ویروس‌ها از جمله مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی هستند که تولید جهانی محصولات کشاورزی را بشدت تحت تاثیر قرار می‌دهند و عامل تهدیدکننده امنیت غذایی به‌حساب می‌آیند. بنابراین، کنترل این عوامل بیماری‌زا یکی از چالش‌های مهم کشاورزی و علمی است که نیازمند راهکارهای ابتکاری و پیشرفته برای پاسخ به تقاضای جمعیت در حال رشد دنیا به غذا است. خاموشی ژن با استفاده از روش RNA مداخله‌گر (RNAi) یکی از روش‌های مهم مهندسی ژنتیک در ایجاد مقاومت به بیماری‌های ویروسی در گیاهان است. این روش با تولید RNAهای دو رشته‌ای (dsRNA) و تشکیل کمپلکس خاموشی القاشونده توسط RNA (RISC) باعث خاموش شدن ژن‌های هدف ویروسی شده و بدین ترتیب مقاومت گیاهان در مقابل ویروس‌ها را سبب می‌شوند. در دهه گذشته تعداد زیادی گیاه تراریخته براساس این مکانیسم‌های خاموشی پس ترجمه‌ای تولید شده که برخی از آنها (مانند خربزه درختی و سیب‌زمینی) به مرحله تجاری رسیده‌اند. در این نوشتار یکی از روش‌های تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس PVY سیب‌زمینی با استفاده از RNAi بطور مختصر ارائه شده است.


کـــرج، بلـوار شهید فهمیـــده، مجموعه موسسات تحقیقاتی کشاورزی کشور

تلفن: ۳۲۷۰۹۶۵۲ - ۰۲۶ فکس: ۳۲۷۰۱۰۶۷ - ۰۲۶

صندوق پستی: ۳۱۵۳۵-۱۸۹۷ ۰۲۶ - ۳۲۷۰۳۵۳۶

Shahid Fahmideh Blvd, Karaj, Iran.

Tel: +9826-3270 9652 Fax: +9826-3270 1067

+9826-3270 3536 P.O.Box: 31535-1897

web: www.abrii.ac.ir e-mail: info@abrii.ac.ir

دستورالعمل فنی

# تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) با استفاده از سازه سنجاق‌سری (RNAi)

نویسندگان:

حسن رهنما

رضا پوررحیم

مرتضی ابراهیمی

بسم الله الرحمن الرحيم

# تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به ویروس Y سیب‌زمینی

# (PVY) با استفاده از سازه سنجاق‌سری (RNAi)

حسن رهنما، رضا پوررحیم، مرتضی ابراهیمی

**نوع نشریه:** دستورالعمل فنی
**نام نشریه:** تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) با استفاده از سازه سنجاق‌سری (RNAi)
**نویسندگان:** حسن رهنما، رضا پوررحیم و مرتضی ابراهیمی
**ویراستار علمی:** مسلم بهمن‌کار
**ویراستاران ادبی:** حسن رهنما و عصمت جعفری نژاد
**طراحی:** محمد جداری
**تهیه شده در:** پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
**شمارگان:** ۳۰
**نوبت انتشار:** اول
**سال انتشار:** ۱۴۰۰
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع‌رسانی کشاورزی ۶۰۲۶۹ به تاریخ ۱۴۰۰/۰۶/۲۹ است.

## فهرست مطالب


چکیده ..... ۲
واژه‌های کلیدی ..... ۲
مقدمه ..... ۲
اهمیت اصلاح مولکولی در سیب‌زمینی ..... ۳
ضرورت ایجاد مقاومت به ویروس ..... ۴
ویروس PVY ..... ۵
خاموشی ژن با استفاده از فناوری RNAi ..... ۷
مواد و روش‌ها ..... ۱۲
تهیه مواد گیاهی ..... ۱۲
تهیه ناقل پلاسمیدی RNAi و انتقال آن به اگروباکتریوم ..... ۱۲
تراریختی و باززایی ..... ۱۳
تهیه ریزنمونه و کشت آنها ..... ۱۳
تهیه سوسپانسیون اگروباکتریوم ..... ۱۴
تلقیح ریزنمونه‌ها ..... ۱۵
مراحل واکشت ریزنمونه‌ها تا باززایی گیاهان تراریخته احتمالی ..... ۱۶
مرحله ریشه‌زایی ..... ۱۷
آزمون‌های مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی ..... ۱۸
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ..... ۱۸
بیان ژن در سطح رونویسی ..... ۱۹
آنالیز دورگ‌سازی سادرن ..... ۲۰
تهیه کاوشگر و بررسی آن ..... ۲۰
دورگ‌سازی نقطه‌ای گیاهان تراریخت احتمالی ..... ۲۱
لکه‌گذاری سادرن ..... ۲۴
هضم آنزیمی DNA ژنومی ..... ۲۴
انتقال DNA هضم‌شده به غشا ..... ۲۴
آزمون زیست‌سنجی مقاومت به PVY ..... ۲۶
تلقیح چالشی (challege inoculation) ..... ۲۸
ارزیابی واکنش گیاهان تلقیح شده ..... ۲۹
فهرست منابع ..... ۳۱

## چکیده

یکی از بیماری‌های مهمی که سالانه خسارت‌های اقتصادی بسیاری به کشاورزان کشور وارد می‌کند و منجر به کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌شود، ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) است. امروزه استفاده از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت ناشی از عامل بیماری‌زا، افق‌های جدیدی در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس گشوده است. در این نوشتار به فرایند استفاده از روش خاموشی ژن برای ایجاد مقاومت به PVY اشاره خواهد شد. برای این منظور از یک سازه ژنی RNAi برگرفته از بخش پروتیین پوششی (CP) ژنوم PVY استفاده می‌شود. سازه با استفاده از اگروباکتریوم تومه فاسینس به ریزنمونه‌های میانگره گیاه سیب‌زمینی انتقال داده می‌شود. نوساقه‌های تولید شده در محیط انتخابی حاوی علف‌کش فسفینوتریسین پس از رشد و تکثیر مورد ارزیابی مولکولی قرار می‌گیرند. تراریختی گیاهچه‌ها و بررسی بیان ژن در گیاهان تراریخته با استفاده از آزمون زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و RT-PCR بررسی می‌شود. به منظور تعیین مقاومت گیاهان تراریخته در برابر آلودگی PVY، آزمون زیست‌سنجی صورت می‌گیرد. در نهایت گیاهان تراریخته مقاوم به گلخانه منتقل شده و پس از انجام آزمون‌های مولکولی و زیست‌سنجی تکمیلی، لاین‌های مقاوم معرفی می‌شوند.


**واژه‌های کلیدی:** سیب‌زمینی، مقاومت به ویروس، خاموشی ژن، RNAi، PVY

## مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به علت دارا بودن نشاسته محتوای ویتامینی و پروتیینی زیاد و نیز عملکرد بالا به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع غذایی انسان در دنیا مطرح است. ایران با سطح زیرکشت ۱۵۳۰۰۰ هکتار، عملکرد ۳۰۳۹۲۲ کیلوگرم در هر هکتار و با تولید سالانه ٤٦٥٠٠٠٠ تن یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان سیب‌زمینی در دنیا به شمار می‌آید (FAOSTAT, 2013).

یکی از مهم‌ترین عوامل مخرب بر تولید سیب‌زمینی انواع بیماری‌های گیاهی هستند که در این بین ویروس‌ها اهمیت زیادی دارند (Hameed *et al.*, 2018b). ارقام زراعی سیب‌زمینی نسبت به حدود ٤٠ ویروس مختلف و دو ویروئید حساس هستند (Salazar, 1996). از جمله مهم‌ترین ویروس‌ها می‌توان به ویروس Y سیب‌زمینی (PVY)، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV) و ویروس X سیب‌زمینی (PVX) اشاره کرد که خسارت فراوانی به این محصول وارد می‌کنند (Fletcher, 2012; Hameed *et al.*, 2017;

Steinger *et al.*, 2014) به گونه‌ای که خسارت ناشی از بیماری ویروس Y بسته به رقم سیب‌زمینی، سال و مکان بین ۱۰-۹۰ درصد گزارش شده است (Valkonen, 2007).

در حال حاضر، تنها راه‌حل این مشکل در کشور تولید یا واردات بذرهای عاری از ویروس سیب‌زمینی است که هزینه‌های سنگینی شامل هزینه نیروی متخصص، امکانات و فضای کشت بافتی، گلخانه‌ها یا مزارع بزرگ ایزوله و نیز آزمون‌های شناسایی بذور آلوده از سالم را به همراه دارد. بنابراین، با توجه به عدم وجود منابع مقاومتی مناسب در ارقام سیب‌زمینی، تلاش در جهت ایجاد ارقام مقاوم می‌تواند بسیار سودبخش باشد.

## اهمیت اصلاح مولکولی در سیب‌زمینی

تولید ارقام جدید گیاهی با استفاده با روش‌های اصلاحی سنتی یک فرایند زمان‌بر و بسیار پرزحمت است و تولید یک رقم اصلاح‌شده گاه چندین سال به طول می‌انجامد. چرا که در اصلاح سنتی انتقال مجموعه کاملی از خصوصیات وراثتی انجام می‌شود و هر گونه صفت نامطلوب وارد شده از والدین در طی تلاقی‌های اولیه باید در نسل‌های بعد با دقت کافی حذف شوند. همچنین استفاده از اصلاح ژنتیکی در گیاه سیب‌زمینی (که با روش‌های معمول مانند گرده‌افشانی کنترل شده و دورگ‌گیری انجام می‌شود) به علت مشکلات مربوط به تولیدمثل جنسی و تشکیل بذر، دارای محدودیت است؛ بنابراین روش‌های درون‌شیشه‌ای می‌توانند زمینه مناسبی را برای اصلاح ژنتیکی سیب‌زمینی فراهم کنند (Wenzler *et al.*,1989).

با وجود اهمیت سیب‌زمینی، ژنتیک و وراثت بسیاری از صفات کمی و کیفی این گیاه هنوز شناخته نشده است. این امر اساساً از طبیعت تتراپلوئیدی[1] ژنوم سیب‌زمینی‌های زراعی، درجه بالای هتروزیگوتی[2] و عدم وجود لاین‌های خویش‌آمیخته[3] هموزیگوس[4] یا عدم وجود کلکسیونی از پایه‌های کاملاً شناخته شده ناشی می‌شود. علاوه بر این، عقیمی[5] و تعداد زیاد گامت‌های نوترکیب حاصل از تقسیم میوزی، بار ژنتیکی بالا و پلی‌ژنیک بودن بیشتر صفات و پیچیدگی بیان آنها، اصلاح کلاسیک سیب‌زمینی را دشوارتر کرده است.

1 Tetraploids
2 Heterozygous
3 Inbred
4 Homozygous
5 Sterility

از طرف دیگر در دنیای پیشرفته امروز، مصرف‌کنندگان طالب ارقام جدید سیب‌زمینی با خصوصیات بازارپسندی ویژه‌ای از قبیل سیب‌زمینی‌های ویژه مصرف خانگی، فرآوری یا ارقام قابل قبول با استانداردهای ارگانیک[1] در کنار عملکرد بالا، ارزش غذایی بالا و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند و به همین دلیل بهبود ارقام سیب‌زمینی جهت ایجاد ارقام پایدار با کیفیت بالا، مقاومت به تنش‌های زیستی (آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز) و تنش‌های غیرزیستی (خشکی و شوری)، از موضوع‌های اصلی در برنامه‌های جهانی اصلاح سیب‌زمینی هستند (Visser *et al.*, 2009). با این وجود، به دلایل ذکر شده، وارد کردن چنین صفات زراعی در ارقام سیب‌زمینی با روش‌های اصلاح کلاسیک زمان‌بر بوده و موفقیت‌های محدودی داشته است، به نحوی که حتی بهترین ارقام امروزی که حاصل ده‌ها تلاقی و گزینش دقیق هستند، دارای برخی صفات نامطلوب هم هستند. بنابراین، راه دیگر برای توسعه بیشتر ارقام زراعی سیب‌زمینی، استفاده از روش‌های اصلاح مولکولی و زیست‌فن‌آوری از قبیل هیبریداسیون سوماتیکی، موتاسیون‌ها و انتقال ژن در کنار اصلاح کلاسیک است (Beaujean *et al.*, 1998). با استفاده از روش‌های اصلاح مولکولی و به ویژه انتقال ژن (برخلاف روش‌های سنتی اصلاح) می‌توان از هر منبعی، دی.ان.اِ یا به عبارتی ژن موردنظر را جداسازی و جهت انتقال ژن به سیب‌زمینی استفاده کرد (Conner *et al.*, 1997). این در حالی است که با انتقال ژن‌های خاص رمزکننده صفات مطلوب به ارقام یا لاین‌های اصلاحی پیشرفته سیب‌زمینی، از ارزش زراعی آنها کاسته نخواهد شد. همچنین روش‌های اصلاح مولکولی می‌توانند ایجاد ارقام جدید از کلون‌های والدی مطلوب را سرعت بخشند (Jongedijk *et al.*, 1992) که نتیجه‌ای از انتقال مستقیم و مکرر ژن‌های جدید به ارقام موردنظر بدون نیاز به تلاقی‌های بیشتر در طی نسل‌ها است. یکی دیگر از محاسن این روش، انتقال ژن‌های مجزا بدون وجود ژن‌های پیوسته نامطلوب و توانایی ایجاد ترکیب‌های ژنی جدید برای بیان ژن هدف است (Conner *et al.*, 1997).

## ضرورت ایجاد مقاومت به ویروس

بیماری‌های ویروسی و اثرات مخرب آن‌ها بر محصول سیب‌زمینی باعث افت شدید در عملکرد می‌شود. گزارش‌های مختلفی در برآورد میزان خسارت توسط عوامل ویروسی در ایران وجود دارد. در برخی موارد از ۲۰ تا ۱۰۰ درصد محصول از بین می‌رود. در مورد گیاه سیب‌زمینی ویروس‌ها از طریق غده‌ها و حشرات

1 Organic

ناقل انتشار می‌یابند. در شرایطی که حتی کشاورز، برای کشت از غده‌های سالم و عاری از ویروس استفاده کند، ویروس‌ها به واسطه حشرات ناقل از گیاهان آلوده به گیاهان سالم انتقال خواهند یافت. به همین دلیل لازم است هر سال از بذرهای غده‌ای عاری از ویروس که با روش کشت بافت بدست آمده و در محیط‌های کاملاً ایزوله کشت و تکثیر شده‌اند، استفاده شود. این عامل باعث خروج ارز فراوان از کشور می‌شود. متاسفانه روش‌های کلاسیک و سنتی نتوانسته است آن طور که باید در این زمینه موفق باشند. استفاده از روش‌های کشت بافت و تولید مستمر بذرهای مادری عاری از ویروس نیز مستلزم صرف هزینه بسیار است. حتی نگهداری این گیاهان در محیط‌های کاملاً ایزوله و غیر قابل نفوذ نسبت به حشرات ناقل ویروس‌ها، کاری بس دشوار و پرهزینه است.

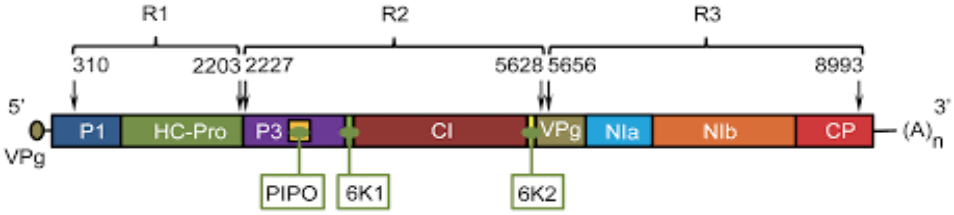
مقاومت به ویروس در گیاهان سیب‌زمینی با روش‌های مختلف (از روش‌های اصلاح نبات سنتی تا روش‌های نوین مهندسی ژنتیک) مورد مهندسی قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که راهکارهای مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به ویروس نسبت به روش‌های اصلاح سنتی مناسب‌تر باشد، چون ماهیت پلی‌پلوئیدی گیاه سیب‌زمینی وارد کردن ژن‌های مقاومت با روش‌های سنتی را بسیار مشکل می‌سازد. به عبارت دیگر، شاید بتوان گفت استفاده از روش‌های پیشرفته زیست‌فناوری برای مقابله با ویروس‌های گیاهی، تنها گزینه موجود است. روش RNAi موثرترین و از جمله جدیدترین روش‌ها برای تولید گیاهان مقاوم به ویروس است.

## ویروس PVY

ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) باعث کاهش شدید عملکرد در بسیاری از محصولات خانواده Solanaceae به ویژه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، توتون (*Nicotiana tabacum* L.)، گوجه‌فرنگی (*Lyco-persicon esculentum* Mill) و فلفل (*Capsicum spp*. L) می‌شود. PVY از جنس *Potyvirus* و یکی از اعضای خانواده *Potyviridae* است. جنس *Potyvirus* از بزرگ‌ترین گروه ویروس‌های گیاهی است که تاکنون شناخته شده است (Revers and Garcia, 2015). انتقال آن‌ها به آسانی با شیره گیاهی، بیشتر توسط شته‌ها به صورت ناپایا و برخی در بذر انجام می‌گیرد.

ژنوم ویروس PVY از نوع RNA تک رشته‌ای است و کل ژنوم به صورت یکپارچه خطی و در حدود ۱۰ kb است (شکل ۱). این ویروس مانند هر ویروس دیگر دارای سویه‌های مختلف است. ایزوله‌های مختلف PVY بسته به قدرت بیماری‌زایی و واکنش میزبان به انواع مختلفی از جمله نوع معمولی ($PVY^{O}$)،

نکروتیک ($PVY^N$)، نواری نقطه‌ای ($PVY^C$)، گروه Z ($PVY^Z$) و $PVY^{NTN}$ طبقه‌بندی می‌شوند (Revers and Garcia, 2015). علائم بیماری بسته به سویه ویروس و ارقام مختلف سیب‌زمینی می‌تواند تحت تاثیر دما و دیگر شرایط محیطی متفاوت باشد. عمده‌ترین علایم شامل موزاییک خفیف و لکه‌لکه شدن در برگ‌ها، نکروزه شدن رگبرگ‌ها و غده‌ها است.




**شکل ۱**- ساختار یکپارچه ژنوم PVY و عملکرد پروتیین‌های تولید شده از آن (به طول ۹/۷ kb). ژنوم شامل دو ناحیه غیر رمزشونده در چارچوب باز خواندنی (NCR).P1: پروتیین P1، HC-Pro: پروتیین کمکی پروتییناز، P3: پروتیین P3، CI: پروتیین دربرگیرنده رشته، NIa: پروتیین دربرگیرنده هسته‌ای، VPg: پروتیین پیوسته به ژنوم، NIb: پروتیین b دربرگیرنده هسته‌ای، CP: پروتیین پوششی. CP و NCR (3′UTR) به منظور ساخت سازه و طراحی پرایمر انتخاب شدند.

امروزه در دنیا از فن‌آوری‌های نوینی همانند خاموشی ژن با روش RNA مداخله‌گر (RNA interference: RNAi) جهت رفع مشکلاتی از قبیل ویروس Y سیب‌زمینی استفاده می‌شود. در این روش با بهره‌گیری از مکانیسم خاموشی پس از رونویسی (PTGS) با طراحی سازه ژنی دارای قطعات همسو[1] و پادسو[2]، مشابه با بخشی از ژنوم خود ویروس که پس از رونویسی حالت سنجاق‌سری به خود می‌گیرند، می‌توان ژن‌های ویروس را در سطح رونویسی خاموش نموده و مانع از تکثیر ویروس شد.

در این راستا پژوهش‌های متعددی در رابطه با ایجاد مقاومت به ویروس انجام شده است. همسانه‌سازی ژن پروتیین پوششی سویه نکروتیک ویروس Y سیب‌زمینی تحت کنترل پیشبر CaMV35S در ناقل ژنی pBin19 و انتقال آن به گیاه توتون با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens*، منجر به تولید گیاهان تراریخته‌ای شد که آزمون رونوشت‌برداری برگردان (RT-PCR)، وجود رونوشت RNA از تراژن در لاین‌های تراریخت را تایید کرد (پوررحیم و همکاران، ۱۳۸٤).

1 Sense
2 Anti-Sense

همچنین گزارش شده است که بهره‌گیری از روش‌های مختلف خاموشی ژن و استفاده از ژن رمزکننده پروتئین پوششی (CP) ویروس، باعث ایجاد مقاومت به ویروس زرد نکروتیک رگبرگ چغندرقند (BNYVV) می‌شود (نیازی و همکاران، ۱۳۸٤). به علاوه، استفاده از قطعات پروتیین پوششی ویروس X سیب‌زمینی در سازه RNAi منجر به ایجاد مقاومت به ویروس PVY در ارقام تراریخت سیب زمینی شده است (Fateri Rezvani *et al*., 2016).

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

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

## خاموشی ژن با استفاده از فناوری RNAi

خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS)[1] مجموعه‌ای از فرایندهایی است که با تجزیه mRNA مانع بیان ژن می‌شوند. PTGS در موجوداتی که حامل یک تراژن بوده، یا با ویروس آلوده شده و یا با RNAی خارجی تیمار شده بودند به صورت کاملاً اتفاقی کشف شد. بعد از آن RNA مداخله‌گر یا RNAi در نماتد

1 Post Translation Gene Silencing

*Caenorhabditis elegans* و فرونشاندن ژن[1] در قارچ‌ها (Cogoni *et al*., 1996; Fire *et al*., 1998) گزارش شد. به‌طور کلی از آنجا که خاموشی ژن در سطح mRNA انجام می‌شود به این مکانیسم خاموشی پس از رونویسی می‌گویند. خاموشی RNA ابتدا در گیاهان اطلسی تراریخته با هدف تغییر رنگ دیده شد. یک تراژن با هدف افزایش بیان چالکون سنتاز (آنزیم دخیل در تولید رنگدانه آنتوسیانین)، طراحی و برای افزایش تولید رنگدانه به گیاه اطلسی وارد شد. در بیش از ٤٠ درصد گیاهان تراریخته به‌طور غیر منتظره‌ای، گل‌های ظاهر شده سفید یا دارای طیف رنگی غیر از رنگ ارغوانی بودند (Paddison *et al*., 2002; Fire *et al*., 1998). این فنوتیپ‌ها خاموشی یا بازدارندگی را نه تنها برای تراژن، بلکه برای نسخه‌های ژن داخلی چالکون سنتاز نیز نشان می‌دادند. این پدیده که به هم‌بازدارندگی[2] معروف شد پس از آن در گستره وسیعی از گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و جلبک‌ها شناسایی شد (Paddison *et al*., 2002; Fire *et al*., 1998). از جمله معایبی که استفاده از بازدارندگی RNAی پادسو[3] داشت این بود که این روش بطور دائمی منجر به از دست دادن ژن هدف نمی‌شد و اغلب یک بازدارندگی ضعیف ایجاد می‌کرد (گورو، ۲۰۰۰). بنابراین، دانشمندان را برآن داشت تا به دنبال یافتن روش‌های دیگر خاموشی ژن باشند.

در پژوهش دیگری مشاهده شد که RNAی دو رشته‌ای (dsRNA) بیشتر از RNAی پادسو تک رشته‌ای، در تحریک تجزیه توالی خاص mRNAی ژن مورد هدف در *C. elegans* موثر بوده و توانایی آن در خاموشی ژن ۱۰ برابر بیشتر از تیمار با رشته همسو[4] یا پادسو به تنهایی است (Fire *et al*., 1998). مطالعات بیشتر نشان داد که مکانیسم‌های اساسی PTGS، RNAi و Quelling با هم مرتبط هستند و به نظر می‌رسد از لحاظ تکاملی، مکانیسم حفظ شده‌ای را برای خنثی کردن بیان اطلاعات ژنتیکی نمایش می‌دهند. این طیف وسیع از مسیرهای خاموشی RTGS، RNAi و Quelling به‌طور کلی خاموشی RNA نامیده شده که در بیشتر موجودات یوکاریوتی دیده می‌شوند (Liu, 2010).

در بررسی سازوکارهای مقاومت ویروس‌های گیاهی توسط ویروس‌شناسان مختلف پدیده مشابهی کشف شده است. ژنوم اکثر ویروس‌های گیاهی حاوی RNAهای تک‌رشته‌ای (SSRNA) است. مشخص شد گیاهانی که پروتیین‌های ویروسی را بیان می‌کنند، مقاومت‌شان به ویروس‌ها بیشتر است، اما بعداً معلوم شد که حتی گیاهانی

1 gene quelling
2 co-suppression
3 Antisense
4 Sense

که مناطق غیررمزساز کوتاهی از توالی RNA ویروس را بیان می‌کنند نیز نسبت به ویروس مقاوم‌اند. توالی‌های ویروسی کوتاه تا حدودی می‌توانستند ویروس‌های وارد شده را مورد حمله قرار دهند (Baulcombe, 2004). مقاومت ویروس در گیاهان نیز به RNA پلی‌مرازهای وابسته به RNA (RDR)[1]ها وابسته است. ssRNAهای ویروسی پس از وارد شدن به سیتوپلاسم، از طریق RDRها به RNAهای دورشته‌ای تبدیل می‌شوند. سپس حد واسط‌های دو زنجیره‌ای به عنوان سوبسترا (گهرمایه‌ای) جهت پروتیین شبه‌دیسر عمل نموده که قطعات دو رشته‌ای ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی استانداردی را تولید می‌کنند که در تجزیه ویروس نقش دارند. نتایج مشابهی در خصوص نقش RNA دو رشته‌ای در جلوگیری از بیان ژن در مطالعه بر روی سایر موجودات (شامل قارچ‌ها و حیوانات) بدست آمده است (Baulcombe, 2004).

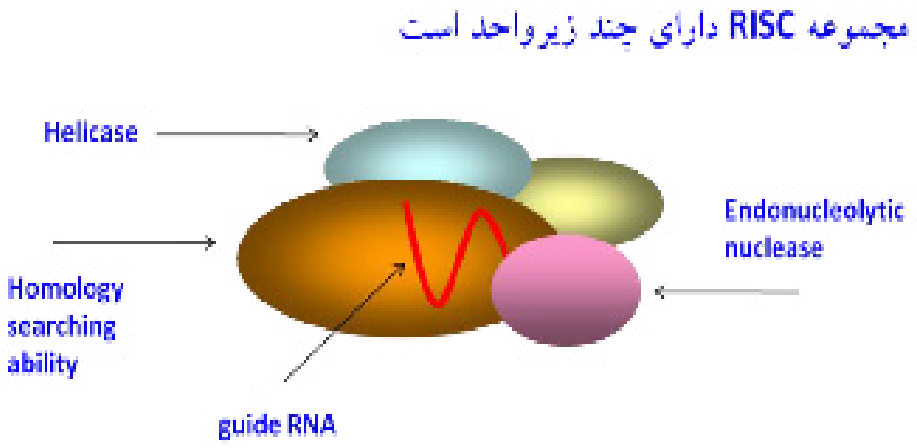
پس از تشکیل miRNA یا siRNAهای ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی توسط پروتیین‌های شبه-دیسر، رشته‌های دوگانه با یک کمپلکس بزرگ ریبونوکلئاز مشارکت نموده و کمپلکس القاکننده خاموشی RNA (RISC)[2] (شکل۲) را به وجود می‌آورند. در طی واکنشی که نیاز به ATP دارد، RISC دوبلکس را باز کرده و سپس RNA همسو آزاد می‌شود. بعد از آن، RISC رشته‌های پادسوی باقی‌مانده را به عنوان راهنمایی برای اتصال به mRNA یا توالی ویروس مورد استفاده قرار می‌دهد که در بیشتر موارد این توالی به عنوان یک آنتی‌کدن (پادرمزینه) tRNA عمل نموده و کدون (رمزینه) mRNA در روی ریبوزوم را تشخیص می‌دهد. در گیاهان رشته‌های پادسو به mRNA هدف متصل شده و RISC نیز معمولاً RNA دو رشته‌ای شده را در وسط محل اتصال می‌شکند. دو نیمه mRNA (یا ویروس) شکسته شده توسط سایر ریبونوکلئازها سلولی مورد تجزیه بیشتر قرار می‌گیرند (شکل ۳) (Baulcombe, 2004).

بنابراین، با استفاده از روش RNA مداخله‌گر (RNAi) که پروتیین‌های پوششی (CP) ویروس‌ها را هدف‌گیری می‌نماید، می‌توان بطور همزمان یک یا چند سویه ویروس را هدف‌گیری کرد.

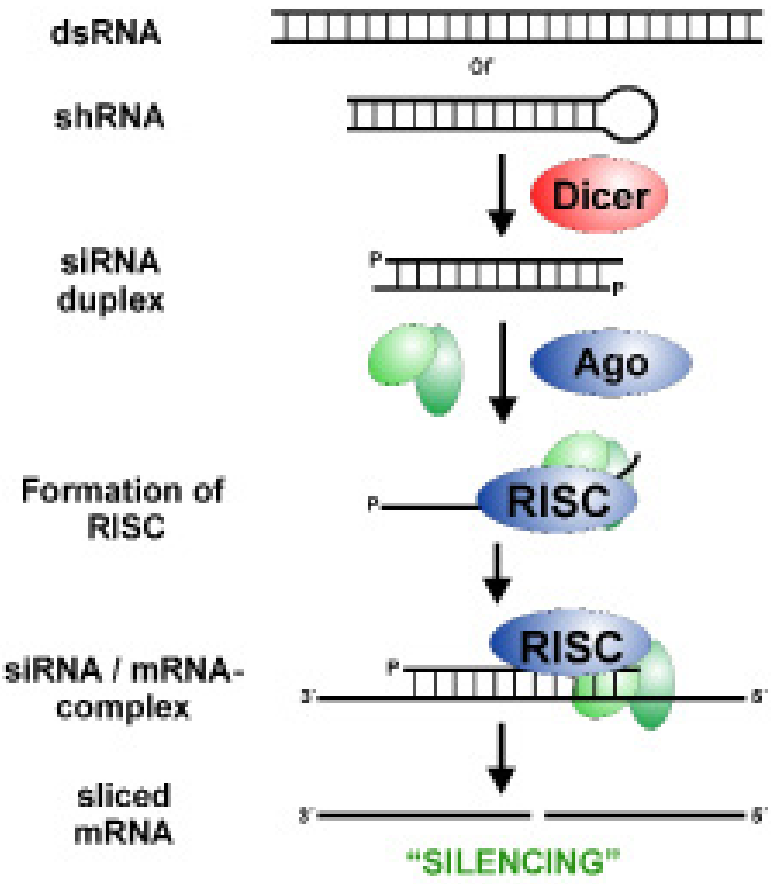
از این روش برای ایجاد مقاومت گیاه سیب‌زمینی به انواع ویروس‌ها استفاده شده است. به عنوان مثال، برای ایجاد مقاومت به انواع ویروس‌هایی مانند PVY (Missiou *et al.*, 2004)، PVY و PLRV (Chung *et al.*, 2013) و PVY، PVX و ویروس S سیب‌زمینی (Hameed *et al.*, 2017) (PVS) و از این راهکار برای تجاری‌سازی سیب‌زمینی‌های تراریخته مقاوم به ویروس در برخی کشورها استفاده شده است (Mathur *et al.*, 2017).

1 RNA dependent RNA polymerase

2 RNA- induced silencing complex




**شکل ۲**- RISC یک مجموعه چند پروتیینی شامل بخش اتصال به RNA و یک بخش شبه RNase H است. این مجموعه با هدایت siRNA، مولکول‌های mRNA دارای توالی مکمل را شناسایی و برش می‌دهد. هدایت RISC به سمت RNA هدف بصورت اختصاصی و وابسته به توالی است.

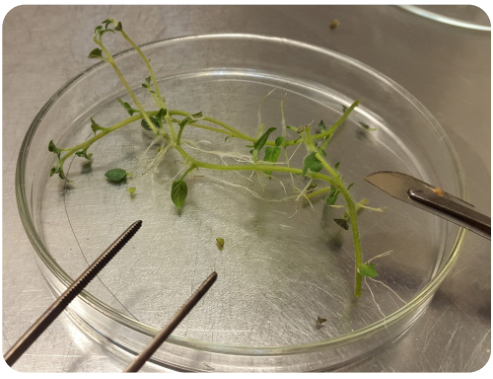



**شکل ۳**- مدلی برای جلوگیری از بیان ژن توسط RNA. siRNAهای دو رشته‌ای بوجود آمده تحت فعالیت RNA پلیمراز، توسط آنزیم DICER (یا پروتئین‌های شبه DICER) در توالی‌های ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی که siRNA نامیده می‌شود، انجام می‌گیرند. RISC به همراه siRNA (با آزاد کردن ATP) یکی از رشته‌های RNA را آزاد می‌کند. رشته RNA باقی‌مانده به عنوان یک راهنما عمل نموده و کمپلکس را به مولکول RNA هدف هدایت می‌کند. RNA هدف توسط RISC ریبونوکلئاز بریده می‌شود و محصولات حاصل توسط سایر ریبونوکلئازها بریده می‌شود (https://www.gene-quantification.de/rnai.html).

# مواد و روش‌ها

## تهیه مواد گیاهی

از آنجا که کشت بافت و انتقال ژن در سیب‌زمینی وابسته به رقم است، این دستورالعمل برای رقم مارفونا تدوین شده است که می‌تواند با اصلاحاتی برای سایر ارقام سیب‌زمینی هم قابل استفاده باشد. به منظور تکثیر گیاهچه‌های درون شیشه‌ای (شکل ٤)، ریزنمونه‌های تک یا دو گرهی در محیط کشت تکثیر حاوی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) به علاوه سه درصد ساکارز، pH ۵/۷، در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی (با شدت ٤٠٠٠ لوکس) و هشت ساعت تاریکی تکثیر می‌شوند.



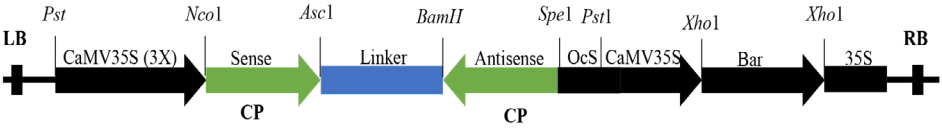
**شکل ٤**- مرحله تکثیر گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سیب‌زمینی (راست) و ریزنمونه‌گیری از آنها (چپ) تحت شرایط استریل

## تهیه ناقل پلاسمیدی RNAi و انتقال آن به اگروباکتریوم

در این روش از سازه خاموشی ژن RNAi با هدف ایجاد مقاومت به PVY استفاده می‌شود. در این سازه بخشی از توالی رمز پروتیین پوششی PVY (CP) به طول ۳۲۰ جفت باز به صورت همسو[1] و پادسو[2] در دو طرف یک قطعه اینترون (۳۸۹ جفت بازی ژن gus)

1 Sense
2 Antisense

در ناقل پلاسمیدی pCAMBIA3300 حاوی ژن نشانگر انتخابی bar همسانه‌سازی شود. سازه پلاسمیدی RNAi حاصل با روش انجماد و ذوب (Sambrook and Russell, 2001) به اگروباکتریوم سویه AGL1 منتقل شود. این پلاسمید حاوی ژن bar رمزکننده آنزیم فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (PAT, bar)، پیش‌بر و پایان‌بر ویروس موزاییک کلم (CaMV 35S) است (شکل ۵).




**شکل ۵**– قطعه T-DNA در پلاسمید pCAMRNAiCP. توالی‌های مرزی سمت راست (RB)، توالی‌های مرزی سمت چپ (LB)، ژن فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (bar)، پیشبر CaMV35S (3X)، قطعه همسو و پادسو PVY CP، اینترون SPS (Spacer)، پایان‌دهنده اکتوپین سینتاز (′OCS3)، *Pst*I، *Nco*I، *Asc*I، *BamH*I، *Spe*I، *Xho*I آنزیم‌های برشی.

## تراریختی و باززایی

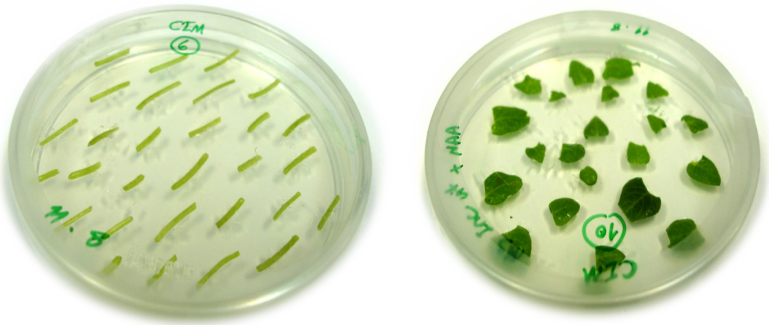
### تهیه ریزنمونه و کشت آنها

گیاهچه‌های سه تا چهار هفته‌ای برای تهیه ریزنمونه جهت تراریختی و باززایی مناسب هستند. ریزنمونه میانگره به طول چهار تا شش میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگی با ابعاد تقریبی ۵×۵ میلی‌متر (شکل ٦) پس از جداسازی به مدت سه روز در محیط القای کالوس (پیش‌کشت) (جدول ۱) کشت و ریزنمونه‌ها به مدت دو روز در اتاقک رشد با دمای ۲۲-۲٤ درجه‌سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت تحت نور لامپ‌های فلورسنت سفید (با شدت ٤۰۰۰ لوکس) نگهداری شوند.

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

| محیط | هورمون (mg/l) | | | آنتی بیوتیک (mg/l) | عامل انتخاب (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| | GA3 | TDZ | NAA | سفوتاکسیم | PPT |
| القای کالوس (پیش کشت) | ۲ | ۲ | ۰/۰۲ | - | - |
| انتخابی و باززایی | | | ۰/۰۲ | ۲۵۰ | ۱/۵ |
| تکثیر | | | | ۱۰۰ | |

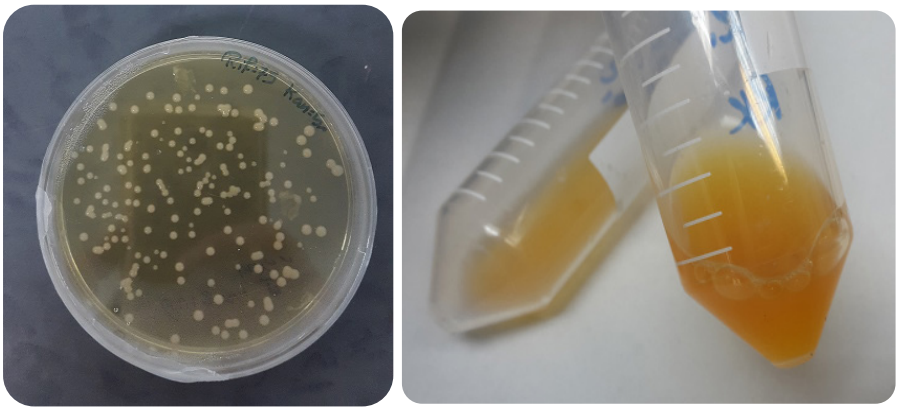
در تمام محیط‌ها، نمک‌ها و ویتامین‌های محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با سه درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار گیاهی و pH ۵/۷ به عنوان محیط پایه استفاده شد.



**شکل ٦**– ریزنمونه‌های میانگره (چپ) و برگی (راست) سیب‌زمینی

## تهیه سوسپانسیون اگروباکتریوم

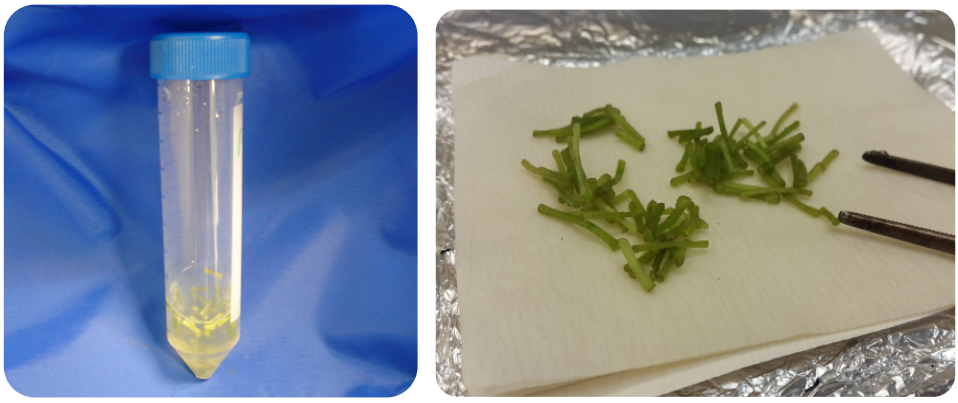
یک کلنی از کشت جامد اگروباکتریوم (شکل۷) حاوی پلاسمید pCAMRNAiCP حامل ساختار سنجاق‌سری CP و ژن bar در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین (از هر کدام ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری به صورت شبانه کشت شود (شکل ۷). کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گیرند تا زمانی که OD٦۰۰ باکتری به ۰/٦ تا ۰/۸ برسد. این سوسپانسیون باکتری آماده استفاده در تراریختی سیب‌زمینی است.



**شکل ۷**- کشت یک کلنی باکتری از محیط کشت جامد (چپ) در محیط مایع LB (راست) و رشد شبانه آن

## تلقیح ریزنمونه‌ها

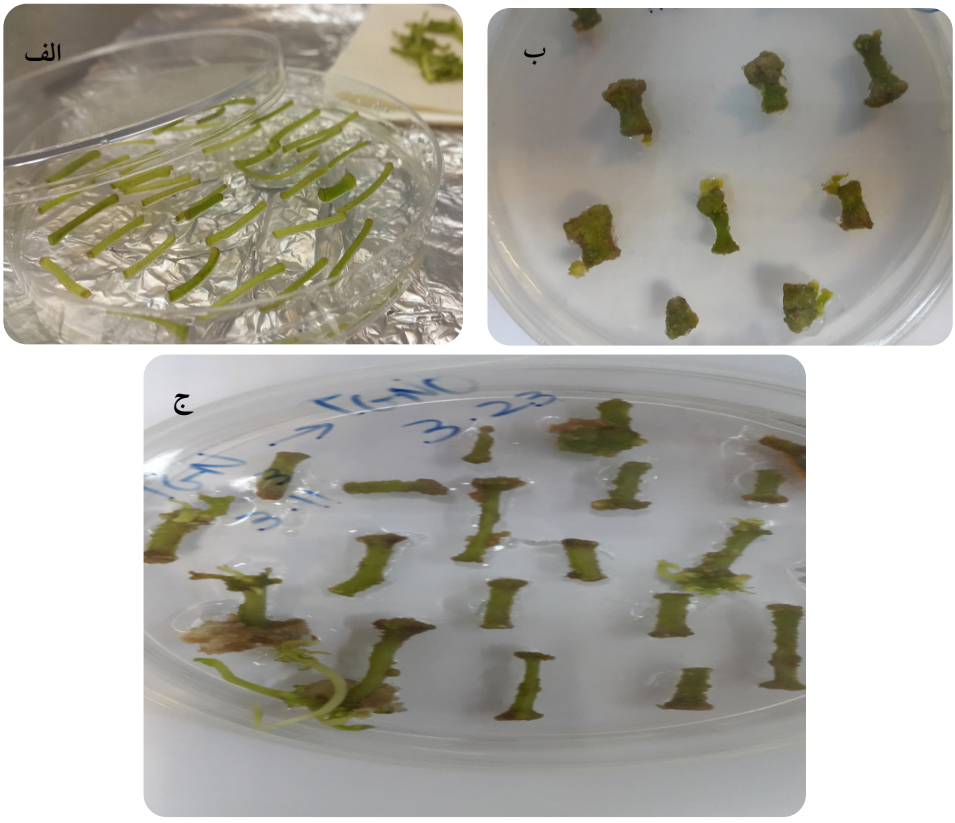
ریزنمونه‌ها از محیط پیش‌کشت به فالکون حاوی سوسپانسیون اگروباکتریومی منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه تلقیح شوند (شکل ۸). بعد از انجام تلقیح ریزنمونه‌ها پس از خشک شدن سطحی بر روی کاغذ صافی استریل دوباره به مدت دو روز (جهت هم‌کشتی) به محیط القای کالوس منتقل شده و سپس به محیط انتخاب و باززایی انتقال یابند.



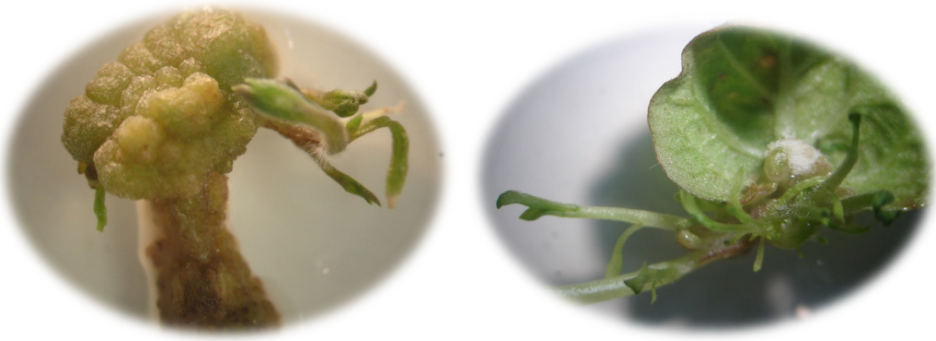
**شکل ۸**- مراحل تلقیح ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری (چپ) و خشک کردن سطحی آن‌ها بر روی کاغذ صافی استریل (راست)

## مراحل واکشت ریزنمونه‌ها تا باززایی گیاهان تراریخته احتمالی

ریزنمونه‌های تلقیح شده پس از دو روز دوره هم‌کشتی در محیط پیش‌کشت به محیط انتخاب (جدول ۱) حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (جهت حذف باکتری) و عامل انتخاب (علف‌کش PPT) منتقل شوند. به منظور کنترل مناسب اگروباکتریوم و جلوگیری از آلودگی پیشنهاد می‌شود حداقل هر هفت روز یکبار ریزنمونه‌ها در محیط تازه واکشت شوند. پس از حدود دو هفته، در انتهای ریزنمونه‌ها کالوس‌ها ظاهر شده و به دنبال آن (در طی حدود دو ماه) باززایی و تولید گیاهچه‌های باززا شده مشاهده خواهد شد (شکل‌های ۹ و ۱۰).




**شکل ۹-** مراحل باززایی گیاهان تراریخته احتمالی: (الف) هم‌کشتی، (ب) شروع تولید کالوس در انتهای ریزنمونه‌ها و (ج) باززایی گیاهچه‌های احتمالی تراریخته در محیط انتخابی



**شکل ۱۰**- نمایی نزدیک‌تر از باززایی گیاهچه‌ها از ریزنمونه میانگره (چپ) و برگ (راست)

### مرحله ریشه‌زایی

گیاهچه‌های باززاشده وقتی به طول حدود دو سانتی‌متر رسیدند، از قاعده قطع شده و به ظروف شیشه مربایی (یا ارلن) حاوی محیط کشت ریشه‌زایی (جدول ۱) منتقل شوند. به تدریج ریشه‌ها در قاعده گیاهچه‌ها ظاهر خواهند شد (شکل ۱۱). پس از ریشه‌دهی گیاهچه‌های حاصل به خاک (ترکیبی با نسبت برابر از پیت و پرلیت) منتقل شوند.

**شکل ۱۱**- ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط درون‌شیشه‌ای (الف) و انتقال آن‌ها به خاک (ب)

## آزمون‌های مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی

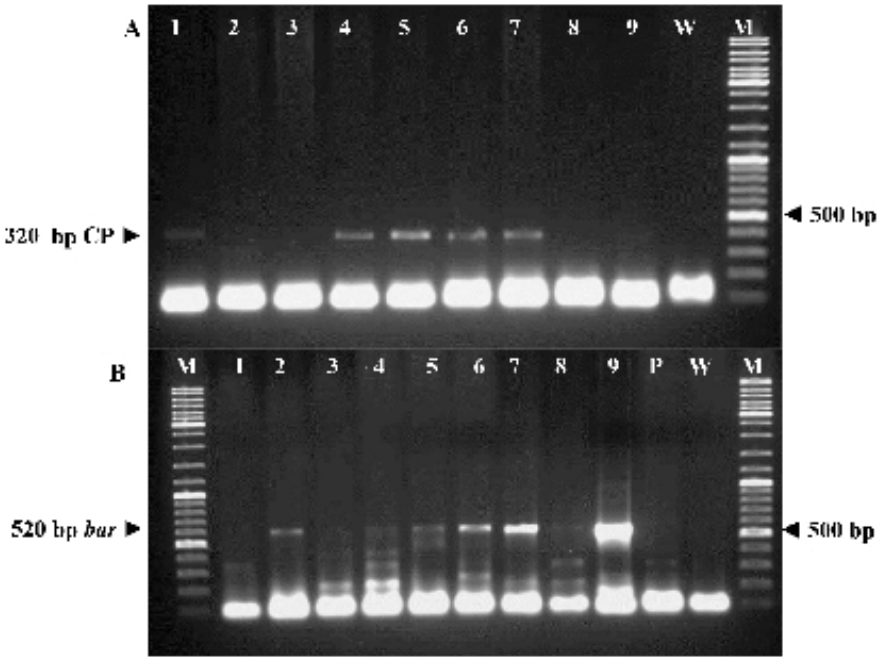
### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور بررسی اولیه و انتخاب لاین‌های تراریخته، DNA از گیاهان (پیوست ۱) باززا شده در محیط انتخاب استخراج و با استفاده از سه جفت آغازگر اختصاصی از بخش‌های همسو و پادسوی سازه رمزکننده پروتیین پوششی ویروس PVY–CP، بخش اینترون (SPS) بین قطعه همسو و پادسو و ژن نشانگر انتخابی bar واکنش PCR انجام شود (جدول ۲).

**جدول ۲**– آغازگرهای ژن bar، قطعه همسو و پادسو ژن CP، قطعه اینترون یا spacer و ژن Tubulin به عنوان کنترل داخلی (Housekeeping gene)

| اسم پرایمر | ناحیه تکثیرشونده | توالی | |
|---|---|---|---|
| CP PVY (sense) | Coat protein | F | 5'-CCATGGAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAG-3' |
| | | R | 5'-GGCGCGCCAATGCACCAAACCATAAGC-CCATG-3' |
| CP PVY (antisense) | Coat protein | F | 5'-ACTAGTAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAG-3' |
| | | R | 5'-GGATCCAATGCACCAAACCATAAGCCCATG -3' |
| SPS | Spacer | F | 5'-GGT GAC CAT GGG GCG CGC CCA ATC GAT GAT TTT AAA T-3' |
| | | R | 5'-CGC GAG GTC ACC ACT AGT TAA TTA AGC TGA GG-3' |
| bar | Selectable marker | F | 5'-CTCGGAGTCAAATCTCGGTGACGGG-3' |
| | | R | 5'-CGAGTCTACCATGAGCCCAGAACG-3' |
| Tubulin | Housekeeping gene | F | 5'-GCTTTCAACACCTTCCTTCAG-3' |
| | | R | 5'-GGGGCGTAGGAGGAAAGC-3' |

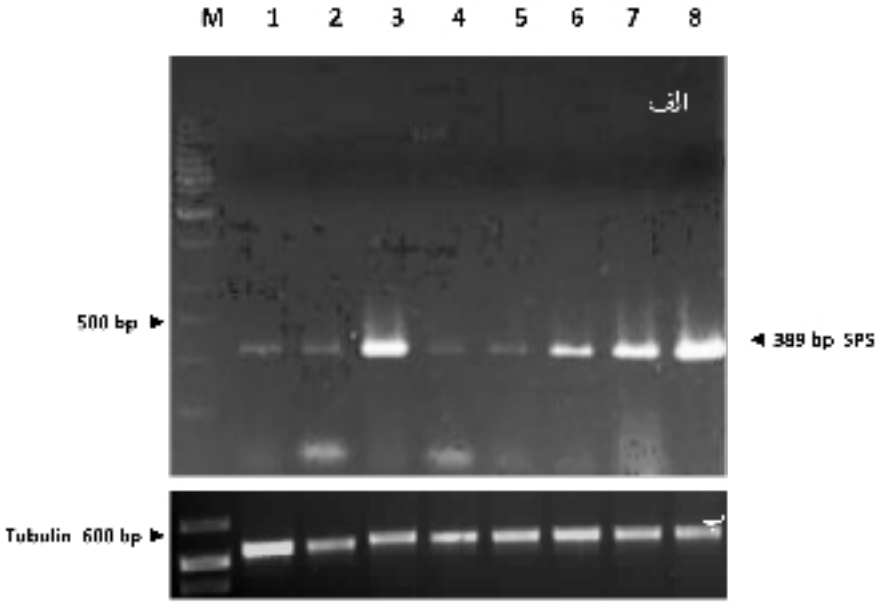
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA گیاهان تراریخته با جفت آغازگرهای قطعه spacer (SPS) و ژن نشانگر انتخابی bar، قطعاتی با اندازه‌های ۳۸۹ و ۵۲۰ (شکل ۳) جفت بازی تکثیر خواهد کرد؛ بدیهی است که این قطعه‌ها نباید در گیاهان غیرتراریخته تکثیر شوند (شکل ۱۲).




**شکل ۱۲**– نتایج آزمون PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان سیب‌زمینی تراریخته احتمالی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن PVY CP (الف) و bar (ب)؛ M، نشانگر DNA ladder mix (شرکت Roche)، آب، P–، گیاه غیرتراریخته، چاهک یک تا نه گیاهان سیب‌زمینی تراریخته.

## بیان ژن در سطح رونویسی

به منظور بررسی بیان ژن در سطح رونویسی، بعد از استخراج RNA کل از گیاهان سیب‌زمینی با استفاده از روش ترایزول (GibcoBRL, Carlsbad, California) آزمون RT–PCR انجام می‌شود (پیوست ۲). ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (Roche, Mannheim, Germany) و آغازگر oligo $(dT)_{15}$ انجام شود و سپس واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه اینترون (SPS) و ژن توبولین (tubulin) به عنوان کنترل داخلی گیاه به منظور کنترل کیفی و کمی نمونه‌های RNA استخراجی انجام گیرد. این آزمون نشان دهنده کارایی سازه ژنی و بررسی میزان بیان ژن در سطح mRNA است (شکل ۱۳).



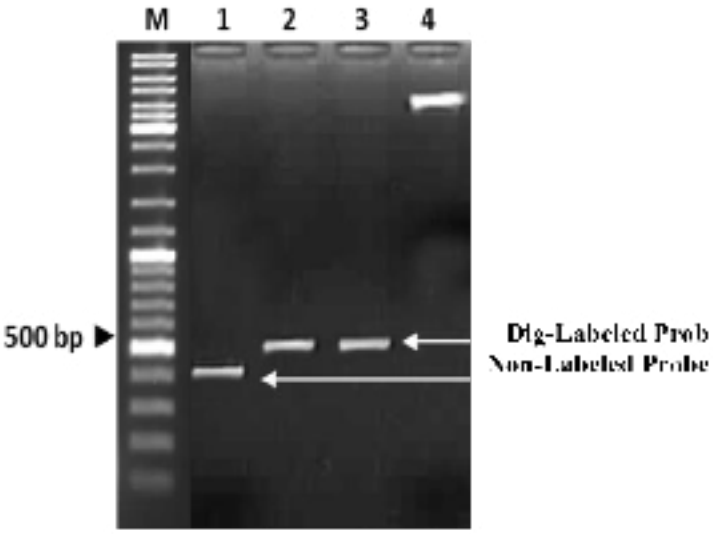

**شکل ۱۳**- آزمون RT-PCR نیمه‌کمی بیان قطعه SPS اینترون بین قطعه همسو و ناهمسو. الکتروفورز محصول واکنش RT-PCR بر روی RNA هشت گیاه سیب‌زمینی تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن SPS (الف). M: DNA ladder mix (شرکت Roche)، (ب)، الکتروفورز محصول RT-PCR با آغازگر اختصاصی ژن توبولین به عنوان کنترل داخلی به منظور کنترل کمی و کیفی RNA نمونه‌های لاین‌های مختلف سیب‌زمینی.

## آنالیز دورگ‌سازی سادرن

### تهیه کاوشگر و بررسی آن

با استفاده از سیستم نشان‌گذاری DIG1 کاوشگر اختصاصی ژن‌های RNAi با کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany) تهیه شود. نشاندار کردن کاوشگر با DIG، طبق دستورالعمل کیت و با روش PCR انجام شود. برای تعیین کیفیت و کمیت کاوشگر نشاندار شده، سه میکرولیتر از محصول PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شود.

همان گونه که در شکل ١٤ مشاهده می‌شود به علت وجود DIG در ساختار dNTPase کاوشگر نشاندار شده، وزن مولکولی آن بالاتر از کاوشگر غیرنشاندار است که این امر نشان دهنده درستی کاوشگر است.




**شکل ١٤**– الکتروفورز کاوشگر اختصاصی ژن CP نشاندار شده با DIG به روش PCR labeling در ژل آگارز یک درصد (از محصول PCR، سه میکرولیتر در الکتروفورز بارگذاری شده‌است). M: نشانگر DNA ladder mix (شرکت Roche)؛ ١: کاوشگر غیر نشاندار؛ ٢و٣: کاوشگر نشاندار شده با DIG.

### دورگ‌سازی نقطه‌ای[1] گیاهان تراریخت احتمالی

برای غربال سریع گیاهان تراریخته احتمالی از طریق دورگ‌سازی نقطه‌ای، حدود شش میکروگرم DNA ژنومی از گیاهان PCR مثبت براساس دستورالعمل DIG DNA labeling and detection kit (Roche, Mannheim, Germany) به شرح زیر استفاده شود:

١) DNA با نگهداری در آب جوش (٩٥ درجه‌سانتی‌گراد) به مدت پنج دقیقه تک رشته‌ای شده و بلافاصله تیوب‌ها در یخ قرار گیرند.

1 Dot blotting

۲)DNA روی غشا نایلونی دارای بار مثبت[1] (Roche, Mannheim, Germany) دورگ‌سازی شده و غشا به مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۱۲۰ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری تا DNA روی آن تثبیت شود.

۳) غشا در لوله مخصوص دورگ‌سازی حاوی محلول پیش‌دورگ‌سازی (محلول دورگ‌سازی بدون کاوشگر) قرار گرفته و سپس لوله حاوی غشا در دستگاه انکوباتور دورگ‌سازی با دمای ۵۳ درجه‌سانتی‌گراد و حرکت دورانی ۱۲ دور در دقیقه به مدت یک ساعت نگهداری شود.

٤) محلول دورگ‌سازی حاوی کاوشگر اختصاصی ژن CP نشاندار شده با DIG در بن‌ماری ٦٨ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شده تا کاوشگر تک رشته‌ای شود.

۵) پس از خالی کردن محلول پیش‌دورگ‌سازی، محلول دورگ‌سازی حاوی کاوشگر تک‌رشته‌ای در لوله دورگ‌سازی اضافه شده و در دستگاه آون دورگ‌سازی با دمای ۵۳ درجه‌سانتی‌گراد به طور شبانه و با حرکت دورانی ۱۲ دور در دقیقه نگهداری شود (١٤-١٢ ساعت).

٦) پس از اتمام مدت دورگ‌سازی، محلول دورگ‌سازی از لوله خالی شده (در دمای ۲۰- قابل نگهداری برای آزمایش‌های بعدی است) و غشا با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول Stringency washing A (پیوست ۳) در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد با حرکت دورانی ۱۲ دور در دقیقه، دو بار هر بار به مدت پنج دقیقه شسته شود. پس از حذف محلول شست‌وشوی A، غشا با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول Stringency washing B (پیوست ۳) در دمای ۵۸ درجه‌سانتی‌گراد با حرکت دورانی ۱۲ دور در دقیقه، دو بار هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شسته شود.

۷) پس از حذف محلول شست‌وشوی B، غشا از درون لوله دورگ‌سازی خارج شده و در یک ظرف مسطح (حداقل هم اندازه غشا) قرار گرفته و سپس با بافر شست‌وشو (پیوست ۳) به مدت دو تا پنج دقیقه در دمای اتاق شست‌وشو داده شود.

۸) پس از حذف بافر شست‌وشو، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بلوک کننده[2] تازه تهیه شده (پیوست ۳) روی غشا اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه با تکان آرام نگهداری شود.

۹) محلول بلوک‌کننده حذف شده و سپس ۲۰ میلی‌لیتر محلول آنتی‌بادی ضد DIG متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز[3] (با نسبت ۱:۵۰۰۰ در محلول بلوک کننده رقیق شود) روی غشا اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه با تکان آرام نگهداری شود.

1 Positively charged nylon membran
2 Blocking reagent
3 Anti-DIG-AP conjugate

۱۰) محلول آنتی‌بادی حذف شده و غشا با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر شست‌وشو دو بار هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با تکان آرام شست‌وشو داده شود.

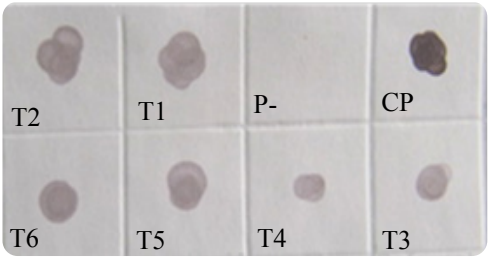
۱۱) پس از حذف بافر شست‌وشو، ۲۰ میلی‌لیتر بافر تشخیص[1] (پیوست ۳) بر روی غشا اضافه شده و در دمای اتاق به مدت پنج دقیقه با تکان آرام نگهداری شود.

۱۲) بافر تشخیص حذف شده و ۱۰ میلی‌لیتر بافر تشخیص حاوی ۲۰۰ میکرولیتر پیش‌ماده رنگی BCIP/ NBT[2] روی غشا اضافه شود و غشای تحت رنگ‌آمیزی در محیط تاریک در دمای اتاق تا زمان ظهور سیگنال‌ها نگهداری شود (دو ساعت).

۱۳) پس از اتمام واکنش رنگ‌زا[3]، بافر حاوی سوبسترای (گهرمایه) رنگی دور ریخته شده و غشا در ۵۰ میلی‌لیتر بافر TE به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق با تکان آرام شست‌وشو و در نهایت از غشا عکس‌برداری شود.

عدم تشکیل لکه توسط DNA گیاه سیب‌زمینی غیرتراریخته نشان‌دهنده عدم وجود توالی هومولوگ با کاوشگر اختصاصی ژن CP در ژنوم خود و غیرتراریخته بودن آن است (شکل ۱۵). ایجاد لکه‌های تیره در سازه نوترکیب pCAMRNAiCP به عنوان شاهد مثبت نشان‌دهنده غلظت مناسب کاوشگر و درستی انجام آنالیز دورگ‌سازی است. تشکیل لکه‌های تیره با DNA گیاهان PCR مثبت نشان‌دهنده دورگ شدن کاوشگر اختصاصی ژن CP با مکمل خود در ژنوم این گیاهان بوده و تایید دیگری بر تراریخته بودن این نمونه‌ها است و می‌توان گفت که این گیاهان حداقل دارای یک نسخه از ژن انتقالی در ژنوم خود هستند.

1 Detection buffer
2 Nitro blue tetrazolium/5- bromo-4- chloro-3-indolyl phosphate
3 Chromogenic reaction




**شکل ۱۵**– آنالیز دورگ‌سازی نقطه‌ای برای گیاهان PCR مثبت و غربال آن‌ها برای آنالیز دورگ‌سازی سادرن. (CP) پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل مثبت. (P-) DNA ژنومی گیاه شاهد غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی. بقیه بلات‌ها (T) مربوط به DNA ژنومی گیاهان مختلف تراریخته است.

## لکه‌گذاری سادرن

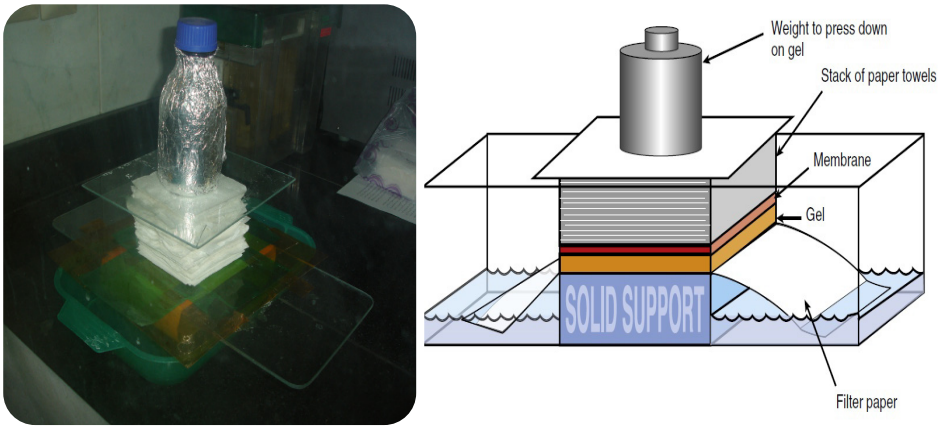
### هضم آنزیمی DNA ژنومی

حدود ۳۰ میکروگرم DNA ژنومی از برگ گیاهانی که دارا بودن ژن در آن‌ها از طریق دورگ‌سازی نقطه‌ای تایید شده (dot مثبت)، گیاه غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی و پلاسمید نوترکیب CP به عنوان شاهد مثبت به وسیله آنزیم‌های *Eco*RI (Roche, Mannheim, Germany) هضم شوند. حدود ۲/۵ واحد آنزیم به ازای هر میکروگرم DNA استفاده شده و واکنش‌های هضمی (با حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر) در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به طور شبانه نگهداری شود.

### انتقال DNA هضم شده به غشا

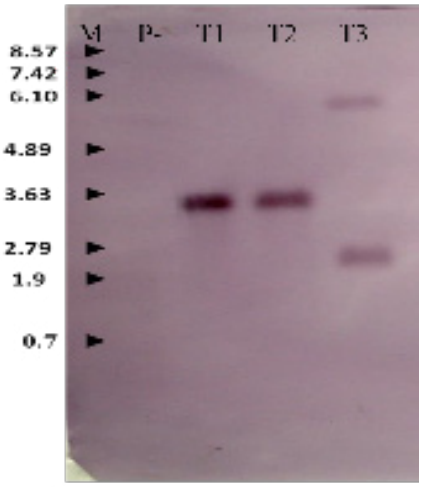
ابتدا کیفیت DNA هضم شده با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شود. DNA ژنومی هضم شده و هضم نشده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شده و در الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ به مدت پنج ساعت تفکیک شوند. ژل آماده شده با محلول HCl ۲۵۰ میلی‌مولاربه مدت ۱۵ دقیقه تیمار شود. پس از شست‌وشوی ژل با آب مقطر استریل، ژل در محلول NaOH ۰/٤ نرمال دو مرتبه و هر مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شود. دوباره ژل با آب مقطر استریل شسته شود. با روش انتقال مویین (Sambrook and Russell, 2001) در هرم سادرن، DNA از ژل به غشای نایلونی دارای بار مثبت (Roche, Mannheim, Germany) انتقال داده شود (شکل ١٦). پس از گذشت ۸–۱۰ ساعت، غشای نایلونی حاوی DNA برداشته شد و با محلول 2X

SSC (پیوست ۳) شست‌وشوی سطحی شده و سپس در آون ۱۲۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شود. پیش دورگ‌سازی، دورگ‌سازی غشا و مراحل بعدی تا عکس‌برداری همانند روش ذکر شده در مورد دورگ‌سازی نقطه‌ای است.




**شکل ۱۶**- انتقال DNA از ژل به غشای نایلونی دارای بار مثبت در هرم سادرن. طرح شماتیک (راست) و واقعی (چپ) اجزای هرم سادرن

همان‌طور که در شکل ۱۷ مشاهده می‌شود، کاوشگر اختصاصی ژن CP با DNA گیاه غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی دورگ نشده و باندی برای آن تشکیل نشده است و این بیانگر عدم وجود قطعه مکمل کاوشگر در ژنوم سیب‌زمینی است. تفاوت در الگوی دورگ‌سازی و اندازه قطعه‌های DNA در سه لاین تراریخته نشان می‌دهد که در دو لاین یک نسخه از ژن CP در یک مکان و در لاین سوم دو نسخه از ژن وجود دارد. در نتیجه دو لاین تراریخته ۱ و ۲ در واقع یک رخداد هستند و لاین سوم با دو نسخه از تراژن، رخداد مستقل دیگری است.




**شـــکل ۱۷**- آنالیـــز دورگ‌ســـازی ســـادرن بـــرای لاین‌هـــای ســـیب‌زمینی تراریختـــه. کاوشـــگر نشـــاندار شـده بـا DIG بـه طـول ۳۲۰ جفـت بـاز بـرای دورگ‌سـازی DNAهـای ژنومـی بـرش داده شـده اسـتفاده شـد. M: خطکـش مولکولـی VII نشـاندار شـده بـا DIG (شـرکت Roche)؛ لاین‌هـای تراریختـه (T). P- گیـاه غیرتراریختـه هضـم شـده بـا آنزیـم *Eco*RI

### آزمون زیست‌سنجی مقاومت به PVY

بـه منظـور بررسـی میـزان مقاومـت لاین‌هـا در مقابـل ویـروس PVR، لازم اسـت آزمون‌های زیست‌سـنجی انجـام شـود. مراحـل انجـام آزمـون بـه شـرح زیر اسـت:

### تهیه منبع ویروس:

سویه N ویروس PVY جدا شده از گیاهان سیب‌زمینی به منظور تکثیر بر روی گیاهان توتون رقم سامسون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) مایه‌زنی مکانیکی شود. بدین جهت بافت گیاهی آلوده به PVY به نسبت یک گرم بافت در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته pH ۷/۲ در یک هاون چینی سرد کاملاً له و عصاره‌گیری شود. عصاره حاصله روی گیاهان جوان چهار تا پنج برگی توتون مایه‌زنی مکانیکی شود.

برای افزایش راندمان انتقال، می‌توان از پودر کاربوراندم ۵۰۰ مش به‌عنوان خراش‌دهنده سلول‌های اپیدرمی سطح برگ استفاده کرد. گیاهان در شرایط گلخانه آزمایشی عاری از حشرات ناقل تحت شرایط دمای ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد، نور طبیعی متناوب ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد نگهداری شوند.

حدود دو هفته پس از تلقیح، آلودگی گیاهان توتون به PVY با استفاده از آزمون الایزا و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی PVY (شرکت بیوربا، سوئیس) مورد بررسی قرار گیرد. بطور اختصار، ابتدا طبق توصیه شرکت سازنده، از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر کربنات (۱۵ میلی‌مولار $Na_2CO_3$، ۳۵ میلی‌مولار $NaHCO_3$، پنج میلی‌مولار $NaN_3$ با pH برابر ۹/۶ تهیه شده و به هر چاهک بشقابک ۱۰۰ میکرولیتر از آن اضافه و یک شب در شرایط چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. شست‌وشوی بشقابک‌ها با بافر شست‌وشو PBS-T (شامل: ۰/۱۳ مولار NaCl، ۰/۰۰۳ مولار KCl، ۰/۰۰۱ مولار $KH_2PO_4$، ۰/۰۰۸ مولار $Na_2HPO_4$، ۰/۰۰۳ مولار $NaN_3$، با pH ۷/٤، حاوی دو درصد PVP–24000، و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween ۲۰) انجام شود. از هر گیاه مورد آزمون یک برگ انتخاب و با استفاده از بافر عصاره‌گیری (شامل هشت گرم NaCl، ۰/۲ گرم $KH_2PO_4$، ۱/۱۵ گرم $Na_2HPO_4$، ۰/۲ گرم KCl، ۲۰ گرم PVP، دو گرم Ov-albumin، ۱/۳ گرم $NaSO_4$، ۰/۲ گرم $NaN_3$ و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween20 در یک لیتر آب‌مقطر، pH برابر ۷/٤ به نسبت ۱:۱۰ (یک گرم بافت با ۱۰ میلی‌لیتر بافر) عصاره‌گیری به عمل آید. در هر چاهک بشقابک الایزا ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ریخته شود. در این مرحله سه چاهک با عصاره حاصله از گیاه سالم (شاهد سالم یا منفی) و دو چاهک با عصاره گیاه آلوده (شاهد آلوده یا مثبت) و دو چاهک با خود محلول بافر عصاره‌گیری (شاهد بافر یا blank) پر شوند. بشقابک‌ها به مدت یک شب در چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شوند. پس از سه بار شست‌وشو مانند مرحله قبل، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز (کانجوگیت) طبق توصیه شرکت سازنده رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر کانجوگیت (2% PVP-24000، $MgCl_2.6H_2O$ 0.001M، Tween-20 0.5ml در PBS با pH ۷/٤) تهیه شده و به هر چاهک اضافه شود. بشقابک به مدت چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. مجددا شست‌وشو در بافر PBS-T انجام و در مرحله بعد محلول سوبسترا شامل یک میلی‌گرم نمک پارانیتروفنیل فسفات در یک میلی‌لیتر بافر دی‌اتانول‌آمین با (pH ۹/۸) تهیه و به چاهک‌ها افزوده شود. میزان جذب نور چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر، ۶۰ دقیقه پس از افزودن محلول سوبسترا به وسیله دستگاه خوانش‌گر الایزا (ELISA reader) مدل BioTek (آمریکا) اندازه‌گیری شود. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری آنها مساوی یا بیش از سه برابر میانگین

میزان جذب مربوط به شاهد سالم (منفی) است، به عنوان نمونه‌های آلوده به ویروس در نظر گرفته شوند. پس از تایید آلودگی گیاهان توتون به ویروس PVY، این گیاهان به عنوان منبع آلودگی ویروس برای ادامه مراحل آزمون انتخاب و در شرایط گلخانه نگهداری شوند.

**تلقیح چالشی (challenge inoculation):**

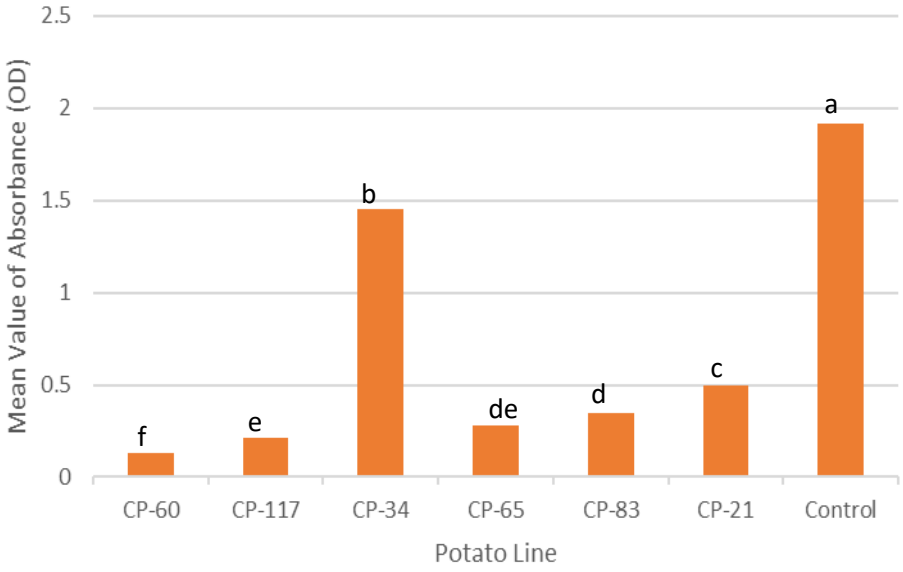
گیاهچه‌های تهیه شده از لاین‌های تراریخته از محیط کشت درون‌شیشه‌ای به خاک پیت‌ماس درون لیوان‌های یک‌بار مصرف پلاستیکی سترون منتقل و پس از نگهداری به مدت دو هفته در شرایط اتاقک رشد با رطوبت بالای ۸۰ درصد جهت سازگاری، به گلخانه منتقل شوند (شکل ۱۸). از هر لاین تعداد حداقل ۱۰ گیاهچه (به عنوان ۱۰ تکرار) در آزمون مورد استفاده قرار گیرد. گلدان‌ها در طول مراحل آزمون در شرایط گلخانه آزمایشی عاری از حشرات ناقل تحت شرایط دمای ۲٤ تا ۲٦ درجه سانتی‌گراد، نور طبیعی متناوب ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد نگهداری شوند. گیاهچه‌های جوان توسط محلول غذایی کود کامل، در فواصل هفته‌ای تغذیه شوند.

گیاهچه‌ها در سن شش تا هفت برگی توسط جدایه PVYn-H مایه‌زنی مکانیکی شوند. برای این منظور ابتدا برگ‌های توتون آلوده به ویروس (منبع آلودگی) به نسبت دو گرم بافت در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار pH ۷/۲ در هاون سرد عصاره‌گیری شوند. برای تسهیل در روند انتقال مکانیکی ویروس، از پودر کاربوراندم ۵۰۰ مش به روش بالا استفاده شود. بلافاصله پس از مایه‌زنی مکانیکی، برگ‌های مایه‌زنی شده توسط آب مقطر استریل به آرامی شسته شوند. گیاهان سیب‌زمینی فاقد قطعه الحاقی و گیاهان سیب‌زمینی رقم اگریا غیرتراریخت تلقیح شده به روش فوق به عنوان شاهدهای مثبت و همچنین گیاهان سیب‌زمینی فاقد قطعه الحاقی، گیاهان سیب‌زمینی رقم مارفونای غیرتراریخته و گیاهان توتون رقم سامسون غیرتراریخت که فقط با بافر خالی مایه‌زنی شده‌اند نیز به عنوان شاهدهای منفی در آزمون در نظر گرفته شوند. به منظور اطمینان از روند انتقال مکانیکی، گیاهچه‌ها پس از ۱۵ روز مجددا همانند مراحل بالا مایه‌زنی مکانیکی شوند. شکل ۱۹ نشان می‌دهد که لاین‌های CP، CP-117، CP-60-٦٥، CP83 و CP-21 مقاومت بالایی نسبت به ویروس PVY از خود نشان داده‌اند. در این میان لاین CP-34 هرچند تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاه کنترل دارد، ولی نسبت به سایر لاین‌های تراریخته مقاومت کمتری از خود نشان می‌دهد.

**شکل ۱۸**- گیاهچه‌های لاین‌های تراریخته مستقر شده در بستر پیت‌ماس و آماده انتقال به گلخانه جهت شروع آزمون تلقیح چالشی

### ارزیابی واکنش گیاهان تلقیح شده

یک ماه پس از اولین مایه‌زنی، گیاهان مایه‌زنی شده از نظر آلودگی به PVY با استفاده از روش DAS-ELISA مورد آزمون قرار گیرند. برای ردیابی ویروس از برگ‌های رویش یافته جدید (بالاتر از ناحیه مایه‌زنی شده) استفاده شود. مراحل آزمون الایزا همانند مرحله قبل است. نتایج آزمون الایزا در فواصل ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از افزودن سوبسترا توسط دستگاه خوانش‌گر الایزا مورد سنجش و ثبت قرار گیرد. گیاهانی که میانگین میزان جذب نوری چاهک مربوط به آنها مساوی یا سه برابر میانگین میزان جذب نوری چاهک شاهد منفی (سالم) است (عدد آستانه یا cut-off)، به عنوان واکنش مثبت (آلوده) در نظر گرفته شود. همچنین علائم ظاهری روی گیاهان مایه‌زنی شده ثبت و یادداشت‌برداری شود.




**شکل ۱۹**- مقایسه لاین‌های مختلف سیب‌زمینی تراریخته در مقابله با PVY با استفاده از آزمون الیزا ۲۱ به روش دانکن در سطح ۵ درصد. غلظت ویروس با اندازه‌گیری OD در طول موج ٤٠٥ نانومتر تعیین شد. Control، گیاه کنترل آلوده شده با ویروس PVY. سایر کدها مربوط به لاین‌های مختلف تراریخته است.

## فهرست منابع

پوررحیم ر، آهون‌منش ع، هاشمی ه، زینلی سی و فرزادفر ش (۱۳۸٤). بررسی مقاومت لاین‌های تراژن توتون *Nicotiana tabacum* cv.Samsun در برابر سه جدایه ایرانی ویروس Y سیب‌زمینی. مجله آفات و بیماری‌های گیاهی، ۷۳ (۲): ۱۷-۳۷.

نیازی ع، ملبوبی مع، معینی ا، جلالی‌جواران م، لهراسبی ت (۱۳۸٤). بیان موقت سازه‌های القا کننده خاموشی ژن در چغندرقند به منظور بررسی مقاومت به ویروس BNYVV. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. مرداد ماه.

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. Nature, 431:356-63.

Beaujean A, Sangwan R, Lecardonnel A and Sangwan-Norreel B (1998) Agrobacterium mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany, 49(326): 1589-9.

Borrelli VMG, Brambilla V, Rogowsky P, Marocco A and Lanubile A (2018) The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9technology. Frontiers in Plant Science, 9: 1245.

Chung BN, Yoon JY and Palukaitis P (2013) Engineered resistance in potato against Potato leafroll virus, Potato virus A and Potato Virus Y. Virus Genes, 47: 86-92.

Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, SELKER EU and Macino G (1996) Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurosporais mediated by a cytoplasmic effector and does notdepend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. EMBO Journal, 15: 3153-3163.

Conner AJ, Jacobs JME and Genet RA (1997) Transgenic potatoes versus ‹traditional› potatoes: what›s the difference? In: McLean CG, Waterhouse PM, Evans G and Gibbs MJ (Eds.) Commercialisation of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Considerations., cooperative research centre for plant science and bureau of resource sciences, Canberra, 23-36.

Di Nicola-Negri E, Tavazza M, Salandr, L and Ilardi V (2010) Silencing of Plum pox virus 5′ UTR/P1 sequence confers resistance to a wide range of PPV strains. Plant Cell Reports, 29: 1435-1444.

FAOATAT (2013) Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. FAO Statistics Division 05 December.

Fateri Rezvani S, Pazhouhandeh M, Ahmadabadi M, Nezami P and Shirzad A (2012) Knock downof P0 of PLRV genome by inducing hpRNA and siRNA of this suppressor of RNA silencing gene and production of transgenic potato resistant plant to this virus. Novin Genetic, 7: 121-126.

Fire A, Siqun XU, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature, 391: 806-811.

Fletcher J (2012) A virus survey of New Zealand fresh, process and seed potato crops during 2010-11. New Zealand Plant Protection, 65: 197-203.

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

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

Hameed A, Tahir MN, Asad S, Bilal R, Van Eck J, Jander G and Mansoor S (2017) RNAi-mediated

simultaneous resistance against three RNA viruses in potato. Molecular Biotechnology, 59: 73-83.
Hameed A, Zaidi SS, Shakir S and Mansoor S (2018) Applications of New Breeding Technologies for Potato Improvement. Frontiers in Plant Science, 9: 925.
Jongedijk E, De Schutter AA, Stolte T, Van den Elzen PJM and Cornelissen BJC (1992) Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. Bioresource Technology, 10: 422-429.
Liu Y (2010) RNA interference Pathways in Filamentous Fungi. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 3849-3863.
Maki-Valkama T, Pehu T, Santala A, Valkonen JPT, Koivu K, Lehto K and Pehu E (2000) High level of resistance to potato virus Y by expressing P1 sequence in antisense orientation in transgenic potato. Molecular Breeding, 6: 95-104.
Mathur V, Javid L, Kulshrestha S, Mandal A and Reddy AA (2017) World cultivation of genetically modified crops: opportunities and risks. inSustainable Agriculture Reviews, ed L. Eric (Cham: Springer), 45-87.
Miroshnichenko D, Timerbaev V, Okuneva A, Klementyeva A, Sidorova T, Pushin A and Dolgov S (2020) Enhancement of resistance to PVY in intragenic marker-free potato plants by RNAi-mediated silencing of eIF4E translation initiation factors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 140: 691-705.
Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M and Tsagris M (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. Molecular breeding, 14: 185-197.
Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 473-497
Paddison P, Caudy A and Hannon G (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 1443-8.
Revers F and Garcia JA (2015) Molecular biology of potyviruses. Advances in Virus Research, 92: 101-99.
Salazar LF (1996) Potato Viruses and their Control. Lima: International Potato Center.
Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk P, Green A and Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNA. Nature, 407: 319-320.
Steinger T, Gilliand H and Hebeisen T (2014) Epidemiological analysis of risk factors for the spread of potato viruses in Switzerland. Annals of Applied Biology, 164: 200-207.
Valkonen JPT (2007) Potato viruses: economic losses and biotechnological potential. In Potato Biology and Biotechnology (D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt and F. Glovers et al. eds), 619-641.
Visser RGF, Bachem CWB, Boer JM, De Bryan GJ, Chakrabati SK, Feingold S, GromadkaR, Ham RCHJ, Van Huang S, Jacobs JME, Kuznetsov Boris, Melo P, De Milbourne D, Orjeda G, Sagredo B and Tang X (2009) Sequencing the potato genome: outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world›s third most important food crop. American Journal of Potato Research, 6: 417-429.
Wenzler H, Migney G, Fisher L and Park W (1989) Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology, 13(1989): 347-354.
Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock R, Nie B and Zhang J (2019) Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. Plant Biotechnology Journal, 17: 1814-1822.

## پیوست ۱

### استخراج DNA از بافت گیاه سیب‌زمینی

برای استخراج DNA در مقیاس کم برای غربال اولیه گیاهان با PCR از روش Dellaporta *et al*. (۱۹۸۳)، به شرح زیر استفاده شود (در مقیاس بزرگ از ۱۰۰ گرم بافت برگی و به همان نسبت از مواد استفاده شود):

۱) چهار گرم از برگ‌های تازه درهاون با استفاده از ازت مایع کاملاً پودر شود.

۲) ۱۶ میلی‌لیتر بافر استخراج ۶۵ درجه‌سانتی‌گراد (جدول زیر) به ازای هفت میلی‌لیتر حجم بافت پودر شده (به ازاء حدود ۱۰–۱۵ میلی‌لیتر حجم بافت پودر شده، ۲۴ میلی‌لیتر بافر استخراج) اضافه شد و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۶۵ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شوند.

جدول: بافر استخراج DNA

| محلول ذخیره | حجم مورد نیاز | غلظت نهایی (میلی‌مولار) |
|---|---|---|
| Tris-HCl, 1M (pH 8) | ۱۰ | ۱۰۰ |
| EDTA, 0.5 M (pH 8) | ۱۰ | ۵۰ |
| NaCl, 2.5 M | ۱۰ | ۵۰۰ |
| $ddH_2O$ | ۷۰ | - |
| SDS | ۱/۲۵ گرم | ۱/۲۵ درصد |
| Sodium Bisulfate | ۰/۳۸ گرم | ۰/۳۸ درصد |

۳) پنج میلی‌لیتر محلول استات پتاسیم پنج مولار به نمونه‌ها اضافه شده و پس از چندین بار سر و ته کردن، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ با تکان آرام نگهداری شوند.

۴) نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع شفاف رویی پس از فیلتر کردن از طریق گاز استریل به فالکون جدید منتقل شود.

۵) معادل دو سوم حجم روشناور، ایزوپروپانل سرد به نمونه‌ها اضافه شده و فالکون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شوند تا DNA رسوب کند.

۶) نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن روشناور، رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو و در دمای اتاق خشک شود.

۷) رسوب DNA در یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شده و پس از انتقال محلول DNA به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری، یک میکرولیترRNase (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آنها افزوده و نمونه‌ها در بن ماری ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شوند.

۸) ۵۰۰ میکرولیتر فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤:۲۵) روی محلول DNA اضافه شده و تیوب‌ها چندین بار سر و ته شوند (۱۰-۵ دقیقه).

۹) نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شوند.

۱۰) روشناور به دقت برداشته شد و به تیوب‌های جدید منتقل شود و پس از اضافه کردن ایزوپروپانل سرد به اندازه هم حجم روشناور، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شوند.

۱۱) نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از حذف روشناور، رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو داده شده و سپس در دمای اتاق خشک شود.

۱۲) رسوب DNA در ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شود و سپس محلول DNA به تیوب جدید منتقل شود. کیفیت و کمیت نمونه‌ها DNA استخراج شده با الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه نوارها با نوارهای DNAλ، تعیین شود و نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شود.

## پیوست ۲

### استخراج RNA

برای بررسی بیان ژن در سطح رونویسی، استخراج RNA گیاهان سیبزمینی با استفاده از روش ترایزول (GibcoBRL, Carlsbad, California) به شرح زیر صورت گرفت.

۱- حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگی در هاون با منجمد کردن در ازت مایع آسیاب شد و نمونه‌های پودر شده به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد.

۲- یک میلی‌لیتر بافر استخراج ترایزول به تیوب‌ها اضافه شد و سپس محتوای تیوب‌ها با دستگاه ورتکس مخلوط شدند.

۳- نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

٤- روشناور حاوی DNA، RNA و پروتیین‌ها به تیوب جدید انتقال داده شد.

۵- ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه شد و تیوب‌ها به مدت ۱۵ ثانیه سر و ته شدند و به مدت پنج دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

٦- نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

۷- از بین سه فاز ایجاد شده در تیوب‌ها، فاز بی‌رنگ بالایی به تیوب جدید انتقال داده شد.

۸- معادل یک دوم حجم روشناور ایزوپروپانل سرد به نمونه‌ها اضافه شد و پس از چند بار سر و ته کردن، نمونه‌ها به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

۹- نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

۱۰- پس از حذف روشناور، رسوب RNA با الکل ۷۵ درصد شست‌وشو داده شد.

۱۱- به رسوب RNA، ۲۰-۵۰ میکرولیتر آب DEPC (با غلظت ۰/۱ درصد) بسته به حجم آن افزوده شد.

۱۲- کیفیت و کمیت RNA به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد ویژه RNA تعیین شد و نمونه‌های RNA در فریزر ۸۰- درجه‌سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

## پیوست ۳

بافرها و محلول‌های مورد نیاز برای لکه‌گذاری سادرن

| محلول دورگ‌سازی (۱۰۰ میلی‌لیتر) | |
|---|---|
| ماده | مقدار |
| بافر Nap* | ۲۰ (میلی‌لیتر) |
| Water | ۳۰ (میلی‌لیتر) |
| BSA | ۱ گرم |
| EDTA (pH 8.0) | ۲۰۰ (میکرولیتر) |
| SDS 20% | ۳۵ (میلی‌لیتر) |
| Water | ۱۵ (میلی‌لیتر) |

| محلول Stringency washing A | |
|---|---|
| ماده | مقدار |
| SSC | ۲X |
| SDS | ۰/۱ درصد |

| محلول Stringency washing B | |
|---|---|
| ماده | مقدار |
| SSC | ۰/X۵ |
| SDS | ۰/۱ درصد |

| ۲۰X SSC | |
|---|---|
| ماده | مقدار (میلی مولار) |
| Tri- Sodium Citrate | ۰/۳ |
| NaCl | ۳ |

| بافر اسید مالیک (pH ۵/۷) | |
|---|---|
| ماده | مقدار (میلی مولار) |
| Maleic acid | ۱۰۰ |
| NaCl | ۱۵۰ |