به اندازه حدود ۱۴۸ جفت باز بزرگ‌تر است. همچنین به منظور حصول اطمینان از عدم آلودگی گیاهان به اگروباکتریوم حاوی حامل نوترکیب، نمونه‌برداری جهت استخراج

استخراج پلاسمید و همسانه سازی حامل‌ها

مراحل همسانه‌سازی، ساخت سلول‌های مستعد *E. coli* و *Agrobacterium tumefaciens* و همچنین انتقال سازه‌ها به این باکتری‌ها بر اساس روش‌های متداول انجام شد (Sambrook & Russell, 2001). برش آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲-۴ ساعت با دو آنزیم به صورت هم‌زمان از آنزیم‌های شرکت فرمنتاز انجام شد. واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل یک واحد از آنزیم‌های برشی (۰/۵ واحد برای هر آنزیم)، ۴ میکرولیتر بافر (Tango (2X)، ۷ میکرولیتر حامل و ۸ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و سپس واکنش اتصال در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. این واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱۰ واحد T4 Ligase، ۱ میکرولیتر 10X Ligase buffer، ۰/۵ میکرولیتر PEG، ۰/۳ نانوگرم پلاسمید برش خورده، ۰/۵ نانوگرم قطعه ژن انجام شد

محصول واکنش اتصال، به سویه DH5α باکتری *E. coli* به روش شوک حرارتی منتقل شد. پس از رشد باکتری روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد داده شد. از تک کلنی‌های رشد یافته جهت Clony PCR استفاده شد و از کلنی‌هایی با نتیجه مثبت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت کشت مایع به منظور استخراج پلاسمید نوترکیب استفاده شد. همچنین از پلاسمیدهای نوترکیب جهت انتقال به اگروباکتریوم به روش شوک الکتریکی (Electroporator eppendorf 2510, Germany) با شرایط 2.0 kV و 200 Ω, 25μF با شرایط استفاده شد. پس از انتقال باکتری‌ها روی محیط LB یا YEB جامد دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ریفامپیسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کشت داده شدند. از باکتری‌های رشد یافته جهت انتقال سازه به کلزا استفاده شد.

انتقال سازه‌ها

جهت انتقال سازه‌های سنس و آنتی‌سنس به ترتیب با انتقال حامل pTuMV-CP-S و pTuMV-CP-AS به‌طور مستقل به کلزای رقم Hayola 401 R-Line

گلخانه کشت شدند و گیاهچه‌های جوان تحت مراقبت قرار گرفتند. چهل بذر از هر لاین والدی کشت شد. لاین‌های T1 همانند لاین‌های T0 مورد ارزیابی آزمون‌های حساسیت به علف‌کش و PCR جهت گزینش گیاهان تراریخت قرار گرفتند. به‌منظور ردیابی قطعه DNA سنس و یا آنتی‌سنس انتقال یافته به گیاهان لاین T1 آغازگرهای CP-130-F و CP-130-R با هدف تکثیر توالی ۱۳۰ نوکلئوتیدی (فاقد توالی‌های سایت برشی) مورد بررسی قرار گرفتند. از آغازگرهای تکثیرکننده ژن استیل کوآنزیم آ (ACC-F و ACC-R) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. به‌منظور ارزیابی مقاومت در گیاهان لاین‌های T1، در مرحله ۳-۵ برگی، ویروس به روش انتقال مکانیکی به گیاهان مایه‌زنی شد. شدت علائم با استفاده از سامانه نمره‌دهی (۰-۸) در پایان چهارمین هفته پس از مایه‌زنی ثبت شد (Jafari *et al.*, 2016). از لاین‌های T1 گیاهان غیر تراریخت نیز به‌عنوان کنترل بیماری‌زایی، نمره‌دهی و مقایسه علائم استفاده شد. تغییرهای احتمالی در علائم بیماری مانند شدت علائم، اختلاف در زمان ظهور علائم بیماری و یا بهبود علائم در برگ‌های جدید ثبت شدند.

نتایج

استخراج DNA و آزمون PCR

وجود قطعه انتقالی در سازه‌های سنس و آنتی‌سنس همسان‌سازی شده توسط توالی‌یابی تأیید شد. آغازگرهای FGC-F و FGC-R که از بخش اینترون و دو ناحیه خارجی و بالاتر از محل‌های برشی طراحی شده بودند. با استفاده از واکنش PCR، قطعه مورد انتظار حدود ۱۷۰۰ جفت بازی در گیاهان تراریخت سنس و یا آنتی‌سنس تکثیر شد که مؤید انتقال سازه‌های مورد نظر به گیاهان تراریخت بود درحالی‌که قطعه یادشده در گیاهان غیر تراریخت تکثیر نشد (شکل ۳). از آنجایی‌که امکان انتقال اگروباکتیریوم از شرایط کشت بافت به همراه گیاه T0 در گلخانه وجود دارد انجام آزمون PCR به‌منظور ردیابی احتمالی قطعه DNA تکثیر شده حدود ۵۰۰ جفت بازی از ژن VirD با آغازگرهای VirD-F و VirD-R انجام شد. عدم تکثیر قطعه یادشده گویای تراریخت بودن گیاهان T0 بود.

DNA از برگ‌های بالای گیاه انجام شد و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش با توانایی تکثیر بخشی از توالی Vir-D (اگروباکتیریوم از آغازگرهای VirD2-A (5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3') و VirD2-B (3'-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-3') این آغازگرها توانا به تکثیر محصول مورد انتظار در واکنش PCR به‌اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت بازی است. جهت شناسایی و انتخاب کلون‌های باکتری ترانسفورم از آغازگرهای FGC-F و FGC-R طراحی شده در این پژوهش استفاده شد. به‌منظور تأیید گیاهان تراریخته از آغازگرهای طراحی شده CP-130-F (5'-GAGAACTCCAATACGTGCGAG-3') و CP-130-R (5'-GTCGTATGCCTTTCGTTTC-3') استفاده شد که منجر به تکثیر قطعه ۱۳۰ جفت بازی از ترادف قطعه انتقالی شد. از آغازگرهای ACC-F (5'-CATATGCTGGGGTCAATGACAAC-3') و ACC-R (5'-GTCGACAGAAGAATGATCGCGAA-3') نیز به‌منظور کنترل داخلی PCR استفاده شد (Roohi *et al.*, 2013).

آزمون حساسیت به علف‌کش

از آنجایی‌که منطقه اینترون حامل pFGC5941 حاوی توالی ژن *Bar* (مقاومت به علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم) است، بنابراین گیاهان تراریخته حاصل باید صفت مقاومت به این علف‌کش را به همراه داشته باشند. جهت تأیید انتخاب گیاهان تراریخته از آزمون حساسیت به علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم استفاده شد. در گلخانه گیاهان در مرحله رشدی دارای ارتفاع ۲۰-۳۰ سانتی‌متری، با علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم در رقت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ارزیابی شدند. از گیاهان غیر تراریخت حاصل از کشت بافت نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد.

ارزیابی مقاومت لاین‌های T1 به TuMV

بذرهای حاصل از لاین‌های T0 والدی در شرایط

آزمون حساسیت به علف‌کش

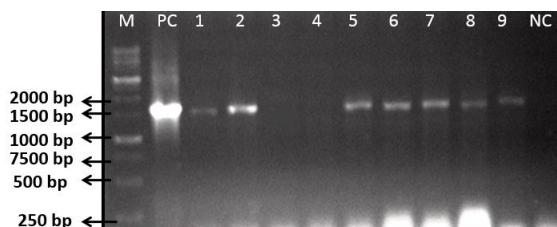
واکنش گیاهان در برابر تیمار با علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم در رقت ۰/۱ میلی‌گرم ماده مؤثره بر میلی‌لیتر پس از ۳-۵ روز قابل‌رديابی بود. علائم تأثیر علف‌کش بر برگ در ابتدا به صورت بافت سوختگی نرم بود که به تدریج پس از گذشت چند روز منجر به نکروز شدن برگ‌ها شد (شکل ۴).

ارزیابی مقاومت گیاهان لاین T1 در برابر TuMV

ویژگی‌های گیاهان T1 تحت بررسی جهت گزینش تراریختی با علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم در جدول ۱ نشان داده شده است. گیاهان مقاوم به علف‌کش جهت استخراج DNA و انجام PCR با آغازگرهای

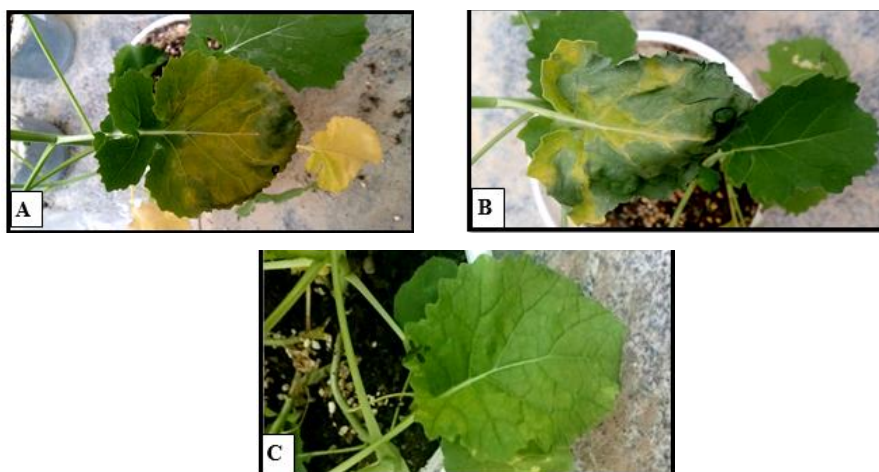
تکثیرکننده قطعه ۱۳۰ نوکلئوتیدی انتخاب شدند. همچنین آغازگرهای تکثیرکننده ژن اختصاصی استیل کوآنزیم آ (کنترل داخلی PCR) نیز باعث تکثیر قطعه مورد انتظار حدود ۸۰۰ جفت بازی شد (شکل ۵).

ارزیابی مقاومت لاین‌های T1 نشان داد که تمام لاین‌های تراریخته از مقاومت یکسانی برخوردار نبودند (شکل ۶ و جدول ۲). بیشترین تعداد گیاهان با بیشترین واکنش مقاومت به گیاهان لاین T1 مربوط به نتاج لاین‌های والد Out-S-8 (۳ گیاه از ۱۴ گیاه) و Out-S-5 (۸ گیاه از ۲۶ گیاه) بود. همچنین در گیاهان T1 مربوط به نتاج لاین‌های والدی IN-S-1 و IN-S-2 واکنش مقاومتی با شدت علائم پایین‌تر از گیاهان غیر تراریخت دیده نشد.



شکل ۳. نقش‌های الکتروفورزی محصول PCR از DNA استخراجی لاین‌های کلزای تراریخته نسل T0 با آغازگرهای اختصاصی pFGC5941، راهک M: نشانگر 1kb (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). راهک PC: حامل pFGC5941 حاوی توالی سنس به‌عنوان کنترل مثبت، 1-2: کلزای تراریخته حاوی قطعه سنس راهک 3-4: کلزای تراریخت تأیید نشده. راهک 5-9: کلزای تراریخته حاوی قطعه آنتی‌سنس. راهک NC: گیاه غیر تراریخته به‌عنوان کنترل منفی.

Figure 3. Electrophoresis patterns of PCR products using extracted DNA from transgenic canola T0 lines by specific pFGC5941 primers. Line M: 1kb marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). Line PC: pFGC5941 cloned vector with the sense sequence as the positive control. Lines 1-2: the transgenic canola with the sense construct. Lines 3-4: non-transgenic detected lines. Lines 5-9: transgenic lines with the sense construct. NC Line: non-transgenic line as the negative control.



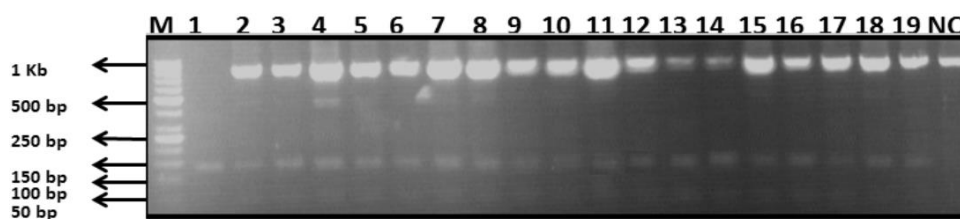
شکل ۴. تیمار برگ گیاهان کلزا با علف‌کش گلوپوسینت آمونیوم. برگ کلزای غیر تراریخت با نشانه‌های زردی و نکروز به ترتیب پنج روز (A) و ۱۰ روز (B) پس از تیمار. (C) برگ کلزای تراریخت بدون دگرگونی ۱۰ روز پس از تیمار.

Figure 4. Treatment of the canola leaf using glufosinate ammonium herbicide. Leaf of the non-transgenic canola showing yellowing and necrosis symptoms after five (A) and 10 (B) days of treatment. Leaf of the transgenic canola with no observed changes after 10 days of treatment (C).

جدول ۱. مشخصات لاین‌های تراریخت To رقم Hayola 401 R-Line

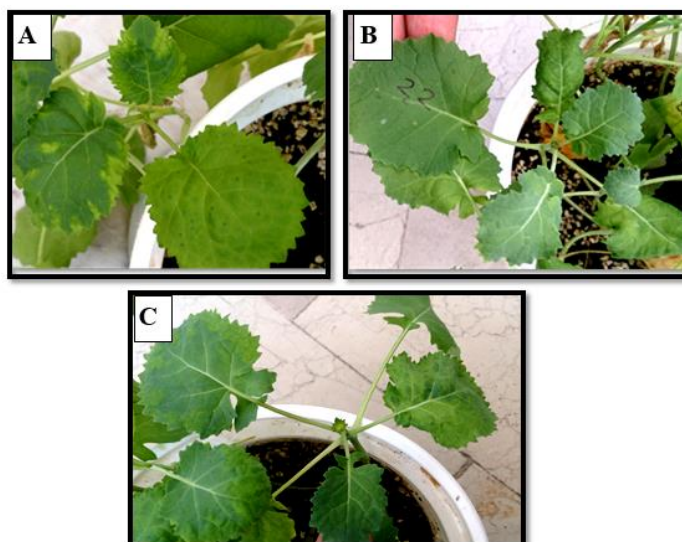
Table 1. T0 transgenic lines properties of Hayola 401 R-Line

Construct	Orientation of sequence	FGC5941 PCR (FGC5941 primers)	VirD PCR (VirD primers)	Glufosinate ammonium resistant assay	Seed production with the good germination potency
pFGC-CP-S-1	Sense	+	-	+	+
pFGC-CP-S-2	Sense	+	-	+	+
pFGC-CP-S-5	Sense	+	-	+	-
pFGC-CP-S-6	Sense	+	-	+	-
pFGC-CP-AS-1	Antisense	+	-	+	-
pFGC-CP-AS-3	Antisense	+	-	+	+
pFGC-CP-AS-5	Antisense	+	-	+	+
pFGC-CP-AS-7	Antisense	+	-	+	+
pFGC-CP-AS-8	Antisense	+	-	+	+
pFGC-CP-AS-10	Antisense	+	-	+	+



شکل ۵. نقش‌های الکتروفورزی محصول PCR از تکثیر قطعه DNA ۱۳۰ نوکلئوتیدی در جهت سنس یا آنتی‌سنس با آغازگرهای CP-130F و CP-130R در گیاهان T1 با احتمال تراریخته شدن. نوار نزدیک به ۸۰۰ جفت بازی حاصل از آغازگرهای تکثیرکننده ژن استیل کوآنزیم آ به‌عنوان کنترل داخلی PCR. راهک M: نشانگر مولکولی 50bp، (GenRuler™ 50bp DNA ladder, Fermentas)، راهک ۱: حامل pFGC5941 حاوی قطعه سنس به‌عنوان شاهد مثبت. راهک‌های ۲-۱۹: گیاهان تراریخته دارای قطعه DNA ۱۳۰ جفت بازی. راهک NC: گیاه غیر تراریخته، راهک T1 به‌عنوان شاهد منفی.

Figure 5. Electrophoresis pattern of PCR products of amplified 130 nucleotides fragment as sense or antisense orientations with specific primers (CP-130F and CP-130R) in transgenic T1 with transgenic probability. The 800bp band product was amplified by specific primers for Acetyl-CoA gene as an internal control for the PCR assay. Line M: 50bp molecular marker (GenRuler™ 50bp DNA ladder, Fermentas). Line 1: the pFGC5941 vector with sense fragment as the positive control. Lines 2-19: transgenic plants with the 130 bp fragment. Line NC: non-transgenic line T1 as the negative control.



شکل ۶. ارزیابی مقاومت به TuMV در گیاهان تراریخت لاین T1. A: گیاه غیر تراریخت لاین T1 به‌عنوان شاهد منفی با شدت نشانه‌های نمره ۶، B: گیاه تراریخته بدون نشانه‌ها با شدت نشانه‌های صفر C: گیاه تراریخته با شدت نشانه‌های نمره ۴ که به آهستگی به همراه بهبود در برگ‌های تازه است.

Figure 6. Evaluation of resistance of transgenic plants T1 to TuMV. A: transgenic line T1 as the negative control with scale number 6 as the symptom severity. B: the transgenic line with no symptoms (scale number 0). C: the transgenic plant with the scale number 4 with symptoms gentle recovery in new leaves.

جدول ۲. نتایج ارزیابی لاین‌های T1 در برابر مایه‌زنی TuMV
Table 2. Results of evaluation of T1 Lines against TuMV

T0 Parent	Plant transformed number	Plant numbers (percentage) with 1-3 scoring and delay symptoms appearance (Resistance)	Plant numbers (percentage) with 4-6 scoring and symptoms recovery (Intermediate Resistance)	Plant numbers (percentage) with 4-6 scoring and not-symptoms recovery (Susceptible)
IN-S-1	14	0 (0%)	0 (0%)	14 (100%)
IN-S-2	22	0 (0%)	0 (0%)	14 (100%)
OUT-S-3	10	0 (0%)	2 (10%)	8 (80%)
OUT-S-5	26	8 (30%)	5 (62%)	13 (50%)
OUT-S-7	10	0 (0%)	3 (30%)	7 (70%)
OUT-S-8	14	3 (21%)	5 (35%)	8 (57%)
OUT-S-10	30	1 (3.3%)	20 (66%)	9 (30%)

رقمی حساس به TuMV معرفی شده است (Jafari *et al.*, 2016). انتقال توالی DNA کوتاه ویروسی به‌منظور القای خاموشی RNA و افزایش مقاومت در گیاه والد پدری (R-Line) و استفاده از نتاج هموزیگوت به‌منظور تلاقی با والد مادری در برنامه‌های اصلاحی کلزا در این رقم ارزشمند است.

در این پژوهش میزان کاهش شدت علائم بیماری در تعدادی از گیاهان دارای سازهٔ آنتی‌سنس به صورت بهبودی مشاهده شد که برابر با نظر Numora *et al.* (2004) به‌عنوان مقاومت حد واسط در نظر گرفته شد و در طول دورهٔ رشد گیاهان در هیچ گیاهی فقدان علائم خاص مشاهده نشد. البته در گیاهانی با شدت علائم پایین معمولاً ظهور علائم با تأخیر زمانی ۵-۱۰ روزه نسبت به شاهد مشاهده شد. البته با توجه به فعال‌سازی سامانهٔ خاموشی گیاه پس از ورود ویروس به داخل گیاه و تشکیل سیگنال خاموشی انتظار رخداد مقاومت گیاه به صورت بهبودی بیماری پس از ظهور علائم در مقایسه با ظهور علائم خفیف و یا فقدان علائم بیشتر است. نتیجه‌های عدم کارایی مناسب سازهٔ سنس ژن رمزکنندهٔ پروتئین پوششی در این پژوهش با نتیجه‌های لهمان در کلزا هم‌خوانی دارد (Lehmann *et al.*, 2003) شاید عدم کارایی سازهٔ حاصل از توالی ژن CP گونه TuMV در جهت سنس در کلزا به گونهٔ میزبان مرتبط باشد (Lehmann *et al.*, 2003). هرچند که با نتایج دو پژوهش دیگر مبنی بر کارایی مناسب سازهٔ سنس ژن رمزکنندهٔ پروتئین پوششی در *N. benthamiana* و آرابیدوپسیس هم‌خوانی ندارد (Jan *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2004).

در نتاج گیاهان OUT-S-10 به تدریج علائم بیماری در برگ‌های در حال تشکیل خفیف و یا ناپدید شد. این پدیده که بهبودی نام دارد به‌عنوان مقاومت حد واسط در نظر گرفته شد. بهبودی در گیاهان نتاج OUT-S-10 بیشتر دیده شد.

بحث

نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که انتقال توالی کوتاهی از ژن رمزکنندهٔ پوشش پروتئینی ویروس موزاییک شلغم (TuMV) در جهت آنتی‌سنس به کلزا می‌تواند باعث ایجاد مقاومت نسبی در برابر مایه‌زنی این ویروس در لاین‌های تراریخته شود به‌طوری‌که مقاومت حاصل به شکل تأخیر در ظهور علائم به همراه کاهش شدت علائم (۰ تا ۳۰ درصد گیاهان) و یا بهبودی (۱۰ تا ۶۶ درصد گیاهان) ایجاد شد. هرچند که ارزیابی مقاومت حاصل از انتقال توالی کامل و یا ناقص بلند ژن رمزکنندهٔ پروتئین پوششی این ویروس در جهت سنس، در گیاهان تراریختهٔ کلزا، آرابیدوپسیس و *N. benthamiana* و همچنین توالی ژن Nib این ویروس در جهت آنتی‌سنس در گیاهان تراریختهٔ *B. junicea* و *B. compestris* بررسی شده است (Jan *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 2003; Nomura *et al.*, 2004; Zhandong *et al.*, 2007; Zhao & Hao, 2010) اما امکان القای مقاومت با یک توالی کوتاه (۱۳۰ نوکلئوتیدی) از این ویروس در گیاه تراریخته کلزا برای اولین بار در این پژوهش بررسی شد. مزیت استفاده از این توالی کوتاه ویروسی کاهش امکان خاموشی توالی هدف مشابه در ژنوم میزبان است. از آنجایی که کلزای رقم Hayola 401 به‌عنوان

به شکسته شدن مقاومت حاصل از ژن CP گونه PVA از جنس پوتی ویروس در *N. benthamiana* در برابر آلودگی همان گیاه به PVY، گونه دیگری از آن جنس، شکسته شود (Savenkov et al., 2001). از آنجایی که در مزرعه امکان آلودگی گیاه به چند ویروس به صورت هم‌زمان وجود دارد بنابراین پیشنهاد می‌شود از ترادف‌های ناقص ترکیبی از چند ویروس هتروولوگوس جهت ایجاد دامنه مقاومت وسیع‌تری در گیاه استفاده شود (Jan et al., 2000). از این جهت به منظور کاهش احتمال شکسته شدن مقاومت ایجاد شده در کلزای تراریخته با استفاده از سازوکار خاموشی RNA پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی از سازه‌هایی با مقاومت چندگانه در برابر سه ویروس مهم گزارش شده از ایران شامل TuMV، CaMV و BWYV استفاده شود.

میزان مقاومت کسب شده توسط سازه وارد شده در گیاهان تراریخته حاوی توالی قطعه القاکننده خاموشی بسیار متنوع است که در واقع دلالت از عدم کارایی یکسان سازه در بین نتاج والد تراریخته دارد. به عنوان مثال کارایی توالی نوکلئوتیدی طراحی شده و انتقالی از ژن CP گونه TuMV به گیاهان تراریخته نسل R1 بین صفر تا ۸۸ درصد تنوع دارد (Jan et al., 1999) و یا صفر تا ۷۵ درصد در آرابیدوپسیس در نسل T2 (Nomura et al., 2004) و یا تنوع در مقاومت حاصل به صورت شدت علائم با نمره متفاوت در *B. compestris var pekinensis* گزارش شده است (Zhandog et al., 2007). در پژوهش حاضر نیز چنین تنوع مقاومت با سامانه نمره‌دهی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این پژوهش، استفاده از سازوکار خاموشی RNA در کلزای مقاوم به ویروس موزاییک شلغم می‌تواند یکی از اهداف مهندسی ژنتیک در برنامه‌های اصلاحی قرار گیرد. البته جهت تجاری‌سازی لاین‌های تولیدی نیاز به انجام آزمایش‌های زیست‌محیطی است. با توجه به موفقیت در ایجاد مقاومت ناقص با استفاده از توالی کوتاه ژن پوشش پروتئینی این ویروس پیشنهاد می‌شود سازوکار القای سازه RNA سنجاق سری در کلزا نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

انتظار می‌رود سازه طراحی شده در این پژوهش از کارایی مشابهی در برابر طیف وسیعی از سایر جدایه‌های مختلف این ویروس را نیز داشته باشد زیرا جهت طراحی آن حداکثر همپوشانی نوکلئوتیدی این قطعه با ۶۰ جدایه از سراسر دنیا ثبت شده در بانک ژنی NCBI مورد توجه هم‌ردیف‌سازی قرار گرفت. از این جهت پیش‌بینی می‌شود امکان استفاده از این سازه نه تنها پایداری مناسبی برای ایجاد مقاومت به TuMV در کلزا داشته باشد بلکه انتظار می‌رود از کارایی مناسبی در تولید سایر گیاهان تراریخت در تیره Brassicaceae را داشته باشد. از طرفی دیگر در این پژوهش ترادف انتخابی جهت خاموشی از ۱۳۰ نوکلئوتید انتهایی ۳' از ژن CP ویروس (نوکلئوتید شماره ۷۸۷-۹۱۶ از ژن CP حدود یک کیلوبازی) که بیش از ۹۶ درصد شباهت با منطقه مشابه از جدایه مایه‌زنی شده دارد جهت کاندیدای هدف خاموشی انتخاب شد. Numora et al. (2004) بیان کردند که حدود ۳۸۰ نوکلئوتید نزدیک به انتهای ۳' ژن CP مربوط به TuMV شامل منطقه‌ای است که بیش از ۹۵/۵ درصد تشابه نوکلئوتیدی با توالی ۱۷ جدایه دیگر این ویروس دارد. آن‌ها نشان دادند که گیاهان آرابیدوپسیس مقاوم تراریخته که دارای این قطعه وارد شده در جهت سنس هستند در برابر هر ۱۷ جدایه مختلف این ویروس که از پنج جنس گیاهی مختلف از تیره Brassicaceae جداسازی شده‌اند از مقاومت مشابهی برخوردارند. همچنین پژوهش‌ها شناسایی siRNA نشان داد که siRNA حاصل از خاموشی ژن CP ویروس مربوط به منطقه ۳۸۰ نوکلئوتیدی حفاظت شده در بالادست نزدیک به انتهای ۳' ژن CP است. همچنین مقاومت حاصل در برابر TuMV در گیاهان توتون تراریخته تنها در گیاهانی شامل شد که دارای منطقه‌های بالادست نزدیک به انتهای ۳' بودند. در واقع تجزیه اختصاصی توالی منطقه انتهایی نزدیک به انتهای ۳' باعث ایجاد مقاومتی با دامنه وسیع علیه تعداد جدایه‌های زیادی از این ویروس می‌شود (Numora et al., 2004) اما باید توجه شود که این نوع مقاومت حاصل از توالی ژن CP شاید توسط گونه هتروولوگوس دیگری شکسته شود. به طور مثال می‌توان

REFERENCES

1. Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 8, 1833-1844.
2. Brodersen, P. & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22, 268-280.
3. Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
4. Ding, S-W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130, 413-426.
5. Farzadfar, S., Ohshima, K., Pourrahim, R., Golnaraghi, A. R., Jalali, S. & Ahoonmanesh, A. (2005). Occurrence of *Turnip mosaic virus* on ornamental crops in Iran. *Plant Pathology*, 54, 261.
6. Ghorbani, S., Shahraeen, N., Dehghanyar, H., Sahandi, A. & Pourrahim, R. (2007). Serological identification and Purification of *Turnip mosaic virus*. (TuMV) in the oil seed rape. *Iranian Journal of Biology*, 20, 61-71.
7. Goldbach, R., Bucher, E. & Prins, M. (2003). Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research*, 92, 207-212.
8. Hu, Q., Niu, Y., Zhang, K., Liu, Y. & Zhou, X. (2011). Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Virology Journal*, 8, 41.
9. Jafari, M., Shams-Bakhsh, M. & Moieni, A. (2016). Reaction of commercial canola varieties and lines against *Turnip mosaic virus* (TuMV) isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52, 147-159.
10. Jan, F.J. Fagoaga, C., Pang, S.-Z. & Gonsalves, D. (2000). A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *Journal of General Virology*, 81, 2103-2109.
11. Jan, F. J., Pang, S. Z., Fagoaga, C. & Gonsalves, D. (1999). *Turnip mosaic potyvirus* resistance in *Nicotiana benthamiana* derived by post-transcriptional gene silencing. *Transgenic Research*, 8, 203-213.
12. Lindbo, J. A. & Dougherty, W. G. (1992a). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 144-153.
13. Lindbo, J. A. & Dougherty, W. G. (1992b) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 189, 725-733.
14. Moloney, M. M., Walker, J. M. & Sharma, K. K. (1989). High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 8, 238-242.
15. Nomura, K., Ohshima, K., Anai, T., Uekusa, H. & Kita, N. (2004). RNA silencing of the introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers broad-spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Phytopathology*, 94, 730-736.
16. Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M. & Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, 9, 73-83.
17. Roohi, L., Zamani, M. R. & Motallebi, M. (2013). Transgenic canola plants harboring beta 1, 3 glucanase (bgnI) gene from *Trichoderma virens* inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Iranian Journal of Biology*, 26, 28-40.
18. Sabokkhiz, M. A., Jafarpour, B., Shahriari, A. & Tarighi, S. (2012). Identification of *Turnip mosaic virus* isolated from canola in northeast area of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 11, 14553-14560.
19. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2100 pp.
20. Savenkov, E. I. & Valkonen, J. P. T. (2001). Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *Journal of General virology*, 82, 2275-2278.
21. Shahraeen, N. (2012). An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology*, 3, 24-28.
22. Shahraeen, N., Farzadfar, S. & Lesemann, D.E. (2003). Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology*, 151, 614-616
23. Simon-Mateo, C. and Garcia, J. A. (2011). Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809, 722-731.
24. Stam, M., Mol, J. N. M. & Kooter, J. M. (1997). Review Article: The Silence of Genes in Transgenic Plants, *Annals of Botany*, 79, 3-12.
25. Vollmann, J. & Rajkan, I. (2009). *Oil crops*. Springer. 548 pp.
26. Waterhouse, P. M. & Upadhyaya, M. N. (1998). Genetic engineering of virus resistance. In: *Molecular biology of rice*. Tokyo: Springer-Verlag, 257-281 pp.

27. Waterhouse, P. M., Graham, M. W. & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13959-13964.
28. Watson, J. M. & Wang, M. (2012). Antiviral resistance in plants. Methods and protocols. Humana Press. 380 pp.
29. Zahedi Tabarestani, A., Shamsbakhsh, M. & Safaei, N. (2010). Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province, *Iranian journal of Plant Protection Science*, 41, 251-259.
30. Zhandong, Y., Shuangyi, Z. & Qiwei, H. (2007). High level resistance to *Turnip mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson) transformed with the antisense NIB gene using marker-free *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. *Plant Science*, 172, 920-929.
31. Zhao, S. & Hao, X. (2010). High level resistance to TuMV (*Turnip mosaic virus*) in transgenic Mustard with the Antisense NIB Gene of the Virus. (2010). *Forth International Conference on Computational and Information Sciences*, 1080-1082.