

بیان افتراقی ژن‌های *HSP90*، *AGO1* و *AGO4* گوجه‌فرنگی در مواجهه با ویروس موزاییک خیار

ندا اصغری^۱، داود کولیوند^{۲*}، امید عینی^۳

۱. کارشناسی ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۳۰)

Differential expression of *HSP90* and *AGO* genes in tomato infected by *Cucumber mosaic virus*

Neda Asghari¹, Davoud Koolivand^{2*}, Omid Eini³

1. Former M. Sc. Student in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

3. Associated Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

(Received: May 30, 2020 - Accepted: Sep. 20, 2020)

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) is a type member of *Cucumovirus* genus in the family *Bromoviridae*. In this research, the expression profile of several genes related to development and methylation was tested in a sensitive variety of tomato infected by CMV-Fny. Tomato inoculation was carried out using a standard isolates of CMV (Fny). To this aim, transcripts of RNA1, RNA2 and RNA3 of CMV were transcribed and then, inoculated using sap inoculation on tobacco plants at the four-leaf stage. After symptoms induction, leaf samples were collected at 7, 14 and 21 days post inoculation (dpi). The virus infection was confirmed by RT-PCR using CMV-CP specific primers corresponding coat protein gene. The expression of several genes related to development and methylation including *Hsp90*, *AGO1* and *AGO4* was tested by real-time PCR. The results showed that the expression of *HSP90* was decreased after infection by CMV compared to healthy plans. In addition, the expression of *AGO1* was increased at 7 and 14 dpi whereas the expression was decreased compared to healthy plans at 21 dpi. The expression of *AGO4* which has the role in plant defense was increased in infected tomato plants at 14 and 21 dpi and *AGO4* expression was decreased compared to healthy plant in 7 dpi. It seems, changes in *AGOs* expression refer to late induction of plant resistance against the virus infection.

Keywords: *Cucumber mosaic virus*, Expression Gene, Real Time PCR.

چکیده

ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus* (CMV)) گونه شاخص جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* است. در این تحقیق بیان برخی ژن‌های مرتبط با رشد و نمو و متیلاسیون در یک رقم حساس گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس موزاییک خیار بررسی شد. برای آلوده‌سازی گوجه‌فرنگی از همسانه‌های آلوده‌گر جدایه استاندارد Fny ویروس موزاییک خیار استفاده شد. بدین منظور پس از تهیه نسخه‌های رونویسی شده از همسانه‌های آلوده‌گر آران‌ای یک، دو و سه ویروس موزاییک خیار، رونوشت‌ها ابتدا روی توتون در مرحله چهاربرگی مایه‌زنی شدند و پس از ظهور علائم و ایجاد آلودگی، عصاره گیاه توتون آلوده به صورت مکانیکی روی گوجه‌فرنگی در مرحله چهاربرگی مایه‌زنی شد. پس از بروز علائم در چندین مرحله از گیاهان آلوده در فاصله‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، نمونه‌برداری از برگ‌های آلوده انجام گرفت. پس از استخراج آران‌ای کل از گیاهان دارای علائم حضور ویروس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس منطبق بر بخشی از ژن پروتئین پوششی تأیید شد. بیان برخی از ژن‌های مرتبط با دفاع و متیلاسیون مانند *HSP90*، *AGO1* و *AGO4* توسط Real Time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان بیان برخی از ژن‌ها مانند *HSP90* در گوجه‌فرنگی‌های آلوده کاهش یافته بود. همچنین بیان ژن *AGO1* در روز هفتم و چهاردهم پس از آلودگی در مقایسه با گیاه سالم افزایش یافت، در حالی‌که در روز ۲۱ پس از آلودگی میزان بیان این ژن نسبت به گیاه سالم کاهش یافت. بیان *AGO4* در گیاهان آلوده به ویروس موزاییک خیار، در روز هفتم نسبت به گیاه سالم کاهش اما در روز ۱۴ و ۲۱ روز پس از آلودگی، افزایش بیان نشان داد. تغییرات بیان ژن در *AGO* احتمالاً می‌تواند ناشی از تأخیر در القای این ژن توسط ویروس در مرحله اول بروز علائم باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزاییک خیار، بیان ژن، Real Time PCR.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L. از گیاهان پرمصرف و شناخته شده در سراسر جهان است که بومی کشور پرو در آمریکای جنوبی است، این گیاه در اواسط قرن شانزدهم به اروپا وارد شده و تا اواخر قرن هجدهم به‌عنوان گیاه زینتی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Mortezaei Nejad & Etemadi 2005). در حال حاضر گوجه‌فرنگی به طور گسترده به‌عنوان مدل تحقیقاتی در بخش‌های مختلف استفاده می‌شود، که نماینده‌ای از خانواده *Solanaceae* است (Wieczorek *et al.*, 2013). طبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (FAO) میزان تولید جهانی گوجه‌فرنگی در سال ۲۰۱۶ در حدود ۱۷۷/۰۴۲/۳۵۹ تن بوده که میزان تولید ایران در این سال ۶/۳۷۲/۶۳۳ تن گزارش شد (Anonymous, 2016).

یکی از عوامل محدودکننده کشت گوجه‌فرنگی بیماری‌های ویروسی است که از بیماری‌های ویروسی مهم گوجه‌فرنگی می‌توان به ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی، ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی و ویروس موزاییک خیار اشاره کرد (Wieczorek *et al.*, 2013). ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*) یکی از ویروس‌های مهم آلوده‌کننده مزارع گوجه‌فرنگی است که متعلق به جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* است (Kouakou *et al.*, 2016). این ویروس باعث بروز علائمی مانند نکروز و موزاییک سبز روشن و تغییر شکل برگ و بندکشی شدن برگ روی گوجه‌فرنگی می‌گردد (Palukaitis *et al.*, 2003). ژنوم ویروس موزاییک خیار از سه قطعه آر‌ان‌ای شامل RNA-1، RNA-2 و RNA-3 تشکیل شده و دارای یک آر‌ان‌ای زیر ژنومی (RNA4) نیز

می‌باشد که از ناحیه ۳' آر‌ان‌ای سه نسخه‌برداری می‌گردد. آر‌ان‌ای یک پروتئین ۱a را رمز می‌کند که جزئی از آنزیم رپلیکاز است که نه تنها در تکثیر بلکه در آلودگی‌های سیستمیک هم نقش دارد (Kim *et al.*, 2008). آر‌ان‌ای دو پروتئین 2a و 2b و آر‌ان‌ای سه پروتئین پوششی (Coat Protein) و پروتئین حرکتی (Movement Protein) را رمز می‌نمایند (Kim *et al.*, 2008). پروتئین 2a به‌عنوان یک RNA dependent RNA polymerase (RdRp) عمل کرده و در همانندسازی ویروس دخالت دارد. پروتئین 2b چندین وظیفه دارد از جمله به‌عنوان بازدارنده خاموشی ژن پس از رونویسی در برابر سیستم دفاعی میزبان عمل می‌نماید (Kim *et al.*, 2008). یکی از مکانیسم‌های مهم و عمده برای مقابله علیه ویروس‌ای گیاهی در گیاهان خاموشی آر‌ان‌ای است. خاموشی آر‌ان‌ای پدیده‌ای است که در آن بیان ژن به‌کمک انواع آر‌ان‌ای مهار می‌شود. خاموشی ژن در دو سطح رونویسی و پس از رونویسی اتفاق می‌افتد اجزای اصلی سیستم خاموش‌کننده آر‌ان‌ای عبارتند از پروتئین‌های ریبونوکلاز (DCL) مانند Dicer، پروتئین AGO و آر‌ان‌ای پلیمراز وابسته به آر‌ان‌ای (RDR) (Ando *et al.*, 2019). یکی دیگر از مکانیسم‌های ژنتیکی دفاعی تنظیم بیان ژن‌ها متیلاسیون است. متیلاسیون افزودن یک گروه متیل روی دی‌ان‌ای یا جایگزینی یک اتم (یا گروه) توسط یک گروه متیل است (Hsu *et al.*, 2010). متیلاسیون می‌تواند در اصلاح فلزات سنگین، تنظیم بیان ژن، تنظیم عملکرد پروتئین و پردازش آر‌ان‌ای دخالت داشته باشد. متیلاسیون دی‌ان‌ای برای تمایز و رشد سلولی ضروری است. علاوه بر این، مشاهده شده است که در برخی موارد متیلاسیون نقش مهمی در بیان ژن دارد (Phillips *et al.*, 2008). تغییر سیتوزین به پنج متیل سیتوزین

AGO4 در بالا دست جایگاه *DCL3* و *RDR2* باعث کاهش انباشت پروتئین *AGO4* می‌شود در حالی که در سمت پایین دست *PoIV* آران‌ای هیچ تأثیری بر پایداری *AGO4* ندارد. که نشان‌دهنده نقش آران‌ای‌های کوچک در پایداری *AGO4* است (Hamera et al., 2016).

گروه دیگری از ژن‌ها Heat shock Protein ها هستند. این ژن‌ها در گیاهان و جانوران حفاظت شده‌اند و نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های دمایی ایفا می‌کنند. ژن *HSP90* فاکتور رونویسی شوک حرارتی (*HSF* Heat shock transcription factors) در تنظیم تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده درگیر است. فاکتور رونویسی شوک حرارتی *HSF*، در سلول‌هایی که تحت تنش نیستند، در فرم منومریک (غیر متصل شونده به دی‌ان‌ای) وجود دارد و به وسیله تنش به فرم تریمر که به پروموتورهای شوک حرارتی متصل می‌شوند تبدیل می‌گردد (Vierling et al., 1991). *HSP90* گروهی از *HSP* ها هستند که چاپرون‌های مولکولی وابسته به ATP و بسیار محافظت شده‌اند که برای توانایی زنده ماندن سلول‌های یوکاریوتی ضروری می‌باشند. با این که ژن از چندین گونه گیاهی جداسازی شده است، اما اطلاعات مربوط به عملکرد و تنظیم آن در گیاهان محدود است (Liu et al., 2004).

در این تحقیق تأثیر آلودگی به ویروس موزاییک خیار در میزبان مهم و اقتصادی گوجه‌فرنگی با بررسی بیان ژن‌های مرتبط در دفاع و متیلاسیون در روزهای مختلف بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تلقیح با ویروس

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار از گیاهان آلوده و سالم انجام شد. بدین منظور رقم Marglobe گوجه‌فرنگی که به ویروس موزاییک

یک تغییر اپی ژنتیکی مهم در دی‌ان‌ای ژنومی است (Bird, 1992). این متیلاسیون سیتوزین با خاموشی ژن همراه است و ژن‌های با پنج متیل سیتوزین فراوان در ناحیه پروموتور خود معمولاً در مرحله رونویسی خاموش می‌شوند (Jones et al., 2001). برخی از ژن‌هایی که تحت تأثیر متیلاسیون می‌باشند عبارت *AGO4a* و *NRPD2 NRPE1 DRM2* و *AGO1* هستند. برخی از پروتئین‌های *AGO* به عنوان فاکتورهای رونویسی عمل می‌کنند و با سایر فاکتورهای رونویسی در تعامل هستند. به دلیل این که اولین *AGO* شناخته شده برش آران‌ای هدف را کاتالیز می‌کرد، به عنوان پروتئین‌های برش‌دهنده شناخته شده‌اند (Song et al., 2004). کمپلکس‌های خاموشی ژن در سطح رونویسی شامل *AGO4*، *AGO6*، *AGO9* و آران‌ای‌های کوچک ۲۴ نوکلئوتیدی هستند (Havecker et al., 2010). کمپلکس‌های خاموشی ژن در سطح پس از رونویسی شامل *AGO1*، *AGO7* و آران‌ای‌های کوچک ۲۱-۲۲ نوکلئوتیدی هستند (Montgomery et al., 2008). *AGO1* نقش مهمی در خاموش کردن آران‌ای ویروسی دارد و در تنظیم بیان ژن‌های میزبان از طریق عملکرد میکرو آران‌ای ایفای نقش می‌کند (Ando et al., 2019) و همچنین به عنوان مؤلفه اصلی RISC در مسیر میکروآران‌ای (miRNA) که آران‌ای‌های هدف را از طریق برش یا مهار ترجمه تنظیم می‌نماید، بازی می‌کند (Varallyay et al., 2013). *AGO1* در بارگیری آران‌ای‌های کوچک ویروس موزاییک خیار تأثیر گذار است و یک پروتئین برش‌دهنده است.

پروتئین‌های آرگونوات از جمله *AGO4a* به میکروآران‌ای‌ها متصل شده و آن‌ها را به سمت کمپلکس RISC هدایت می‌نمایند تا مناطق خاصی از دی‌ان‌ای را هدف قرار دهند (Matzke et al., 2005; Baumberger et al., 2015). جهش در

مکانیکی با استفاده از بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار مایه‌زنی شدند.

بررسی علایم و نمونه‌برداری از گیاهان مایه‌زنی‌شده
به‌منظور ردیابی ویروس و بررسی بروز برخی ژن‌های مورد بررسی در میزبان، از برگ‌های جوان بعد از گذشت هفت، ۱۴ و ۲۱ روز از مایه‌زنی علایم بیماری بررسی و نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله حدود یک الی دو دقیقه در ظرف حاوی ازت مایع قرار گرفته و سپس جهت استخراج آران‌ای کل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ردیابی ویروس با روش RT-PCR

به‌منظور ردیابی ویروس و نیز بررسی بیان ژن‌ها در گیاهان تلقیح شده، استخراج آران‌ای از حدود ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی از نمونه‌های برداشت شده، با استفاده از کیت استخراج آران‌ای (Agilent, USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای سنجش کمیت و کیفیت آران‌ای‌های استخراج شده از دستگاه نانودراپ (USA Thermo scientific) استفاده شد.

سنتر cDNA (دی‌ان‌ای مکمل) با استفاده از کیت ساخت cDNA (TaKara, Japan) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. مطابق دستورالعمل شرکت سازنده حدود یک میکروگرم از آران‌ای استخراج‌شده برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل استفاده شد. دو میکرولیتر از آغازگر اختصاصی و یا آغازگر Oligo dt با یک میکروگرم از آران‌ای استخراج‌شده مخلوط شده و توسط آب دیونیزه به حجم ۱۰/۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس، مخلوط آماده شده در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه قرار داده شد. پس از قرار دادن

خیار حساس است (Saristan et al., 2005)، استفاده شد. گیاهان در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر در شرایط گلخانه کاشته شدند. خاک به‌کاررفته مخلوطی از خاک حاصلخیز مزرعه و پرلیت و کود دامی پوسیده به نسبت ۱:۱:۲ بود. دمای گلخانه در طی آزمایش ۲۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳۰ تا ۴۰ درصد و شرایط نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) تنظیم شد.

به‌منظور آلوده‌سازی گیاهان از جدایه CMV-Fny استفاده شد. این جدایه متعلق به زیرگروه I ویروس موزاییک خیار است که به‌عنوان جدایه استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این‌که ویروس موزاییک خیار دارای سه قطعه آران‌ای مجزا است هر کدام از قطعات درون پلاسمید قرار گرفته است. برای تهیه رنوشت‌ها و آلوده‌سازی گیاهان از سه کلون به نام‌های p109, p209 و p309 که به ترتیب حاوی آران‌ای یک، دو و سه ویروس موزاییک خیار بودند استفاده شد (Palukaitis et al., 2003).

ابتدا پلاسمیدهای مذکور حاوی قطعات ژنومی آران‌ای یک، دو و سه، به باکتری *E. coli* سویه DH5α با روش شوک حرارتی انتقال داده شدند. سپس برای تهیه رنوشت‌های آران‌ای‌های ژنومی ویروس، هر کدام از پلاسمیدهای ذکرشده توسط آنزیم *PstI* خطی شدند. رنوشت‌هایی که از کلون‌های آلوده‌گر تهیه شدند روی میزبان تکثیر *Nicotiana clelvellandi* به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند. به‌منظور انجام مایه‌زنی، چهار گیاه توتون در مرحله چهاربرگی آماده شد و روی هر برگ ۱۵ میکرولیتر مخلوطی از رنوشت‌های تهیه‌شده هر کدام از آران‌ای‌های ژنومی مایه‌زنی شد. برای مایه‌زنی رنوشت‌ها از بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار استفاده شد. پس از ظهور علائم در گیاهان توتون، عصاره گیاهی تهیه شده و گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از عصاره تهیه شده به‌صورت

ردیابی ژن‌ها در نمونه‌های مختلف به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. در تمامی مراحل از گیاه سالم و آب دیونیزه و به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید. برای ارزیابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، الکتروفورز افقی در ژل آگارز یک درصد و بافر (1X) TBE انجام شد.

بررسی بیان ژن در گیاهان آلوده با کمک Real-Time PCR

پس از تهیه آران‌ای دی‌ان‌ای مکمل بیان ژن‌های *AGO1*، *AGO4* و *HSP90* در سه بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه با کمک روش Real Time PCR با سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکال مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از دستگاه Corbett Rotar Gene Q (Qiagene) و محلول سایبر گرین استفاده شد.

از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن‌های مذکور و همچنین از آغازگرهای اختصاصی ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن استاندارد استفاده شد.

در بررسی بیان هر یک از ژن‌های مورد مطالعه از سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکال استفاده شد. چرخه حرارتی شامل یک چرخه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، چهل چرخه شامل ۹۵ درجه ۲۰ ثانیه، ۵۵ درجه برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۲۰ ثانیه در دستگاه بهینه‌سازی شد.

مخلوط روی یخ، مخلوطی شامل دو میکرولیتر 10X Script Buffer (50 Mm Tris-HCl, 750 mM) 2.0 μL of dNTP mix, 30 mM MgCl₂, KCl (10 mM) ۰/۵ میکرولیتر RNase Block و یک میکرولیتر Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μL) Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase به میکروتیوب‌ها اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها در ترموسایکلر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. حضور ویروس موزاییک خیار در نمونه‌ها با استفاده از روش آر تی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای منطبق بر ژن پروتئین پوششی (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. پی‌سی‌آر در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix ساخت شرکت Ampliqon، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی، ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر برای ردیابی ویروس موزاییک خیار، به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۴۵ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی دی‌ان‌ای مکمل حاصل از واکنش نسخه برداری معکوس از آران‌ای‌های استخراج‌شده نمونه‌های برداشت شده در زمان‌های مختلف نیز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه پی‌سی‌آر استاندارد جهت بررسی اولیه و

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای ژن‌های مورد هدف در این تحقیق
Table 1. Name and Primer sequences of target genes in this study

نام آغازگر	توالی آغازگر	ژن هدف	منبع
GAP For	GGCTGCAATCAAGGAGGAA	GAPDH	Ghanbari <i>et al.</i> , 2016
GAP Rev	AAATCAATCACACGGGAAGT	GAPDH	

AG1 For	GCTACTCAAATGGGAC	AGO1	This study
AG1 Rev	AAGAAAAGCATGAAGGC	AGO1	This study
SLHSP For	GCACAGGCACTTAGGGACTC	SLHSP90	This study
SLHSP Rev	CTGAGGTGAGAAGGGCAGTC	SLHSP90	This study
AG4 For	GCTACTCAAATGGGACAGTGG	AGO4	This study
AG4 Rev	AAGAAAAGCATGAAGGCGTTAC	AGO4	This study
CMVCPF	CGGATCCATGGACAAATCTGAATCAACC	CP	This study
CMVCPR	GGCGGCCGCTCAGACTGGGAGCACCCAG	CP	This study

مایه‌زنی گیاهان گوجه‌فرنگی در مرحله سه تا چهار برگی که دارای رشدی یکسانی بودند انجام شد علائمی از قبیل موزائیک خفیف و رگه‌های سبز روشن هفت روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی گیاهان گوجه‌فرنگی، برگ‌های گوجه‌فرنگی علائم رگه‌های سبز کم رنگ و کلروز همراه با بدشکلی و کاهش رشد برگ و بوته را نشان دادند. توقف رشد بوته‌ها و باریک‌شدن و بند کفشی شدن برگ‌ها همراه با تاول روی برگ در روز بیست و یکم پس از مایه‌زنی مشاهده شد. همچنین، برگ‌های گیاهان آلوده به طور کامل رشد نکرده و میان‌گره‌ها و دم‌برگ‌ها کوتاه‌تر از گیاهان گوجه‌فرنگی سالم بودند (شکل ۲).

تغییر بیان ژن *AGO4* در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

آنالیز داده‌ها در در Real Time PCR نشان دادند که *AGO4* در گیاهان آلوده به ویروس موزائیک خیار در ۷ روز پس از آلودگی کاهش (شکل ۳) ولی در روز ۱۴ افزایش معنی داری نشان داد (شکل ۳) و در ۲۱ روز بعد از آلودگی میزان بیان این ژن تغییر چندانی نسبت به گیاه شاهد نشان نداد (شکل ۳). این تغییرات بیان احتمالاً می‌تواند ناشی از تاخیر در القای ژن *AGO4* ناشی از حضور و تکثیر ویروس در مرحله اول بیان علائم باشد.

داده‌ها مطابق روش ΔCt بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز شدند. ΔCt سیکلی، که در آن میزان تکثیر ژن هدف وارد فاز صعودی می‌شود را به‌عنوان چرخه مرجع در نظر گرفته شد که به اصطلاح سیکل آستانه فرض می‌شود (Ramakers *et al.*, 2003). میزان چرخه آستانه ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با چرخه آستانه ژن استاندارد *GAPDH* به روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه گردید. برای محاسبه $\Delta\Delta Ct$ از فرمول زیر:

$$\Delta\Delta Ct =$$

$$\Delta Ct \text{ (نمونه آلوده به ویروس)} - \Delta Ct \text{ (نمونه سالم)}$$

و نسبت ژنی از فرمول زیر محاسبه گردید:

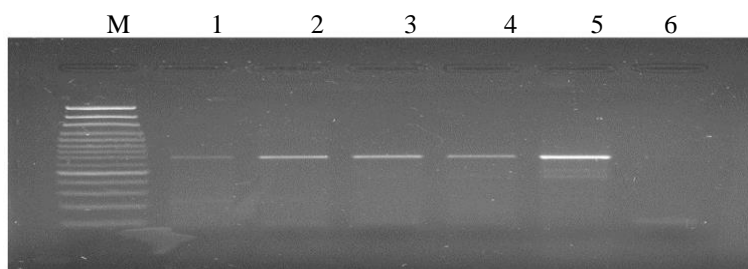
$$\text{نسبت ژنی} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

برای بررسی تفاوت آماری بیان ژن‌ها بین گیاهان آلوده به ویروس و شاهد از آنالیز واریانس داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS استفاده شد. آنالیز داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار SPSS و اکسل (۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج و بحث

ردیابی مولکولی ویروس موزائیک خیار در گیاه گوجه‌فرنگی

وجود ویروس در گیاهان مایه‌زنی شده با تکثیر قطعه ای به اندازه ۵۵۰ جفت باز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در شکل (۱) نشان داده شده است که ویروس تکثیر یافته است. پس از اثبات حضور ویروس در برگ‌های مایه‌زنی شده توتون،



شکل ۱. الکتروفورز قطعات تکثیر شده مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، M: Ladder DNA 100bp، ۱-۴: نمونه‌های آلوده به ویروس موزاییک خیار به ترتیب در روزهای دوم، هفتم، چهاردهم و ۲۱، ۵: شاهد مثبت ۶: شاهد منفی (گیاه سالم)

Figure 1. Electrophoresis of amplified fragments corresponded to a part of Coat Protein gene of CMV using specific primers, M: Ladder DNA 100bp, 1-4: Infected samples by CMV in 2, 7, 14 and 21 dpi. 5: Positive samples, 6: Negative sample (Healthy Plant)



شکل ۲. علائم ویروس موزاییک خیار روی برگ گوجه‌فرنگی در مقایسه با گیاه شاهد سالم در روزهای مختلف (۱) گیاه سالم، (۲) روز هفتم آلودگی موزاییک خیار، (۳) موزاییک و بدشکلی و تغییر شکل برگ، (۴) تغییر شکل برگ، موزاییک شدید

Figure 2. Symptoms of CMV in tomato plants in different days post inoculation. 1) Healthy Plant, 2) 7 dpi, Mild mosaic, 3) 14 dpi, Mosaic, Leaf Deformation 4) Sever Mosaic, Leaf deformation

نسبت به روز هفتم کمتر بود. افزایش بیان می‌تواند ناشی از فعالیت دفاعی بیشتر میزبان در مقابل آلودگی ویروس باشد (شکل ۳). اما در ۲۱ روز پس از آلودگی کاهش بیان ژن دیده شد در مقایسه با گیاه سالم دیده شد (شکل ۳). در روز ۲۱ پس از آلودگی بیان این ژن در گیاه سالم حدود چهار برابر افزایش بیان در مقایسه با گیاه سالم داشت. این کاهش بیان در مقایسه با گیاه سالم می‌تواند ناشی از غلبه ویروس بر سیستم دفاعی گیاه و جلوگیری از خاموشی ژن توسط گیاه باشد.

تغییر بیان ژن *HSP90* در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

تکثیر *HSP90* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

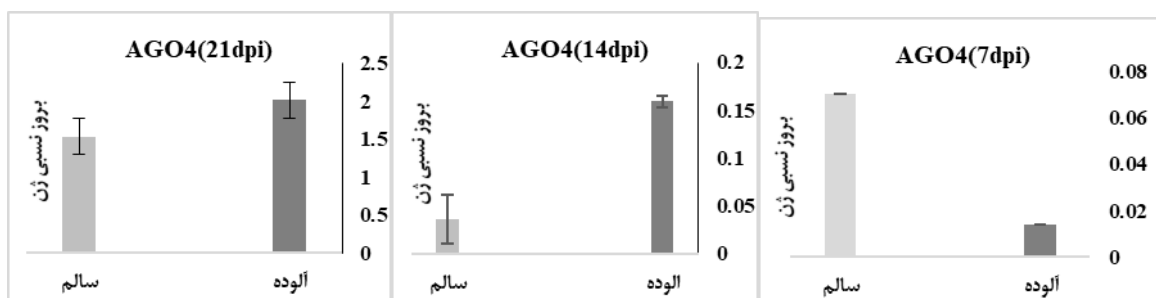
تغییر بیان ژن *AGO1* در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

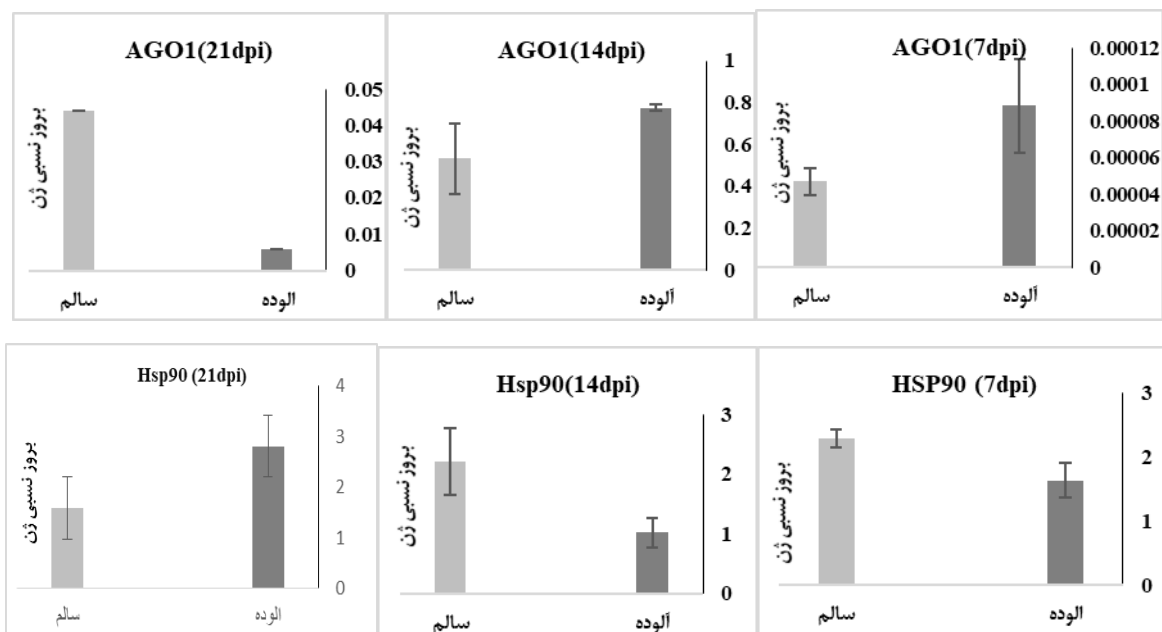
بررسی میزان بیان ژن *AGO1* نشان داد که بین گیاهان آلوده شده با ویروس موزاییک خیار و گیاهان سالم تفاوت دیده می‌شود که تفاوت بیان در سطح یک درصد معنی دار بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد ژن *AGO1* در گیاهان آلوده به ویروس موزاییک خیار در ۷ روز پس از آلودگی نسبت به گیاه سالم در حدود دو برابر افزایش بیان دارد (شکل ۳) و این روند افزایش بروز در ۱۴ روز پس از آلودگی نیز مشاهده گردید، به طوری که در ۱۴ روز پس از آلودگی بیان این ژن نسبت به گیاه سالم افزایش نسبی داشت اما این افزایش

نیز افزایش بیان این ژن در روز ۲۱ پس از مایه‌زنی مشاهده شد که ناشی از تحت تأثیر قرار گرفتن گیاه میزبان توسط ویروس و غلبه ویروس بر سیستم دفاعی گیاه است، کاهش بیان در روز هفتم و ۱۴ام در مقایسه سایر مطالعات احتمالاً ناشی از تفاوت در سیستم بیماری‌زایی و تکثیر ویروس و همچنین غلبه بر سیستم خاموشی ژن به‌عنوان مکانیسم مقاومت میزبان است، علاوه بر این با توجه به علائمی که شرح داده شد میزان بروز علائم و غلبه بر سیستم دفاعی گیاه در روزهای هفتم و ۱۴ام در مقایسه با روز ۲۱ام کمتر است.

پروتئین‌های مؤثر در خاموشی ژن، Small RNAs هستند که به دو گروه اساسی siRNA و miRNA تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های آرگونات از جمله *AGO4* به miRNA های ۲۴ نوکلئوتیدی متصل شده و آن‌ها را به سمت کمپلکس RISC هدایت می‌نمایند تا مناطق خاصی از DNA را هدف قرار دهند. بنابراین در مواجهه گیاه با آلودگی ویروس در روزهای ۱۴ام و ۲۱ام میزان بیان این ژن جهت مقابله با آلودگی و تکثیر ویروس افزایش خواهد یافت تا توانایی خاموش کردن ژن‌های ویروسی را داشته باشد.

در آزمون پی‌سی‌آر مورد تأیید قرار گرفت که نتیجه‌ی پی‌سی‌آر حاکی از تکثیر قطعه‌ی اختصاصی مربوط به این ژن بود. پس از آزمون Real time PCR، نتایج نشان داد که میزان بیان برخی از ژن‌ها مانند *HSP90* در گوجه‌فرنگی‌های آلوده به ویروس پس از گذشت ۷ روز کاهش یافته بود (شکل ۳). این نتایج در تیمار ۱۴ روز پس از آلودگی نیز تکرار شد که این کاهش میزان بیان ژن را تصدیق کرد (شکل ۳). نتایج Real time PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی *HSP90* پس از ۱۴ روز آلودگی میزان بیان ژن در نمونه آلوده نسبت به نمونه سالم کاهش پیدا کرد. این نتایج با تاریخ ۲۱ روز پس از آلودگی نیز تکرار شد و حاصل آن افزایش بیان ژن مورد نظر بود (شکل ۳). درحالی‌که افزایش بیان *HSP* در عفونت‌های ویروسی و یا در پاسخ به یک تنش عمومی القا شده توسط ویروس، به خوبی شناخته شده است و در این آزمایش تنها در تاریخ ۲۱ روز پس از آلودگی این نکته صدق می‌کند و این افزایش بیان با نقش مقاومتی این ژن‌ها مطابقت دارد. در سایر مطالعات افزایش میزان بیان این ژن در تنش‌های مقاومتی اثبات شده است، در تحقیق حاضر





شکل ۳. بیان ژن‌های *AGO1*، *AGO4* و *HSP90* هفت، چهارده و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با همسانه آلوده گر ویروس موزاییک خیار

Figure 3. Expression of *AGO4*، *AGO1* and *HSP90*، 7، 14 and 21 days post inoculation by infectious clones of CMV

موزاییک خیار در طی آلودگی و بیان *AGO4* در مسیر دفاعی گیاه میزبان در موارد مختلف با هم تفاوت دارند. پروتئین 2b به‌عنوان بازدارنده دفاع گیاهان با دخالت در تنظیم خاموشی ژن، رونویسی *AGO4* را متوقف و کنترل می‌کند. مطالعه مذکور نشان داد که تجمع پروتئین *AGO4* توسط 2b و آلودگی به CMV در گیاه *A. thaliana* تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد، با این وجود بررسی الگوهای بیان در جداسازی سلول‌های آلوده و بررسی توسط کروماتوگرافی اندازه‌ای (Size Exclusion Chromatography) نشان داد که 2b توانایی برهمکنش با *AGO4* را دارد (Hamera et al., 2016).

AGO1 یک پروتئین برش دهنده است که در تولید آران‌های کوچک حاصل از برش قطعات ژنومی ویروس موزاییک خیار تأثیر گذار است. در راستای نقش حیاتی *AGO1* در دفاع مبتنی بر خاموشی آران‌ای، القای بیان *AGO1*، به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی میزبان است که باعث افزایش بیان این ژن

در صورت فراگیر شدن ویروس در گیاه میزبان بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد که در آن صورت گسترش علائم ویروس در گیاه مشاهده می‌شود. طی پژوهشی Hamera و همکاران (۲۰۱۲)، شواهدی ارائه دادند که CMV 2b با پروتئین *AGO4* ساخت دومین (PIWI/Argonaut/Zwille) PAZ و ارتباط مستقیم دارد. به‌طور خلاصه، نتایج آنها نشان می‌دهد که 2b می‌تواند با عملکرد *AGO4* مقابله کند و میزان بیان آن را تغییر دهد. با توجه به این نتایج، احتمالاً میزان کاهش بیان این ژن ناشی از فعالیت بیشتر ژن 2b ویروس موزاییک خیار است، این پروتئین به‌عنوان بازدارنده خاموشی ژن در مقابل سیستم دفاعی گیاه عمل می‌کند و به فراگیر شدن ویروس در گیاه کمک می‌کند، درحالی‌که از سیستمیک شدن خاموشی ژن توسط گیاه جلوگیری می‌کند. هامرا و همکاران طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۶ انجام دادند با تجزیه بیوشیمیایی عصاره‌های سلولی آلوده *A. thaliana* نشان دادند که میزان بیان 2b از ویروس

AGO1 بر برخی از گونه‌های miRNA تأثیر می‌گذارد. تحقیقات قبلی همچنین نشان داده است که پس از آلوده‌شدن گیاه آراییدوپسیس به ویروس CMV، مقدار miR168 افزایش یافته و سپس AGO1 تنظیم می‌شود، در نتیجه خاموشی RNA ضد ویروسی گیاه را سرکوب می‌کند (Ando *et al.*, 2019; Várallyay *et al.*, 2013). در پژوهشی دیگر Hamera و همکاران (۲۰۱۲)، ژن 2b ویروس موزائیک خیار (CMV2b) را به‌عنوان یک سرکوب‌کننده خاموشی ژن معرفی کردند که در خاموشی سیستمیک و موضعی مداخله می‌کند و فعالیت برشی ژن AGO1 را مهار می‌کند (Hamera *et al.*, 2012). این نتایج تأییدکننده میزان بیان این ژن در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی است که احتمالاً با میزان بیان ژن 2b مرتبط است. ناکوی و همکاران (۲۰۱۰)، در برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس ToLCNDV کاهش سطح ژن AGO1 نسبت به برگ‌های سالم را گزارش کردند. درحالی‌که روهانگ و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که بیان ژن AGO1 در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس موزائیک خیار به مقدار کم، افزایش پیدا کرد درحالی‌که در صورت ایجاد جهش در پروتئین 2b، این افزایش بیان سریع‌تر و بیشتر صورت گرفت.

فاکتور رونویسی شوک حرارتی در تنظیم تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده مؤثر می‌باشد. افزایش بیان HSP در عفونت‌های ویروسی و یا در پاسخ به یک تنش عمومی القاشده توسط ویروس، به‌خوبی شناخته شده است و در این آزمایش تنها در ۲۱ روز پس از آلودگی این نکته صدق می‌کند و این افزایش بیان با نقش مقاومتی این ژن‌ها مطابقت دارد. کاهش بیان در روز هفتم و ۱۴ام در مقایسه با سایر مطالعات احتمالاً ناشی از تفاوت در سیستم بیماری‌زایی و تکثیر ویروس و همچنین غلبه بر سیستم خاموشی ژن به‌عنوان مکانیسم مقاومت میزبان است. علاوه بر این

مهم و کلیدی می‌شود، لازم به ذکر است کنترل تجمع پروتئین AGO1 توسط القای بیان میکروآران‌ای miR168 تنظیم می‌گردد. با استفاده از یک سیستم بیان گذرا و مطالعات مربوط به آلودگی ویروسی، مشخص شده است که ژن بازدارنده خاموشی p19 از *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) مسئول القای بیان میکروآران‌ای miR168 و تنظیم سطح AGO1 است (Várallyay *et al.*, 2013). با وجود این که بطور کلی افزایش بیان در روز هفتم و ۱۴ام در مقایسه با گیاه سالم مشاهده شد اما میزان افزایش بیان در گیاه آلوده نسبت به گیاه سالم در روز چهارم نسبت به افزایش بیان در گیاه آلوده نسبت به گیاه سالم در روز هفتم کاهش داشت. این کاهش تفاوت بیان بین گیاه آلوده و سالم احتمالاً به‌دلیل تکثیر و غلبه بیشتر ویروس بر سیستم دفاعی گیاه میزبان است، که این نتایج با نحوه ظهور علائم در روزهای مختلف همخوانی دارد. نتایج بیان در ۲۱ روز پس از آلودگی نشان دهنده کاهش بیان این ژن در گیاه آلوده نسبت به گیاه سالم بود. این کاهش بیان در مقایسه با گیاه سالم ممکن است ناشی از غلبه ویروس بر سیستم دفاعی گیاه و جلوگیری از خاموشی ژن توسط گیاه باشد. افزایش بیان این ژن در گیاه آراییدوپسیس در پاسخ به ویروس موزائیک خیار نیز در طی پژوهشی در سال ۲۰۱۳ گزارش شده است (Várallyay *et al.*, 2013). پژوهشگران نشان داده‌اند که AGO1 و AGO2 توانایی اتصال به آران‌ای‌های کوچک مشتق شده از CMV را دارند و این امر نشان‌دهنده ارتباط با خاموش آران‌ای می‌باشد. AGO1 نقش مهمی در خاموش کردن RNA ضد ویروسی و تنظیم بیان ژن‌های ذاتی از طریق عملکرد miRNA ایفا می‌کند. سطح mRNA AGO1 توسط miR168 تنظیم می‌شود، درحالی‌که به‌نظر می‌رسد سطح پروتئین

(2012). همچنین افزایش بیان HSP در گیاه آرابیدوپسیس آلوده به ویروس خراشک توتون نیز با نقش مقاومتی این ژن‌ها مطابقت دارد (Agudelo-Romero *et al.*, 2008).

در این تحقیق همچنین ژن‌های دیگری از جمله ژن‌های مربوط به متیلاسیون مانند NRPE1، NRPD1، ADK، NAC و ... ژن‌های مربوط به رشد و نمو مانند TCP1 و TCP4 مورد بررسی قرار گرفت که در ارتباط با ویروس موزائیک خیار تفاوت معنی‌داری از لحاظ بیان ژن نداشتند، احتمال می‌رود که ویروس موزائیک خیار در ارتباط با بیان ژن‌های اشاره‌شده تأثیری نداشته و ویروس در مسیر بیان این ژن‌ها دخالتی ندارد.

با توجه به علائمی که شرح داده شد میزان بروز علائم و غلبه بر سیستم دفاعی گیاه در روز های هفتم و ۱۴ام در مقایسه با روز ۲۱ام بیشتر است. جاکوش و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که بیان پروتئین پوششی TMV موتان یا جهش یافته در گیاهان موجب افزایش بیان HSP می‌شود و این نتیجه حضور فراوان پروتئین‌های غیر طبیعی در سیتوپلاسم است. ژن HSP با مشارکت پروتئین مقاومتی N در برابر ویروس موزائیک توتون نیز ایجاد مقاومت کرده است (Lio *et al.*, 2004). در گوجه‌فرنگی تحت استرس دمایی بیان ژن‌های HSP در گیاهان آلوده به ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی در مقایسه با گیاهان فاقد ویروس افزایش یافت (Pusage *et al.*,)

REFERENCES

- Anonymous (2016). FAOSTAT data. Food and Agriculture Organization. Online. <http://faostat.fao.org/> faostat/collections subset= agriculture.
- Agudelo-Romero P, Carbonell P, de la Iglesia, F (2008) Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Tobacco etch virus*. *Virology*. 5: 92-102
- Ando S, Miyashita S, Takahashi H (2019). Plant defense systems against cucumber mosaic virus: lessons learned from CMV-*Arabidopsis* interactions. *J. Gen. Plant Pathol.* 85: 174-181.
- Baumberger N, Baulcombe D (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11928-11933.
- Bird A (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* 70:5-8.
- Ghanbari M, Eini O, Ebrhimi S (2016). Differential expression of MYB33 and AP2 genes and response of TY resistant plants to beet curly top Iran virus infection in tomato. *J. Plant Pathol.* 98: 555-562.
- Hamera S, Song X, Su L, Chen X, Fang R (2012). *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to *AGO4*-related small RNAs and impairs *AGO4* activities. *Plant J.* 69: 104-115.
- Hamera S, Yan YX, Song SU, Chaudhary I, Murtaza L, Su M, Tariq X, Chen R, Fang S (2016). Expression of *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b alters FWA methylation and its siRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Open* 5: 1727-1734.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush M, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC (2010). The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22:321-334.
- Hsu CC, Li HP, Hung YH, Leu YW, Wu WH, Wang FS, Lee KD, Chang PJ, Wu CS, Lu YJ (2010). Targeted methylation of CMV and E1A viral promoters. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 402: 228-234.
- ICTV. *Virus Taxonomy*: 2014 Release.

- Retrieved 15 June 2015.
- Kim MJ, Huh SU, Ham BK, Paek KH (2008). A novel methyltransferase methylates *Cucumber mosaic virus* 1a protein and promotes systemic spread. *J. Virol.* 82(10): 4823-4833.
- Kouakou AK, Bagui TA, Agneroh AP, Soro JT, Zoueu T (2016). *Cucumber mosaic virus* detection by artificial neural network using multispectral and multimodal imagery. *Optik-Inter. J. Light Elect. Optic.* 127: 11250-11257.
- Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng, S, Dinesh-Kumar SP (2004) Molecular chaperon *Hsp90* associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* 279: 2101-2108.
- Matzke MA, Kanno T, Matzke AJ (2015). RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plant. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 243-267.
- Montgomery T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC (2008). Specificity of Argonaute 7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133: 128-141.
- Mortezaei-Nejad F, Etemadi N (2005). The Survey of Quantitative and Qualitative in 17 Cultivars Tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Isfahan Region. *J. Res. Agri. Sci.* 1: 31-32.
- Palukaitis PF, García-Arenla (2003). *Cucumoviruses*. *Adv. Virus Res.* 62: 241-323.
- Phillips T (2008). The role of methylation in gene expression. *Nature Edu.* 1: 116.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J. Bartel DP (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 20: 3407-3425.
- Sacristán S, Fraile A, Malpica JM, García-Arenal F (2005). An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathol.* 95:827-833.
- Song JJ, Smith SK., Hannon GJ, Joshua L (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434-1437.
- Vierling E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 42: 579-620.
- Várallyay E, Havelda Z (2013) Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of Argonaute1 Level. *Mol. Plant Pathol.* 14: 567-57.
- Wieczorek P, Wrzesińska B, Obrępańska-Stęplowska A (2013). Assessment of reference gene stability influenced by extremely divergent disease symptoms in *Solanum lycopersicum*. *Virol. Meth.* 194: 161-168.