بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد

رشته بیماری شناسی گیاهی

طراحی و ساخت وکتور نوترکیب مبتنی بر مکانیسم RNA Silencing برای ایجاد مقاومت به ویروس CABYV

استاد راهنما:

دکتر اکبر شیرزاد

استاد مشاور:

دکتر مقصود پژوهنده

پژوهشگر:

فریده باقری وناشی

دی / ۱۳۹۲

تبریز/ ایران

خدایا...

دست‌هایم را به ناپیدایی تو گشوده‌ام، چنان که در ذکری عالم گیر به سمت تو آمده‌اند!

آن قدر بزرگی، که هستی و همه‌ی اسبابش ملک کوچکی از املاک توست.

خدایا!

نمی‌دانم که کلمه را چگونه تقدیمت دارم، حال آن که کلمه آفریده توست، و چه موهبتی که تو نیز با کلمه با من سخن گفته‌ای...

بر انگشتانم که نگاه پر عطوفت خود را معطوف می‌داری توان نوشتن در آن‌ها جاری می‌شود!

خدایا!

اگر بخواهیم که مطلوب دیگران باشیم، تو اسبابش را به ما داده‌ای و ما را به سرعت به هدفان می‌رسانی، اما افسوس که این دلخوشی نه لذت‌بخش است و نه پایدار!

اما اگر بخواهیم مطلوب تو باشیم، سخت است و به دیده‌ای دست نیافتنی، اما آهسته آهسته شیرین است و پایدار...

خدایا!

مرا مطلوب خود گردان و از روی رحمت و فضل و بخشش‌ات با من مدارا کن!

خدایا!

در آستانه نیاز و فقر کامل خود به سویت رو کرده‌ام و می‌دانم که تو بی‌منتهای بی‌نیازی!

خدایا!

از نداشته‌هایم آن چه را که می‌دانم و نمی‌دانم و تو خوب به همه‌ی آن‌ها واقفی، نصیبم فرما...

به امید رحمتت...

تقدیم به:

دو موجود مقدس،

آنان که ناتوان شدند تا من به توانایی برسم، موهایشان سپید شد تا من در اجتماع رو سپید شوم و عاشقانه سوختند تا روشنگر راهم باشند و گرمابخش وجودم.

پدرم و مادرم.

و پایان نامه ام را تقدیم می کنم به روح پاک دایی عزیزم

که از همه هستی اش گذشت و رفت

تا ما آیندگان بتوانیم باشیم و از علمان دفاع کنیم.

فریده باقری

دی ۱۳۹۲

سپاس گزاری . . .

حمد و سپاس خدای را که تمام عالم به معرفت او عارف است و به عنایت بی علت او واقف،

پروردگاری را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

اینک به پاس لطف الهی که پایان نامه ی حاضر، آماده شده است بر خود واجب می دانم از استاد راهنمای گرانقدر جناب آقای دکتر **اکبر شیرزاد**، که راهنمایی و مطالعه این پایان نامه را به عهده گرفتند، سپاس گزاری نمایم.

از حمایت های بی دریغ استاد صبور و دلسوز، جناب آقای دکتر **مقصود پژوهنده**، که در کمال سعه صدر و با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه دریغ ننمودند و زحمت مشاوره این رساله را بر عهده گرفتند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر **محمد پارسنگ**، که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند سپاس گزاری می نمایم.

و بوسه می زنم بر دستان پدر و مادر عزیزم که توانستم زیر سایه مهربانی و صبوری هایشان در راه کسب علم و دانش قدم بردارم. هم چنین تشکر می کنم از برادران و خواهران عزیزم، به پاس کمک های بی دریغ و دلگرمی های بی پایان شان، که بهترین پشتیبان من بودند.

از همه دوستان عزیزم بویژه خانم ها عبدالهی و پورهنگ که در مراحل مختلف این پایان نامه یاری گر من بودند تشکر می کنم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده ..... یک
مقدمه ۲
۱ بررسی منابع ۵
۱-۱ ویروس‌های گیاهی ۵
۱-۲ اهمیت گیاهان خانواده کدوئیان ۵
۱-۳ ویروس‌های خانواده کدوئیان ۶
۱-۴ کنترل ویروسهای کدوئیان ۸
۱-۵ (Cucurbit-aphid-Born Yellow Virus : CABYV) ۸
۱-۵-۱ معرفی ویروس ۸
۱-۵-۲ مهمترین علائم CABYV ۹
۱-۵-۳ انتقال CABYV ۱۱
۱-۵-۴ نژادهای CABYV ۱۱
۱-۵-۵ دامنه میزبانی CABYV ۱۱
۱-۵-۶ مشخصات پیکره ویروس CABYV ۱۱
۱-۵-۶-۱ *P0* ۱۲
۱-۶ روش‌های کنترل ویروس‌ها و ایجاد مقاومت به ویروس‌ها در گیاهان ۱۴
۱-۶-۱ کنترل زراعی (Cultural Control) ۱۴

فهرست مطالب

۱-۶-۱-۱ برداشت و حذف گیاهان آلوده از مزرعه ۱۴

۱-۶-۱-۲ استفاده از نهال‌های عاری از ویروس ۱۴

۱-۶-۱-۳ حذف آلودگی لباس، ابزار و دست‌ها با محلول Trisodium Phosphate. ۱۴

۱-۶-۱-۴ کنترل ناقلین ویروس‌ها با استفاده از حشره‌کش‌ها ۱۴

۱-۶-۲ حفاظت تقاطعی یا Cross-Protection ۱۴

۱-۶-۲-۱ حفاظت تقاطعی بوسیله پروتئین..... ۱۵

۱-۶-۲-۲ حفاظت تقاطعی بوسیله RNA..... ۱۶

۱-۶-۲-۳ حفاظت تقاطعی با مکانیسم‌های چندگانه ۱۶

۱-۶-۳ استفاده از ارقام مقاوم ۱۷

۱-۶-۳-۱ میزبان بدون واکنش ۱۷

۱-۶-۳-۲ واکنش فوق حساسیت ۱۷

۱-۶-۳-۳ مقاومت اکتسابی سیستمیک ۱۷

۱-۶-۳-۴ ژن‌های مقاومت طبیعی در گیاهان..... ۱۷

۱-۶-۳-۴-۱ مقاومت عمودی، مقاومت تک ژنی، مقاومت با ژن اصلی..... ۱۸

۱-۶-۳-۴-۲ مقاومت افقی، مقاومت چند ژنی، مقاومت با ژن‌های فرعی ۱۹

۱-۶-۴ ایجاد مقاومت از طریق روش‌های سنتی ۱۹

۱-۶-۵ ایجاد مقاومت از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک ۲۰

۱-۶-۵-۱ ایجاد مقاومت بوسیله بیان پروتئین‌های پاتوژن..... ۲۱

۱-۶-۵-۲ مقاومت مبتنی بر RNA..... ۲۳

۱-۶-۵-۳ مقاومت مبتنی بر ژن‌های میزبان(Host-drived Resistance)..... ۲۵

۱-۶-۵-۴ مقاومت با استفاده از آنتی‌بادی در گیاهان ۲۶

فهرست مطالب

۱-۶-۶ مقاومت بوسیله RNA Silencing ۲۶

۱-۶-۶-۱ مکانیسم خاموشی RNA ۲۷

۱-۶-۶-۲ تاریخچه تولد RNA Silencing به عنوان یک دفاع ضد ویروسی در گیاهان ۲۹

۱-۶-۶-۳ روش‌های ایجاد مقاومت در گیاهان مبتنی بر RNA Silencing ۳۰

۱-۶-۶-۴ روش غلبه بر مقاومت RNA Silencing میزبان توسط ویروس‌ها ۳۲

۱-۶-۶-۵ نحوه عملکرد پروتئین‌های ممانعت کننده از RNA Silencing ۳۶

۲ مواد و روش‌ها ۳۹

۲-۱ مواد ۳۹

۲-۱-۱ مواد شیمیایی ۳۹

۲-۱-۲ آنزیم‌ها ۴۰

۲-۱-۲-۱ آنزیم‌های برشی ۴۰

۲-۱-۲-۲ سایر آنزیم‌ها ۴۰

۲-۱-۳ مارکرهای مورد استفاده ۴۰

۲-۱-۴ آغازگرها یا الیگودئوکسی ریبونوکلئوتیدها ۴۱

۲-۱-۵ نژادهای باکتریایی و محیط‌های کشت آن‌ها ۴۲

۲-۱-۶ آنتی بیوتیک‌ها ۴۲

۲-۱-۷ وکتورها ۴۳

۲-۱-۸ محلول‌های مورد نیاز برای الکتروفورز ۴۴

۲-۱-۸-۱ بافر TAE ۴۴

۲-۱-۸-۲ محلول اتیدیوم بروماید ۴۵

فهرست مطالب

۲-۱-۸-۲ بافر بارگذاری ۴۵

۲-۲ روش‌ها ۴۶

۲-۲-۱ کلون کردن قطعه ۴۰۰ جفت بازی *PO* در جهت سنس درون وکتور pFGC5941.... ۴۶

۲-۲-۱-۱ واکنش PCR ۴۶

۲-۲-۱-۲ برنامه و چرخه‌های دمایی واکنش‌های PCR ۴۶

۲-۲-۱-۳ الکتروفورز قطعات DNA روی ژل آگارز ۴۷

۲-۲-۱-۴ خالص‌سازی محصول PCR ۴۷

۲-۲-۱-۵ تعیین غلظت اسیدهای نوکلئیک ۴۸

۲-۲-۱-۶ واکنش برش آنزیمی ۴۸

۲-۲-۱-۷ الکتروفورز قطعات DNAی برش‌یافته بر روی ژل آگارز LMP ۴۹

۲-۲-۱-۸ خالص‌سازی DNA از ژل LMP..... ۴۹

۲-۲-۱-۹ لیگاسیون اول ۵۰

۲-۲-۱-۱۰ تهیه سلول‌های مستعد باکتریایی ۵۰

۲-۲-۱-۱۰-۱ سلول‌های مستعد الکتروپواسیون *E. coli*..... ۵۱

۲-۲-۱-۱۰-۲ سلول‌های مستعد شوک حرارتی *E. coli* ۵۱

۲-۲-۱-۱۱ روش تهیه سلول‌های مستعد شوک حرارتی *E. coli* ۵۲

۲-۲-۱-۱۲ اندازه‌گیری OD با دستگاه اسپکتروفتومتری..... ۵۳

۲-۲-۱-۱۳ تراریزش سلول‌های باکتریایی ۵۳

۲-۲-۱-۱۳-۱ انتقال پلاسمید به باکتری با روش الکتروپوراسیون ۵۳

۲-۲-۱-۱۳-۲ .انتقال DNAی پلاسمید به باکتری با روش شوک حرارتی ۵۳

فهرست مطالب

۲-۲-۱-۱۴ گزینش کلنی‌های مثبت ۵۴

۲-۲-۱-۱۵ استخراج DNAی پلاسمید ۵۴

۲-۲-۱-۱۵-۱ روش استخراج پلاسمید ۵۵

۲-۲-۲ کلون کردن قطعه ۴۰۰ جفت بازی PO در جهت آنتی‌سنس درون وکتور pFGC5941 حاوی قطعه سنس ۵۶

۲-۲-۲-۱ تکثیر قطعه DNA ۵۶

۲-۲-۲-۲ واکنش برش آنزیمی ۵۷

۲-۲-۲-۳ الکتروفورز قطعات DNAی برش یافته بر روی ژل آگارز LMP ۵۷

۲-۲-۲-۴ لیگاسیون دوم ۵۷

۲-۲-۲-۵ انتقال محصول لیگاسیون به باکتری‌های شایسته ۵۷

۲-۲-۲-۶ گزینش کلنی‌های مثبت ۵۸

۲-۲-۲-۷ استخراج پلاسمید ۵۸

۳. نتایج و بحث ۶۰

۳-۱ هدف اصلی و معرفی پلاسمید ۶۰

۳-۱-۱ ایجاد سازه RNAi از ژن *PO* ۶۱

۳-۱-۱-۱ کلونینگ در جهت سنس ۶۱

۳-۱-۱-۱-۱ واکنش PCR از pBin61-PO CABYV برای تکثیر قطعه ۴۰۰ نوکلئوتیدی *PO* ۶۱

۳-۱-۱-۱-۲ هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده ۶۲

۳-۱-۱-۱-۳ هضم آنزیمی وکتور pFGC5941 با آنزیم‌های محدود کننده ۶۲

۳-۱-۱-۱-۴ مرحله آخر کلونینگ در جهت سنس برای بدست آوردن pFGC-*PO* و تایید وکتور-های نوترکیب حاصل ۶۳

فهرست مطالب

۳-۱-۱-۲ کلونینگ دوم *PO* در جهت آنتی‌سنس در وکتور pFGC5941 ..... ۶۹
۳-۱-۱-۲-۱ PCR از pBin61-PO ^{CABYV} برای تکثیر PO ^{CABYV} ۶۹
۳-۱-۱-۲-۲ برش با آنزیم‌های محدودکننده برای کلونینگ در جهت آنتی‌سنس ۶۹
۳-۱-۱-۲-۳ هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pFGC-*PO* ۶۹
۳-۱-۱-۲-۴ مرحله آخر کلونینگ دوم و تایید وکتورهای نوترکیب pFGC-*PO* در جهت آنتی-سنس ۷۱
۳-۲ بحث ۷۴
۴ نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات ۷۹
۴-۱ نتیجه‌گیری کلی ۸۰
۴-۲ پیشنهادات ۸۱
منابع و ماخذ ۸۲

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ تصویر زردی و ضخیم شدن برگهای پیر در خربزه (A) و نکروز برگ‌های پایه‌ای در گیاهان مسن‌تر (B) مزرعه آلوده خربزه (C) مزرعه آلوده کدو (D) کلروز برگ پایه در کدو و کاهش رشد (E) در مقایسه با برگهای سالم(F). ۹

شکل ۱-۲ ساختار ژنومی Polerovirusها ۱۱

شکل ۱-۳ تصویر شماتیک از مجموعه SCF یوبی کوئیتین لیگاز. یک پروتئین F-box و اتصال سوبسترا مرتبط با F-box و تعامل SKP1 به مجموعه اصلی که واسطه یوبی کوئیتینه شدن سوبستراست ۱۲

شکل ۱-۴ مکانیسم مولکولی و عمومی RNA Silencing در یوکاریوت‌ها ۳۱

شکل ۱-۵ مکانیسم ممانعت کننده‌های RNA Silencing..... ۳۶

شکل ۲-۱ تصویر الکتروفورز مارکرهای استفاده شده در این تحقیق..... ۴۱

شکل ۲-۲ نقشه‌ی وکتور pFGC5941. این وکتور توسّط دانشگاه آریزونای آمریکا طرّاحی شده و اطّلاعات مربوط به آن در سایت http://www.chromdb.org/5941seq.html موجود می‌باشد. ۴۴

شکل ۲-۳ مراحل استخراج پلاسمید ۵۶

شکل ۳-۱ استراتژی کلونینگ قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ژن *P0* ، در وکتور مخصوص RNAi،۱) binary وکتور گیاهی ۲) کلونینگ در جهت سنس ۳) کلونینگ در جهت آنتی سنس ۴) سازه‌ی RNAi. ۶۰

شکل ۳-۲ شکل شماتیک رونوشت سازه‌ی RNAi در سلول. این ساختار راه انداز مکانیسم RNA Silencing یا PTGS علیه ویروس مهاجم می‌باشد... ..... ۶۰

شکل ۳-۳ قطعه ژن P0 حاصل از واکنش PCR..... ۶۱

شکل ۳-۴ نتیجه‌ی الکتروفورز محصول PCR. M، مارکر DNA، قطعه‌ی ۴۰۰ جفت بازی تکثیر یافته از انتهای ژن *P0*..... ۶۱

شکل ۳-۵ نتیجه‌ی الکتروفورز محصولات برش یافته توسّط آنزیم‌های *Xho*I و *Nco*I. **الف)** ژل LMP ٪۲ حاوی M، مارکر DNA، ۱، قطعه‌ی *P0* هضم شده. **ب)** ژل LMP ٪۰/۸ حاوی وکتور pFGCی خالی هضم شده ۶۳

فهرست اشکال

شکل ۳-۶ وکتور درج قطعه‌ی سنس *P0* درون وکتور pFGC خالی طی واکنش لیگاسیون و ایجاد وکتور pFGC-*P0*. ۶۴

شکل ۳-۷ رشد باکتری‌های *E. coli* ترانسفورم شده با محصول لیگاسیون. ،الف) رشد کلنی‌های دریافت کننده‌ی وکتور pFGC-*P0* Sense ، ب) کشت مجدد باکتری‌های تعدادی از کلونی‌های گزینش شده، روی محیط حاوی کانامایسین جهت افزایش خلوص تک کلونی‌ها ۶۵

شکل ۳-۸ الف)چگونگی اتصال پرایمرهای سنس به وکتور خالی (ب)وکتور حاوی قطعه‌ی سنس و تفاوت طول باند حاصل از آنها طی PCR. ۶۶

شکل ۳-۹ الف) نتیجه الکتروفورز محصول PCR کلنی‌های حاصل از کلونینگ اول (Sense) (ب) نتیجه الکتروفورز محصول PCR پلاسمید حاصل از کلونینگ اول (Sense). ۶۷

شکل ۳-۱۰ نتیجه‌ی الکتروفورز محصول PCR *P0*، برش آنزیمی آن ژن و همچنین وکتور برای کلونینگ در جهت antiSens. ۷۰

شکل ۳-۱۱ درج قطعه آنتی‌سنس *P0* درون وکتور pFGC –*P0* طی واکنش لیگاسیون و ایجاد وکتور pFGC – *P0P0* ۷۱

شکل ۳-۱۲ رشد باکتری‌های *E. coli* ترانسفورم شده با محصول لیگاسیون، رشد کلنی‌های دریافت کننده‌ی وکتور pFGC-P0 antiSense. ۷۲

شکل ۳-۱۳ نتیجه الکتروفورز PCRهای تائید کلونینگ دوم در جهت antiSense. ۷۳

فهرست جداول

جدول ۱-۱ ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان. ۶

جدول ۱-۲ پروتئین های ممانعت کننده ویروسی RNA Silencing ۳۳

جدول ۲-۱ فهرست ترکیبات شیمیایی ۳۹

جدول ۲-۲ فهرست آنزیم‌های برشی ۴۰

جدول ۲-۳ فهرست سایر آنزیم‌ها ۴۰

جدول ۲-۴ فهرست مارکرها ۴۱

جدول ۲-۵ لیست پرایمرها ۴۲

جدول ۲-۶ ترکیبات محیط کشت LB مایع و جامد ۴۲

جدول ۲-۷ لیست آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده ۴۳

جدول ۲-۸ ترکیبات بافر TAE ×۱۰ به ازای یک لیتر ۴۵

جدول ۲-۹ ترکیبات بافر بارگذاری ×۶ ..... ۴۵

جدول ۲-۱۰ ترکیبات واکنش PCR ۴۶

جدول ۲-۱۱ برنامه حرارتی واکنش PCR ۴۷

جدول ۲-۱۲ ترکیب واکنش لیگاسیون در حجم ۲۰ میکرولیتر ۵۰

جدول ۲-۱۳ مواد تشکیل‌دهنده محلول‌های مورد نیاز در تهیه سلول‌های مستعد به روش شوک حرارتی ۵۲

جدول ۲-۱۴ لیست محلول‌های استفاده شده در استخراج DNA پلاسمید ۵۵

چکیده:

گیاهان خانواده کدوئیان دارای اهمیت خوراکی و همچنین داروئی در سراسر جهان می‌باشند. ویروس زردی شته‌زاد کدوئیان (Cucurbit Aphid-Born Yellow Polerovirus: CABYV) یکی از شایع‌ترین ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان در جهان است. ویروس CABYV کاهش محصول قابل توجهی را در خانواده گیاهی کدوئیان به‌خصوص خربزه و خیار از طریق کاهش تعداد میوه ایجاد می‌کند. تنها راه کاهش خسارت این ویروس استفاده از ارقام مقاوم و مبارزه با ناقلین آن است که روش دوم بدلیل هزینه بالا و مسائل زیست محیطی مورد تاکید نمی‌باشد. تحقیقات کمی در خصوص ایجاد مقاومت به این ویروس در کدوئیان صورت گرفته است. یکی از روشهای موثر برای ایجاد مقاومت به ویروس‌ها در گیاهان استفاده از مقاومت پاتوژن‌زاد (Pathogen-derived resistance) است که بر اساس استفاده از ژن‌ها یا توالی‌های ویروسی و انتقال آنها به گیاه میزبان استوار است. پدیده خاموشی ژن پس از رونویسی (Post-transcriptional gene silencing: PTGS) یا RNA Silencing یکی از این روش‌ها می‌باشد. در تحقیق حاضر برای بررسی امکان ایجاد مقاومت به ویروس CABYV با استفاده از سیستم ایجاد مقاومت ناشی از پاتوژن (مقاومت با واسطه RNA) از ژن *P0* ویروس استفاده گردید. در این تحقیق سازه‌ای طراحی شد که در آن قطعه‌ای از ویروس در جهت سنس و آنتی‌سنس در دو طرف اینترون و در مقابل پروموتور 35S در پلاسمید pFGC5941 قرار داده شد که پس از رونویسی حالت سنجاق‌سری به خود می‌گیرد. برای این‌کار با آغازگرهای اختصاصی قطعه ۴۰۰ بازی از ORF0 که کدکننده پروتئین ممانعت‌کننده از RNA Silencing می‌باشد با PCR تکثیر گردید. با روش برش آنزیمی و لیگاسیون این قطعه ابتدا در جهت سنس مقابل پروموتور در پلاسمید قرار گرفت و سپس در جهت آنتی‌سنس و پس از اینترون وارد شد. این پلاسمید نوترکیب می‌تواند برای تراریزش و ایجاد مقاومت در گیاهان مختلف میزبان این ویروس بکار برده شود..

واژه‌های کلیدی: خاموشی ژن، مقاومت به ویروس، CABYV، مهندسی ژنتیک

مقدمه

ویروس‌ها پس از قارچ‌ها مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در گیاهان هستند و در مـواردی بیشـترین خسارت را به محصولات کشاورزی وارد می‌آورند. خسارت برخی از ویروس‌ها در کشور ما هر ساله به صدها میلیارد ریال بالغ می‌گردد. بیماری‌های ویروسی یکی از عوامل محدود کننده تولید کـدوئیان در دنیا می‌باشند وخسارت ویروس‌های شته‌زاد ازجمله ویروس زردی شـته‌زاد کـدوئیان (*Cucurbit Aphid-born Yellow Virus*: CABYV) در این محصولات قابل ملاحظه است. این ویـروس باعـث زردی، ضخیم‌شدن رگبرگ‌ها، کم‌شدن فاصله بین گره‌ها و در نهایت از بین رفتن محصول و گیاه می-شـود. ایـن ویـروس بـا ژنـوم ssRNA+ و پیکـره چنـدوجهی از جـنس Polerovirus و خـانواده Leutoviridae می‌باشد. با توجه به اهمیت این ویروس از لحاظ اقتصادی و علمی، مهندسـی ژنتیـک درصدد ایجاد مقاومت به این ویروس است. پدیده RNA Silencing یک مکانسیم طبیعی دفـاعی بـر علیه عوامل ژنتیکی بیگانه مثل ویروس‌ها است که اولین بـار در گیاهـان کشـف و خاموشـی پـس از رونویسی ژن (Post transcriptional gene silencing: PTGS) نامیده شد. این مکانسیم با ایجاد یک مولکول RNA دو رشته‌ای (dsRNA) تولید شده در طی تکثیر ژنوم ویروس آغاز می‌شود. سپس این RNAدو رشته‌ای به وسیله یک پروتئین نوکلئاز، به نام Dicer، به قطعات کوچکتر در حدود۲۱ تـا ۲۴ نوکلئوتیدی تقسیم می‌شود کهRNAهای کوچـک تـداخلی(Small interfering RNA: siRNA) نـام دارند(Pazhouhandeh 2007). سپس این‌RNAهای کوچک در یک مجموعه ویژه به نامRISC، جای می‌گیرند. جزء کلیدیRISC، پروتئین آرگونات اسـت (Baumberger and Baulcombe 2005). ایـن مجموعه قادر است mRNA مکمل خود را شناسایی و تجزیـه کنـد. عوامـل خـاموش‌کننـده‌ی ژن از طریق پلاسمودسماتا به سلول‌های مجاور و از طریق آوندآبکش به سرتاسر گیاه انتقال می‌یابد. اخیـرا نشان داده شده است که بسیاری از پروتئین‌های ویروسی می‌توانند مـانع از RNA Silencing شـوند. پروتئین‌های ممانعت کننده ویروس‌های گوناگون در مراحـل مختلفـی از مکانسـیم RNA Silencing فعالیت می‌کنند (Alvarad and Scholthof 2009). تقریبا از تمام گونه‌های ویروس‌های گیاهی بیشتر از ۳۵ پروتئین اختصاصی ممانعت کننده از مکانیسم Silencing شناسایی شده اسـت (Li and Ding 2006). این پروتئین‌ها ساختار و عملکرد بسیار متفـاوتی دارنـد. در سـال ۲۰۰۶ نشـان داده شـد کـه پروتئین 2b ویروس موزاییک خیار از فعالیت تجزیه کنندگی آرگونات ۱ ممانعت می‌کنـد(Zhang *et*

al. 2006) . پروتئین P38 ویروس رگه‌ای شلغم (*Turnip Rattle Virus*: TRV) فعالیت DCL2 و DCL4 را در آرابیدوبسیس بلوکه می‌کند (Deleris *et al*. 2006). نشان داده شده که پروتئین *P0* ویروس CABYV به عنوان ممانعت کننده از مکانسیم Silencing گیاه عمل می‌کند (Pazhouhandeh *et al*. 2006). در این تحقیق برای اولین بار وکتور نوترکیب تولید کننده سازه سنجاق سری قطعه‌ای از ژن ممانعت کننده‌ی RNA Silencing ویروس زردی شته‌زاد کدوئیان، یعنی ORF0، طراحی و ساخته شد. این وکتور می‌تواند در ادامه برای تراریزش گیاهان خانواده کدوئیان به منظور ایجاد ارقام مقاوم استفاده گردد و در آنها مکانیسم RNA Silencing را بر علیه ویروس به‌طور دائمی روشن سازد.

فصل اول

بررسی منابع

۱-بررسی منابع

۱-۱- ویروس‌های گیاهی

ویروس‌های آلوده کننده گیاهان مسئول کاهش در عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی در سراسر جهان هستند. در نتیجه اهمیت اقتصادی زیادی دارند. این انگیزه‌ای برای تحقیقات گسترده در بیولوژی سلولی و مولکولی این پاتوژن‌ها و تعامل بین آنها و گیاهان میزبان‌شان و ناقلین آنها فراهم کرده است (Caranta *et al*. 2011). در محصولات یک‌ساله، مثل اغلب سبزیجات و غلات، معمولاً از بذر برای تکثیر استفاده می‌شود و آلودگی‌های ویروسی در این گونه محصولات در صورت بذر زادی جدی می‌باشند و در یک سال، ممکن است کل محصول خسارت دیده و در همان مزرعه محصول سالمی برداشت نشود (Walkey 1991).

۱-۲- اهمیت گیاهان خانواده کدوئیان

خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) گیاهانی یک پایه و یک‌ساله بوده ودارای ساقه خزنده و طویل می‌باشند. اصل آنها از جنوب شرق آسیا و تکثیر این گیاهان از طریق بذر می‌باشد. خانواده کدوئیان با اهمیت اقتصادی بالا در کشاورزی، شامل ۱۳۰ جنس و ۸۰۰ گونه می‌باشد (Kocyan *et al*. 2007). گونه‌های عمده خانواده کدوئیان (خربزه، خیار، هندوانه و کدو) محصولات سبزی مهم در سراسر جهان، به خصوص در کشورهای در حال توسعه است. میوه کال، دانه و قطعات هوایی گیاهان این خانواده مصرف خوراکی و داروئی دارد (Raman and Lau 1996). همچنین این خانواده منبع خوبی از ویتامین های A، K، C، تیامین، نیاسین، ویتامین B6 و همچنین مقدار زیادی پتاسیم است. موسسه ملی سرطان، خیار را به علت دارا بودن خواص پیشگیرانه از سرطان بسیار مفید معرفی کرده است. یکی از بهترین منابع از کاروتنوئیدها در انسان کدوئیان هستند که کاروتنوئیدها نه تنها کمک به محافظت از پوست و چشم در مقابل اشعه UV می‌کنند بلکه دخیل در تولید آنزیم های سم‌زدایی هستند که از بدن در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند.

۱-۳- ویروس‌های خانواده کدوئیان

ویروس‌های کدوئیان همیشه باعث کاهش عمده کمیت و کیفیت محصولات کدوئیان در سراسر جهان شده و یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده برای تولید کنندگان هستند. بیش از ۳۵