طراحی و ساخت سازه سنجاق سری با استفاده از ترادف ژن 2b برای القای مقاومت به ویروس موزائیک خیار*

Design and construction of hairpin structure using sequence of CMV-2b gene for induction of resistance to *Cucumber mosaic virus*

عبدالباسط عزیزی، مسعود شمس‌بخش** و احمد معینی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱)

چکیده

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) بیش از هزار وسیصد گونه گیاهی را آلوده و سبب افت کمی و کیفی محصولات می‌شود. در این تحقیق کاربرد خاموشی پس از نسخه برداری با استفاده از سازه سنجاق سری برای بدست آوردن گیاهان مقاوم به CMV بررسی شد. به این منظور ترادف ۱۴۵ جفت بازی حفاظت‌شده ویروسی از ژن بازدارنده سیستم خاموشی گیاه میزبان انتخاب شد. این ترادف بصورت سنس و آنتی سنس که توسط اینترون از هم جدا می‌شوند در حامل دوگانه p*FGC*5941 همسانه سازی و حامل نوترکیب p*FGC-2b-h* نامیده شد. حامل ساخته‌شده به اگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل گردید. گیاهان توتون (*Nicotiana benthamiana*) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) بصورت موقت به این سازه تیمار شد و شش روز بعد با ویروس موزائیک خیار مایه زنی شدند. کارائی سازه ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی با ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد این سازه کارائی بالای در کاهش علایم و غلظت ویروس در برگ‌های بالائی نسبت به گیاه شاهد دارد و از این سازه می‌توان در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به CMV استفاده کرد.

کلیدواژه: CMV، *Nicotiana benthamiana*، خاموشی پس از رونویسی

---

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه‌شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱ - به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Design and construction of hairpin structure using sequence of CMV-2b gene for induction of resistance to *Cucumber mosaic virus*[*]

A. AZIZI, M. SHAMS-BAKHSH[**] and A. MOEENI[1]

(Received: 21.5.2014; Accepted: 31.1.2015)

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) infects more than 1300 plant species that causes reduction in yield and quality of crops. In this research, the application of the hairpin-mediated RNA silencing technology was investigated for obtaining resistance to CMV. Therefore, a fragment of 145 nt from the silencing suppressor gene of CMV was selected. The CMV sequences from NCBI were aligned and the consensus sequence was selected and synthesized. This gene sequence was cloned as sense and antisense in pFGC5941 binary vector and the recombinant vector named p*FGC-2b-h*. The obtained plasmid was transferred to GV3101 agrobacterium strain. Transient assay on bean (*Phaseolus vulgaris*) and *Nicotiana benthamiana* was performed by the agrobacterium containing p*FGC-2b-h* and six days later plants were mechanically inoculated by CMV. Fifteen days postinoculation, plants were assessed using symptoms appearance and ELISA test. Results showed that the construct can effectively reduce the symptoms and virus accumulation level. Furthermore, the results suggested that the p*FGC-2b-h* construct can be used to obtain transgenic plants resistance to CMV.

Keywords: CMV, *Nicotiana benthamiana*, Posttransciptional gene silencing

---

* Part of Ph.D. Thesis of The First Author Submitted to Faculty of Agric., Tarbiat Modares Univ., Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: Shamsbakhsh@modares.ac.ir

1.Former Ph.D. Student and Associate Prof. of Plant Pathol. Dept., and Associate Prof. of Plant Breeding Dept., Faculty of Agric., Tarbiat Modares Univ., Tehran, Iran.

مقدمه

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) گونه تیپ جنس *Cucumovirus* متعلق به تیره *Bromoviridae* دامنه میزبانی وسیعی دارد و بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی را آلوده می‌کند (García-Arenal & Palukaitis 2008). این ویروس قادر به آلوده کردن محصولات زراعی مهمی بوده و به سبب خسارت فراوان آن، تبدیل به یکی از مهمترین و اقتصادی ترین ویروس-های گیاهی شده است (Yang *et al.* 1997). این ویروس شته برد بوده و بصورت ناپایا منتقل می‌شود (Nault 1997, Gildow *et al.* 2008). همچنین در بعضی از میزبان‌ها بذربرد نیز می‌باشد (Yang *et al.* 1997). جدایه‌های ویروس موزائیک خیار براساس تفاوت در دامنه میزبانی، علائم بیماری، گونه شته ناقل، خصوصیات سرولوژیکی و ترادف نوکلئوتیدی در دو گروه اصلی I و II دسته بندی می‌شوند (Anderson *et al.* 1995, Hong *et al.* 2007). ویروس موزائیک خیار اولین بار از ایران توسط *کایزر و دانش* گزارش شد (Kaiser & Danesh 1971). کنترل بیماری ویروس موزائیک خیار به دلیل دامنه میزبانی وسیع و انتقال بصورت ناپایا با بیش از ۶۰ گونه شته بسیار مشکل می‌باشد (García-Arenal & Palukaitis 2008). از این رو بهترین راه مدیریت بیماری ناشی از این ویروس کشت ارقام مقاوم می‌باشد. تعدادی ژن مقاومت طبیعی به CMV شناسایی شده‌اند از جمله RT4-4 (Seo *et al.* 2006, Wang *et al.* 1999) در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و RCY1 در *Arabidopsis thaliana* (Takahashi *et al.* 2002). یکی دیگر از راهبردهای ایجاد مقاومت به ویروس‌ها از طریق مهندسی ژنتیک و با استفاده از قطعاتی از ژنوم ویروس می‌باشد که مقاومت ناشی از بیمارگر نامیده می‌شود (Pathogen derived resistance, PDR) (Sanford & Johnston 1985). بیشتر مطالعات انجام گرفته با استفاده از مقاومت ناشی از بیمارگر با استفاده از بیان ژن پوشش پروتئینی ویروس بوده است (Lehmann *et al.* 2003, Lomonossoff 1995, Malpica *et al.* 1998). از دیگر روش‌های ایجاد مقاومت به ویروس‌ها با استفاده از راهبرد PDR استفاده از خاموشی ژن پس از رونویسی (Post transcriptional gene silencing, PTGS) می-باشد (Lennefors *et al.* 2006). این راهبرد سبب تحریک مکانیسم خاموشی آر ان ا می‌شود و یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان علیه ویروس‌ها می‌باشد (Fire *et al.* 1998, Waterhouse *et al.* 2001). هنگامی که توالی‌های تکراری معکوس از بخشی از cDNA (inverted repeat of partial cDNA) ویروس گیاهی به گیاه میزبان منتقل شود، آر ان اهای دولای ویروسی رونویسی شده و خاموشی آر ان ا القاء می‌شود، در نتیجه گیاه تراریخت به ویروس متناظر مقاوم می‌شود (Wang *et al.* 2000, Frizzi & Huang 2010). مقاومت ناشی از بیمارگر با استفاده از راهبرد توالی‌های تکراری معکوس برای ویروس‌های گیاهی مختلف استفاده شده است و با استفاده از این روش مقاومت بالائی بدست آمده است (Hu *et al.* 2011, Nicola-Negri *et al.* 2005, Sun *et al.* 2010). تحقیقات متعددی برای ایجاد مقاومت به CMV با استفاده از این روش انجام گرفته است (Hu *et al.* 2011, Kalantidis *et al.* 2002, Kavosipour *et al.* 2012). همچنین از میکرو آر ان اهای مصنوعی برای ایجاد مقاومت به این ویروس استفاده شده است (Qu *et al.* 2007). نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که استفاده از توالی ژن‌های ویروسی بازدارنده خاموشی از کارائی بیشتری برای ایجاد مقاومت برخوردار است (Qu *et al.* 2007, Kalantidis *et al.*

(1999 ,Li *et al.* 2002). ژن 2b ویروس CMV بازدارنده ویروسی خاموشی آر ان ا بوده و از مکانیسم مقاومت ذاتی گیاه در مقابل CMV جلوگیری می‌کند (Zhang *et al.* 2006, Brigneti *et al.* 1998). بعلاوه این ژن از رونویسی ژن‌های واکنش دهنده به جاسمونیک اسید نیز جلوگیری کرده و درنتیجه سبب حساسیت به حشرات می‌شود (Lewsey *et al.* 2010, Ziebell *et al.* 2011). گیاهان تراریخت توتون با یک قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ژن 2b ویروس موزائیک خیار در حدود ۳۰ درصد مقاومت به CMV نشان می‌دهند (Kavosipour *et al.* 2012). پروتئین 2b مربوط به CMV باعث کاهش تجمع siRNAهای ۲۱، ۲۲، و ۲۴ نوکلئوتیدی می‌شود. بعلاوه مشخص شده که این پروتئین از فعالیت RDR و تولید siRNAهای ثانویه جلوگیری کرده و همچنین بازدارنده فعالیت مسیر سالسیلیک اسید می‌باشد. از دیگر نقش‌های 2b جلوگیری از پیشرفت علائم بیماری در مراحل اولیه آلودگی است (Diaz-Pendon *et al.* 2007). بدلیل اهمیت ژن 2b در ایجاد آلودگی گیاه در برابر CMV، در تحقیق حاضر ژن 2b مورد هدف قرار گرفت. در پژوهش حاضر قطعه‌ای حفاظت‌شده به اندازه ۱۴۵ جفت بازی از ژن 2b انتخاب شد و کارایی سازه بدست آمده در ایجاد مقاومت علیه ویروس موزائیک خیار بررسی شد.

مواد و روش‌های بررسی

مواد گیاهی، جدایه ویروس و روش تیمار گیاهان

بذر گیاهان *Nicotiana benthamiana* و لوبیای معمولی *Phaseolus vulgaris* کشت شد. آلودگی موقت گیاهچه‌های لوبیا به اگروباکتریوم در مرحله ای که جفت برگ تک برگچه ای تا ۷۰-۸۰ درصد رشد کرده بودند انجام گرفت و تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم به زیر برگ گیاهان *N. benthamiana* در مرحله ای که دومین جفت برگ گیاهچه رشد کامل کرده بودند انجام گرفت. برای آلوده سازی به ویروس از بافر فسفات [0.1 M K2HPO4, 0.15 % 2-β- mercapto ethanol, pH 8.5] استفاده گردید. مایه‌زنی گیاهان به ویروس موزائیک خیار، جدایه فارس، شش روز بعد از تزریق باکتری انجام گرفت.

تهیه سازه پلاسمیدی

ژن 2b در چند جدایه CMV (HQ916353, AF150731, S72187, Y16925, AM183118, AB368497, AF033667) همردیف سازی شد و ناحیه حفاظت‌شده آنها از توالی ۲۴۴۲ تا ۲۵۸۶ در جدایه K با رس شماره S72187 انتخاب شد و در ناحیه ′۵ این قطعه ۱۴۵ نوکلئوتیدی جایگاه برشی آنزیم‌های *Xho*I و *Bam*HI و در انتهای ′۳ آن جایگاه برشی آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III قرار داده شد. ترادف بدست آمده در پایگاه اینترنتی RNAi scan (http://bioinfo2.noble.org/RNAi Scan/RNAiScan.htm) برای بررسی خاموشی ترادف‌های غیر هدف در گیاه و همچنین از نظر تشکیل ساختارهای ثانویه با استفاده از نرم افزار RNA structure مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت و ناحیه با کمترین ساختار ثانویه انتخاب گردید.

سپس توالی مورد نظر توسط شرکت Generay Biotech company کشور چین ساخته شد. در طراحی قطعه مورد نظر جایگاه آنزیم‌های محدودگر *Xho*I و *Eco*RI جهت همسانه سازی بصورت سنس و آنزیم‌های محدودگر *Bam*HI و *Hind*III برای همسانه سازی آنتی سنس در حامل p*KANNIBAL* در نظر گرفته شد. حامل نوترکیب جهت تکثیر به باکتری *Escherichia coli* سویه

DH5α به روش شوک حرارتی منتقل گردید (Green and Sambrook, 2012). کشت باکتری در محیط کشت LB حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین انجام گرفت. برای تائید نوترکیبی و همسانه سازی صحیح در حامل از PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. حامل نوترکیب توسط آنزیم‌های *Xho*I و *Bam*HI برش خورده تا توالی‌های سنس و آنتی سنس به همراه اینترون *Pdk* از آن جدا شود. سپس حامل دوگانه p*FGC*5941 نیز با آنزیم‌های محدودگر مشابه برش داده شد تا اینترون *CHSA* از آن خارج شود، و سپس قطعه دارای توالی سنس و آنتی سنس ژن 2b به همراه اینترون *Pdk* به بدنه حامل برش داده‌شده p*FGC*5941 منتقل گردید. جهت تائید انتقال ژن مورد نظر به حامل دوگانه p*FGC*5941 از هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر *Kpn*I که یک جایگاه برشی در اینترون *Pdk* و یک جایگاه روی بدنه حامل دارد و همچنین تعیین توالی ناحیه مورد نظر، استفاده شد. حامل دوگانه نوترکیب p*FGC-2b-h* نام گرفت.

واکنش اتصال در حجم ۱۰ میکرولیتر (۱۰ واحد T4 Ligase، یک میکرولیتر ×10 Ligase buffer، ۰/۵ میکرولیتر PEG، ۰/۳ ng پلاسمید برش خورده، ۰/۵ ng قطعه ژن) در دمای یخچال (چهار درجه سلسیوس) به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت.

تهیه سلول مستعد اگروباکتریوم و انتقال سازه به آن

به منظور انتقال سازه به اگروباکتریوم از روش شوک الکتریکی استفاده گردید. جهت تهیه سلول‌های مستعد اگروباکتریوم ابتدا سویه GV3101 در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت YEB کشت شد و زمانی که غلظت آن به OD=0.6 رسید، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس سلول باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با نیروی ۴۰۰۰xg به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. سپس فاز رویی حذف و رسوب در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون سرد حل و ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد سوسپانسیون در سانتریفیوژ با شرایط یادشده رسوب داده شد و سپس در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر سرد حل و روی یخ نگهداری شد. تکرار شستشو و رسوب چهار بار انجام گرفت. در مرحله بعد رسوب در ۲۵ میلی لیتر بافر سوکروز-گلیسرول (272mM Sucrose, 15% Glycerol) حل و به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت، سپس مطابق شرایط یادشده رسوب داده شد. در مرحله بعد رسوب باکتری در دو میلی لیتر بافر سوکروز-گلیسرول حل شد و به میزان ۸۰ میکرولیتر در لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم و در فریزر نگهداری گردید. برای انتقال پلاسمید، نه نانوگرم از پلاسمید در ۸۰ میکرولیتر از سلول تهیه‌شده مخلوط و از دستگاه الکتروپورتور electroporator eppendorf 2510 طبق دستور شرکت سازنده (2.0 kV، 25 µF و 200 Ω) استفاده شد.

زیست سنجی مقاومت به ویروس

برای تزریق اگروباکتریوم به زیر برگ گیاهان جهت بیان موقت ژن، از روش موکشیمانا و همکاران (Mukeshimana *et al.* 2013) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این کار اگروباکتریوم سویه GV3101 در محیط کشت YEB دارای ۵۰ میلی گرم آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین کشت داده شد و دو روز بعد باکتری با سانتریفیوژ ۴۰۰۰×g به مدت پنج دقیقه رسوب داده شد. سپس رسوب بدست آمده در آب مقطر سترون دارای 100 µM استوسیرینگون حل و غلظت سوسپانسیون به OD=0.2 رسانده شد سپس یک ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰rpm تکان داده شد. جهت

بهینه کردن فاصله زمانی بین تزریق اگروباکتریوم به برگ‌ها و آلوده سازی گیاه به ویروس به فاصله زمانی دو روز از دو تا ۱۰ روز آلوده سازی گیاهان لوبیا به ویروس جدایه فارس انجام گرفت.

جهت آزمون زیست سنجی و بررسی مقاومت گیاهان ۱۵ روز بعد از مایه زنی به ویروس از نظر غلظت ویروس در گیاه و همچنین علائم رشدی گیاه مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمون زیست سنجی در گیاهان *N. benthamiana* انجام گرفت. ارزیابی سرولوژیکی به روش الایزای غیر مستقیم انجام گرفت. این آزمایش برای هر کدام از تیمارهای مورد نظر در چهار بوته (تکرار) انجام گرفت. همچنین اندازه رشد بوته و علائم بیماری در زمان‌های مختلف بعد از آلوده سازی به ویروس، با بوته شاهد مقایسه گردید و بعد از سه هفته وزن تر و خشک بوته‌ها مقایسه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تی انجام شد.

آزمون الیزا Direct antigen coating (DAC)-ELISA

برای ارزیابی کارایی سازه از روش سرولوژیکی DAC-ELISA استفاده گردید (Khetarpal *et al.* 1994). آنتی سرم CMV از مرکز تحقیقات ویروس شناسی دانشگاه شیراز تهیه گردید. ابتدا ۰/۲ گرم بافت برگ انتهایی گیاه در دو میلی لیتر از بافر عصاره گیری-بافر پوششی (۷۵٪ بافر عصاره گیری، ۲۵٪ بافر پوششی) خرد شد و از عصاره بدست آمده ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های الیزا ریخته شد. پس از یک شب نگهداری تشتک الیزا شستشو شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنتی سرم ویروس به رقت یک به ۳۵۰ اضافه شد و بعد از یک شب نگهداری در یخچال، شستشو و آنتی بادی ثانویه Goat-Anti-Rabbit تهیه‌شده از شرکت پرومگا با رقت یک به ۷۵۰۰ اضافه گردید و دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. بعد از حذف و شستشو تشتک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای حاوی پارانیتروفنل فسفات به نسبت ۰/۰۰۱ گرم در میلی لیتر ریخته شد و ۴۵ دقیقه بعد شدت جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه الیزا خوان Anthos 2020 ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد.

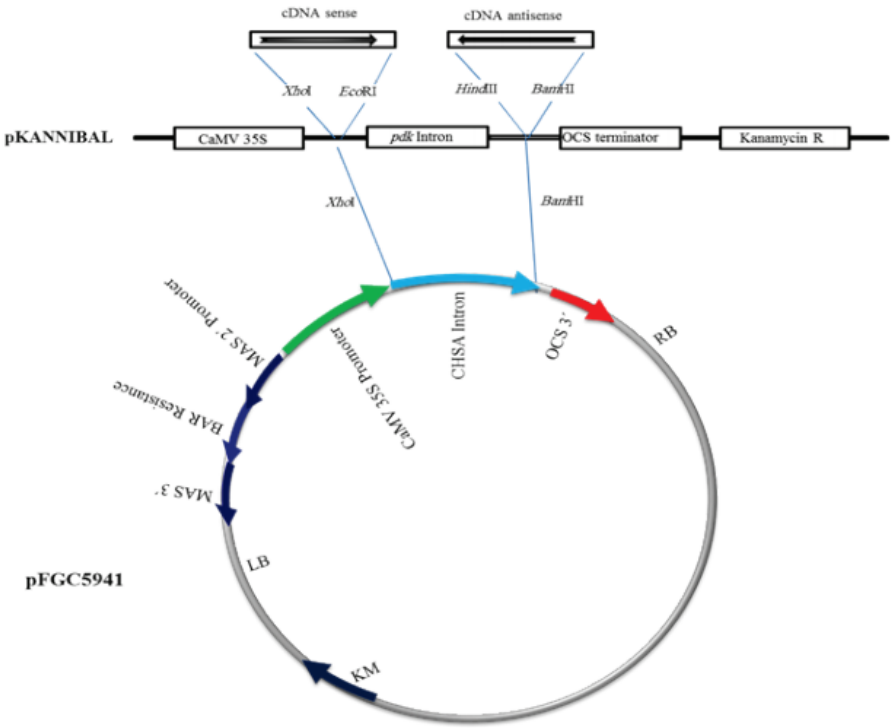
نتایج

بررسی‌های بیوانفورماتیکی

توالی سازه در پایگاه اینترنتی RNAi scan (http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan/RNAiScan.htm) بررسی و نشان داده شد که با توالی‌های موجود از گیاهان هم‌خوانی ندارد و هیچ کدام از small RNAهای بدست آمده از آن نمی‌تواند توالی‌های ثبت‌شده گیاهی در سامانه را خاموش کند. همچنین تجزیه و تحلیل‌ها با نرم افزار RNA structure نشان داد که ساختار ثانویه با طول بلند در cDNA این قطعه وجود ندارد.

تهیه و ساخت سازه سنجاق سری

قطعه ۱۴۵ جفت بازی ساخته‌شده توسط شرکت Generay Biotech با آنزیم‌های برشی محدودگر *Xho*I و *Eco*RI برش داده شد و این قطعه در حامل p*KANNIBAL* برش خورده توسط آنزیم‌های محدودگر مشابه به صورت سنس همسانه سازی شد و با هضم آنزیمی حامل نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی مشابه، همان قطعه ۱۴۵ جفت بازی خارج شد. همچنین در واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای K-F: (5'-agt tca ttt cat ttg gag agg-3') و K-R: (5'- tat ctc att aaa gca gga ctc-3')، که از کلنی‌ها باکتریایی انجام شد، صحت آن تائید گردید. حامل نوترکیب بدست آمده p*Kannibal-s* نام گرفت. در



شکل ۱) شکل شماتیکی از نحوه طراحی و همسانه سازی سازه p*FGC-2b-h* با استفاده از حامل‌های p*KANNIBAL* و p*FGC*4941 .

Figure 1) Schematic drawing design and cloning of the p*FGC-2b-h* construct using p*KANNIBAL* and p*FGC*4941.

مرحله بعد حامل نوترکیب p*Kannibal-s* و قطعه ۱۴۵ جفت بازی 2b توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III برش داده شد و سپس توالی بصورت آنتی‌سنس در p*Kannibal-s* همسانه سازی شد و توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز و هضم آنزیمی با آنزیم‌های مشابه که منجر به خروج همان قطعه ۱۴۵ جفت بازی می‌شود، تائید گردید و این سازه نوترکیب p*Kannibal-h* نام گرفت. سازه بدست آمده توسط آنزیم‌های *Xho*I و *Bam*HI بصورت هضم ناقص برش داده شد و حامل دوگانه p*FGC*5941 نیز توسط این دو آنزیم برش کامل خورده و اینترون *CHSA* از آن جدا گردید. سپس سازه سنجاق سری ۱۷۶۰ جفت بازی سنس-اینترون *pdk*-آنتی سنس جداشده از p*Kannibal-h* طی واکنش اتصال در داخل بدنه حامل p*FGC*5941 قرار داده شد و سازه بدست آمده توسط هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر *Kpn*I برش خورد و با خروج قطعه ۲۴۱۷ جفت بازی از حامل نوترکیب و همچنین تعیین توالی، تائید شد و p*FGC-2b-h* نامگذاری گردید (شکل ۱). همچنین اینترون حامل p*FGC*5941 با اینترون *pdk* جایگزین شد و سازه بدست آمده *pFGC-K* نام گرفته و به عنوان حامل شاهد در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

زیست سنجی، بررسی‌های سرولوژیکی و ارزیابی‌های گلخانه‌ای

در آلوده سازی گیاه لوبیای معمولی به اگروباکتریوم دارای سازه سنجاق سری p*FGC-2b-h* و ویروس موزائیک خیار، نتایج بااستفاده از الیزای غیر مستقیم نشان داد که بهترین فاصله زمانی لازم بین تزریق اگروباکتریوم و مایه زنی به ویروس شش روز می‌باشد و این زمان برای

شکل۲) اثر ویروس موزائیک خیارو سازه p*FGC-2b-h* بر روی وضعیت رشدی و علائم در گیاهان *N. benthamiana* سه هفته بعد از مایه زنی. H) گیاه سالم آلوده نشده به ویروس اما تیمار شده توسط سازه خالی p*FGC-K* بصورت موقت C) گیاه آلوده شده به ویروس و حامل بدون سازه C.h) گیاه مایه کوبی شده توسط ویروس و حامل دارای سازه سنجاق سری p*FGC-2b-h*.

Figure 2) Reaction of *N. benthamiana* plants to Cucumber mosaic virus three weeks after inoculation (H) Healthy plants that not inoculated with CMV but with p*FGC-K* construct, (C) Plants inoculated with CMV and p*FGC-K*, (C.h) plants inoculated transiently by p*FGC-2b-h* construct and CMV.

استقرار سازه در گیاه و سیستمیک شدن siRNAها لازم می‌باشد (داده‌ها نشان داده نشده است). اگروباکتریوم کشت‌شده به گیاهان *N. benthamiana* در مرحله دو برگی تزریق شد و شش روز بعد با ویروس مایه زنی شدند. گیاهان دو، سه و پنج هفته بعد از مایه زنی بر اساس میزان رشد و علائم بیماری ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که گیاهان تیمارشده با سازه سنجاق سری p*FGC-2b-h*، تا سه هفته بعد از مایه زنی با ویروس علائم بیماری را نشان ندادند و رشد گیاهان تیمارشده مشابه با شاهد مایه زنی نشده بود. اما بعد از پنج هفته علائم موزائیک و پیچیدگی برگ ظاهر شد. درحالی که گیاهان شاهد تیمارشده با حامل p*FGC- K* رشد کمتری داشته و بدشکلی و موزائیک را در دو هفته اول نشان دادند و پس از سه هفته نیز از نظر رشدی اختلاف قابل توجهی با شاهد سالم داشتند (شکل ۲) بطوریکه از نظر آماری با آزمون LSD در سطح ۱٪ معنی دار بود.

در بررسی سرولوژیکی دو هفته پس از مایه زنی، نتایج الیزای غیر مستقیم (DAC-ELISA) از گیاهان *N. benthamiana* نشان دهنده اختلاف معنی دار جذب گیاهان تزریق‌شده با سازه سنجاق سری p*FGC-2b-h* با گیاهان تزریق‌شده با پلاسمید بدون سازه سنجاق سری p*FGC-K* در طول موج ۴۰۵ نانومتر بود، بصورتی که در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری بین گیاهان سالم و گیاهان تیمارشده به سازه ژنی p*FGC-2b-h* و CMV وجود نداشت. همچنین در اندازه گیری وزن خشک و تر بوته‌های دارای سازه و شاهد نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح یک درصد بین شاهد بدون سازه p*FGC-K* و بوته‌های دارای سازه p*FGC-2b-h* بود.

بحث

به رغم اینکه کنترل خسارت بیماری ناشی از ویروس موزائیک خیار با کشت گیاهان مقاوم قابل دستیابی است، رقم مقاوم تجاری در بسیاری از گونه‌های زراعی معرفی نشده و رقم مقاومی که به همه جدایه‌های CMV مقاوم

باشد، وجود ندارد. استفاده از حشره‌کش‌ها برای کنترل ناقل هم موفقیت اندکی در بر دارد، زیرا ویروس بصورت ناپایا منتقل شده و وقتی شته توسط حشره‌کش از بین می‌رود که ویروس را منتقل کرده است (Garcia-Arenal & Palukaitis 2009). ژن‌های مقاومت به این بیماری در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند از جمله ژن RCY1 در اکوتیپ C24 گیاه آرابیدوپسیس که باعث مقاومت به جدایه زردی CMV (Y) می‌شود و این مقاومت بصورت فوق حساسیت در ناحیه شروع آلودگی بروز می‌کند (Takahashi *et al.* 2002) اما این ژن‌ها تنها باعث مقاومت به جدایه خاصی شده و انتقال آن به گیاهان دیگر نیز دارای چالش‌هایی می‌باشد.

یکی از مکانیسم‌های مقاومت طبیعی گیاهان در مقابل آلودگی‌های ویروسی، خاموشی ژن بعد از رونویسی می‌باشد (Covey *et al.* 1997). این مکانیسم بعنوان روشی موفقیت آمیز برای تولید گیاهان مقاوم به تعدادی از ویروس‌های گیاهی بکار گرفته شده است (Hu *et al.* 2011). مقاومت به‌واسطه RNA بسیار قوی و اختصاصی می‌باشد (Mueller *et al.* 1995) درحالی که مقاومت به‌واسطه پروتئین اغلب وسیع الطیف بوده و ضعیف‌تر می‌باشد (Lehmann *et al.* 2003). با توجه به اهمیت بالای ایجاد مقاومت به روش خاموشی آر ان ا، در این تحقیق سازه سنجاق سری برای ایجاد مقاومت به ویروس موزائیک خیار برپایه خاموشی آر ان ا طراحی و ساخته شد. مقاومت به ویروس‌های گیاهی با راهبرد خاموشی آر ان ا به روش‌های مختلفی ایجاد می‌شود. بیان آر ان ا دولا کارائی مناسبی برای مهندسی مقاومت در گیاهان دارد و همچنین این راهبرد نسبت به روش‌های ایجاد مقاومت مبتنی بر پروتئین برای محیط زیست سالم تر بوده، خطر نوترکیبی و کپسیدپوشی ناخودی (heterologous encapsidation) را ندارد (Hu *et al.* 2011).

ایجاد گیاهان تراریخته با استفاده از سازه سنجاق سری توانسته است تا ۹۰ درصد کارائی خاموشی ژن را بالا ببرد (Smith *et al.* 2000). یکی از روش‌های موفق ایجاد مقاومت معرفی توالی‌های دولای آر ان ا ویروسی در گیاهان بوده و با این روش می‌توان در لاین‌ها و میزبان‌های مختلف و به ویروس‌های متفاوت مقاومت ایجاد کرد (Nicola-Negri *et al.* 2005, Pandolfini *et al.* 2003, Tyagi *et al.* 2008, Hu *et al.* 2011). در این تحقیق نیز از حامل‌های p*KANNIBAL* و p*FGC*5941 که برای ساختن سازه سنجاق سری و معرفی آن به ژنوم گیاه طراحی شده‌اند، استفاده شد. در طراحی سازه سنجاق سری از اینترون *pdk* مربوط به حامل p*KANNIBAL* نیز جهت افزایش کارائی خاموشی استفاده گردید. در آلودگی موقت گیاهان *N. benthamiana* به اگروباکتریوم دارای سازه سنجاق سری و بدون سازه سنجاق سری به عنوان شاهد، نتایج نشاندهنده کارائی بالای این روش بود، بصورتی که در سازه سنجاق سری علائم ظاهری گیاه مشابه گیاه سالم بود و جذب الیزا هم در مقایسه با گیاه آلوده‌شده با ناقل بدون سازه سنجاق سری معنی دار بود. تحقیقات نشان داد که به علت وجود SDE 1-like به جای RdRp در *N. benthamiana*، تولید siRNA از RNAهای نابالغ افزایش یافته و این خود می‌تواند باعث افزایش خاموشی ژن شود (Yang *et al.* 2004) به همین سبب کارائی سازه در *N. benthamiana* بررسی گردید. سازه سنجاق سری ساخته‌شده در تیمار موقت گیاهان *N. benthamiana* و *N. tabacum* دارای کارائی بسیار خوبی در کنترل CMV بود، اما با توجه به زمینه ژنتیکی متفاوت گونه‌ها و حتی ارقام مختلف گیاهی که باعث اختلاف در کارائی یک سازه برای کنترل یک ویروس می‌شود (Tan *et al.* 2012)، در ایجاد

گیاهان تراریخت مقاوم به ویروس موزائیک خیار قبل از استفاده از این سازه نیاز است با استفاده از سامانه بیان موقت کارائی آن در گیاه مورد نظر ارزیابی نمود.

پروتئین 2b علاوه بر siRNAها، با آر ان ای دولا با طول بلند هم متصل می‌شود درحالی که نسبت به دیگر بازدارنده‌های خاموشی از جمله P19 بصورت ضعیف تری با miRNAها متصل می‌شود. به همین دلیل اثرات تخریبی سازه روی خود گیاه کمتر بوده و کاندیدای مناسب تری برای ایجاد گیاه مقاوم می‌باشند. همچنین در جدایه‌های ضعیف این ویروس یک اسید آمینه در پروتئین 2b تغییر کرده و به همین علت با siRNAها اتصال ضعیف‌تری پیدا می‌کند (Goto *et al.* 2007). در پژوهش حاضر از اگروباکتریوم سویه GV3101 استفاده شد، زیرا در تحقیقات قبلی گزارش شده که سویه GV3101 باعث انتقال بیش از یک کپی از ژن بصورت پشت سر هم در یک لوکوس از سلول گیاهی شده و در نتیجه خاموشی ژن و مقاومت افزایش می‌یابد (Tan *et al.* 2012, Gelvin 2003) هرچند که در بعضی مطالعات بین میزان مقاومت و تعداد نسخه‌های ژن ارتباطی مشاهده نشده است (Hu *et al.* 2011, Chuang & Meyerowitz 2000, Hily *et al.* 2007).

از سازه آر ان ای دولا مربوط به ترادف ژن پروتئین پوششی CMV برای مقاومت به ویروس در گیاه *N. tabacum* استفاده شده است. درنتیجه مقاومت بسته به پروموتر بیانی ۲۵ تا ۳۵ درصد افزایش یافته است (Kalantidis *et al* 2002). همچنین سازه سنجاق سری ژن 2b در گیاهان تراریخت توتون منجر به ۳۳ و ۳۰ درصد مقاومت به ترتیب براساس علائم بیماری و نتایج الیزا، بدست آمده است (Kavosipour *et al.* 2012). اما از آنجا که تفاوت در طول قطعه ژنی (Chen *et al.* 2004)، سیستم حامل/اگروبا کتریوم (Tan *et al.* 2012)، و با هدف قرار دادن نواحی مختلف پروتئین ویروسی سطح مقاومت ایجادشده متفاوت می‌باشد (Jiang *et al.* 2011)، تحقیق حاضر می‌تواند کمک شایانی در پیداکردن طول قطعه و ناحیه ژنی مناسب و همچنین ترکیب بهتری از سیستم حامل/اگروباکتریوم ارائه دهد.

چن و همکاران (Chen *et al.* 2004) از توالی RNA2 ویروس CMV سازه‌هایی بصورت توالی تکراری معکوس از بخش‌های ′3 ژن 2a و ژن 2b ساختند. نتایج نشان دهنده تفاوت در میزان مقاومت گیاهان تراریخته *N. benthamiana* بود و آنها این تفاوت را به تفاوت در طول قطعه ژنی که استفاده کرده بودند مربوط دانستند. بصورتی که سازه‌های دارای قطعه ۱۵۳۴ جفت بازی در ۷۵ درصد گیاهان و سازه دارای قطعه ۴۹۰ جفت بازی فقط در ۳۰ درصد گیاهان مقاومت ایجاد کرد. تاثیر سیستم حامل/اگروباکتریوم برای ایجاد مقاومت مهم تشخیص داده شده است (Tan *et al.* 2012). در تحقیق حاضر توالی انتخاب‌شده ژن 2b از ناحیه حفاظت‌شده این ژن که دارای کمترین ساختار ثانویه بود و ارزیابی‌ها با جدایه فارس CMV انجام گرفت. نتایج نشان دهنده کارائی بالای این سازه در ایجاد مقاومت به این جدایه بود ولی از آنجائیکه در مطالعات مشخص شده که حداقل ۹۰ درصد تشابه توالی برای ایجاد مقاومت به واسطه RNA لازم است و همچنین روشن شد که نوع توالی وارد شونده به ژنوم گیاه تاثیر بسیار بالائی در ایجاد گیاهان ایمن به بیماری دارد (Ritzenthaler 2005)، بهتر است که کارائی این سازه برای دیگر جدایه‌های این ویروس مورد ارزیابی قرار گیرد. هرچند که با استفاده از ناحیه حفاظت‌شده این ویروس انتظار این است که به سایر جدایه‌ها نیز مقاومت نشان دهد.

در این تحقیق از روش مکانیکی برای مایه زنی گیاهان استفاده شده است اما از آنجا که میزان زادمایه و روش مایه زنی نیز می‌تواند در میزان مقاومت تاثیر داشته باشد. همچنان که در تحقیقی مشخص شده که در مایه زنی مکانیکی گیاهان تراریخت ۱۰۰ درصد گیاهان ایمن بودند درحالی که در انتقال ویروس با پیوند مقاومت شکسته شد (Abad *et al.* 2000, Tan *et al.* 2012)، ممکن است مقاومت کسب‌شده توسط این سازه‌ها در طبیعت و در انتقال ویروس توسط شته بصورت متفاوتی بروز کند.

آلودگی گیاه به ویروس باعث جذابیت بیشتر گیاه برای شته‌های حامل شده و حساسیت گیاه برای جمعیت‌های شته را بیشتر می‌کند (Macias & Mink 1969, Ziebell *et al.* 2011). شته‌ها به مواد فرار آزادشده از گیاهان آلوده به ویروس جذب شده و بنابراین CMV به زنده ماندن و تغذیه شته‌ها کمک می‌کند. همچنین نشان داده شده است که با ایجاد جهش در ژن 2b مقاومت به شته ایجاد می‌شود (Ziebell *et al.* 2011). در تحقیق حاضر خاموشی ژن پروتئین 2b مورد هدف قرار گرفت و از اینرو پیشنهاد می‌شود که ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس از طریق سازه p*FGC-2b-h* به شته‌ها نیز انجام شود.

با هدف قرار دادن نواحی مختلف پروتئین ویروسی سطح مقاومت متفاوتی ایجاد می‌شود (Jiang *et al.* 2011). همچنین توالی‌هایی که دارای ساختار ثانویه کمتر یا ضعیف تری هستند، برای ایجاد مقاومت به ویروس از طریق amiRNA مناسب‌تر تشخیص داده شده است و گزارش‌هایی وجود دارد که نواحی قابل دسترس در توالی هدف در کارائی خاموشی ژن بسیار موثر بوده و ساختارهای ثانویه آن ناحیه در این امر نقش بسیار مهمی بازی می‌کند (Duan *et al.* 2008). در این پژوهش از ناحیه خاصی از ژنوم CMV استفاده شد که دارای کمترین ساختار ثانویه بود و همچنین این ترادف حفاظت شده بود تا نسبت به طیف وسیعی از جدایه‌های CMV مقاوم شود و همچنین مقاومت ایجادشده پایداری بیشتری از خود بروز دهد و نتایج بررسی‌های آلودگی موقت این سازه در *N. benthamiana* نیز این پیش بینی‌ها را تا حدودی تائید نمود.

منابع

Abad J., Anastasio G., Fraile M. A. and Garcia Arenal F. 2000. A search for resistance to cucumber mosaic virus in the genus Lycopersicon. Journal of Plant Pathology. 82 (1): 39-48.

Anderson B. J., Boyce P. M. and Blanchard C. L. 1995. RNA 4 sequences from cucumber mosaic virus subgroups I and II. Gene 161: 293-294.

Brigneti G., Voinnet O., Li W. X., Ji L. H., Ding S. W. and Baulcombe D. C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO Journal. 17: 6739–6746.

Chen Y. K., Lohuis D., Goldbach R. and Prins M. 2004. High frequency induction of RNA mediated resistance against cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. Molecular Breeding 14 (3): 216-225.

Chuang C. F. and Meyerowitz E. M. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 4985-4990.

Covey S. N., Al-Kaff N. S., Langara A., and Turner D. S. 1997. Plants combat infection by gene silencing. Nature 385: 781–782.

Diaz-Pendon J. A., Li F., Li W. X., and Ding S. W. 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic Virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral

small interfering RNAs. Plant Cell 19: 2053–2063.
Duan C.G., Wang C. H., Fang R. X., and Guo H. S. 2008. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. Journal of Virology. 82: 11084- 11095.
Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811.
Frizzi A. and Huang S. 2010. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. Plant Biotechnology Journal 8: 655-677.
Garcia-Arenal F. and Palukaitis P. 2009. *Cucumber mosaic virus*, pp. 171-176. In: B.W.J. Mahy, and M.H.V. van Regenmortel (Eds). Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Elsevier. 613 p.
Garcia-Arenal F. and Palukaitis P. 2008. *Cucumber mosaic virus*. 614-19 In: B. W. J. Mahy, and M. H. V. van Regenmortel (Eds). Encyclopedia of Virology 3th ed. Oxford, Academic Press.
Gelvin S. B. 2003. Agrobacterium and plant transformation: The biology behind the 'gene jockeying' tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67 (1): 16-37.
Gildow F. E., Shah D. A., Sackett W. M., Butzler T., Nault B. A. and Fleischer S. J. 2008. Transmission efficiency of cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. Phytopathology 98: 1233-1241.
Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T. and Masuta C. 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. Plant Cell Physiology 48(7): 1050–1060.
Green M. R. and Sambrook J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2028 p.
Hily J. M., Ravelonandro M., Damsteegt V., Bassett C., Petri C., Liu Z., and Scorza R. 2007. Plum pox virus coat protein gene intron-hairpin-RNA (ihpRNA) constructs provide resistance to plum pox virus in *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. Journal of the American Society for Horticultural Science132:850-858.
Hong J. S., Ohnishi S., Masuta C., Choni J. K. and Ryu K. H. 2007. Infection of soybean by cucumber mosaic virus as determined by viral movement protein**.** Archive of Virology 152: 321-328.
Hu Q., Niu Y., Zhang K., Liu Y., and Zhou X. 2011. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus. Virology Journal 8:41.
Jiang F., Song Y., Han Q., Zhu C. and Wen F. 2011. The choice of target site is crucial in artificial miRNA-mediated virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 76: 2-8.
Kaiser W. J. and Danesh D. 1971. Biological of four viruses affecting *Cicer arientinum* in Iran. Phytopathology 61: 372-375.
Kalantidis K., Psarsdakis S., Tabler M. and Tsagris M. 2002. The occurrence of CMV specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus derived doubles-tranded RNA is indicative of resistance to the virus. Molecular Plant-Microbe Interaction 15 (8): 826-833.
Kavosipour S., Niazi A., Izadpanah K., Afsharifar A. R. and Yasaie M. 2012. Induction of resistance to cucumber mosaic virus (CMV) using hairpin construct of 2b gene. Iranian Journal of Plant Pathology 48(2): 209-219. (in Persian with English Summary).
Khetarpal R.K., Parakh D.B., Singh S., Nath R., Jain R.K. and Varma A. 1994. Bean common mosaic virus detected by DAC- indirect ELISA in exotic *Phaseolus vulga*ris L. Indian Journal of Virology 10: 13–16.
Lehmann P., Jenner C. E., Kuzubek E., Greenland A. J. and Walsh J. A. 2003. Coat protein-mediated resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*). Molecular Breeding 11: 83–94.
Lennefors B. L., Savenkov, E. I., Benesfelt J., Wremerth-Weich, E., Van Roggen P., Tuvesson S., Valkonen J. P.T. and Gielen J. 2006. dsRNA-mediated resistance to beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). Molecular Breeding 18:313–325.
Lewsey M.G., Murphy A. M., Maclean D., Dalchau N., Westwood J. H., Macaulay K., Bennett M. H., Moulin M., Hanke D. E. and Powell G. 2010. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. Molecular Plant-Microbe Interaction 23: 835–845.
Li H. W., Licy A. P., Guo H. S., Li W. X., Ji L. H., Wong S. M. and Ding S. W. 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defense mechanism. EMBO Journal 18 (10):

2683–2691.
Lomonossoff G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. Annual Review of Phytopathology 33: 323–343.
Macias W. and Mink G. I. 1969. Preference of green peach aphids for virus-infected sugarbeet leaves**.** Journal of Economic Entomology 62: 28–29.
Malpica C. A., Cervera M. T., Simones C. and Van Montagu M. 1998. Engineering resistance against viral disease in plants, in Plant-Microbe Interactions. pp. 287–320. In: B. B. Biswas and H. K. Das (Eds), Subcellular Biochemistry. 29. Plenum Press, New York., USA
Mueller E., Gilbert J. E., Davenport G., Brigneti G. and Baulcombe D. C. 1995. Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. The Plant Journal 7: 1001–1013.
Mukeshimana G., Ma Y., Walworth A. E., Song G. and Kelly J. D. 2013. Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Biotechnology Reports 7: 59–70.
Nault L. R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. Annals of the Entomological Society of America 90: 521-541.
Nicola-Negri E. D., Brunetti A., Tavazza M. and Ilardi V. 2005. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. Transgenic Research 14: 989–994.
Pandolfini T., Molesini B., Avesani L., Spenda A. and Polverari A. 2003. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. BMC Biotechnology 3 (7): 1-15.
Qu J., Ye J. and Fang R. 2007. Artificial MicroRNA-Mediated Virus Resistance in Plants. Journal of Virology 6690–6699.
Ritzenthaler C. 2005. Resistance to plants viruses: old issue, new answers? Current Opinion in Biotechnology 16 (2): 118-122.
Sanford J. C. and Johnston S. A. 1985. The concept of parasite derived resistance- deriving resistance genes from the parasite's own genome**.** Journal of Theoretical Biology 113: 395–405.
Seo Y. S., Rojas M. R., Lee J. Y., Lee S. W., Jeon J. S., Ronald P., Lucas W. J. and Gilbertson R. L. 2006. A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103 (32): 11856–11861.
Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G and Waterhouse P. M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407: 319–320.
Sun Z. N., Song Y. Z., Yin G. H., Zhu C. X. and Wen F. J. 2010. Hp-RNAs derived from different regions of the NIb gene have different abilities to protect tobacco from infection with potato virus Y. Journal of Phytopathology. 158: 566–568.
Takahashi H., Miller J., Nozaki Y., Sukamto Takeda M., Shah J., Hase S., Ikegami M., Ehara Y. and Dinesh-kumar S. P. 2002. RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. The Plant Journal 32: 655-667.
Tan X., Zhang D., Wintgens C., Willingmann P., Adam G. and Heinze C. 2012. A comparative testing of cucumber mosaic virus (CMV)-based constructs to generate virus resistant plants. American Journal of Plant Sciences 3: 461-472.
Tyagi H., Rajasubramaniam S., Rajam M. V. and Dasgupta I. 2008. RNA-interference in rice against Rice tungro bacilliform virus results in its decreased accumulation in inoculated rice plants. Transgenic Research 17: 897-904.
Wang H. L., Sudarshana M. R., Gilbertson R .L. and Lucas W. J. 1999. Analysis of cell-to-cell and long-distance movement of a bean dwarf mosaic geminivirus-green fluorescent protein reporter in host and non-host species: identification of sites of resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 345–355.
Wang M. B., Abbott D. C. and Waterhouse P. M. 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. Molecular Plant Pathology 1: 347-356.

Waterhouse P. M., Wang M. B. and Lough T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411:834-842.

Yang S. J., Carter S. A., Cole A. B., Cheng N. H. and Nelson R. S. 2004. A natural variant of a host RNA dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101 (16): 6297-6302.

Yang Y., Kim K. S. and Anderson E. J. 1997. Seed transmission of cucumber mosaic virus in spinach. Phytopathology 87:924-931.

Zhang X., Yuan Y., Pei Y., Lin S., Tuschl T., Pate D. J. and Chua N. H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. Genes and Development 20: 3255–3268.

Ziebell H., Murphy A. M., Groen S. C., Tungadi T., Westwood J. H., Lewsey M. G., Moulin M., Kleczkowski A., Smith A. G., Stevens S. M., Powell G. and Carr J. P. 2011. Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. Scientific Reports 1: 187