

اثر سرکوبگرهای خاموشی ویروس موزائیک زرد راه راه جو (Barley yellow striate mosaic virus) بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در گیاه *Nicotiana benthamiana*

16c

سمیرا ربیعی^۱، علیرضا افشاری^{۲*} و کرامت‌اله ایزدپناه^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱)

چکیده

اتوفاژی یک فرایند محافظت شده در یوکاریوت‌ها برای حذف اجزای سلولی آسیب دیده یا نا خواسته است. این مسیر در مقاومت به بیماری‌های گیاهی نیز دخیل می‌باشد اما مکانیزم آن دقیقاً مشخص نیست. در این مطالعه تاثیر دو پروتیین سرکوبگر (P: فسفو پروتیین و P3: پروتیین فرعی ۳) متعلق به ویروس موزائیک زرد راه راه جو (BYSMV) بر بیان چهار ژن مهم دخیل در اتوفاژی شامل *ATG6*، *ATG2*، *ATG7* و *AGO1* در گیاه *N. benthamiana* مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های P و P3 در ناقل pCAMBIA-1302 تحت پروموتور 2×35S و برجسب Hemagglutinin در انتهای آمینی به منظور ردیابی پروتیین‌ها، همسانه‌سازی شدند. سازه هر ژن با استفاده از آگروباکتیوم در سطح پشت برگ گیاهان *N. benthamiana* تزریق گردید. پنج روز پس از تزریق، میزان بیان این ژن‌ها با استفاده از پی‌سی‌آر در زمان واقعی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که هر سه تیمار (P, P3, P+P3) منجر به افزایش بیان ژن‌های *ATG2*، *ATG6*، *ATG7* گردیدند. این افزایش بیان در ژن *ATG2* به ترتیب ۵/۵۷، ۶/۱۵ و ۵/۲۶ برابر در تیمارهای P/GFP، P3/GFP و P/P3/GFP بود. در حالی که هر سه تیمار بر بیان ژن *AGO1* اثر منفی داشتند بنحوی که بیان آن را تقریباً ۱/۵ برابر، نسبت به تیمار کنترل، کاهش دادند. این نتایج حاکی از نقش ژن‌های *ATG6*، *ATG7*، *ATG2* در پاسخ دفاعی گیاه *N. benthamiana* در مقابل سرکوبگر BYSMV می‌باشد که می‌تواند به درک بهتر مکانیزم‌های دفاعی پیچیده گیاه در مقابل بیمارگرهای ویروسی و دست‌یابی به روش‌های جدید کنترل ویروس‌های گیاهی کمک نماید.

کلیدواژه: اتوفاژی، فسفو پروتیین، سرکوبگر خاموشی آران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: afshari@shirazu.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

۲. بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

Effect of RNA silencing suppressors of Barley yellow striate mosaic virus on expression levels of autophagy-related genes in *Nicotiana benthamiana*16c

S. Rabiee¹, A. Afsharifar^{2*}, and K. Izadpanah³

(Received: 29.4.2019; Accepted: 2.7.2019)

Abstract

Autophagy is a degradation process in eukaryotes through which damaged or unwanted intracellular components are degraded. This process is also involved in plant disease resistance, although its mechanisms are not precisely known. Autophagy is regulated by multiple autophagy-related proteins (ATGs). In this study, we investigated the possible impact of two *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV) proteins, i.e., phosphoprotein (P) and ancillary protein 3 (P3), on four important genes involved in autophagy (ATG2, ATG6, ATG7, and AGO1) in *N. benthamiana*. P and P3 genes were cloned in pCAMBIA-1302 vector under the control of the 2 × 35S promoter and Hemagglutinin tag. Constructs of each gene were agroinfiltrated in the abaxial side of the *N. benthamiana* leaves. Five days after agroinfiltration, the expression level of these genes was measured using RT- qPCR. The results showed that expression of *ATG2*, *ATG6* and *ATG7* genes increased in all treatments (P, P3, P+P3). The level of *ATG2* expression was 5.57, 15.6 and 5.6 fold, in P/GFP, P3/GFP and P/P3/GFP treatments, respectively, while a 1.5-fold reduction was obtained in expression of *AGO1* in all treatments. These results implied that P and P3 proteins of BYSMV can modify the expression of autophagy related genes in *N. benthamiana* plant. These findings suggest the involvement of *AGO1*, *ATG6*, *ATG7* and *ATG2* in immune responses of *N. benthamiana* against BYSMV, which provide a better understanding of plant host defense mechanisms against virus infections and might be an opportunity to exploit a novel antiviral approach.

Keywords: Autophagy, Phosphoprotein, RNA silencing suppressor

*Corresponding author's E-mail: afshari@shirazu.ac.ir

1. Ph.D. student of Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran..

2. Department of plant protection, Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran..

3. Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

مقدمه

(Yang & Klionsky 2010). نقش اتوفازی در اصل برای homeostasis یا حفظ شرایط پایدار و ثابت در محیط داخل سلول است اما می‌تواند به طور قابل توجهی باعث بهبود بقای سلولی در شرایط تنش‌های مختلف شامل پیری، گرسنگی و آلودگی‌های میکروبی گردد (Boya et al. 2013, Klionsky & Codogno 2013). مطالعات مختلف نقش محافظتی ژن‌های ATG را در پاسخ به پیری، استرس‌های مختلف، عوامل بیماری‌زا و از جمله ویروس‌های انسانی نشان داده است (Liu & Bassham 2012). در گیاهان، اتوفازی با تنظیم سیگنالینگ هورمون دفاعی و مرگ سلول میزبان مرتبط است و برخی از عوامل بیماری‌زا برای افزایش بیماری‌زایی به دستکاری فرآیند اتوفازی اقدام می‌کنند (Kabbage et al., 2013, Dagdas et al. 2016).

به تازگی نقش اتوفازی در آلودگی ویروس گیاهی شروع به مطرح شدن نموده است. در تحقیقی نشان داده شد که تخریب اتوفازی انتخابی پروتیین پوشش و پیکره‌های ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) بواسطه Neighbor of BRCA1 Gene 1 (NBR1) در فرآیندی بنام زئوفازی (Harfen et al. 2017) صورت می‌گیرد. همچنین دخالت اتوفازی در ایمنی گیاه در برابر جمینی ویروس‌ها نشان داده شد (Haxim et al. 2017). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که مسیر ضد ویروسی اتوفازی بر علیه ویروس موزائیک کلم گل بصورت انتخابی عمل می‌کند به نحوی که پروتیین NBR1 از طریق هدف قرار دادن سرکوبگر خاموشی HC-pro، باعث جلوگیری از تجمع پیکره‌های ویروسی می‌شود. بنظر می‌رسد که ویروس در مقابله با سیستم اتوفازی، از طریق بعضی از پروتیین‌های خود باعث محدود شدن نقش اتوفازی مبتنی بر NBR1 می‌شود (Hafren et al. 2017). ویروس‌ها همچنین ممکن

گیاهان مکانیزم‌های مختلف دفاعی را برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها در طی تکامل بدست آورده‌اند. دو مکانیزم اصلی دفاعی ضد ویروسی گیاهان شامل خاموشی آرنا (RNA silencing) (Ding and Voinnet. 2007) و مقاومت مبتنی بر ژن‌های مقاومت (resistance gene-mediated resistance) (Mandadi & Scholthof 2013) می‌باشد. شواهد اخیر حاکی از اینست که فرایند اتوفازی علاوه بر نقش‌های کلیدی مختلف در راستای حفظ پایداری سلول، دارای نقش‌های ضد ویروسی نیز می‌باشند. خودخواری یا اتوفازی (autophagy) یک فرآیند Metabolic بسیار حفاظت شده است که از طریق مسیر تجزیه‌ی لایزوزومی منجر به پاکسازی پروتیین‌های کهنه و بازیافت مواد سلولی آسیب دیده یا مواد سلولی غیر قابل نیاز در شرایط استرس یا در طی فرایندهای خاص نمو گیاه می‌شود (Liu & Bassham 2012).

در این فرایند سلول مواد سیتوپلاسمی خود را در زیگل‌های غشایی دو لایه بنام اتوفاگوزوم (autophagosomes) بسته‌بندی کرده، سپس این مجموعه تحویل اندامک‌های باز یافت سلول (لیزوزوم در پستانداران یا واکوئول در مخمر و گیاهان) می‌شوند تا برای استفاده مجدد سلول، توسط آنزیم‌های لیزوزوم، تخریب شوند. همچنین مراحل اتوفازی متکی بر تغییر شکل قابل توجه غشای اندامک‌های درون سلولی، فرآیندهای انتقال و فعالیت مشترک ۳۶ ژن کدکننده پروتیین‌های مرتبط با اتوفازی autophagy-related genes (ATGs) می‌باشد. این ژن‌ها در چهار کلاس اصلی قرار داده شده‌اند و در گیاهان مختلف شامل آرابیدوپسیس، برنج و ذرت بسیار حفاظت شده‌اند (Mizushima et al. 2011, Lamb et al. 2013,)

است برای ایجاد اختلال در سیستم اتوفازای، از تشکیل اتوفاگوزوم جلوگیری کنند تا شرایط لازم برای تکثیر ویروس، تخریب پاسخ‌های میزبانی و افزایش عمر سلولی فراهم آورند (Dong & Levine 2013, Deretic 2012). بنابراین اهمیت نقش اتوفازای دربر همکنش ویروس-میزبان در گیاهان ممکن است به میزان مشاهده شده در حیوانات باشد.

به تازگی دخالت سه ژن *ATG2*، *ATG6* و *ATG7* در پاسخ‌های دفاعی گیاه *N. benthamiana* در مقابل سرکوبگر خاموشی HC-Pro ویروس‌های سیب زمینی نشان داده شد (Tahmasebi et al. 2017). نتایج این تحقیق نیز حاکی از آن است که اتوفازای بر سیستم ضد ویروسی خاموشی آرانا تاثیر می‌گذارد، که نتایج حاصل از چند مطالعه دیگر (Shelly et al. 2009, Berryman et al. 2013, Judith et al. 2012) می‌باشد.

خاموشی آرانا بعنوان مکانیزم اصلی ضد ویروسی در گیاهان محسوب می‌شود و وابسته به همولوژی یک ترادف خاص است که با هدف قرار دادن آرانا ویروسی، گیاهان را در برابر ویروس‌ها محافظت می‌کند (Ding 2010). در مقابل، فعال شدن مقاومت مبتنی بر ژن مقاومت باعث کلید خوردن یک پاسخ دفاع سریع می‌شود که اغلب شامل مرگ برنامه ریزی شده سلولی و بروز لکه موضعی (واکنش فوق حساسیت) می‌شود. واکنش فوق حساسیت می‌تواند از عفونت موضعی ویروسی جلوگیری کند و باعث القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه گردد. ماشین خاموشی ژن با تجمع آرانا‌های دو لا (*dsRNA*) در سلول‌های میزبان کلید می‌خورد و با نوکلئازهای شبه دایسر (*DCL*) به آرانا‌های دو لا با اندازه‌ی ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید بنام آرانا‌های مداخله‌گر کوچک (*viral small interfering*)

(RNAs, vsiRNAs) تبدیل و سپس از طریق متیله شدن بوسیله HUA enhancer 1 (HEN1) پایدار می‌گردند. یک رشته از این آرانا‌های کوچک تثبیت شده در کمپلکس ریسک (RISC) RNA-induced silencing complex (RISC) حاوی پروتیین‌های آرگونات (*ARGONAUTE*, *AGO*) است، بکار گرفته می‌شود که برای تخریب آرانا‌های ویروسی شناسایی شده، عمل می‌کند (Fang & Qi 2016, Bologna & Voinnet 2014). ویروس‌های گیاهی طوری تکامل یافته‌اند که اکثر آن‌ها برای مقابله با سیستم دفاعی خاموشی آرانا گیاه میزبان پروتیین‌هایی را بنام سرکوب‌گرهای خاموشی آرانا (*viral suppressors of RNA silencing, VSRS*) تولید می‌کنند. شواهد متعدد حاکی از این است که سرکوبگرها قادرند که با مکانیزم‌های مختلفی تقریباً در هر مرحله از مسیر خاموشی آرانا، اختلال ایجاد کنند (Incarbone & Dunoyer 2013). یکی از این مکانیزم‌ها شامل اختلال در عملکرد آرگونات‌ها می‌باشد که در سیستم ضد ویروسی خاموشی آرانا دخالت دارند. شواهد مختلف حاکی از این است که سرکوبگرهای ویروسی با ساز و کارهای مختلف بر آرگونات‌ها اثر می‌گذارند که از جمله به القای تخریب پروتیین‌های آرگونات (Baumberger et al. 2007)، ممانعت از ملحق شدن آرگونات‌ها به کمپلکس ریسک (Schott et al. 2012)، یا کاهش غیر مستقیم میزان آرگونات، می‌توان اشاره نمود (Rivas et al. 2005). آرگونات‌های یوکاریوتی بازیگرهای کلیدی در خاموشی آرانا می‌باشند که از میان آن‌ها *AGO1* به عنوان یکی از پروتیین‌های ضد ویروسی مهم از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Alvarado & Scholthof 2012, Scholthof et al. 2011). از طرف دیگر، شواهد متعدد حاکی از آن است که اتوفازای سرکوبگرهایی مانند HC-pro در

است برای ایجاد اختلال در سیستم اتوفازای، از تشکیل اتوفاگوزوم جلوگیری کنند تا شرایط لازم برای تکثیر ویروس، تخریب پاسخ‌های میزبانی و افزایش عمر سلولی فراهم آورند (Dong & Levine 2013, Deretic 2012). بنابراین اهمیت نقش اتوفازای دربر همکنش ویروس-میزبان در گیاهان ممکن است به میزان مشاهده شده در حیوانات باشد.

به تازگی دخالت سه ژن *ATG2*، *ATG6* و *ATG7* در پاسخ‌های دفاعی گیاه *N. benthamiana* در مقابل سرکوبگر خاموشی HC-Pro ویروس‌های سیب زمینی نشان داده شد (Tahmasebi et al. 2017). نتایج این تحقیق نیز حاکی از آن است که اتوفازای بر سیستم ضد ویروسی خاموشی آرانا تاثیر می‌گذارد، که نتایج حاصل از چند مطالعه دیگر (Shelly et al. 2009, Berryman et al. 2013, Judith et al. 2012) می‌باشد.

خاموشی آرانا بعنوان مکانیزم اصلی ضد ویروسی در گیاهان محسوب می‌شود و وابسته به همولوژی یک ترادف خاص است که با هدف قرار دادن آرانا ویروسی، گیاهان را در برابر ویروس‌ها محافظت می‌کند (Ding 2010). در مقابل، فعال شدن مقاومت مبتنی بر ژن مقاومت باعث کلید خوردن یک پاسخ دفاع سریع می‌شود که اغلب شامل مرگ برنامه ریزی شده سلولی و بروز لکه موضعی (واکنش فوق حساسیت) می‌شود. واکنش فوق حساسیت می‌تواند از عفونت موضعی ویروسی جلوگیری کند و باعث القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه گردد. ماشین خاموشی ژن با تجمع آرانا‌های دو لا (*dsRNA*) در سلول‌های میزبان کلید می‌خورد و با نوکلئازهای شبه دایسر (*DCL*) به آرانا‌های دو لا با اندازه‌ی ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید بنام آرانا‌های مداخله‌گر کوچک (*viral small interfering*)

(Polymerase (L) و پروتئین Glycoprotein (G), رمزگذاری می‌کند که آرانا پیک آنها به صورت حفاظت شده‌ای در جهت ۳' به ۵' (3'-N-P-M-G-L-5') ترانوئیدی می‌شوند. ژن P یک پروتئین هسته‌ای ۳۰۸ آمینواسیدی که نقش مهمی در همانندسازی و ترانوئیدی دارد را رمزگذاری می‌کند. این پروتئین حداقل برای دو نقش مهم ضروری است: (۱) برقراری اتصال فیزیکی و اصلاح موقعیت پروتئین L بر روی الگوی N-RNA و (۲) در حین سنتز N از طریق تشکیل کمپلکس N-P بعنوان یک چاپرون عمل کرده و از خود تجمعی (self-aggregation) و اتصال به آرانا سلولی جلوگیری می‌کند. در طی تکثیر ژنوم، جهت اطمینان از بسته‌بندی (encapsidation) اختصاصی آرانا و ویروسی به داخل کمپلکس ریونوکلئوپروتئین، (RNP) پروتئین N از کمپلکس N-P به رشته آرانا در حال ساخت منتقل می‌شود. همچنین در چندین رابدوویروس، فسفوپروتئین نقش اساسی در جلوگیری از پاسخ ضد ویروسی میزبان ایفا می‌کند (Walker et al. 2018). علاوه بر پنج ژن اصلی ساختاری، رابدوویروس‌های گیاهی یک یا چند ژن اضافی (accessory genes) را میان ژن‌های N-P، P-M یا G-L رمزگذاری می‌کنند که دخالت بعضی از این پروتئین‌ها در حرکت سلول به سلول و سرکوب خاموشی آرانا، نشان داده شده است (Walker et al. 2011). پروتئین P3 مربوط به BYSMV یکی از ژن‌های فرعی این ویروس است که در ناحیه میان ژن‌های P و M قرار دارد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه

بذر گیاه *Nicotiana benthamiana* Domin-16c در شرایط گلخانه در دمای 24 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، دوره‌ی

پوتی ویروس‌ها، 2b در کوکوموویروس‌ها و bc1 در جمینی ویروس‌ها مورد هدف قرار می‌دهد (Nakahara et al. 2012, Tadamura et al. 2012, Haxim et al. 2017). نکته جالب این که ویروس‌های گیاهی قادرند مسیر اتوفاژی بر علیه مکانیزم خاموشی آرانا میزبان را به خدمت بگیرند. سرکوبگر P0 متعلق به پولروویروس‌ها (Poleroviruses) از طریق اتوفاژی موجب تخریب AGO1 می‌شود (Derrien et al. 2012). در مجموع، این یافته‌ها به روشنی نقش اتوفاژی در مسیر ضد ویروسی خاموشی آرانا در گیاهان را نشان می‌دهد.

در پژوهشی که اخیراً در خصوص شناسایی پروتئین سرکوبگر ویروس موزائیک زرد راه راه جو (Barley yellow striate mosaic virus; BYSMV) صورت گرفت، فسفوپروتئین (P) و پروتئین فرعی ۳ (P3) به عنوان دو سرکوبگر ضعیف برای BYSMV شناسایی شدند (نتایج در حال انتشار ریعی و همکاران). نظر به پیچیدگی فرآیند اتوفاژی و اطلاعات محدود در خصوص نحوه اثر پروتئین‌های سرکوبگر ویروسی بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی، بویژه در رابدوویروس‌ها، در مطالعه کنونی اثر احتمالی انفرادی و ترکیبی دو پروتئین P و P3 ویروس موزائیک زرد راه راه جو بر بیان چهار ژن *ATG2*، *ATG6*، *ATG7* و *AGO1* مورد بررسی قرار گرفت. *BYSMV* متعلق به جنس *Cytorhabdovirus* از خانواده‌ی *Rhabdoviridae* و جزء ویروس‌های مهم آلوده‌کننده‌ی خانواده‌ی گندمیان (*Poaceae*) است (Milne & Conti 1986). این ویروس یکی از ویروس‌های خسارت‌زا در استان‌های فارس و چهارمحال و بختیاری در گیاهان ارزن، جو و گندم است (Izadpanah et al. 1991). ژنوم رابدوویروس‌ها یک مجموعه اصلی شامل پنج پروتئین ساختاری (پروتئین Nucleoprotein (N)، فسفوپروتئین (P) Phosphoprotein، پروتئین ماتریکس (M) Matrix، گلیکوپروتئین

دقیقه. برای انجام پی سی آر از دستگاه ترموسایکر Gene Amp Applied Biosystems FTGENE2D، شرکت Eppendorf استفاده شد. محصولات تکثیر شده در ژل آگاروز % ۱/۲ الکتروفورز شدند. و با استفاده از دستگاه ژل خوان کداک (GEL LOGIC, 200) عکس برداری شدند. برای تعیین اندازه قطعات هدف از مارکر 100bp (Promega G3161) استفاده گردید. در ادامه به منظور ساخت سازه‌های ژنی، قطعات تکثیر شده ابتدا درون ناقل پلاسمیدی pGemT و سپس در ناقل پلاسمیدی pCK-GFP-S65C همسانه سازی گردیدند. در ناقل دوم ژن GFP تحت پروموتور 35S 2× ویروس موزائیک کلم گل (2× 35S cauliflower mosaic virus) و تقویت کننده‌های ترجمه قرار داده شد. پلاسمید pCK-GFP-S65C با آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI* برش داده شد و GFP حذف گردید تا با قطعات هدف مورد مطالعه جایگزین گردد. کل کاست سازه‌های نو ترکیب از pCK-δ-GFP-S65C به ناقل بیان pCambia expression binary (vector 1302) منتقل گردیدند و برای اطمینان از انتقال، با آنزیم *PstI* برش داده شدند. برای انتقال پلاسمیدهای به دست آمده به آگروباکتریوم از روش انجماد و ذوب (freeze-thaw) و از آگروباکتریوم نژاد C58C1 استفاده گردید (Weigel & Glazebrook 2006).

سنجش بیان موقت پروتئین‌های هدف با استفاده از Agroinfiltration

به منظور سنجش بیان پروتئین‌های مورد نظر، ابتدا تک کلنی‌های *A. tumefaciens* C58C1 حامل پلاسمیدهای منتقل شده و شامل سازه‌های ژن‌های هدف ویروس BYSMV در ۵ میلی لیتر از محیط حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۵ میلی گرم در لیتر تتراسایکلین مایه زنی و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸

نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و رطوبت ۸۰٪ کشت شد و گیاهچه‌ها پس از حدود ۶ تا ۸ هفته به ژرمیناتور منتقل شدند.

تکثیر ژن‌های فسفو پروتئین و پروتئین فرعی ۳، ساخت سازه‌های ژنی و پلاسمیدهای باکتریایی

در این مرحله ابتدا از کیت Platinum PCR super Mix High Fidelity ساخت شرکت Invitrogen برای قطعات فسفو پروتئین و پروتئین فرعی ۳ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس توالی رس شماره‌های ثبت شده در بانک ژن (BYSMV جدایه زنجان با رس شمار KP163566 برای فسفو پروتئین و جدایه چینی با رس شمار KM213865 برای P3) تکثیر شدند (جدول ۱). آغازگرهای رفت و برگشت علاوه بر دارا بودن (به ترتیب) سایت‌های برشی *NcoI* و *BamHI*، به منظور ردیابی پروتئین‌ها در انتهای آمینی دارای توالی Hemagglutinin tag - (HA) بودند. این آغازگرها قطعاتی با اندازه تقریبی ۸۸۰ و ۵۱۵ جفت باز را به ترتیب برای فسفو پروتئین و پروتئین فرعی ۳ تکثیر می‌کنند. هر ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مواد زیر بود: ۲۲/۷۲ میکرولیتر از کیت مخلوط اجزای پی سی آر (Platinum PCR super Mix High Fidelity)، یک میکرولیتر آغازگرهای forward و reverse (200nM) و ۰/۷ میکرولیتر از محصول RT-PCR. برنامه پی سی آر عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه برای واسرشت نمودن اولیه دی‌ان‌ا، یک برنامه ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه برای واسرشته سازی، ۶۰ درجه به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه به منظور اتصال آغازگرها، و ۶۸ درجه به مدت یک دقیقه برای تکثیر، و یک چرخه به منظور تکثیر نهایی در ۶۸ درجه به مدت ده

جدول ۱- لیست آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplified fragment Size (bp)	Assay	Reference
AGO1	AG01-F AG01-R	GCCATGGGGCACCTTCTG GAGACGAGGAACCCAGCCTC	132	RT-qPCR	Tahmasebi <i>et al.</i> 2017
ATG6	ATG6-F ATG6-R	ACCTGCGTA AAGGAGTTT GCTGAC AGAGCTTTGGTCCAACTTTCCTGC	164		Tahmasebi <i>et al.</i> 2017
ATG2	ATG2-F ATG2-R	GCAATTGGGCTTGGAGTGCAATTTG CCTGTGGGGCATCTTAGGTTGAT	154	RT-qPCR	Tahmasebi <i>et al.</i> 2017
ATG7	ATG7-F ATG7-R	CCAGCAGTGGAAAGCAGAAGGTCTT GCCACCGACTTCCCGTGATCA	166		Tahmasebi <i>et al.</i> 2017
EIF1- α	EIF1- α -F EIF1- α -R	AGCTTTACCTCCCAAGTCAATC AGAACGCCTGTCAATCTTGG	116	RT-qPCR	Tahmasebi <i>et al.</i> 2017
P3	P3-2526F P3-2526R	aCCATGGgtTACCCTATACGATGTTCCAGATTACG CTATGGAC AACAAAGCGGAA AGGATCCTTAATCAAGGGCTATCAG	515	Detection	Yan <i>et al.</i> 2015
P	P-Zarjan-F P-Zarjan-R	CCATGGgtTACCCATACGATGTTCCAGATTACG CTATGGCAAGCCCGCATCC aGGATCCTCACTCCATTCCGAGGTTT	880	Detection	Almasi <i>et al.</i> 2015

Abbreviations: F: Forward primer, R: Reverse primer

استخراج آرانا و پی‌سی‌آر در زمان واقعی (Quantitative real time PCR, RT-qPCR)

استخراج آرانا از نمونه‌ها با استفاده از ترکیب تجاری ترایزول (TRI Reagent; TRIZOL® REAGENT) ساخت شرکت Sigma مطابق دستور العمل شرکت سازنده ۵ روز پس از آگرواینفیلتریشن و با استفاده از ۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بافت گیاهی انجام شد. پس از عصاره‌گیری در یک میلی‌لیتر محلول ترایزول، آرانا کل با استفاده از کلروفورم جدا، و سپس با استفاده از ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد. در ادامه پس از شستشو با اتانول ۷۵٪، رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از آنزیم نوکلئاز حل گردید. از کیت Ambion (Applied Biosystems) TURBO Dnase ساخت شرکت Invitrogen به منظور تیمار آرانا و حذف دی‌ان‌ا طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. برای انجام واکنش ترانویسی معکوس از کیت High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Kit Inhibitor ساخت شرکت Bio-Rad استفاده شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر 10× buffer، ۸٪ میکرولیتر از dNTP mix (100mM)، دو میکرولیتر RT Rando primers (10×)، یک میکرولیتر reverse transcriptase MultiScribe™ Enzyme، یک میکرولیتر RNase inhibitor و ۷٪ میکرولیتر Nuclease-free H₂O تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم و در نهایت برای غیر فعال کردن آنزیم ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه از آغازگرهای ژن‌های مرتبط با اتوفاژی برای سنجش سطح بیان این ژن‌ها و *elongation factor -1alpha* (EIF-1α) به عنوان کنترل داخلی استفاده

درجه‌ی سانتی‌گراد کشت شده و برای مایه‌زنی با ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه مخلوط و سپس ۲۴ ساعت دیگر تحت شرایط مشابه نگهداری شدند. رسوب سلول‌های باکتری پس از سانتریفوژ کردن در ۴۰۰۰ دور در دقیقه با محلول ده میلی‌مولار کلرید منیزیم شستشو داده شده و سپس در بافر اینفیلتریشن (10mM MgCl₂, 10mM MES and 0.2mM acetosyringone) مجدداً به صورت سوسپانسیون درآورده شدند. سوسپانسیون‌های باکتری پس از نرمال سازی به مدت ۳ الی ۴ ساعت در دمای اتاق روی هم زن مغناطیسی، تا حصول OD₆₀₀= 0.15 تکان داده شدند. در ادامه روش اینفیلتریشن همزمان (-Co) infiltration assays) با مقدار مساوی آگروباکتریوم حامل پلاسمیدهای pCambia نوترکیب با هر یک از ژن‌های مورد مطالعه BYSMV به همراه پلاسمید pCK-GFP- S65C انجام شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از کشت‌های آگروباکتریوم حاوی ژن‌های ویروس مورد مطالعه با استفاده از سرنگ پلاستیکی یک میلی‌لیتری در سطح پشتی برگ‌های گیاهان *N. benthamiana* شش هفته‌ای تزریق شدند. در این بررسی از mGFP/empty- vector (RS control) و HC-Pro متعلق به PVY^{C-to} به ترتیب به عنوان کنترل‌های منفی و مثبت مهار خاموشی ژن و گیاهان *N. benthamiana* تزریق نشده به عنوان کنترل برای اتوفاژی (سطح پایه) استفاده شد. پیش از انجام آگرواینفیلتریشن گیاهان آبیاری شدند و به مدت دو ساعت در تاریکی قرار داده شدند. پس از تزریق، گیاهان در دستگاه ژرمیناتور تحت شرایط دمایی ۲۴±۲ درجه‌ی سانتی‌گراد دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و رطوبت نسبی ۸۰٪ قرار داده شدند.

کوچک) طبق دستورالعمل TGX™ and TGX Stain- Free™ FastCast™ Acrylamide Kit متعلق به شرکت Life Science استفاده شد. نمونه‌های پروتئین استخراج شده برای ردیابی پروتئین‌های هدف، به مقدار ۷ میکروگرم به همراه بافر مخصوص (-0.3 M Tris, Loading Buffer; 0.6 M DTT, 10% SDS, 0.06% Bromophenol blue, 30% Glycerol) و در حجم نهایی ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر به درون چاهک‌های موجود در ژل ریخته شدند. در این مرحله از مارکر پروتئینی Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standaeds 10-250 kDa استفاده گردید. برای ردیابی پروتئین، باندهای پروتئینی با استفاده از Trans-Blot Turbo (C.N; 170-4155) Blotting System بر روی غشای نایلونی (PVDF) منتقل شدند. غشاها ابتدا در ۲۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند و بعد از شستشو با آب استریل، در ۲۰ میلی‌لیتر بافر TBS (Tris 1M pH 7.5, NaCl and Tween-20) بر روی همزن قرار گرفتند. پانزده میلی‌لیتر TBS-Tween +2% milk برای بلاکینگ به آن‌ها اضافه شد و بعد از یک ساعت بهم خوردن و شستشوی مجدد، ردیابی پروتئین‌ها با استفاده از آنتی‌بادی اولیه (-1:20000 mouse anti-HA TBS-Tween +2% milk 5µl) و آنتی‌بادی دوم (goat anti mouse) با غلظت 1:3000 در حضور western ECL substrate (BIO-RAD) شناسایی شده و در نهایت تصاویر مبتنی بر فیلم ثبت گردیدند.

نتایج و بحث

گیاه *N. benthamiana* به ویژه لاین تراژن 16c در سراسر جهان در بسیاری از مطالعات به کار رفته است. این لاین، پروتئین فلورسنت سبز (*Aequorea victoria green*)، GFP (fluorescent protein) را به میزان زیاد بیان می‌کند. این لاین برای به تصویر کشیدن حرکت و فعالیت

شدند (جدول ۱). واکنش پی سی آر در زمان واقعی با استفاده از سیستم StepOne Plus Real Time system (Applied Bio systems) انجام شد. هر واکنش پی سی آر حاوی ۷/۵ میکرولیتر مخلوط 2× Fast SYBR Green master mix، ۲ میکرولیتر مخلوط واکنش cDNA و ۲۰۰ نانومول از هر آغازگر در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بود. محصول این واکنش با استفاده از کیت Sybr Green PCR master mix طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. واکنش پی سی آر. با ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای واسرشتگی دی‌ان‌ا شروع گردید و به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل ۳ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در پلیت‌های ۹۶ خانه ای انجام شد. هر واکنش پی سی آر در زمان واقعی در سه تکرار (تکرار تکنیکی) بر روی سه گیاه (تکرار بیولوژیکی) صورت گرفت. بر این اساس افزایش بیان mRNA ژن‌های هدف با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) محاسبه گردید. داده‌های آزمایش با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) و سپس آزمون مقایسات چند گانه توکی (Tukey's multiple comparisons test) با استفاده از نرم افزار آماری PAST، مورد بررسی قرار گرفتند (Hammer et al. 2001).

آنالیز پروتئین‌ها

استخراج پروتئین طبق دستورالعمل کیت ترایزول (TRIzol™ Plus RNA Purification Kit; Invitrogen) از نمونه‌هایی که برای استخراج آرانا به کاررفت، انجام گرفت. برای ردیابی پروتئین‌های هدف به منظور تایید بیان موقت آن‌ها در گیاه *N. benthamiana* لاین 16c از ژل آکریل آمید نرمال ۱۲٪ و همچنین ژل آکریل آمید 10% Tricine-SDS-PAGE، (برای پروتئین فرعی ۳ با اندازه

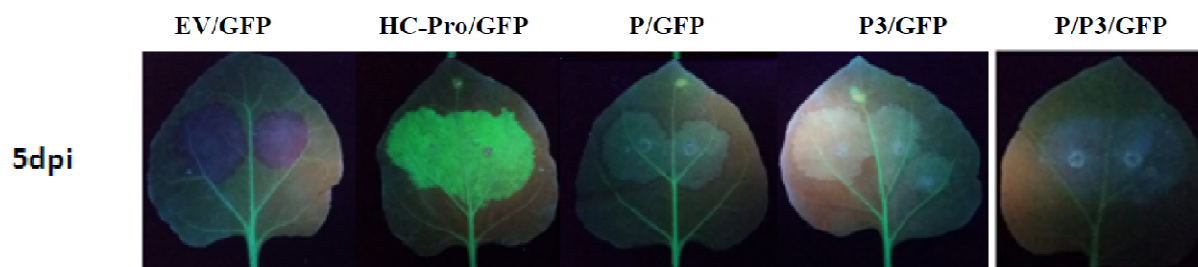
(Bejerman et al. 2016, Mann et al. 2016, Jackson et al. 2005). چند پروتیین مهارکننده‌ی خاموشی ویروسی (RNA silencing suppressors, RSS) شامل P1، P14، پروتیین غنی از سیستئین (CRP: cysteine-rich protein) به ترتیب متعلق به *Beet necrotic yellow vein virus*، *Chinese wheat mosaic virus* و پروتیین ۱۲ کیلودالتونی غنی از سیستئین (۱۲ kDa) *Potato virus M* و *Potato virus X* در دو ویروس (CRP فعالیت سرکوبگری ضعیفی را مشابه آنچه در این مطالعه برای پروتیین‌های P و P3 BYSMV توضیح داده شد (شکل ۱)، نشان دادند (Andika et al. 2012; Fusaro et al. 2012; Senshu et al. 2009; Senshu et al. 2011; Sun et al. 2012).

بیان موقت فسفوپروتیین و پروتیین فرعی ۳ در گیاه *N. benthamiana* 16c با استفاده از آزمون وسترن بلات در ۵ روز پس از تلقیح تایید شد و باندی با اندازه تقریبی ۱۸/۶ کیلودالتون برای P3 بدست آمد. اما برای فسفوپروتیین به جای باند تقریباً ۳۳ کیلو دالتونی باند بزرگتری که تقریباً ۶۶ کیلو دالتون بود ردیابی شد که احتمالاً نشان دهنده‌ی تمایل فسفوپروتیین به اولیگومر شدن است. این نتایج با نتایج مان و همکاران (Mann et al. 2015) مطابقت داشت (شکل ۲).

برای نشان دادن تاثیر پروتیین‌های سرکوبگر شناسایی شده بر بیان چهار ژن درگیر در مکانیزم دفاعی اتوفازای، از بیان موقت ژن‌های P و P3 تحت پرموتور CaMV2x35S در برگ‌های گیاه *N. benthamiana* 16c ۵ روز پس از تزریق استفاده شد و سطح بیان چهار ژن *ATG6*، *ATG2*، *ATG7* و *AGO1* به عنوان ژن‌های درگیر در مکانیزم اتوفازای با استفاده از پی سی آر کمی سنجیده شد. سطح بیان ژن‌های *ATG6*، *ATG2* و *ATG7* در گیاهان *N. benthamiana* 16c اینفیلتریت شده به ترتیب ۵/۶۵، ۵/۷۵،

آران‌ای‌های کوچک، همکنش ویروس - گیاه، ویروئید - گیاه، ساختار و عملکرد پروتیین، تعامل پروتیین - پروتیین، ویروس‌های انسان و پرندگان و سرکوبگرهای خاموشی مورد استفاده قرار گرفته است (Philips et al. 2017).

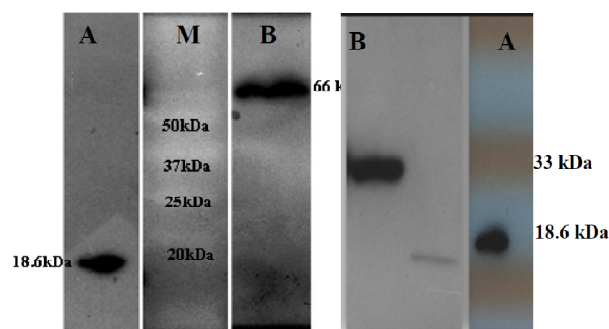
خاموشی ژن به عنوان مکانیزمی در کاهش بیان موقت ژن‌های وارد شده به گیاه از طریق آگروباکتریوم دخالت دارد (Johansen & Carrington 2001). تزریق همزمان سازه‌های ژن‌های مربوط به مهارکننده‌های خاموشی به همراه سازه‌ی GFP در برگ‌های گیاه *N. benthamiana* امکان سنجش فعالیت سرکوبگری پروتیین یا پروتیین‌ها را فراهم می‌کند (Chiera et al. 2007). در این مطالعه برای سنجش بیان موقت دو ژن BYSMV با استفاده از روش اینفیلتریشن همزمان دو کشت باکتریایی شامل: pCAMBIA با ژن گزارشگر mGFP، و دیگری ناقل دوتایی حاوی ژن‌های BYSMV (P یا P3) و ترکیب این دو پروتیین به عنوان سرکوبگر، فراهم گردید. تجزیه و تحلیل نمونه‌ها در زمان ۵ روز پس از آلودگی (5dpi) نشان داد که پروتیین‌های P و P3 سرکوبگرهای ضعیفی هستند (نتایج در حال انتشار ربیعی و همکاران)، زیرا در صورت عدم فعالیت سرکوبگری پروتیین‌های مورد بررسی، بیان GFP بعنوان یک ژن خارجی توسط سیستم خاموشی گیاه شناخته می‌شود و در محل تزریق لکه‌های قرمز که نشان دهنده‌ی پدیده‌ی خاموشی است مشاهده می‌شود. در غیر اینصورت می‌توان رنگ سبز را در محل تزریق مشاهده کرد. در پروتیین‌های مورد مطالعه از یک طرف بیان GFP نسبت به کنترل مثبت (PVA HC-Pro) بسیار کمتر و از سوی دیگر میزان بیان آن‌ها نسبت به کنترل منفی بیشتر بود. به همین دلیل همانطور که پیش بینی می‌شد این دو پروتیین مانند سرکوبگر سایر رابدوویروس‌ها، بعنوان سرکوبگرهایی با عملکرد ضعیف شناخته شدند



شکل ۱- اثر انفرادی و ترکیبی فسفو پروتئین (P) و پروتئین فرعی ۳ (P3) ویروس موزائیک زرد راه راه جو (BYSMV) بر بیان ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) در لاین 16c گیاهان تراژن *N. benthamiana* در ۵ روز پس از آلودگی. گیاهان تیمار شده با ژن پروتئین فلورسنت سبز همراه با پلاسמיד خالی (EV; mGFP/empty-vector)، یا HC-Pro (متعلق به PVY^{C-to})، که به ترتیب به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی مهار خاموشی ژن به کار رفتند، یا همراه با پروتئین P، P3 و یا همراه هر دو پروتئین P و P3.

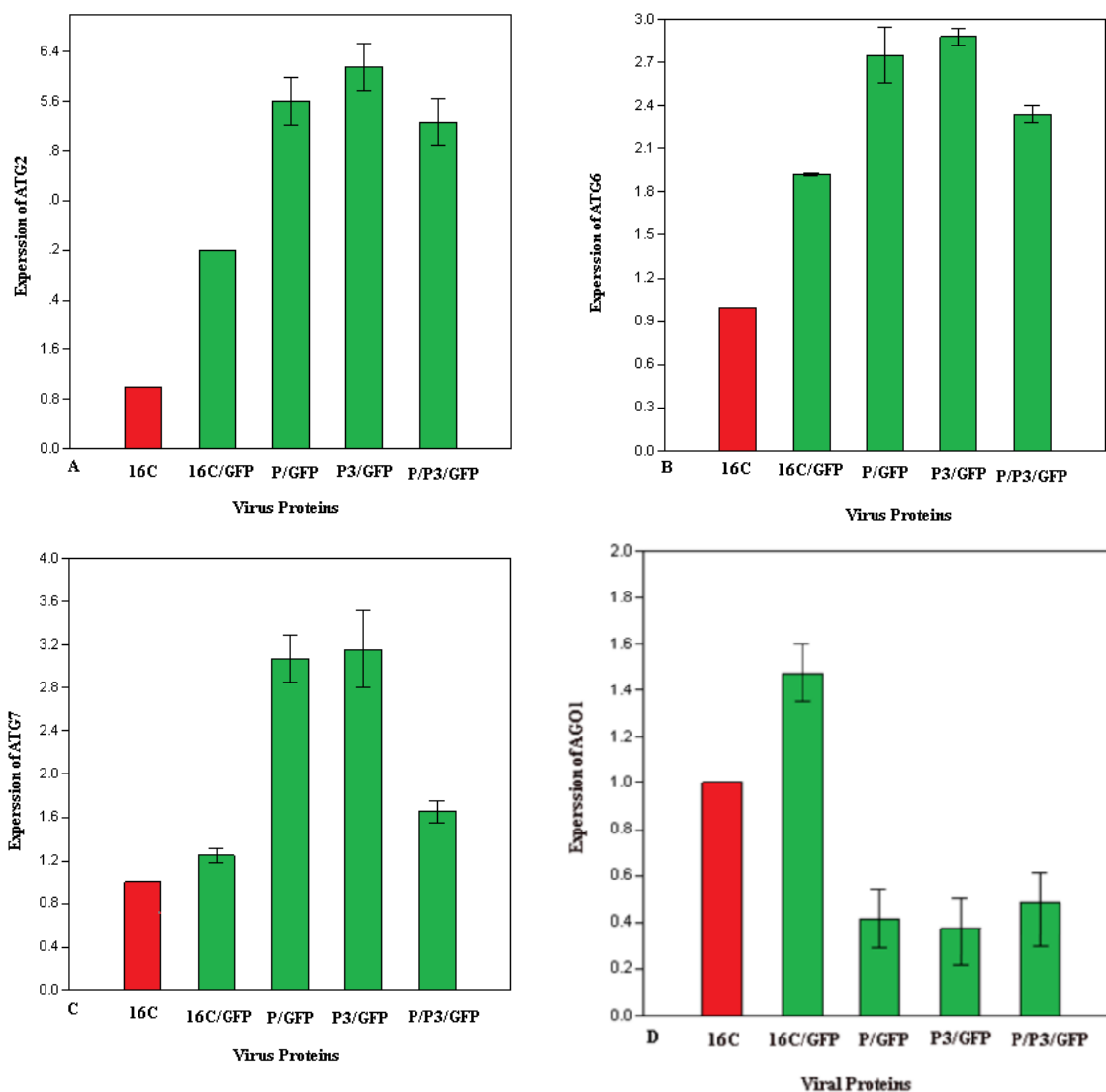
Fig 1- Effects of BYSMV phosphoprotein (P), ancillary gene 3 (P3), and their combination on GFP expression in *N. benthamiana* 16c plants at 5 dpi. The leaves were co-infiltrated with mixtures of constructs carrying GFP and BYSMV-P, BYSMV-P3 or P+P3. mGFP /empty-vector (EV) and HC-Pro from PVY^{C-to} (as negative and positive controls of RSS), respectively.

۲/۶ و ۲/۹، ۲/۸۷ و ۳/۱۵ برابر نسبت به حالت پایه (گیاه توتون لاین 16c) به عنوان کنترل، افزایش بیان داشتند در گیاهان *N. benthamiana* 16c اینفلتریت شده با ترکیب دو پروتئین (P/P3) در *ATG2*، *ATG6* و *ATG7* به ترتیب ۵/۲۶، ۲/۳۴ و ۱/۶۵ برابر افزایش بیان وجود داشت و نشان داد که پروتئین‌های مورد بررسی در حالت تنها و بدون ترکیب با پروتئین دیگر هم در سرکوب مکانیزم خاموشی آران او هم در اثر گذاری بر تغییر بیان ژن‌های اتوفاژی بهتر عمل می‌کنند. در مقابل سطح بیان *AGO1* در هر سه تیمار، P، P3 و P/P3 تقریباً ۱/۵ برابر نسبت به کنترل کاهش بیان نشان داد (شکل ۳). سرکوبگرهای مورد بررسی با تحت تاثیر قرار دادن بیان ژن‌های *ATG*، *ATG2* و *ATG7* موجب افزایش بیان آن‌ها در مقایسه با تیمار کنترل شدند. بیشترین افزایش در هر سه تیمار مربوط به *ATG2* بود. در مقابل میزان بیان *AGO1* در مقایسه با کنترل کاهش یافت. نتایج این تحقیق با کارهای انجام شده پیشین که نشان دادند اثر خاموشی با بیان همزمان سرکوبگرهای گیاهی کاهش پیدا می‌کند، مطابقت دارد (Voinnet et al.)



شکل ۲- ردیابی پروتئین‌های P و P3 با استفاده از آنتی‌بادی *anti-HA-flag tagged* برای نشان دادن بیان موقت آن‌ها در تیمارهای دو (الف) و پنج روز (ب) پس از اینفلتریشن. پروتئین ۱۸/۶ کیلو دالتونی در نمونه‌های ۲ و ۵ روز پس از اینفلتریشن (A) و باندهای ۳۳ و ۶۶ کیلو دالتونی (B) در نمونه‌های ۲ و ۵ روز پس از اینفلتریشن به ترتیب برای پروتئین‌های P و P3. M: مارکر پروتئینی (KaleidoscopeTM Standaeds 10Kd-250kD).

Fig 2- Immunoblot analysis of BYSMV P and P3 proteins using anti-HA-flag tagged antibody for detection of their transient expression at 2 and 5dpi treatments. A in both pictures 18.6 kDa protein at 2 and 5 dpi samples (A).and 33 and 66 kDa proteins at 2 and 5 dpi samples for P3 and P respectively, at 2 and 5dpi. M: protein marker precision plus proteinTMKaleidoscopeTM Standaeds 10Kd-250kD



شکل ۳- سنجش کمی چهار ژن دخیل در اتوفازی (*AGO1* و *ATG7*, *ATG6*, *ATG2*) در گیاهان تراژن *N. benthamiana* 16c با استفاده از RT-qPCR پنج روز پس از تزریق (اینفیلتریشن) آگروباکتریوم حاوی سازه‌های پروتئین‌های ویروس موزائیک زرد راه راه جو (*P*, *P3* و *P/P3*). از گیاه *N. benthamiana* 16c بدون هیچ گونه تزریقی به عنوان کنترل و در نرمال سازی داده‌ها از ژن *EIF-1α* استفاده گردید. میله‌های عمودی نشان دهنده‌ی خطای استاندارد بر اساس حداقل سه تکرار بیولوژیکی است. کوتاه‌ها: 16c/GFP= کنترل منفی، 16c= کنترل منفی، GFP= پروتئین فلورسنت سبز، P= فسفو پروتئین، P3?

Figure 3- Relative quantification of *ATG2*, *ATG6*, *ATG7* and *AGO1*, accumulation levels in leaf discs of *N. benthamiana* 16c agro-infiltrated with BYSMV constructs *P*, *P3* and *P/P3*, measured by RT-qPCR at 5 dpi. The *EIF-1α* transcript level of *N. benthamiana* was used as an internal control. Error bars denote standard errors from at least three biological replicates.

Abbreviations: 16C/GFP= RSS negative control; 16C=negative control; GFP= Green fluorescent protein; P= Phosphoprotein, P3=Protein3.

بیمارگرهای نکروتروف باعث افزایش مقاومت گیاه میزبان (Kabbage *et al.* 2013) در حالی که در مقابل مطالعات متعدد حاکی از این است که اتوفازی در برابر (2003, Chiera *et al.* 2008, Tahmasebei *et al.* 2017).

ویروس‌هایی مانند پروتیین پوششی در Turnip crinkle ، Tomato bushy ، Cucumber mosaic virus 2b، virus Sweet P1 ،(Potato virus X P25 ،stunt virus P19 Beet western yellows P0 و potato mild mottle P1 Derrien) ، virus بر روی عملکرد AGO1 تاثیر منفی دارند (Derrien et al. 2012, Azevedo et al. 2010, Giner et al. 2010, Zhang et al. 2006, Chiu et al. 2010, Varallyay et al. 2010). بررسی‌های انجام شده بیانگر آنست که پروتیین P19 متعلق به Cymbidium ring spot virus در گیاه *N. benthamiana* و توباموویروس آلوده‌کننده چلیپاییان *crTMV* (crucifer-infecting Tobamovirus) در گیاه *A. thaliana* نیز منجر به تجمع بیش از حد miR168 و بدنبال آن، کاهش بیان پروتیین AGO1 می‌شود (Varallyay et al., 2010). آلودگی *N. benthamiana* به *crTMV* نیز منجر به کاهش تجمع آراناپیک مربوط به AGO1 گردید (Havelda et al. 2008). یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی کاهش بیان AGO1 به القای مسیر miRNA در پاسخ P، P3 و P/P3 و یا وجود موتیف‌های GW/WG در P3 و یا موتیف‌های جایگزین در P برای اتصال به AGO1 و تاثیر بر عملکرد AGO1 است. کاهش بیان AGO1 به واسطه‌ی مهارکننده‌های خاموشی آرانا می‌تواند یک مکانیزم برای کاهش اثر RISC^۱ در برهمکنش ویروس-گیاه و در نتیجه تسهیل همانندسازی ویروس باشد. با کنترل AGO1 توسط مهارکننده‌های خاموشی ویروسی اثر ضد ویروسی کمپلکس RISC در تعامل گیاه و ویروس کاهش می‌یابد و در نهایت این امر موجب تسهیل همانند سازی ویروس و افزایش آلودگی می‌شود. افزایش بیان در ژن‌های *ATG2*، *ATG6* و *ATG7*

بیمارگر بیوتروف سفیدک پودری، دارای اثر منفی بر روی مقاومت گیاه میزبان می‌باشد (Wang et al. 2011) به نحو مشابهی اتوفازی می‌تواند بسته به مورد باعث آسانی یا سرکوب آلودگی‌های ویروسی در سلول‌های پستانداران شود (Paul and Münz, 2016; Wang et al. 2016b). معه‌ذا در مورد نحوه تاثیر اتوفازی بر آلودگی ویروس‌ها در گیاهان اطلاعات محدودی وجود دارد (Haxim et al. 2017). بر اساس اطلاعات موجود سرکوبگر P0 متعلق به پولروویروس‌ها منجر به تخریب اتوفازی AGO1 ، یک جزء از سیستم دفاع ضد ویروسی مبتنی بر RNAi می‌شود (Derrien et al., 2012). همچنین پروتیین سرکوبگر، VPg متعلق به ویروس موزاییک شلغم (Turnip mosaic virus) نیز گزارش شده است که باعث تخریب یکی از اجزای دفاع ضد ویروسی مبتنی بر RNAi سلولی (SGS3) ، از طریق اتوفازی می‌شود (Cheng and Wang, 2016). بر اساس نتایج یک مطالعه مربوط به تیمار ممانعت‌کنندگی اتوفازی و خاموشی یک ژن اتوفازی (ATG gene Beclin 1)، به نظر می‌رسد که پروتیین سرکوبگر 2b متعلق به ویروس موزاییک خیار از طریق اتوفازی مورد هدف تخریب قرار می‌گیرد (Nakahara et al. 2012). در تحقیق کنونی نشان داده شد که فسفو پروتیین (P) و پروتیین فرعی ۳ (P3) ویروس موزاییک زرد راه جو باعث بروز دو نوع تغییر در بیان چهارژن مهم دخیل در پروسه‌ی ضد ویروسی اتوفازی (*AGO1*، *ATG2*، *ATG6*، *ATG7*) می‌شوند. این پروتیین‌ها که اخیراً نقش سرکوبگری آن‌ها نشان داده شده است (ربیعی و همکاران در دست انتشار) از یک طرف باعث کاهش بیان *AGO1* و از سویی دیگر باعث افزایش بیان سه ژن *ATG7*، *ATG6*، *ATG2* می‌شوند. این یافته‌ها با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد. تحقیقات انجام شده حاکی از این است که سرکوبگر

^۱ RNA-Induced Silencing Complex (RISC)

مکانیزم خاموشی آران دچار اختلال می‌شوند، سرکوبگرهای مختلف می‌توانند جهت پایداری ژن‌ها و تولید پروتئین‌های مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین با درک مکانیزم خاموشی ژن و استفاده از پروتئین(هایی) با پتانسیل سرکوبگری خاموشی می‌توان از گیاهان تراژن بعنوان منبعی برای تولید دارو و یا محصولات پروتئینی با ارزش استفاده کرد (Roth et al. 2004). از سوی دیگر از طریق تولید ترکیبات مهارکننده پروتئین‌های سرکوبگر، می‌توان در جهت شناسایی و تولید ترکیبات موثر ضد ویروس‌های گیاهی استفاده کرد، که این امر مستلزم درک صحیح از نقش‌های پیچیده اتوفازای در پاسخ‌های ایمنی ذاتی گیاه می‌باشد. بنابراین علیرغم سوالات و ابهامات زیاد، درک بیشتر ما از مکانیزم‌های مولکولی حاکم بر تعامل میان اتوفازای و آلودگی‌های ناشی از ویروس‌ها می‌تواند در ابداع روش‌های موثر ضد ویروسی، موثر باشد (Yordy et al., 2012).

بر اساس اطلاعات موجود اگر چه که دخالت اتوفازای به عنوان یک سیستم سرکوب‌کننده خاموشی آران ویروسی کاملاً پذیرفته شده است، با این حال، تبیین دقیق نقش‌های پیچیده اتوفازای مستلزم درک شبکه پیچیده تعاملات عملکردی بین اتوفازای و پاسخ ایمنی گیاهان، و نیز تعیین ویژگی‌های سایر لایه‌های دفاعی می‌باشد.

می‌تواند منجر به القای پروسه‌ی اتوفازای در پاسخ به P، P3 و P/P3 شود تا نقش مهم خود را در ایمنی ضد ویروسی گیاه ایفا کند. در همین راستا، در گیاهان توتون تراژن خاموشی ژن‌های *ATG6*، *ATG7* و *ATG3* باعث افزایش تجمع TMV گردید (Liu et al. 2005). علاوه بر این چندین ژن اتوفازای در پاسخ به سرکوبگر C2 متعلق به ویروس Spinach curly top virus نیز افزایش بیان داشتند (Liu et al. 2014). افزایش بیان ژن‌های مرتبط با اتوفازای و شکل‌گیری اتوفازوزوم‌ها (autophagosomes) در طول آلودگی Tomato yellow leaf curl sardinia virus در گیاهان گوجه فرنگی آلوده نشان داده شده است (Miozzi et al. 2014). جالب است که فعالیت *ATG8* تنها در گیاه آرابیدوپسیس آلوده شده با Cabbage leaf curl virus گزارش شده است (Ascencio-Ibanez et al. 2008). به طور کلی فرایند اتوفازای از طریق ارتباط با تعدادی از مسیرهای مهم ایمنی ذاتی گیاه شامل مرگ سلولی و واکنش فوق حساسیت ناشی از بیمارگر، دفاع بواسطه تنظیم سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید، و خاموشی آر ای مبتنی بر القای ویروس، نهایتاً منجر به تغییراتی در مسیرهای مهم متابولیکی و علائم دهی می‌شود (Zhou et al. 2014). از آنجایی که بسیاری از برنامه‌های بیوتکنولوژی در زمینه بیان ژن‌ها در گیاهان از طریق

منابع

- Almasi, R., Afsharifar, A., Niazi, A. and Izadpanah, K. (2015). Molecular characterization of glycoprotein and phosphoprotein genes of a BYSMV isolate from Iran and transmission efficiency of different isolates. Iranian Journal of Plant Pathology, 51(2).
- Alvarado V. Y. and Scholthof H. B. 2012. AGO2: a new Argonaute compromising plant virus accumulation. Frontiers in Plant Science: 112.
- Andika I. B., Zheng S., Tan Z., Sun L., Kondo H., Zhou X. and Chen J. 2013. Endoplasmic reticulum export and vesicle formation of the movement protein of Chinese wheat mosaic virus are regulated by two transmembrane domains and depend on the secretory pathway. Virology 435(2): 493-503.
- Ascencio-Ib ez J. T., Sozzani R., Lee T.J., Chu T. M., Wolfinger R. D., Cella R. and Hanley-Bowdoin L. 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen

- response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology* 148(1):436-454.
- Azevedo J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S. and Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & development* 24(9): 904-915.
- Baumberger N., Tsai C. H., Lie M., Havecker E. and Baulcombe D. C. 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current Biology* 17 (18): 1609-1614.
- Bejerman N., Mann K. S. and Dietzgen R. G. 2016. *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* P protein is a local and systemic RNA silencing suppressor which inhibits programmed RISC activity and prevents transitive amplification of RNA silencing. *Virus Research* 224: 19-28.
- Berryman S., Brooks E., Burman A., Hawes P., Roberts R., Netherton C. and Jackson T. 2012. FMDV induces autophagosomes during cell entry via a class III PI3K-independent pathway. *Journal of virology* JVI-00846.
- Bologna N. G. and Voinnet O. 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual review of plant biology* 65: 473-503.
- Boya P., Reggiori F. and Codogno P. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology* 15(7): 713-720.
- Cheng X, Wang A. 2016. The potyvirus silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via Ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology* 91:e01478-16. Doi: 10.1128/JVI.01478-16, PMID: 27795417.
- Chiera J. M., Lindbo J. A. and Finer J. J. 2008. Quantification and extension of transient GFP expression by the co-introduction of a suppressor of silencing. *Transgenic Research* 17:1143-1154.
- Chiu M. H. Chen I. H., Baulcombe D. C. and Tsai C. H. 2010. The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular plant pathology* 11(5): 641-649.
- Dagdas Y. F., Belhaj K., Maqbool A., Chaparro-Garcia A., Pandey P., Petre B. and Win J. 2016. An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *Elife* 5: e10856.
- Deretic V. 2012. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Current Opinion in Immunology* 24:21-31.
- Derrien B., Baumberger N., Schepetilnikov M., Viotti C., De Cillia J., Ziegler-Graff V. and Genschik P. 2012. Degradation of the antiviral component *ARGONATI* by the autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:15942-15946.
- Ding S. W. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 10:632-644.
- Ding S. W. and Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130(3): 413-426.
- Dong X. and Levine B. 2013. Autophagy and viruses: adversaries or allies. *Journal of innate immunity* 5(5): 480-493.
- Fang X. and Qi Y. 2016. RNAi in plants: an Argonaute - centered view. *The Plant Cell* 28(2):272-285.
- Fusaro A. F., Correa R. L., Nakasugi K., Jackson C., Kawchuk L., Vaslin M. F. and Waterhouse P. M. 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426(2): 178-187.
- Giner A., Lakatos L., García-Chapa M., López-Moya J. J. and Burguán J. 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS pathogens* 6(7): e1000996.
- Hafrén A., Macia J. L., Love A. J., Milner J. J., Drucker M. and Hofius D. 2017. Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(10): E2026-E2035.
- Hammer Ø., Harper D. A T. and Ryan P. D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9.
- Havelda Z., Várallyay. V I czi A. and Burguán J. 2008. Plant virus infection induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal* 55:278-288.
- Haxim Y., Ismayil A., Jia Q., Wang Y. Zheng X., Chen T. and Cheng, J. 2017. Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *Elife* 6: e23897.
- Izadpanah K., Ebrahim-Nesbat F. and Afsharifar A. R. 1991. *Barley yellow striate mosaic virus* as the cause of a major disease of wheat and millet in Iran. *Journal of Phytopathology* 131(4): 290-296.

- Jackson A. O., Dietzgen R. G., Goodin M. M., Bragg J. N. and Deng M. 2005. Biology of Plant Rhabdoviruses. Annual Review of Phytopathology 43: 623-660.
- Johansen L. K. and Carrington J. C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium - mediated transient expression system. Plant physiology 126(3): 930-938.
- Judith D., Mostowy S., Bourai M., Gangneux N., Lelek M., Lucas-Hourani M. and Tangy F. 2013. Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. The European Molecular Biology Organization journal 14(6): 534-544.
- Kabbage M., Williams B. and Dickman M. B. 2013. Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. PLoS pathogens 9 (4): e1003287.
- Klionsky D. J. and Codogno P. 2013. The mechanism and physiological function of macroautophagy. Journal of innate immunity 5(5): 427-433.
- Lamb C. A., Yoshimori T. and Tooze S. A. 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nature reviews Molecular cell biology 14(12): 759.
- Levine B., Mizushima N. and Virgin H. W. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. Nature 469:323-335.
- Liu F., Grundke I., Iqbal K. and Gong C. X. 2005. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. European Journal of Neuroscience 22(8): 1942-1950.
- Liu, L., Chung, H. Y., Lacatus, G., Baliji, S., Ruan, J., & Sunter, G. (2014). Altered expression of Arabidopsis genes in response to a multifunctional geminivirus pathogenicity protein. BMC plant biology, 14(1), 302.
- Liu Y. and Bassham D. C. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. Annual Review of Plant Biology 63:215-237.
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallóczy Z., Levine B. and Dinesh-Kumar S. P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. Cell 121(4): 567-577.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCoR and the 2⁻ΔΔCT method. Methods 25(4): 402-408.
- Mandadi K. K. and Scholthof K. B. G. 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease?. The plant cell 25(5): 1489-1505.
- Mann K. S., Johnson K. N., Carroll B. J. and Dietzgen R. G. 2016. Cytorhabdovirus P protein suppresses RISC-mediated cleavage and RNA silencing amplification in planta. Virolog 490: 27-40.
- Milne R. G. and Conti M. 1986. Barley yellow striate mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses (312).
- Miozzi L., Napoli C., Sardo L. and Accotto G. P. 2014. Transcriptomics of the interaction between the monopartite phloem-limited geminivirus tomato yellow leaf curl Sardinia virus and *Solanum lycopersicum* highlights a role for plant hormones, autophagy and plant immune system fine tuning during infection. PLoS One 9(2): e89951.
- Mizushima N., Yoshimori T. and Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annual review of cell and developmental biology 27: 107-132.
- Nakahara K. S., Masuta C., Yamada S., Shimura H., Kashihara Y., Wada T. S. and Sekiguchi T. 2012. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:10113-10118.
- Paul P, Münz C. 2016. Autophagy and mammalian viruses: roles in immune response, viral replication, and beyond. Advances in Virus Research 95:149–195. Doi: 10.1016/bs.aivir.2016.02.002, PMID: 27112282.
- Philips J. G., Naim F., Lorenc M. T., Dudley K. J., Hellens R. P. and Waterhouse P. M. 2017. The widely used *Nicotiana benthamiana* 16c line has an unusual T-DNA integration pattern including a transposon sequence. PloS one 12(2): e0171311.
- Rivas F. V., Tolia N. H., Song J. J., Aragon J. P., Liu J., Hannon G. J. and Joshua-Tor L. 2005. Purified Argonaute2 and a siRNA form recombinant human RISC. Nature structural & molecular biology 12(4): 340.
- Roth B. M., Pruss G. J and Vance V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. Virus research 102(1): 97-108.
- Schott G., Mari-Ordonez A., Himer C., Alioua A., Voinnet O., Dunoyer P. 2012. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. The European Molecular Biology Organization journal 31: 2553–2565

- Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M. and Namba S. 2009. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *Journal of general virology* 90(4): 1014-1024
- Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M. and Namba S. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *Journal of virology* JVI-05273.
- Shelly S., Lukinova N., Bambina S., Berman A. and Cherry S. 2009. Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 30(4): 588-598.
- Shoji-Kawata S. and Levine B. 2009. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochimica ET Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1793:1478-1484.
- Tadamura K., Nakahara K. S., Masut C. and Uyeda I. 2012 Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. *Plant Signaling and Behavior* 7:1548 1551.
- Tahmasebi A., Afsharifar A., Rabiee S. and Izadpanah K. 2017. Altered expression of autophagy-related genes in *Nicotiana benthamiana* plants in response to Potato virus A HC-Pro silencing suppressor. *Iranian Journal of Plant Pathology* 53(1) Pages?
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. and Baulcombe D. 2003. Retracted: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* 33(5): 949-956.
- Walker P., Dietzgen R., Joubert D. and Blasdel K. 2011. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research* 162:110-125.
- Walker P. J., Blasdel K. R., Calisher C. H., Dietzgen R. G., Kondo H., Kurath G., Longdon B., Stone D. M., Tesh R. B., Tordo N., Vasilakis N., Whitfield A. E. and ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *Journal of General Virology* 99:447-448.
- Wang Y, Nishimura MT, Zhao T, Tang D. ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis* (2011). ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 68: 74-87.
- Lan-Lan W., Xin-Ru W., Xue-Mei W., Huang H., Jian-Xiang W., Xue-Xin C., Shu-Sheng L. and Xiao-Wei Wang. 2016. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies, *Autophagy*, 12(9): 1560-1574.
- Yan T., Zhu J. R., Di D., Gao Q., Zhang Y., Zhang A. and Wang, X. B. 2015. Characterization of the complete genome of Barley yellow striate mosaic virus reveals a nested gene encoding a small hydrophobic protein. *Virology* 478: 112-122.
- Yang Z. and Klionsky D. J. 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* 22(2): 124-131.
- Brian Y., Michal C. T., Kachiko Hayashi, O. A., Akiko I. 2013. Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense, *International Immunology*, Volume 25.
- Zhang X., Yuan Y. R., Pei Y., Lin S. S., Tuschl T., Patel D. J. and Chua N. H. 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & development* 20(23): 3255-3268.
- Zhou T., Murphy A. M., Lewsey M. G., Westwood J. H., Zhang H. M., Gonzalez I. and Carr J. P. 2014. Domains of the cucumber mosaic virus 2b silencing suppressor protein affecting inhibition of salicylic acid-induced resistance and priming of salicylic acid accumulation during infection. *Journal of General Virology* 95:1408-1413.