

## **Replicability of an ALSV-based VIGS vector in wild strawberry and fenugreek**

**Alireza Teymouri-Nezhad**

MSc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email address: alirezataymouri@gmail.com

**Nemat Sokhandan-Bashir** 

Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email address: nsokhandan@yahoo.com

**Nasser Mahna** 

\*Corresponding author. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email address: mahna@tabrizu.ac.ir

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Nowadays, due to the intrinsic ability of viruses in transferring genes and their incorporation into the host genome, they are used as a powerful tool for silencing and overexpression of different genes in plants. Virus-induced gene silencing (VIGS) is widely used in plant genetics for knocking genes down thanks to its ease of use and the short time required to generate the associated phenotype. Apple latent spherical virus (ALSV)-based vectors can be used for effective and stable VIGS in a broad range of plant families such as Brassicaceae, Rosaceae, Solanaceae, Fabaceae, Cucurbitaceae, Scrophulariaceae and so forth. However, to the best of our knowledge, there is no report on the replicability and applicability of this viral vector in wild strawberry and fenugreek. In this research, we aimed to optimize and evaluate the propagation of an ALSV-based VIGS vector in these two horticultural plants.

#### **Materials and methods**

The seeds from the accession Hawaii-4 (H4) (PI551572) of the woodland (wild) strawberry, *Fragaria vesca* L. ssp. *vesca* f. *alba* (Ehrh.) Staudt, and *Trigonella foenum-graceum* (fenugreek) were planted and thereafter, the grown plants were used for inoculation. The *Chenopodium quinoa* was used as a propagation mediator plant. To do this, viral plasmids pEALSR1 and pEALSR2

were inoculated into *C. quinoa* plants by two methods, carborundum-mediated and injection-by-syringe.

## Results

The *C. quinoa* plants showed virus-induced chlorosis and necrosis symptoms 3-5 week after inoculation. Subsequently, the extract of infected plant tissues was inoculated onto the leaves of wild strawberry and fenugreek plants. Total RNA were extracted from all inoculated leaves and used for RT-PCR. Results indicated that a 211 bp fragment of pEALSR2 plasmid was amplified using RNA of all inoculated plants.

## Conclusions

It was concluded that this ALSV-based vector was introduced and propagated in the target plants and can be used successfully as a VIGS vector in these plants for gene silencing and overexpression purposes.

**Keywords:** *Fragaria vesca*, Virus-induced gene silencing, *Trigonella foenum-graceum*, Apple latent spherical virus, Quinoa

**Paper Type:** Research paper.

**Citation:** Teymouri-Nezhad A, Sokhandan-Bashir N, Mahna N (2023) Replicability of an ALSV-based VIGS vector in wild strawberry and fenugreek. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 97-114.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 97-114.

DOI: 10.22103/jab.2023.19435.1400

Received: May 05, 2023.

Received in revised form: June 27, 2023.

Accepted: June 28, 2023.

Published online: September 30, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## قابلیت تکثیر یک وکتور VIGS بر پایه ALSV در توت‌فرنگی وحشی و شنبلیله

علیرضا طیموری نژاد

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه:

alirezataymouri@gmail.com

نعمت سخندان بشیر

استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: nsokhandan@yahoo.com

ناصر مهنا

\*نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه:

mahna@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷

### چکیده

**هدف:** امروزه، از ویروس‌ها، به علت توانایی طبیعی ویروس‌ها در انتقال ژن و الحاق به ژنوم میزبان، به عنوان ابزاری قوی برای خاموشی ژن‌های درونی گیاه و انتقال ژن بیگانه به درون سلول‌های میزبان استفاده می‌شود. سیستم خاموشی ژن القاء‌شده توسط ویروس (VIGS) در ژنتیک گیاهی به دلیل سهولت در استفاده و صرف زمان کوتاه برای ایجاد فنوتیپ موردنظر، کاربرد زیادی دارد. در این راستا، وکتور ویروسی کروی پنهان سبب (ALSV) می‌تواند برای VIGS پایدار و مؤثر در میان طیف گسترده‌ای از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، درختان میوه رزاسه، سولاناسه، فاباسه، کوربیتاسه، اسکروفولاریاسه، و چند خانواده دیگر کاربرد داشته باشد. در این تحقیق بهینه‌سازی تکثیر و کاربرد گسترده‌تر وکتور VIGS بر پایه ALSV در گیاهان باغبانی و معرفی میزبانی جدید برای این وکتور ویروسی مدنظر بوده است.

**مواد و روش‌ها:** برای این منظور بذور توت‌فرنگی وحشی (*Fragaria vesca*) (توده (Hawaii-4 (H4) (PI551572) و شنبلیله (*Trigonella foenum-graceum*) کشت شده و گیاهان حاصل برای مایه زنی مورد هدف قرار گرفتند و از گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa*) به عنوان یک گیاه واسطه برای تکثیر ویروس استفاده شد. بدین منظور، پلاسمیدهای ویروسی pEALSR1 و pEALSR2 با دو روش کاربرد کاربوراندوم و تزریق با سرنگ به گیاه کینوا انتقال یافتند.

**نتایج:** گیاهان کینوا بعد از ۳-۵ هفته، آلودگی به ویروس موردنظر را به صورت علائم نکروز و کلروز بروز دادند. سپس عصاره این گیاهان آلوده به ویروس استخراج شد و روی گیاهان توت‌فرنگی و شنبلیله مایه‌زنی انجام شد. در هفته پنجم بعد از مایه‌زنی، استخراج RNA کل از برگ‌های توت‌فرنگی و شنبلیله و کینوا و در نهایت RT-PCR انجام شد. نتایج نشان داد که قطعه موردنظر متعلق به پلاسمید pEALSR2 به طول ۲۱۱ جفت باز بوده و با استفاده از RT-PCR انجام گرفته روی RNA استخراج شده از این گیاهان تکثیر شده است.

**نتیجه‌گیری:** این موضوع نشان می‌دهد که این وکتور ویروسی به سلولهای گیاهان مورد بررسی وارد شده و تا حدی که با روشهای مولکولی قابل تشخیص باشد، تکثیر شده است و بنابراین، می‌توان از این وکتور برای خاموشی ژن و بیش‌بیان ژنهای کوچک در این گیاهان استفاده نمود.

**کلیدواژه‌ها:** *Fragaria vesca*، خاموشی ژن القاء‌شده توسط ویروس، *Trigonella foenum-graceum*، کینوا، ویروس

کروی پنهان سیب

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** طیموری‌نژاد علیرضا، سخندان بشیر نعمت، مهنا ناصر (۱۴۰۲) قابلیت تکثیر یک وکتور VIGS بر پایه ALSV در توت‌فرنگی وحشی و شنبلیله. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۳)، ۹۷-۱۱۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



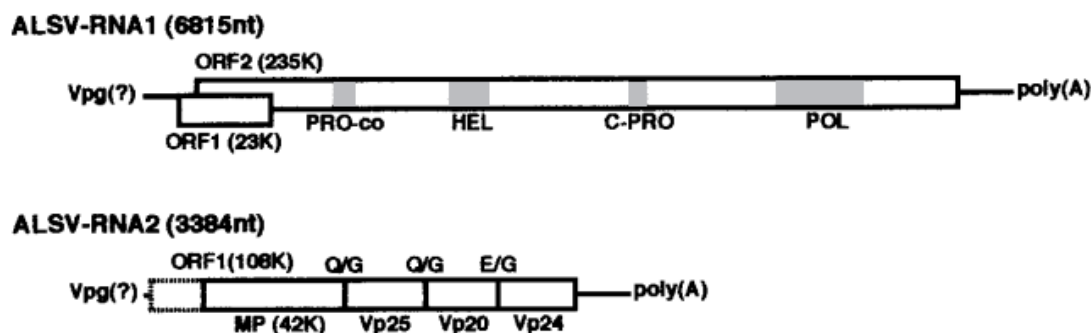
© the authors

## مقدمه

قابلیت بیان ژن‌های خارجی یا خاموشی ژن‌های درونی گیاه در بیولوژی گیاهی انقلاب بزرگی ایجاد کرده است. بیان ژن در گیاه می‌تواند هم به صورت جایگذاری دائمی درون ژنوم گیاهی یا بیان توسط وکتورهای ویروسی باشد (Yaegashi et al. 2007). وکتورهای ویروسی گیاهی دارای مزایایی مانند سهولت در استفاده و سرعت بالای تراریختی می‌باشند اما ممکن است مشکلاتی نظیر عدم پایداری ژنتیکی داشته باشند (Chapman et al. 1992). بنابراین می‌توان از آن‌ها به‌عنوان ابزاری قوی برای انتقال ژن بیگانه به درون سلول‌های میزبان استفاده کرد (Kootstra & Verma 2003). امروزه خاموشی ژن القاء‌شده توسط ویروس<sup>۱</sup> (VIGS) در ژنتیک گیاهی به دلیل سهولت در استفاده و صرف زمان کمتر، کاربرد زیادی دارد (Sasaki et

1. Virus-induced gene silencing

al. 2011). واژه VIGS توصیف کننده یک فناوری است که در آن از ویروس‌های نوترکیب برای کاهش بیان ژن‌های موجودات زنده استفاده می‌شود و اساس کار آن، خاموشی پس از رونویسی ژن<sup>۲</sup> (PTGS) می‌باشد (Becker & Lange 2010). وکتورهای VIGS با دریافت کردن قسمتی از توالی ژن هدف، مهندسی می‌شوند. این وکتور بعد از تکثیر و ایفای نقش در سلول میزبان، توالی RNA مربوط به کاهش فعالیت ژن هدف را فعال می‌کند و با به کارگیری یک RNA مداخله‌گر کوچک ۲۱-۲۵ نوکلئوتیدی باعث جلوگیری از فعالیت RNA هدف می‌شود (Lu et al. 2003). وکتور مشتق از ویروس پنهان کروی سیب<sup>۳</sup> (ALS<sup>V</sup>) می‌تواند برای VIGS پایدار و مؤثر در میان طیف گسترده‌ای از گیاهان از جمله آراییدوپسیس، درختان میوه رزاسه، سولاناسه، فاباسه، کوکوربیتاسه، بوراجیناسه، کاریوفیلاسه، جنتیاناسه و اسکروفولاریاسه کاربرد داشته باشد (Lange et al. 2013; Kamada et al. 2018; Fujita et al. 2019; Li et al. 2019a; Li et al. 2019b; Devani et al. 2020; Izuishi et al. 2020; Werner Ribeiro et al. 2020; Luo et al. 2021; Mancinotti et al. 2021; Ogata et al. 2021; Jin et al. 2022; Yamagishi & Yoshikawa 2022). ویروس کروی نهفته سیب (ALS<sup>V</sup>) در اصل از یک درخت سیب در ژاپن جدا شد که قطر آن ۲۵ نانومتر می‌باشد و حاوی دو نوع ssRNA<sup>۴</sup> به نام‌های (RNA1 و RNA2) و سه پروتئین پوششی (VP25, VP20, VP24) می‌باشد (شکل ۱) (Sasaki et al. 2011). RNA1 به استثناء دم پلی A از ۶۸۱۳ نوکلئوتید تشکیل شده است و یک قالب خواندن باز<sup>۵</sup> (ORF) دارد که یک پلی پپتید ۲۴۳ کیلو دالتونی را کد می‌کند که شامل شکل کلی کوفاکتور پروتئاز، هلیکاز، اتصال دهنده NTP، پروتئاز سیستئین و RNA پلیمراز از انتهای N می‌باشد. RNA2 به استثنای دم پلی A انتهای ۳'، ۳۳۸۵ نوکلئوتید دارد همچنین دارای یک قالب خواندن باز می‌باشد که پلی پپتید 119k/108k را کد می‌کند. این پلی پپتید شامل پروتئین حرکتی (MP) (53K/42K) در نزدیکی N-ترمینال و ۳ پروتئین پوششی در ناحیه C-ترمینال می‌باشد (Igarashi et al. 2009).



شکل ۱. ساختار RNA1 و RNA2 ویروس ALSV (Li et al. 2000)

Figure 1. Structure of RNA1 and RNA2 of ALSV virus (Li et al. 2000)

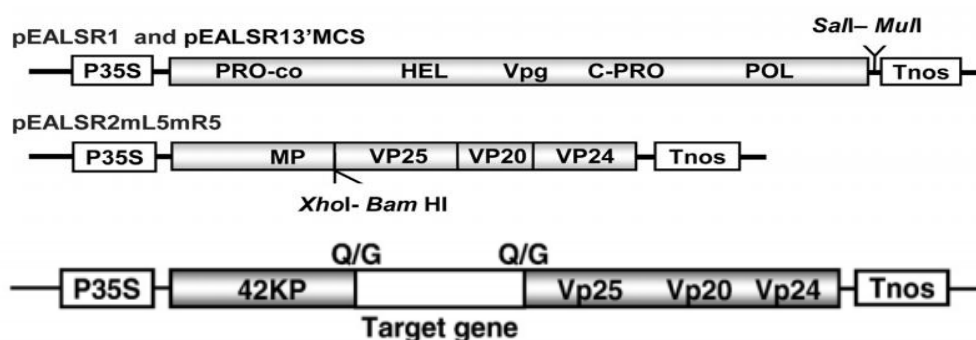
۲. Post Transcriptional Gene Silencing

۳. Apple latent spherical virus

۴. Single strand RNA

۵. Open reading frame

ALSV تحت شرایط آزمایشگاهی طیف میزبانی گسترده‌ای دارد. در میان میزبان‌های گیاهی مختلف ALSV سبب ایجاد نشانه‌های موزاییکی آشکار در کینوا<sup>۲</sup> خواهد شد این در حالی است که آلودگی در میزبان‌های دیگر به صورت نهفته است (Sato et al. 2014). از آنجایی که ALSV بیشتر گیاهان میزبان را بدون علائم آلوده می‌کند، می‌تواند ابزاری ارزشمند برای ارزیابی عملکرد ژن‌های موردنظر در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی باشد (Igarashi et al. 2009). همان‌طور که در شکل زیر دیده می‌شود (شکل ۲) درون ژنوم ویروسی یک جایگاه کلون سازی اضافه شده است تا یک بخش یا توالی کامل ژن گیاهی موردنظر در آن قرار داده شود (Becker & Lange 2010).



شکل ۲. ساختار وکتورهای pEALSR1 و pEALSR2 از سری وکتورهای ویروس ALSV (Igarashi et al. 2009; Taki et al. 2013)

Figure 2. Structure of the vectors, pEALSR1 and pEALSR2, from the ALSV viral vector series (Igarashi et al. 2009; Taki et al. 2013)

وکتورهای ALSV برای بیان ژن‌های خارجی در گیاهان و آنالیز حرکت و توزیع ویروس در بافت‌های گیاهی آلوده شده استفاده می‌شوند (Sasaki et al. 2011). در این پژوهش از بهینه‌سازی شرایط لازم برای انتقال و تکثیر وکتور ALSV به گیاهان شنبليله (*Trigonella foenum-graceum*) و توت‌فرنگی وحشی (*Fragaria vesca*) به منظور معرفی میزبان‌های جدیدی برای القاء خاموشی ژن توسط این وکتور ویروسی (VIGS) استفاده شد. همچنین از گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa*) به عنوان یک گیاه واسطه برای تکثیر ویروس استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

**پلاسمیدهای ویروسی:** دو پلاسمید pEALSR1، حاوی RNA1 ویروس ALSV و pEALSR2 حاوی RNA2 ویروس ALSV از آقای یوشیکاوا<sup>۱</sup> از دانشگاه ایویت ژاپن<sup>۲</sup> دریافت شدند و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز نگهداری شدند. آزمایشات مربوط به تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2 حاوی ژنوم ویروس ALSV برای تکثیر بیشتر با روش الکتروپوریشن به درون باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شدند و برای آماده‌سازی و الکتروپوریشن باکتری *E. coli* از دستگاه (Bio-Rad) MicroPulser Electroporator استفاده شد. بعد از تکثیر باکتری *E. coli*، برای جداسازی باکتری از محیط کشت سه بار سانتریفیوژ با تنظیمات ۶۵۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سپس رسوب باکتریایی در ۱۰۰۰ میکرولیتر گلیسرول سرد ۱۰ درصد تعلیق شد. بدین ترتیب سلول‌های مستعد برای الکتروپوریشن آماده شدند. برای الکتروپوریشن ۵ میکرولیتر از هر پلاسمید ویروسی به‌طور جداگانه به ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی باکتریایی اضافه شد و به درون کووت سرد مخصوص الکتروپوریشن انتقال یافت. سپس با دستگاه (Bio-Rad) MicroPulser Electroporator (Bio-Rad) شوک الکتریکی به محتویات کووت وارد شد. زمان انجام پالس ثبت شده توسط دستگاه برای pEALSR1 و pEALSR2 به ترتیب ۵ و ۶ میلی‌ثانیه و مقدار شوک الکتریکی برای هر دو ۱/۸ کیلوولت اندازه‌گیری شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید در محیط کشت مایع (LB-broth) تکثیر یافتند و سپس جهت استخراج پلاسمید درون باکتری‌ها از روش لیز-قلیایی استفاده شد (Sambrook et al. 1989). سپس پلاسمیدهای استخراج شده جهت تکمیل و تکثیر وکتور ویروسی ALSV به مقدار کافی، به گیاهان کینوا مایه‌زنی شدند.

### کشت و مایه‌زنی گیاهان: کشت بذر گیاهان در گلدان در فضای گلخانه باغبانی ساختمان شماره ۲ دانشکده کشاورزی

دانشگاه تبریز انجام شد. کشت بذر گیاهان کینوا و شنبلیل و همچنین تکثیر استولون‌های توت‌فرنگی‌های موردنیاز برای انجام این تحقیق در محیط کشت پرلیت-پیت با نسبت ۵۰:۵۰ در دمای با میانگین ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد انجام شد. برای مایه‌زنی گیاهان کینوا در ۴-۵ هفته بعد از کشت این گیاه، در مرحله ۶ برگ حقیقی، برگ‌های ۳-۵ در حضور پودر کاربوراندوم یا تزریق (با سرنگ انسولین) با پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2 که با غلظت ۲-۱ میکروگرم بر میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شده بودند، یا عصاره گرفته‌شده از گیاهان کینوا که قبلاً با پلاسمید آلوده شده بودند، مایه‌زنی شدند. برای عصاره‌گیری از گیاهان کینوا آلوده به ویروس ابتدا برگ‌های با علائم ویروسی در یک هاون چینی سرد گذاشته شدند سپس به ازای هر گرم برگ ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم با pH=7.4 به هاون اضافه شد و پس از له شدن نمونه، عصاره‌گیری انجام شد و برای مایه‌زنی گیاهان موردنظر

۱. Nobuyuki Yoshikawa

۲. Iwate University, Japan

در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مایه‌زنی گیاه شنبلیله با عصاره‌های گرفته‌شده از گیاهان آلوده‌شده کینوا با دو روش شامل تزریق با سرنگ انسولین و یا در حضور پودر کاربوراندوم در مرحله ۶ برگی با مایه‌زنی برگی‌های ۳-۵ انجام شد. در ۵ هفته بعد از مایه‌زنی برگ‌های ۷-۹ جمع‌آوری شدند و جهت بررسی وجود وکتور ویروسی، استخراج RNA و به دنبال آن RT-PCR انجام شد. برای مایه‌زنی گیاهان توت‌فرنگی برگ‌های ۳-۵ این گیاهان در مرحله ۶ برگی با پودر کاربوراندوم مایه‌زنی شدند. در ۵ هفته بعد از تلقیح گیاهان برگ‌های ۷-۸ این گیاه جمع‌آوری شد و برای بررسی وجود وکتور ویروسی، استخراج RNA از این گیاه انجام گرفت و در نهایت RT-PCR روی آن انجام شد.

**اندازه‌گیری غلظت پلاسمید، RNA و cDNA:** اندازه‌گیری غلظت و کیفیت RNA و cDNA گیاهان مورد

آزمایش با دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Germany) Biophotometer plus انجام شد.

**استخراج RNA:** هنگام استخراج RNA کل از برگ‌های گیاهان برای عاری بودن از RNase، تمام ظروف و وسایل

موردنیاز استریل شدند. استخراج RNA از گیاهان شنبلیله و توت‌فرنگی و کینوا با دو روش متفاوت انجام شد به گونه‌ای که استخراج RNA شنبلیله با استفاده از کیت استخراج RNA (Total RNA Purification Kit) از شرکت (Jena bioscience) انجام شد ولی برای توت‌فرنگی و کینوا از روش CTAB درصد استفاده شد (Gambino et al. 2008). جهت جلوگیری از آلودگی DNA، RNA گیاهان موردنظر با DNase (Fermentas) تیمار شدند.

**RT-PCR:** برای انجام RT-PCR برای مشخص شدن آلودگی گیاهان به وکتور ویروسی ALSV از یک جفت آغازگر

اختصاصی استفاده شد. آغازگر مستقیم با توالی 3'-GCGAGGCACTCCTTA-5' و آغازگر معکوس با توالی 5'-GCAAGGTGGTTCGTGA-3 از شرکت تکاپوزیست خریداری و استفاده شدند. توالی این آغازگرها از منبع یاماگیچی و همکاران برای تکثیر ناحیه خاصی از ژنوم RNA2 ویروس ALSV اقتباس گردید (Yamagishi et al. 2011).

**سنتز DNA مکمل (cDNA):** برای ساخت DNA مکمل الگو (cDNA) ابتدا مقدار ۱ میکرولیتر از RNA گیاه

موردنظر به یک لوله ۰/۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس به ترتیب ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو دی تی و ۱۰/۴ میکرولیتر آب مقطر دپسی به لوله اضافه شد. لوله حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه درون دستگاه ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از خارج کردن از دستگاه ترموسایکلر و قرار گرفتن لوله روی یخ به مدت ۵ دقیقه به ترتیب مقدار ۴ میکرولیتر 5XRT Buffer، ۰/۶ میکرولیتر RNase inhibitor و ۲ میلی مولار به مقدار ۲ میکرولیتر و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Fermentas) به مقدار ۱ میکرولیتر به لوله اضافه شد. در نهایت به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه ترموسایکلر (Astec-818, Japan) قرار گرفت تا cDNA گیاهان موردنظر ساخته شود.

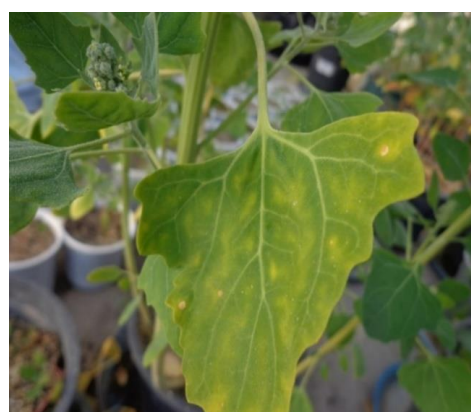


**PCR:** برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل (ASTEC-818, Japan) استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از cDNA حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس، RNA و پلاسمید در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. بدین صورت که در هر واکنش ۸ میکرولیتر مستر میکس، ۲ میکرولیتر الگو، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها با غلظت ۴ پیکومول قرار داده شد و حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دمایی شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۳۲ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد، و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ و در نهایت طولیل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

**الکتروفورز:** برای الکتروفورز از ژل ۱ درصد آگارز در بافر TBE استفاده شد. برای رنگ آمیزی قطعات تکثیر شده از اتیدیوم بروماید با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. برای تعیین اندازه قطعات بر روی ژل از مارکر مولکولی Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas) استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها با ولتاژ ۸۰ ولت و جریان ۴۰-۴۵ آمپر به مدت یک ساعت انجام شد. سپس ژل حاوی نمونه الکتروفورز شده برای مشاهده نوارهای DNA یا RNA در دستگاه ژل داک قرار گرفت و با استفاده از اشعه ماورای بنفش از نمونه‌ها عکس‌برداری شد.

## نتایج

نتایج مطالعات گلخانه‌ای: گیاهان کینوا که با پلاسمیدهای ویروسی pEALSR1 و pEALSR2 مایه‌زنی شده بودند، ۳-۵ هفته بعد از مایه‌زنی علائم کلروز و نکروز ناشی از آلودگی به ویروس ALSV بر روی برگ‌های بالایی مایه‌زنی نشده بعضی از این گیاهان مشاهده شد (شکل ۳). عصاره گرفته‌شده از این گیاهان برای آلودگی مجدد گیاهان کینوا و شبلیله و توت‌فرنگی استفاده شد.

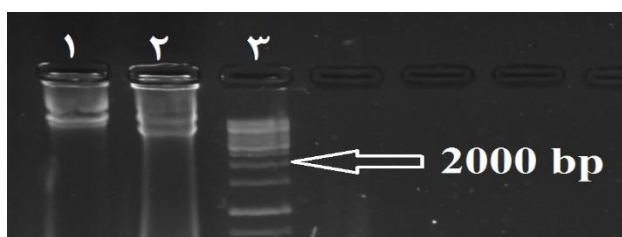


شکل ۳. Error! No text of specified style in document. کلروزه و نکروزه شدن برگ‌های کینوا بعد از ۵-

۳ هفته در اثر مایه‌زنی با پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2

**Figure 3. Chlorosis and necrosis of the leaves of quinoa plants 3-5 weeks after inoculation of pEALSR1 and pEALSR2 plasmids**

نتایج استخراج پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2 از باکتری *E. coli*: غلظت پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2 توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که غلظت این پلاسمیدها به ترتیب ۷۲۷۳/۵ و ۶۰۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که از غلظت مناسبی برخوردار بودند. الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج‌شده از باکتری *E. coli* برای بررسی کیفیت روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و مشاهده شد که پلاسمیدهای موردنظر از کیفیت مناسبی برخوردارند (شکل ۴).

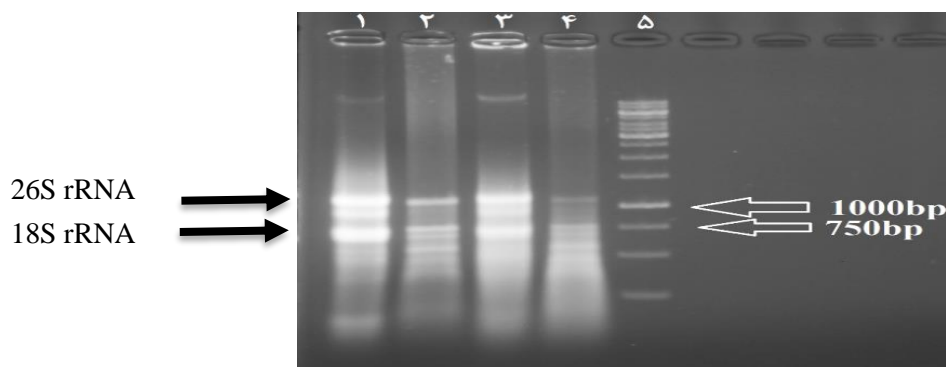


**شکل ۴. الکتروفورز ژل آگارز برای پلاسمیدها: چاهک ۱، پلاسمید pEALSR1؛ چاهک ۲، پلاسمید pEALSR2؛ چاهک ۳، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)**

**Figure 4. Agarose gel electrophoresis of plasmids: Lane 1, pEALSR1 plasmid; Lane 2, pEALSR2 plasmid; Lane 3, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)**

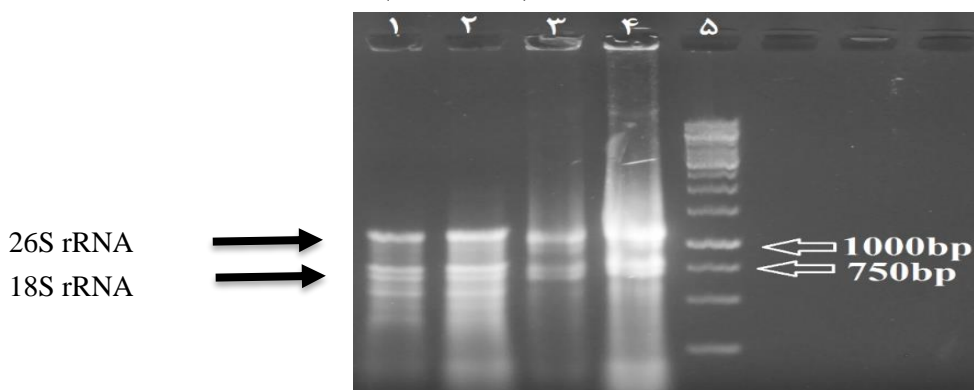
**نتایج استخراج RNA:** غلظت RNA استخراج‌شده از گیاهان مورد آزمایش با دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که RNA های گیاهان موردنظر از کیفیت مناسبی برخوردار بودند. به گونه‌ای که مقدار غلظت RNA گیاه شاهد کینوا ۱۰۵۳ نانوگرم بر میکرولیتر و RNA گیاه کینوا آلوده به ویروس ۱۶۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر و مقدار غلظت RNA گیاهان توت‌فرنگی شاهد ۷۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر و RNA گیاه توت‌فرنگی آلوده به وکتور ویروسی ALSV ۱۳۰۷ نانوگرم بر میکرولیتر بود. همچنین اندازه‌گیری غلظت RNA گیاهان شنبليله نشان داد که غلظت RNA گیاهان شنبليله شاهد ۱۳۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت RNA گیاه آلوده به وکتور ویروسی ALSV از طریق کاربرد پودر کاربوراندوم ۹۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت RNA گیاه آلوده به ویروس ALSV از طریق تزریق با سرنگ انسولین ۸۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. الکتروفورز RNA استخراج‌شده از گیاه شنبليله نشان داد که RNA گیاهان موردنظر از غلظت مناسبی برخوردار است (شکل ۵ و ۶). نتایج RT-PCR: بعد از سنتز cDNA گیاهان موردپژوهش غلظت آن‌ها توسط دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که cDNA گیاهان موردپژوهش از غلظت مناسبی برخوردار بود. به گونه‌ای که غلظت cDNA گیاهان کینوا آلوده به ویروس ۴۲۹۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و cDNA گیاهان کینوا شاهد ۵۱۰۶/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

غلظت cDNA گیاهان توت‌فرنگی شاهد ۱۳۰۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت cDNA گیاهان توت‌فرنگی آلوده به ویروس ۵۹۴۳/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت cDNA گیاهان شنبلیله شاهد ۳۷۹۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت cDNA گیاه آلوده به وکتور ویروسی ALSV با کاربرد پودر کاربوراندوم ۴۲۳۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت cDNA گیاه آلوده به وکتور ویروسی ALSV توسط تزریق با سرنگ انسولین ۴۴۲۱/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.



شکل ۵. الکتروفورز RNA گیاهان کینوای شاهد و آلوده شده با ALSV: چاهک ۱، RNA گیاه کینوا آلوده شده؛ چاهک ۲، RNA چاهک شماره ۱ بعد از تیمار با DNase؛ چاهک ۳، RNA گیاه کینوای شاهد؛ چاهک ۴، RNA چاهک شماره ۳ بعد از تیمار با DNase؛ چاهک ۵، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

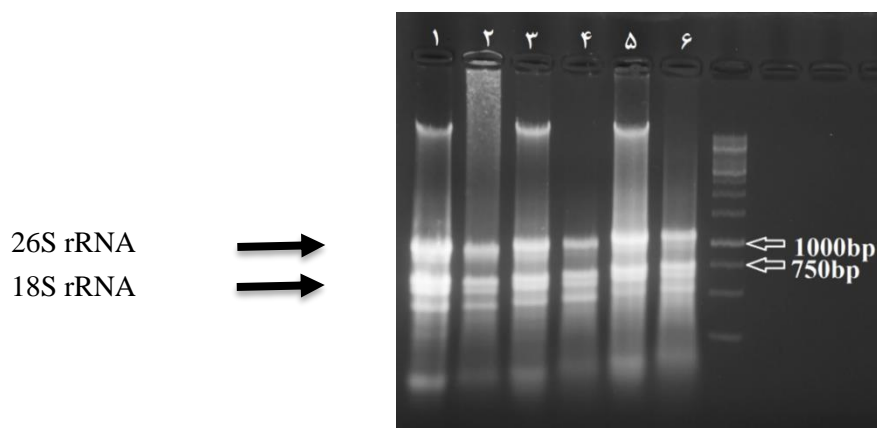
Figure 5. Agarose gel electrophoresis of RNA extracted from the control and ALSV-infected quinoa plants: Lane 1, RNA from infected quinoa plants; Lane 2, DNase-treated RNA from lane 1; Lane 3, RNA from control quinoa plants; Lane 4, Dnase-treated RNA from lane 3; Lane 5, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)



شکل ۶. الکتروفورز ژل آگارز برای RNA استخراج شده از گیاهان توت‌فرنگی شاهد و آلوده شده با ALSV: چاهک ۱، RNA تیمار شده با Dnase از گیاه شاهد توت‌فرنگی؛ چاهک ۲، RNA تیمار شده با DNase از گیاه آلوده شده توت‌فرنگی؛ چاهک ۳، RNA گیاه شاهد توت‌فرنگی؛ چاهک ۴، RNA گیاه آلوده شده توت‌فرنگی؛ چاهک ۵، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

Figure 6. Agarose gel electrophoresis of RNA extracted from control and ALSV-infected strawberry plants: Lane 1, DNase-treated RNA extracted from control strawberry plants; Lane 2, DNase-treated RNA extracted from infected strawberry plants; Lane 3, RNA

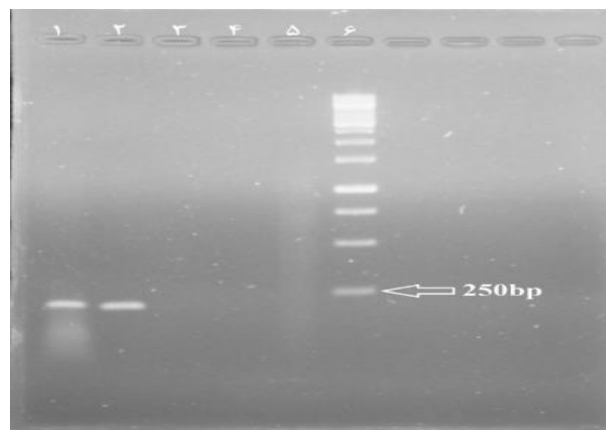
extracted from control strawberry plants; Lane 4, RNA extracted from infected strawberry plants; Lane 5, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)



شکل ۷. الکتروفورز ژل آگارز برای RNA گیاهان شاهد و آلوده شده شنبليله: چاهک ۱، RNA گیاه شاهد شنبليله؛ چاهک ۲، RNA چاهک شماره ۱ بعد از تیمار با DNase؛ چاهک ۳، RNA گیاه شنبليله آلوده شده با ویروس ALSV؛ چاهک ۴، RNA چاهک شماره ۳ بعد از تیمار با DNase؛ چاهک ۵، RNA گیاه شنبليله آلوده شده با ویروس ALSV از طریق تزریق با سرنگ انسولین؛ چاهک ۶، RNA چاهک شماره ۵ بعد از تیمار با DNase؛ چاهک ۷، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

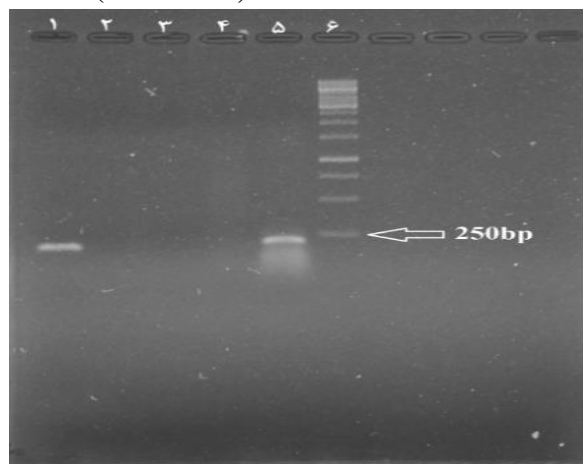
**Figure 7. Agarose gel electrophoresis of RNA extracted from control and ALSV-infected fenugreek plants: Lane 1, RNA from control fenugreek plants; Lane 2, DNase-treated RNA from lane 1; Lane 3, RNA from ALSV-infected fenugreek plants using carborundum; Lane 4, DNase-treated RNA from lane 3; Lane 5, RNA from ALSV-infected fenugreek plants through injection by insulin syringe; Lane 6, DNase-treated RNA from lane 5; Lane 7, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)**

RT-PCR برای هر سه گیاه کینوا و شنبليله و توت فرنگی انجام شد. همان طور که انتظار می رفت قطعه DNA ۲۱۱bp حاصل از ژنوم RNA2 ویروس ALSV در این گیاهان تکثیر شد. در کنار RT-PCR، یک PCR نیز با RNA آلوده به ویروس تیمار شده با Dnase از گیاه مورد نظر برای تأیید این موضوع که قطعه DNA تکثیر شده حاصل RT-PCR می باشد، انجام شد و نتیجه آن مورد تأیید بود. (شکل ۸ و ۹ و ۱۰)



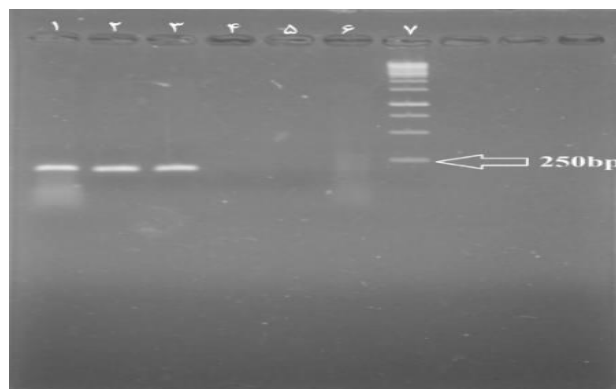
شکل ۸. الکتروفورز قطعات DNA حاصل از RT-PCR در گیاهان کینوای شاهد و آلوده شده با ALSV: چاهک ۱، پلاسمید pEALSR2؛ چاهک ۲، گیاه کینوای آلوده شده؛ چاهک ۳، گیاه کینوای شاهد؛ چاهک ۴، کنترل منفی (بدون DNA)؛ چاهک ۵، RNA گیاه کینوا آلوده شده که به عنوان الگو در واکنش پی سی آر قرار گرفته است؛ چاهک ۶، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

Figure 8. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments from RT-PCR using RNA samples from the control and ALSV-infected quinoa plants: Lane 1, pEALSR2 plasmid; Lane 2, ALSV-infected quinoa plants; Lane 3, Control quinoa plants; Lane 4, Negative control (no DNA); Lane 5, RNA as the PCR reaction template from the infected quinoa plants; Lane 6, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)



شکل ۹. الکتروفورز قطعات DNA حاصل از RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از گیاهان توت‌فرنگی شاهد و آلوده شده با ALSV: قطعه حاصل از RT-PCR روی گیاهان توت‌فرنگی آلوده شده به ویروس ALSV (چاهک ۱)؛ گیاهان توت‌فرنگی شاهد (چاهک ۲)؛ کنترل منفی (بدون DNA) (چاهک ۳)؛ گیاهان توت‌فرنگی آلوده به ویروس ALSV (چاهک ۴)؛ چاهک ۵. پلاسمید pEALSR2. چاهک ۶. Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

Figure 9. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments from RT-PCR using RNA samples from the control and ALSV-infected strawberry plants: Lane 1, ALSV-infected strawberry plants; Lane 2, Control strawberry plants; Lane 3, Negative control (no DNA); Lane 4, PCR-amplified RNA from ALSV-infected strawberry plants; Lane 5, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)



شکل ۱۰. الکتروفورز قطعات DNA حاصل از RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از گیاهان شنبليله شاهد و آلوده شده با ALSV: چاهک ۱، پلاسمید pEALSR2؛ چاهک ۲، RT-PCR روی RNA گیاهان شنبليله آلوده شده با استفاده از کاربوراندوم؛ چاهک ۳، RT-PCR روی RNA گیاهان شنبليله آلوده شده با تزریق از طریق سرنگ انسولین؛ چاهک ۴، RT-PCR روی RNA گیاهان شاهد شنبليله؛ چاهک ۵؛ کنترل منفی (بدون DNA)؛ چاهک ۶، PCR روی RNA گیاهان شنبليله آلوده؛ چاهک ۷، Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

**Figure 10.** Agarose gel electrophoresis of DNA fragments from RT-PCR using RNA samples from the control and ALSV-infected fenugreek plants: Lane 1, pEALSR2 plasmid; Lane 2, RT-PCR on ALSV-infected fenugreek plants using carborundum; Lane 3, RT-PCR on ALSV-infected fenugreek plants using injection by insulin syringe; Lane 4, RT-PCR on control fenugreek plants; Lane 5, Negative control (no DNA); Lane 6, PCR on RNA from infected fenugreek plants; Lane 7, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

## بحث

بهبودسازی شرایط لازم جهت کاربرد ALSV به عنوان یک وکتور القاء کننده VIGS نشان داد که گیاهان توت فرنگی و شنبليله در شرایط بررسی شده می توانند میزبان مناسبی برای این وکتور ویروسی باشند. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پلاسمید pEALSR2 و وکتور ALSV نشان دهنده آلوده بودن گیاهان توت فرنگی و شنبليله به وکتور ویروسی مذکور می باشد (شکل ۹ و ۱۰). طی این واکنش برای هر دو گیاه توت فرنگی و شنبليله باندی با طول تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ جفت باز مشاهده شد که با طول باند مورد انتظار یعنی ۲۱۱ جفت باز متناسب بود. همچنین بعضی از گیاهان کینوا ۳-۵ هفته بعد از مایه زنی با پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2، علائم کلروز و نکروز حاصل از آلودگی توسط ویروس را از خود بروز دادند. میزان آلودگی به این صورت بود که از ۱۵ گلدان مایه زنی شده با پلاسمیدهای مذکور، ۳ گلدان معادل ۲۰ درصد گلدان ها علائم کلروز و نکروز حاصل از آلودگی به ویروس را از خود بروز دادند. همانطور که ایگاراشی و همکاران برای

ارزیابی اثر VIGS و کتور ALSV روی ژن‌های درونی گیاهان نشان دادند و کتور ALSV که توالی‌هایی از ژن‌های <sup>۹</sup> (SU) و <sup>۱۰</sup> (PDS) را به همراه داشت به صورت یکدستی خاموشی این ژن‌ها را در گیاهان مدل مانند تنباکو و آرابیدوپسیس و محصولات مهم تجاری مانند گوجه‌فرنگی و گونه‌های فاباسه و کورکوبیتاسه الفاء کرد (Igarashi et al. 2009). گروهی از محققین، از کتور ویروسی ALSV که بیان‌کننده پروتئین فلورسنت سبز بود برای آنالیز VIGS در گیاهان تنباکو بیان‌کننده GFP استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که در گیاهان تنباکو-GFP-ALSV تلفیح شده با GFP-ALSV، بعد از ۵ روز از تلفیح روی برگ‌های مایه‌کوبی شده لکه‌های تاریک کوچکی ظاهر شد و سپس گسترش پیدا کرد. سرانجام ۱۲ روز بعد از مایه‌کوبی تمام برگ را این لکه‌های تاریک فراگرفت. همچنین فلورسنت برگ‌های بالایی، بالاتر از ۱۲ برگ حقیقی، در ۲۱ روز بعد از تلفیح ناپدید شد. آنالیز برگ‌های خاموش شده GFP نشان داد که RNA های ویروسی و پروتئین‌ها در همه برگ‌هایی که mRNA ژن GFP تخریب شده بود، تجمع پیدا کردند. همچنین آنالیز لکه‌گذاری مستقیم بافت نشان داد که شیوع GFP-ALSV همیشه بر الفاء VIGS در برگ‌های آلوده شده GFP-Tobacco مقدم است (Yaegashi et al. 2007). از وجه تمایز این تحقیق نسبت به کارهای قبلی انجام شده در این زمینه می‌توان به معرفی میزبانانی جدید برای این وکتور ویروسی (دو گیاه شنبليله و توت‌فرنگی) و بهینه‌سازی شرایط لازم برای انتقال ژن از طریق این وکتور به منظور ایجاد VIGS مؤثر اشاره کرد. در این تحقیق مشخص شد که انتقال مایه تلفیح (پلاسمیدهای pEALSR1 و pEALSR2 یا عصاره گرفته شده از گیاهان کینوا آلوده به ویروس) به گیاهان شنبليله و کینوا علاوه بر کاربرد پودر کاربوراندوم از طریق تزریق با سرنگ انسولین نیز امکان‌پذیر است. تزریق مایه تلفیح با سرنگ انسولین به گیاه توت‌فرنگی به دلیل بافت برگی زبر و شکننده و عدم حرکت مایه تلفیح در برگ آن، امکان‌پذیر نبود. ذکر این نکته ضروری است که کلون‌های ALSV-cDNA آلودگی بالایی ندارند و مایه‌زنی مستقیم کلون‌های ALSV-cDNA به گیاهان موردنظر نمی‌تواند مؤثر واقع شود به طوری که ابتدا باید حتماً آلودگی گیاهان کینوا با کلون ذکر شده انجام شود و عصاره گیاهانی که علائم ظاهری بروز دادند جمع‌آوری و برای آلودگی گیاهان موردنظر استفاده شود (Kon & Yoshikawa 2014).

**نتیجه‌گیری:** از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که وکتور ویروسی ALSV در گیاهان توت‌فرنگی و شنبليله به خوبی تکثیر شده است. بنابراین می‌توان از وکتور ویروسی ALSV برای انتقال ژن به هر دو گیاه توت‌فرنگی و شنبليله به منظور خاموشی ژن و نیز بیش بیان ژن‌های کوچک استفاده نمود. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که علاوه بر روش رایج استفاده از پودر کاربوراندوم برای مایه‌زنی گیاهان، حداقل در مورد گیاهان کینوا و شنبليله، سرنگ انسولین را نیز می‌توان برای مایه‌زنی ویروس ALSV بکار برد.

<sup>۹</sup>. Subunit of magnesium chelatase gene

<sup>۱۰</sup>. Phytoene desaturase gene

سپاسگزاری: بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه تبریز برای پایاننامه کارشناسی ارشد علیرضا طیموری نژاد

سپاسگزاری می شود.

## References

- Becker A, Lange M (2010) VIGS—genomics goes functional. *Trends Plant Sci* 15, 1-4.
- Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J* 2, 549-557.
- Devani RS, Kute A, John S et al. (2020) Development of a Virus-Induced Gene Silencing System for Dioecious *Coccinia grandis*. *Mol Biotechnol* 62, 412-422.
- Fujita N, Kazama Y, Yamagishi N et al. (2019) Development of the VIGS System in the Dioecious Plant *Silene latifolia*. *Int J Mol Sci* 20.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* 19, 520-525.
- Igarashi A, Yamagata K, Sugai T et al. (2009) Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virol* 386, 407-416.
- Izuishi Y, Isaka N, Li H et al. (2020) Apple latent spherical virus (ALSV)-induced gene silencing in a medicinal plant, *Lithospermum erythrorhizon*. *Sci Rep* 10, 13555.
- Jin W, Zhang Y, Su X et al. (2022) First report of apple latent spherical virus infecting *Angelica sinensis*. *Plant Dis* 107(4), 1252.
- Kamada K, Omata S, Yamagishi N et al. (2018) Gentian (*Gentiana triflora*) prevents transmission of apple latent spherical virus (ALSV) vector to progeny seeds. *Planta* 248, 1431-1441.
- Kon T, Yoshikawa N (2014) Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Front Microbiol* 5, 595.
- Kootstra NA, Verma IM (2003) Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol* 43, 413-439.
- Lange M, Yellina AL, Orashakova S et al. (2013) Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Virus-*



Induced Gene Silencing: Methods and Protocols, 1-14.

- Li C, Hirano H, Kasajima I et al. (2019a) Virus-induced gene silencing in chili pepper by apple latent spherical virus vector. *J Virol Methods* 273, 113711.
- Li C, Yamagishi N, Kasajima I et al. (2019b) Virus-induced gene silencing and virus-induced flowering in strawberry (*Fragaria x ananassa*) using apple latent spherical virus vectors. *Hortic Res* 6, 18.
- Li C, Yoshikawa N, Takahashi T et al. (2000) Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family Comoviridae. *J Gen Virol* 81, 541-547.
- Lu R, Malcuit I, Moffett P et al. (2003) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J* 22, 5690-5699.
- Luo Y, Na R, Nowak JS et al. (2021) Development of a Csy4-processed guide RNA delivery system with soybean-infecting virus ALSV for genome editing. *BMC Plant Biol* 21, 419.
- Mancinotti D, Rodriguez MC, Frick KM et al. (2021) Development and application of a virus-induced gene silencing protocol for the study of gene function in narrow-leafed lupin. *Plant Methods* 17, 131.
- Ogata T, Toyoshima M, Yamamizo-Oda C et al. (2021) Virus-Mediated Transient Expression Techniques Enable Functional Genomics Studies and Modulations of Betalain Biosynthesis and Plant Height in Quinoa. *Front Plant Sci* 12, 643499.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Sasaki S, Yamagishi N, Yoshikawa N (2011) Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods* 7, 1-11.
- Sato N, Kon T, Yamagishi N et al. (2014) Apple latent spherical virus vector as vaccine for the prevention and treatment of mosaic diseases in pea, broad bean, and eustoma plants by Bean yellow mosaic virus. *Viruses* 6, 4242-4257.
- Taki A, Yamagishi N, Yoshikawa N (2013) Development of apple latent spherical virus-based vaccines against three tospoviruses. *Virus Res* 176, 251-258.
- Werner Ribeiro C, Duge de Bernonville T, Glevarec G et al. (2020) ALSV-Based Virus-

Induced Gene Silencing in Apple Tree (*Malus x domestica* L.). *Methods Mol Biol* 2172, 183-197.

Yaegashi H, Yamatsuta T, Takahashi T et al. (2007) Characterization of virus-induced gene silencing in tobacco plants infected with apple latent spherical virus. *Arch Virol* 152, 1839-1849.

Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K et al. (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana* FT gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol Biol* 75, 193-204.

Yamagishi N, Yoshikawa N (2022) Efficient virus-induced gene silencing system in pumpkin (*Cucurbita maxima*) using apple latent spherical virus vector. *J Virol Methods* 301, 114456.