

گونه‌های شدید و خفیف ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی مورد هدف miRNA های متفاوتی از میزبان قرار می‌گیرند

Various Tomato microRNAs could target a Mild and a Severe Strain of *Tomato Leaf Curl Virus*

نفیسه طوسی^۱ و امید عینی^{۲*}

Nafiseh Tousi¹ and Omid Eini^{2*}

۱- دانشجوی دکتری، ۲- استادیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان،

ایران

1- PhD student, 2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: omid.eini@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۷- تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۴)

چکیده

جمعیتی ویروس‌ها یکی از مهمترین عوامل محدود کننده کشت گوجه‌فرنگی در سراسر جهان محسوب می‌شوند. ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*Tomato leaf curl virus* (ToLCV یکی از اعضای خانواده جمعیتی ویریده می‌باشد که دارای گونه‌های با بیماری‌زایی شدید و خفیف است. مشخص شده است که برخی از miRNA های میزبان قادرند ویروس‌های حیوانی را هدف قرار داده و مانع از استقرار آنها شوند. تاکنون هیچ گزارشی مبتنی بر روش‌های آزمایشگاهی، در مورد ویروس‌های گیاهی ارائه نشده است. با این وجود براساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، ویروس‌های گیاهی نیز می‌توانند به وسیله miRNA های میزبان هدف قرار گیرند. در این تحقیق، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی امکان اتصال miRNA های مختلف میزبان به گونه‌های شدید و خفیف ToLCV بررسی شده است. نتایج نشان داد miR156 امکان اتصال به هر دو گونه ToLCV را دارد. گونه خفیف ویروس، مورد هدف miR157، miR168، miR396 و miR166 قرار می‌گیرد در حالی که گونه شدید، ToLCV-Au، توسط گروه دیگری از miRNA ها شامل miR159، miR319 و miR403 هدف قرار می‌گیرد. تمام miRNA ها بجز miR156a با نواحی کد کننده ژنوم ویروس‌ها جفت می‌شوند. در مورد ویروس ToLCV-Au، miRNA319c به ژن V1 متصل می‌شود. miR159c و miR403 به ترتیب به ژن های C1 و C3 متصل می‌شوند. ژن C1 گونه ToLCV-Ir، توسط miR157a و miR156h و ژن V2 آن نیز در محل های مختلف مورد هدف miRNA ها شامل miR168b، miR396b و miR166i قرار می‌گیرد. نقش احتمالی miRNA های به دست آمده در تولید علائم شدید و خفیف توسط هر دو گونه بحث شده است.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک
ToLCV
miRNA
RNA hybrid
گوجه فرنگی

مقدمه

میکروآر.ان.ای‌ها (miRNAs) آر.ان.ای‌های کوچک اندوژن و غیر کدکننده هستند که بین ۲۴-۲۰ نوکلئوتید طول دارند. در گیاهان، miRNAها نقش کلیدی در رشد، نمو و پاسخ به استرس‌های زنده و غیرزنده بازی می‌کنند (Jin et al., 2013). miRNAها از یک آر.ان.ای اندوژن پس از تشکیل ساختارهای حلقه‌های بنیادی یا سنجاق سری (stem-loop) توسط پروتئین دایسر ((DCL1 (DICER-LIKE1 تولید می‌شوند. miRNA بالغ به کمپلکس RISC ((miRNA-miRISC متصل شده که رونوشت (transcript) توالی هدف را شناسایی و در مرحله نسخه برداری یا پس از نسخه برداری مانع از بیان آن می‌شود (Llave et al., 2002; Bartel, 2004). مشخص شده است که miRNAهای اندوژن میزبان ویروس‌های حیوانی را هدف قرار داده و سبب مهار رونوشت‌های حاصل از ژنوم ویروسی می‌شوند (Jopling et al., 2005). به عنوان مثال، نشان داده شده است که miR507 انسانی رونوشت آنزیم پلیمرز B2 را در ویروس آنفلونزا هدف قرار داده و سبب کاهش سطح بیان این فاکتور ضروری ویروس می‌شود. با این حال miRNAهایی نیز وجود دارند که سبب افزایش بیان و تکثیر ویروس می‌شوند، مانند miR122 که به ناحیه 5'-UTR ویروس هپاتیت نوع C (HCV) متصل می‌شود. اما تاکنون، در مورد ویروس‌های گیاهی هیچ گزارش آزمایشگاهی وجود ندارد و تنها روش‌های محاسباتی به منظور تشخیص miRNAهای گیاهی که قادر به اتصال به ژنوم ویروس هستند استفاده شده‌اند (Li et al., 2010). به عنوان مثال، با استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی مشخص شده است که دو miRNA کلیدی، miR159 و miR319، امکان اتصال به ژنوم ویروس *Tomato leaf curl New Delhi virus* را در گیاه گوجه‌فرنگی دارد (Naqvi et al., 2011).

بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت گوجه‌فرنگی در سراسر جهان است (Moriones & Navas-Castillo, 2000). از اولین گزارش TYLCV در ایران (Hajimorad, et al., 1996)، بیماری ناشی از این ویروس و ویروس‌های مشابه به سرعت و به‌طور وسیعی در تمام مناطق کشت گوجه‌فرنگی کشور گسترش یافته است به‌طوری که در سالهای اخیر حداقل ژنوم شش سویه از چهار گونه T(Y)LCV از مزارع گوجه‌فرنگی استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان، فارس، خوزستان، مرکزی، یزد، خراسان، کرمان و سایر مناطق ایران گزارش شده‌اند. خسارت این ویروس در برخی نواحی ایران به‌خصوص در استان‌های جنوبی کشور به حدی بالاست که کشاورزان مجبورند گیاهان دیگری نظیر بادمجان را جایگزین گوجه‌فرنگی کنند و در غیر این صورت هیچ محصولی نمی‌توانند برداشت کنند (Behjatnia et al., 2011). گونه‌های مختلف جنس جمینی ویروس عامل ایجاد این بیماری مهم هستند. ژنوم ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) شش ژن را کد می‌کند، چهار ژن (C1، C2، C3 و C4) روی رشته مکمل و دو ژن (V1 و V2) روی رشته اصلی قرار دارند. C1 پروتئین مرتبط با تکثیر و C2 پروتئین فعال‌کننده نسخه برداری است. C3 سبب افزایش تکثیر ویروس می‌شود. C4 پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی بوده و در تولید علائم در میزبان نقش مهمی بازی می‌کند. V1 پروتئین پوششی و V2 پیش پروتئین پوششی هستند. در بین آنها گونه استرالیایی ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCV-Au) علائم بسیار شدیدی شامل پیچیدگی برگ، زردی و کوتولگی ایجاد می‌کند (Dry, et al., 1993). درحالی که گونه ایرانی ویروس (ToLCV-Ir) علائم خفیف‌تری در گیاهان گوجه‌فرنگی ایجاد می‌نماید (Behjatnia et al., 2009).

غربالگری miRNAهای پیش‌بینی شده

به‌منظور تعیین بهترین محل اتصال، برای هر توالی هدف حداکثر پنج توالی مشابه که قادر به اتصال باشد در نظر گرفته شد و حداقل میزان انرژی آزاد و تعداد اتصالات نوکلئوتیدهای نابجا به ترتیب منفی بیست و چهار تعیین شد (Naqvi et al., 2011). سایر مشخصات تعیین شده در نرم‌افزار بدین شرح بود: (۱) کمتر از چهار اتصال نابجا از ۲۱ نوکلئوتید بین miRNA می گوجه‌فرنگی و ژنوم ویروس هدف، (۲) حداکثر تشابه توالی در ناحیه seed region در محل نوکلئوتیدهای ۸-۲ از انتهای 5' توالی miRNA، (۳) فقط یک اتصال نابجا در ناحیه seed region جایی که نوکلئوتیدهای اطراف آن با حداکثر قدرت جفت شده‌اند، در نظر گرفته شد (Naqvi et al., Meyers et al., 2008; 2011).

جهت ردیابی miRNA/miRNA*های گوجه‌فرنگی که امکان اتصال به رونوشت‌های حاصل از توالی مکمل ژنوم ویروس‌های ToLCV-Ir و ToLCV-Au را داشته باشند (C1, C2, C3 and C4)، این رونوشت‌ها نیز در بررسی توالی در نظر گرفته شدند.

نتایج

miRNAهای گوجه‌فرنگی به‌طور بالقوه توانایی جفت شدن با ژنوم ویروس‌های ToLCV-Au و ToLCV-Ir و نواحی کدکننده (ORFs) آنها را دارند.

نتایج حاصل از بررسی داده‌های نرم‌افزار RNA hybrid براساس قوانین مربوط به miRNAهای گیاهی نشان داد که گروه‌های مختلفی از miRNAهای گوجه‌فرنگی توانایی اتصال به ژنوم و نواحی کدکننده هر یک از دو ویروس ToLCV-Au و ToLCV-Ir را دارند (جدول ۱ و ۲). میزان انرژی مورد نیاز برای جفت‌شدن miRNA با ژنوم

در این مطالعه، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، miRNAهای گوجه‌فرنگی که قادر به اتصال به هر دو گونه شدید و خفیف ویروس هستند بررسی شده‌اند. نقش احتمالی miRNAهای پیش‌بینی شده در تولید علائم توسط این گونه‌ها، بحث شده است.

مواد و روش‌ها

گونه‌های ویروسی و بررسی RNA hybrid

به‌منظور انجام بررسی هیبرید آر.ان.ای، توالی کامل ژنوم ToLCV-Au (GenBank accession NC_003896) و ToLCV-Ir (Genbank accession AY297924) استفاده شدند. ToLCV-Au سبب ایجاد پیچیدگی شدید برگ، زردی و کوتولگی می‌شود (Dry, et al., 1993) درحالی که علائم ناشی از ToLCV-Ir خفیف‌تر است (Behjatnia et al., 2009). توالی ژنوم این دو ویروس فقط ۷۴ درصد شباهت دارد. بنابراین هر گونه می‌تواند توسط miRNAهای متفاوتی از میزبان هدف قرار گیرد.

توالی miRNAهای گوجه‌فرنگی شامل miRNAهای پیش‌بینی‌شده و همینطور miRNAهایی که از طریق روش‌های آزمایشگاهی تأیید شده‌اند از تارنمای miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (release21) و سایر پژوهش‌های منتشرشده درمورد گوجه‌فرنگی به دست آمد (Zhang et al., 2008; Valiollahi et al., 2014). با استفاده از نرم‌افزار RNA hybrid (bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/submissio.html)، miRNA/miRNA*های گوجه‌فرنگی به‌طور جداگانه از نظر توان اتصال به ژنوم ویروس‌های ToLCV-Ir و Au بررسی شدند.

miR168، miR396 و miR166 مورد هدف قرار گیرد، درحالی که گونه شدید، ToLCV-Au، امکان اتصال به miR159، miR319 و miR403 را دارد.

ویروس، محل اتصال miRNA در توالی ژنوم ویروس و نیز میزان این تشابه توالی در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که برخی از miRNAهای گوجه‌فرنگی از جمله miR156 توانایی جفت شدن با هر دو گونه ویروسی را دارد. علاوه بر آن، مشخص شد که گونه خفیف ویروس ToLCV-Ir، می‌تواند توسط miR157

جدول ۱- توالی های miRNAهای گوجه فرنگی که توانایی اتصال به ژنوم ویروس ToLCV-Au و نواحی کدکننده آن را دارند.

Table 1. Tomato miRNA sequences binding to ToLCV-Au genome and its encoded Open Reading Frames (ORFs).

miRNA	ΔG (kcal/mol)	Binding position on Virus genome	Target-miR hybrid
miR156a	-23.3	89	target 5' C AAG U 3' GCUUAUUU UUUUUUGUCG CGAGUGAG AGAAGACAGU miRNA 3' CA 5'
miR159c	-26.0	2463	target 5' A G AC A 3' UGGAGUUCUCU CAA UUUAAU ACCUCGAGGGA GUU AGGUUA miRNA 3' A 5'
miR319c	-27.7	151	target 5' U C 3' GGG A UCCUUUAGUCCA UCCU GGG AAGUCAGGU miRNA 3' CGA U 5'
miR319c	-25.2	151	target 5' U C 3' GGG A UCC UUUAGUCCA UCCU AGG AAGUCAGGU miRNA 3' CG A U 5'
miR403	-29.1	1454	target 5' A CCCC C 3' UGGGUU UGUGCGUGAAUC GCUCAA ACACGCACUUAG miRNA 3' AUU 5'

جدول ۲- توالی های miRNA های گوجه فرنگی که توانایی اتصال به ژنوم ویروس ToLCV-Ir و نواحی کدکننده آن را دارند.

Table 2. Tomato miRNA sequences binding to ToLCV-Ir genome and its encoded Open Reading Frames (ORFs).

miRNA	ΔG (kcal/mol)	Binding position on Virus genome	Target-miR hybrid
miR156a	-23.3	89	target 5' C AAG U 3' GCUUAUUU UUUUUUGUCG CGAGUGAG AGAAGACAGU miRNA 3' CA 5'
miR157a	-22.6	2528	target 5' A AA 3' GUGC CUCU UCUUU GUUAG CACG GAGA AGAAG CAGUU miRNA 3' A U A 5'
miR156h	-22.6	2528	target 5' A AA 3' GUGC CUC UUCUUU GUUAG CACG GAG AAGAAG CAGUU miRNA 3' A A A 5'
miR168b	-27.8	485	target 5' C G U G U 3' CCUGAU U CCCAAG GA GGGCUA A GGGUUC CU miRNA 3' CA G C G 5'
miR396b	-24.7	940	target 5' A G 3' UCAAG AAGCUG GGAA AGUUC UUCGAC CCUU miRNA 3' UUCA U A 5'
miR166i	-25.7	591	target 5' A C A 3' GGGGAAUGG GUUUGA CC CUCCUUACU CGGACU GG miRNA 3' U A CU 5'

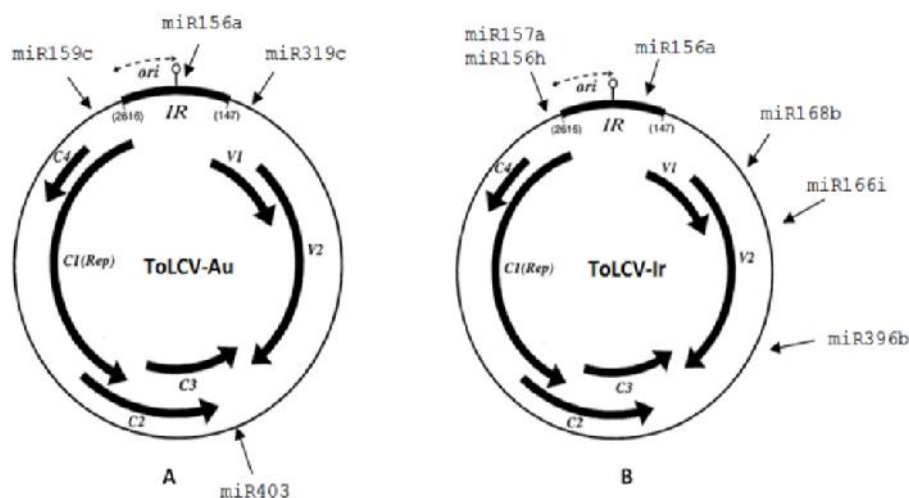
گیاه میزبان را در برابر ویروس از طریق دخالت miRNA ها افزایش دهد. همچنین مشخص شد که ژن V2 در ویروس ToLCV-Ir نیز می‌تواند در محل‌های مختلف مورد هدف miRNA ها قرار گیرد (miR168b, miR396b و miR166i). این مسأله نشان دهنده اهمیت نقش تنظیمی این ژن توسط miRNA ها است. ژن V2، که پروتئین پوششی ویروس را کد می‌کند، مسئول کپسیده شدن ژنوم ویروس بوده و ضمناً در حرکت ویروس در داخل گیاه میزبان و تشخیص توسط ناقلین حشره‌ای ویروس نقش دارد. پروتئین پوششی ویروس‌های گیاهی با توجه به نقش‌های کلیدی ذکر شده یکی از مهمترین پروتئین‌های ویروسی می‌باشد که در صورت عدم کارایی مناسب این پروتئین به تنهایی،

شکل ۱ محل اتصال miRNA های گوجه‌فرنگی را به ژنوم ویروس‌های ToLCV-Ir و ToLCV-Au نشان می‌دهد. تمام miRNA ها بجز miR156a با نواحی کدکننده ژنوم ویروس‌ها جفت می‌شوند. در مورد ویروس ToLCV-Au، miRNA319c به ژن V1 متصل می‌شود که پیش پروتئین پوششی را کد می‌کند و در بروز علائم و تکثیر ویروس نقش دارد. miR159c و miR403 به ترتیب به ژن‌های C1 و C3 که در تکثیر ویروس نقش دارند، متصل می‌شوند. ژن C1 گونه ی ToLCV-Ir، توسط miR157a و miR156h هدف قرار می‌گیرد. با توجه به نقش مهم ژن C1 در تکثیر ویروس ToLCV-Ir، نقش تنظیمی احتمالی این ژن به وسیله miRNA های مختلف می‌تواند به‌طور بالقوه پاسخ دفاعی

گوجه‌فرنگی که می‌توانند به‌طور بالقوه به ژنوم ویروس‌های ToLCV-Au و ToLCV-Ir و رونوشت‌های آنها متصل شوند، پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد که گروه‌های مختلف miRNA در میزبان به دو گونه متفاوت ویروس ToLCV متصل می‌شوند. سطوح پایین انرژی مورد نیاز برخی از miRNAهای گوجه‌فرنگی برای اتصال به ژنوم ویروس، از جمله miR403 در ToLCV-Au و miR168b در ToLCV-Ir، موید این مسأله است که این تعامل ممکن است در طبیعت در گیاهان آلوده نیز اتفاق بیفتد. سطح مشابهی از انرژی آزاد معادل -23 kcal/mol در موارد آزمایشگاهی تأیید شده از اتصال miRNAها به توالی هدفشان قبلاً گزارش شده است (Perez-Quintero *et al.*, 2010).

بحث

miRNAهای گوجه‌فرنگی به ژنوم ویروس‌های ToLCV-Au و ToLCV-Ir و نواحی کدکننده آنها متصل می‌شوند. در این تحقیق با استفاده از روش RNA hybrid (Krüger&Rehmsmeier, 2006) miRNA/miRNA^* های



شکل ۱- محل اتصال miRNAها توسط پیکان‌های کوچک روی ژنوم ToLCV-Au (a) و ToLCV-Ir (b) نشان داده شده است. پیکان‌های ضخیم نشان‌دهنده محل ژن‌های مختلف ویروسی روی توالی اصلی ویروس (V) و توالی مکمل آن (C) است.

Fig1. The position of miRNAs binding sites is shown by small arrows on the genome of ToLCV-Au (left) and ToLCV-Ir (right). Thick arrows indicate the Open Reading Frames (ORFs) on the virion- (V) or complementary- (C) sense strands.

پروتئین 2b در ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*) که هردو از طریق مداخله در عملکرد ژن *AGO1* سبب بازداري از خاموشي ژن می‌شوند (Giner et al., 2010; Azevedo et al., 2010).

درمورد ToLCV-Au، دو ژن C2 و C4 به عنوان بازدارنده‌های خاموشي گزارش شده‌اند (Dogra et al., 2009; Selth et al., 2004) که می‌تواند توليد علائم شديد توسط اين ويروس را با وجود امکان اتصال miRNAهای مختلف ميزبان به ژنوم آن توجيه نمايد. درمورد گونه خفیف، ToLCV-Ir، ژن موثر در بازدارندگی از مسير خاموشي ژن هنوز شناسایی و معرفی نشده است. فقدان یا ضعيف بودن بازدارنده خاموشي ژن به وسيله اين گونه خفیف ToLCV ممکن است به miRNAهای پیش‌بینی شده اين امکان را بدهد که ژنوم ويروس را به طور موثرتری مورد هدف قرار دهند.

مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مشخص شود آیا سطح بیان miRNAهای ميزبان، که به طور بالقوه قادرند ژنوم ويروس را هدف قرار دهند، در پاسخ به آلودگی ویروسی به حد کافی افزایش می‌یابد تا بتواند به ساز و کار بازدارنده خاموشي ژن توسط ويروس غلبه یابد. به عنوان مثال، مشخص شده است که سطح بیان دو miRNA کلیدی، miR159 و miR319، که امکان اتصال به ژنوم ToLCV-Au را دارند، در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس *Tomato leaf curl New Delhi virus* افزایش می‌یابد (Naqvi et al., 2010). نتایج منتشر نشده طوسی و همکاران، ۲۰۱۶، نیز حاکی از افزایش بیان miR156، miR159 و miR403 در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ToLCV-Au بوده است.

نتایج پیش‌بینی نشان داد که هر یک از گونه‌های ویروسی بررسی شده توسط گروه‌های متفاوتی از miRNAهای ميزبان هدف قرار می‌گیرند. پژوهش‌های بیشتری نیاز است تا عکس‌العمل متقابل این miRNAها با گونه‌های ToLCV و نیز اثرهای احتمالی این تعاملات روی استقرار ویروس و ایجاد علائم توسط آن به اثبات برسد.

بنابراین، انتظار می‌رود که بیشتر miRNAs/miRNAs* پیش‌بینی شده در ميزبان قابلیت تعامل با ژنوم و رونوشت‌های ویروس‌های ToLCV-Ir و ToLCV-Au را در گیاهان گوجه‌فرنگی نیز داشته باشند. کاربرد موفقیت‌آمیز miRNAهای مصنوعی به منظور کنترل جمنی‌ویروس‌ها نیز می‌تواند موید این مسأله باشد که ویروس‌های گیاهی نیز می‌توانند توسط miRNAهای ميزبان هدف قرار گیرند (Van Vu et al., 2013).

جداول ۱ و ۲ نشان می‌دهند که miRNAهای گوجه‌فرنگی شامل miR156 می‌توان اتصال به هر دو گونه ToLCV را دارد. علاوه بر آن، مشخص شد که گونه خفیف ویروس ToLCV-Ir، می‌تواند توسط تعداد بیشتری miRNA شامل miR157، miR168، miR396 و miR166 هدف قرار گیرد، درحالی‌که گونه شديد، ToLCV-Au، امکان اتصال به miR159، miR319 و miR403 را دارد. گزارش شده است که این miRNAها نقش‌های مهمی را در سیستم دفاعی ميزبان (mir396 و mir319)، رشد و نمو برگ (mir319) و نمو گیاه (mir168) بازی می‌کنند (Palatnik et al., 2003; Carla Schommer & Palatnik, 2012). در نتیجه ایجاد علائم شديد توسط گونه ToLCV-Au ممکن است نتیجه تعامل این ویروس با miR319 و miR159 باشد که در نمو برگ نقش دارند.

در حضور مسير miRNAهای ميزبان، هر دو ویروس مذکور، تکثیر شده و علائم خفیف و شديد توليد می‌نمایند. این امر می‌تواند چنین توجيه شود که بیان پروتئین‌های بازدارنده ویروس و تداخل این عوامل در مسير خاموشي ژن، قادر است مراحل مختلف این ساز و کار را به منظور محافظت از ویروس مختل نماید. در گیاهان و بی‌مهرگان خاموشي ژن توسط miRNA بعنوان یک روش دفاعی مهم در برابر ویروس‌های مهاجم می‌باشد (Danielson & Pezacki, 2013). جهت مقابله با مسير خاموشي ژن، در تمام ویروس‌های گیاهی و تعداد زیادی از ویروس‌های حشرات و پستانداران بازدارنده‌های خاموشي ژن (Viral suppressors of RNA silencing (VSRs) تکامل یافته است (Ding, and Voinnet, 2007; Li, & Ding, 2006). از جمله پروتئین p38 در ویروس مضرس لاله (*Turnip crinkle virus*) و

منابع

- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T. and Voinnet, O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24:904-915.
- Bartel D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281-297.
- Behjatnia, S. A. A., Izadpanah, K. and Afsharifar, A. 2011. The status of geminivirus species in Iran. First Iranian Plant Virologist symposium, Shiraz, Iran. (In Farsi with English abstract)
- Behjatnia S. A., Eini O., Rasulpour R. 2009. Pathogenicity demonstration, transferring and host range of *Tomato leaf curl Iranian virus* Infectious clone. *Plant Pathology* 1: 47-59.
- Carla Schommer E. G. B., Silvana V. Spinelli, Palatnik a. J. F. 2012. Role of MicroRNA miR319 in Plant Development. and Stress Responses Signaling and Communication in Plant. (Sunkar, R., ed.). Springer: 29-47.
- Danielson, D. C. and Pezacki, J. P. 2013. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS Letters* 587: 1198-1205.
- Ding, S. and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-426.
- Dogra S., Eini O., Rezaian M., Randles J. 2009. A novel shaggy-like kinase interacts with the *Tomato leaf curl virus* pathogenicity determinant C4 protein. *Plant Molecular Biology* 71: 25-38
- Dry I. B., Rigden J. E., Krake L. R., Mullineaux Ph. M., Rezaian M. A. 1993. Nucleotide sequence and genome organization of *Tomato leaf curl geminivirus*. *Journal of General Virology* 74: 147-151.
- Giner, A., Lakatos, L., Garcia-Chapa, M., Jose Lopez-Moya, J. and Burgyan, J. 2010. Viral protein inhibits RISC activity by Argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLOS Pathogens* 6: e1000996.
- Hajimorad, M. R., KheyrPour, A., Alavi, V., Ahoonmanesh, A., Bahar, M., Rezaian, M. A. and Gronenborn, B. 1996. Identification of whitefly transmitted tomato yellow leaf curl geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. *Plant Pathology* 45: 418-425.
- Jin D., Wang Y., Zhao Y., Chen M. 2013. MicroRNAs and Their Cross-Talks in Plant Development. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 161-170.
- Jopling C. L., Yi M., Lancaster A. M., Lemon S. M., Sarnow P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309: 1577-1581.
- Krüger J. and Rehmsmeier M. 2006. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible *Nucleic Acids Research* 34: 451-454.
- Li, F. and Ding, S. 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual Review of Microbiology*. 60: 503-531.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K. D., Carrington J. C. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297: 2053-2056.
- Meyers B. C., Axtell M. J., Bartel B., Barteld D. P., Baulcombe D., Bowman J. L., 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell* 20: 3186-3190.
- Moriones E, Navas-Castillo J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71: 123-34.
- Naqvi A. R., Choudhury N. R., Mukherjee S. K., Haq Q. M. R. 2011. In silico analysis reveals that several tomato microRNA/microRNA* sequences exhibit propensity to bind to tomato leaf curl virus (ToLCV) associated genomes and most of their encoded open reading frames (ORFs). *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 13-17.
- Naqvi A., Haq Q., Mukherjee, S. 2010. MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virology Journal* 7: 281.
- Palatnik J. F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J. C., et al. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Perez-Quintero A., Neme R., Zapata A., Lopez C. 2010. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. *BMC Plant Biology* 10: 138.
- Selth L. A., Randles J. W., Rezaian M. 2004. Host responses to transient expression of individual genes encoded by Tomato leaf curl virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 17: 27-33.
- Valiollahi E., Farsi M., Fevreiro P., Kakhki A. M. 2014. Bioinformatic characterization and expression analysis of miRNAs in *Solanum lycopersicum*. *Plant Omics Journal* 7: 108-116.
- Van Vu T., Roy Choudhury N., Mukherjee S. K. 2013. Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, show tolerance to virus infection. *Virus Research* 172: 35-45.
- Zhang J., Zeng R., Chen J., Liu X., Liao Q. 2008. Identification of conserved microRNAs and their targets from *Solanum lycopersicum* Mill. *Gene* 423: 1

Various Tomato microRNAs could target a Mild and a Severe Strain of Tomato Leaf Curl Virus

Nafiseh Tousi¹ and Omid Eini^{2*}

1- PhD student, 2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* Corresponding Author, Email: omid.eini@znu.ac.ir

ABSTRACT

Geminiviruses are one of the main constraints in tomato production worldwide. *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) is a geminivirus (family *geminiviridae*) that produces various symptoms in plants including leaf curling, yellowing and stunting. MicroRNAs are endogenous small RNAs which play a key role in both plants and animal defense and development. Certain animal viruses were found to be targeted by host miRNA which prevent their establishments. In plants, on the other hand, there is no experimental evidence for such an effect on plant viruses. However, based on in silico analysis, viral plants also could be targeted by host miRNAs. Here, we investigated if different sets of tomato miRNAs could potentially bind to a mild and severe species of ToLCV using in silico analysis. We found that tomato miRNAs including mir156 bind to both strains of ToLCV. The mild strain, ToLCV-Ir, was found to be targeted by mir157, 168, 396 and 166 while the severe strain, ToLCV-Au, was targeted by other groups of miRNAs including mir159, mir319 and mir403. The possible role of the identified miRNAs in production of mild and severe symptoms by both strains is discussed. All sequences except miR156a target the coding regions of the virus. In ToLCV-Au miRNA319c binds to the V1 gene, which encodes the precoat protein and which is involved in symptom expression and virus movement. miR159c and miR403 bind to the C1 and C3 genes, respectively, that are involved in virus replication. The C1 ORF of ToLCV-Ir can be targeted by both miRNAs miR157a and miR156h. The V2 gene can be targeted by three miRNAs (miR168b, miR396b and miR166i) at different sites. This suggests the potential importance of regulation of this particular ORF by miRNAs. The possible role of the identified miRNAs in production of mild and severe symptoms by both strains is discussed.

Key Words

Bioinformatics, ToLCV, miRNA, RNA hybrid, Tomato