

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره سوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سر دبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: مهندس سمیرا کهک و مهندس مهدیه مجدی

هیات تحریریه

دکتر فضل‌الله افراز (استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)
دکتر منصورامیدی (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر علی‌اکبر شاه نجات بوشهری (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر مسعود توحیدفر (دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)
دکتر بهزاد قره یاضی (استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی)
دکتر رضا معالی‌امیری (دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)
دکتر محمد علی ملبوبی (دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری)
دکتر سید ضیاءالدین میرحسینی (دانشیار، دانشگاه گیلان)

صفحه آرایی: مهندس افسانه شمس و مهندس ملیحه نعل‌چگر

درجه علمی- پژوهشی مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی طی نامه شماره ۸۹/۳/۱۱/۸۹۳۶۴ مورخه ۸۹/۱۱/۱۸ کمیسیون بررسی نشریات علمی کشور تأیید شده است.

مسئولیت محتوای علمی، اطلاعاتی، اسامی نویسنده(گان) و ترتیب آن‌ها به عهده مکاتبه کننده مقاله است.

دو فصل‌نامه در ویرایش و تخریص مطالب آزاد است. درج مطالب به منزله تأیید کامل محتوای آن‌ها نیست.

مقالات وارده مسترد نمی‌شود. نقل مطالب با ذکر ماخذ مجاز است.

نشانی: تهران، انتهای اتوبان همت به سمت غرب، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

پست الکترونیک: gebs.j.bs@gmail.com ، تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۷۵

پایگاه اینترنتی: www.gebsj.ir

امور چاپ: مرکز نشر دانشگاهی

تیراژ: ۵۰۰



مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره سوم، شماره ۱، شماره پیاپی ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۳

فهرست مطالب

- اسامی داوران همکار در این شماره
- راهنمای نگارش مقاله

مقاله های پژوهشی

- اثر مگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن منتون ردوکتاز و میزان منتول در گیاه دارویی نعنای فلفلی
دیاکو رسولی، محمود سلوکی، براتعلی فاخری و صدیقه اسماعیل زاده بهابادی ۱-۸
- بهینه سازی بیان موقت ژن به واسطه آگروباکتریوم در بادام
ندا میرآخوری، افسانه حیدری ریحانی، بهروز شیران و سعدالله هوشمند ۹-۱۸
- بیان متفاوت ژن *NPR1* و برخی از ژن های مرتبط با بیماری زایی در پاسخ به مصرف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در برنج
ژاله حکمتی، علی اعلمی، محمدمهدی سوهانی، رضا شیرزادیان خرم آباد و سیده حمیده کاروانکش ۱۹-۳۰
- تجزیه بیوانفورماتیکی EST های جداسازی شده از گیاه *Aeluropus littoralis* تحت تنش شوری
امین ابراهیمی، رضا معالی امیری، قربان علی نعمت زاده و هوشنگ علیزاده ۳۱-۴۰
- ردیابی مولکولی جدایه های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک های دارای پوشش گیاهی مختلف
فاطمه گرایلی مرادی، محمود محمدی شریف، علیرضا هادی زاده و ولی الله بابایی زاد ۴۱-۵۴
- بررسی ساختار جایگاه تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی
هاجر یحیائی پور، بهزاد قره یاضی، سیداحمد سادات نوری، علی ایزدی دربندی و قربانعلی نعمت زاده ۵۵-۶۶

با سپاس از داورانی که در این شماره ما را یاری کردند.

- ۱- دکتر علیرضا احمدی
- ۲- دکتر منصور امیدی
- ۳- دکتر علی ایزدی دربندی
- ۴- دکتر مقصود پژوهنده
- ۵- دکتر مسعود توحیدفر
- ۶- دکتر بهرام سامانفر
- ۷- دکتر علی اکبر شاهنجات بوشهری
- ۸- دکتر بدرالدین طباطبایی
- ۹- دکتر رضا طلایی حسنلویی
- ۱۰- دکتر بابک عبداللهی مندولکانی
- ۱۱- دکتر بهزاد قره‌یاضی
- ۱۲- دکتر رضا معالی امیری
- ۱۳- دکتر علی مومنی

راهنمای نگارش مقاله در مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

استفاده شود. در موارد خاص (مانند اسامی علمی گونه‌ها) از قلم کج (Italic) استفاده شود.

۳-۱- عنوان فارسی: عنوان فارسی مقاله باید حداکثر ۱۵ کلمه و منعکس کننده محتوای کامل مقاله باشد. قلم نگارش عنوان، B- تیر با اندازه ۱۴ است.

۳-۲- عنوان انگلیسی: عنوان انگلیسی مقاله باید ترجمه دقیق عنوان فارسی باشد که بلافاصله در زیر عنوان فارسی با قلم Times New Roman، اندازه ۱۲ و به صورت Bold آورده شود.

۳-۳- چکیده فارسی: در این بخش چکیده مقاله باید بیانگر مساله، هدف، روش، نتایج به دست آمده و نتیجه‌گیری کلی از پژوهش باشد و تا حد ممکن نباید از ۳۰۰ کلمه تجاوز کند. لازم است واژه‌های کلیدی (حداکثر ۵ واژه بر اساس حروف الفباء) مرتبط با موضوع پژوهش در پایان چکیده مقاله درج شود.

۳-۴- مقدمه: در این قسمت لازم است پس از معرفی موضوع پژوهش (تعریف مساله) به منابع و پژوهش‌های انجام شده قبلی (داخلی یا خارجی) اشاره شود و همچنین هدف از اجرای پژوهش در پایان مقدمه ذکر شود.

۳-۵- مواد و روش‌ها: در این بخش از مقاله مواد و وسایل به کار رفته، شیوه اجرای پژوهش، طرح آماری و روش‌های شناسایی و ارزیابی به‌طور کامل با ذکر منبع توضیح داده می‌شوند.

۳-۶- نتایج: نتایج حاصل از پژوهش به‌صورت متن، جدول و شکل قابل ارائه است. لازم است از تکرار و ارائه ارقام به شکل‌های چندگانه (جدول، نمودار و غیره) اجتناب شود. شکل‌ها در متن مقاله باید به‌صورت سیاه و سفید ارائه شوند. لازم به ذکر است که شکل‌ها به‌صورت جداگانه، با فرمت JPG و 300DPI در انتهای مقاله هر کدام در صفحه مجزا آورده شوند. ضمناً در تدوین جدول‌ها باید از رسم خطوط عمودی در داخل جدول پرهیز شود. هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوطه باشد. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول با استفاده از نماد ستاره (*) در بالا و سمت چپ جمله یا عدد مورد نظر و توضیح در پانوشته جدول در سمت راست با اندازه قلم ۱۰ مشخص می‌شود. عنوان و محتوای جدول‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی تهیه شود و اعداد داخل جدول نیز انگلیسی باشد. عنوان جدول با واژه "جدول"، شماره آن و خط تیره (به‌صورت ساده نه پررنگ) شروع می‌شود. شکل‌ها باید دارای وضوح و تمایز مطلوب باشند. عرض شکل‌ها نباید از ۷/۵ سانتی‌متر تجاوز کند. عناوین شکل‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی باید در پایین آن قرار گیرد و با کلمه "شکل"، شماره آن و خط تیره شروع می‌شود. روابط و معادلات

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی: نشریه‌ای علمی پژوهشی است که توسط انجمن ایمنی زیستی ایران منتشر می‌شود. هدف اصلی این مجله اطلاع‌رسانی و نشر دانش روز مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی و چاپ مقاله‌های پژوهشی (Research Paper)، تحلیلی (Review Paper) و کوتاه (Short Communication) تهیه شده در زمینه‌های مختلف مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. را که قبلاً چاپ نشده یا همزمان به مجلات دیگر فرستاده نشده باشند است. ایمنی زیستی به مجموعه‌ای از تدابیر، سیاست‌ها، مقررات و روش‌هایی اطلاق می‌شود که برای تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و پیشگیری از آثار سوء احتمالی کاربرد این فناوری بر تنوع زیستی، سلامت دام، گیاه و محیط زیست بکار گرفته می‌شود. همچنین نتایج پژوهش‌هایی که خلاصه آنها در سمینارها و کنفرانس‌های علمی ارائه شده باشند را با داوری علمی پذیرفته، چاپ و منتشر می‌کند. مسئولیت صحت و سقم محتوای علمی مقاله و ترتیب نام نویسنده (نویسندگان) بر عهده شخصی است که مقاله را به مجله ارسال می‌کند و کلیه مکاتبات با وی انجام می‌شود. دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری نیز برای ارسال مقاله باید موافقت کتبی استاد (استادان) راهنمای خود را کسب کرده باشند. رعایت موارد زیر در تهیه مقاله ضروری است.

الف- راهنمای تهیه مقاله تحقیقی

روش نگارش: مقالات باید روی کاغذ سفید و بدون آرم و در ابعاد ۲۹×۲۱ سانتیمتر (A4)، با حفظ ۲/۵ سانتی‌متر حاشیه از هر طرف و ۱/۵ سانتی‌متر فاصله بین سطرها، به صورت تایپ رایانه‌ای و به زبان فارسی تهیه و ارسال شود. محتوای مقاله نباید از ۱۵ صفحه تجاوز کند. لازم است مقاله‌ها با نرم‌افزار Word 2003، در محیط ویندوز XP و با قلم B-لوتوس با اندازه ۱۲ برای متن فارسی، با قلم Times New Roman با اندازه ۱۰ برای متن انگلیسی، به صورت معمولی تایپ شده و از طریق پست الکترونیک gebs.j.bs@gmail.com یا پایگاه الکترونیک مجله به آدرس www.gebsj.ir به دفتر مجله ارسال شود.

برگه مشخصات مقاله: این قسمت در دو صفحه مجزا (فارسی و انگلیسی) شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی و آدرس پستی و الکترونیکی نویسنده (نویسندگان) خواهد بود. اجزاء مقاله: قسمت‌های اصلی مقاله به ترتیب عبارتند از: عنوان، چکیده، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و چکیده به زبان انگلیسی نتایج و بحث ممکن است به‌صورت توأم یا جداگانه ارائه شود. برای قالب‌بندی تیترها از تیتربندی (Heading) استاندارد MS Word

importance. Plenum Press, New York, USA, 199-265.

Farshadfar E. 1998. Application of quantitative genetics in plant breeding. Razi University Press, Kermanshah, Iran. (In Farsi with English abstract).

Brown B, Aaron M. 2001. The politics of nature. In: Smith J (Ed.) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, 230-257.

کنفرانس

Vojdany P 1996. Importance of in-situ conservation of genetic resources. In: Proceedings of 4th Agronomy and plant breeding congress. Iran, Esfahan Industrial University, 554-573. (In Farsi with English abstract).

گزارش نهایی طرح پژوهشی

Pasban Eslam B 2004b. Evaluation of physiologic and agronomic characters of oilseed rape cultivars for late season drought resistance. Research final Report. Research, Education and Extension organization. Iran. 83.289:25-27. (In Farsi with English abstract).

منابع برخط (On-line)

FAO. 2009. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.

۱۰-۳- چکیده انگلیسی (Abstract): چکیده فارسی مقاله باید به طور کامل به انگلیسی ترجمه و با قلم Times New Roman اندازه ۱۲ و در پایان مقاله درج شود. در انتهای چکیده انگلیسی ترجمه واژه‌های کلیدی فارسی بر اساس حروف الفباء آورده شود. ضمناً نام نویسنده (نویسندگان) نوشته و آدرس آنان آورده شود.

ب- راهنمای تهیه مقاله مروری

فرستنده مقاله مروری باید نویسنده اول مقاله بوده و در زمینه موضوع مقاله در سطح کشور صاحب نظر باشد. نویسنده اول مقاله لازم است حداقل دو مورد از تحقیقات خود که به موضوع مقاله مربوط بوده، در مجله‌های معتبر علمی-پژوهشی چاپ شده و بیانگر پژوهش‌های نامبرده در پنج سال گذشته باشد، در منابع استفاده کرده باشد.

در مقاله مروری تمامی موارد ذکر شده برای مقاله پژوهشی به استثناء مواد و روش‌ها، نتایج و بحث باید رعایت شود.

ج- راهنمای تهیه مقاله کوتاه

مقاله کوتاه از نظر ارزش علمی و محتوی هم‌تراز مقاله کامل است و تنها از نظر مطالب ارائه شده، کوتاه‌تر است و بایستی حداکثر در ۴ صفحه و با رعایت تمامی موارد ذکر شده در مقاله پژوهشی و با حذف عنوان‌بندی داخل مقاله (حذف عنوان‌های مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث) تهیه شود.

در متن مقاله باید شماره‌گذاری شوند و ارجاع به جدول‌ها، شکل‌ها و روابط در متن با شماره مورد یاد شده داخل پرانتز صورت می‌گیرد.

۷-۳- بحث: در این قسمت نتایج حاصل از پژوهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و با توجه به هدف پژوهش بحث و نتیجه‌گیری به عمل می‌آید. مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج پژوهش‌های مشابه در منابع داخلی و خارجی در این بخش از مقاله ضروری است. در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را تماماً تحت عنوان نتایج و بحث ارائه کرد.

۸-۳- از نوشتن پاورقی اجتناب شود.

۹-۳- سپاسگزاری (اختیاری): در پایان بحث حداکثر در چهار سطر می‌توان از افراد و مراکزی که در راهنمایی و یا انجام پژوهش مساعدت کرده و یا در تامین بودجه، امکانات و لوازم پژوهش نقش موثری داشته‌اند تقدیر و سپاسگزاری کرد.

۱۰-۳- منابع: کلیه منابع مورد استفاده اعم از فارسی و انگلیسی در انتهای مقاله به زبان انگلیسی و به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده اول بدون ذکر شماره آورده شود. در انتهای منابع فارسی عبارت (In Farsi with English abstract) قید شود. در متن ارجاع به منابع باید تا حد ممکن از ذکر نام نویسنده (نویسندگان) در شروع جمله خودداری و منابع در انتهای جمله و در پرانتز ارائه شوند و برای جداسازی چند منبع از یکدیگر از نقطه ویرگول ";" استفاده شود. مانند

(Thion et al.1996; Dodd et al.2006)

منابع مورد اشاره باید چاپ شده یا با اجازه چاپ (پذیرش شده) باشند و پژوهش‌های چاپ نشده قابل ذکر در لیست منابع نخواهد بود. برای مثال به موارد ذیل اشاره می‌شود.

مقاله علمی پژوهشی

Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55:373-399.

Beck EH, Heim R, Hansen J. 2004. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. Journal of Biosciences 29:449-459.

Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanzpour SS. 2011. Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 2, 59-69. (In Farsi with English abstract).

کتاب

Ducke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic

د- دستور خط نگارش مقاله

از مؤلفان و مترجمان محترم مقاله‌ها درخواست می‌شود در نگارش مقاله‌های ارسالی نکات زیر را، که برگرفته از "دستور خط فرهنگستان زبان و ادب فارسی" است، رعایت کنند.

خواهشمند است از به کاربردن واژه‌های عربی خودداری نموده و بعد از معادل سازی آنها از عربی به فارسی (با توجه به دستور فرهنگستان زبان و ادب فارسی) در متن مقاله مورد استفاده قرار گیرد.

فاصله‌گذاری: میان واژه‌های هر جمله یا عبارت "فاصله یک حرفی" بین واژه‌های مستقل از هم باید رعایت شود (که نمونه‌های آن را در همین نوشته ملاحظه می‌فرمایید). اما در واژه‌های مرکب، باید فاصله "درون کلمه" یا "نیم فاصله" را رعایت کرد (مانند فاصله‌ها، یک‌روز، آن‌ها، خردورز و آلرژیا).

پس از پراتر باز "(" و پیش از پراتر بسته ")", قبل از نقطه، کوما و نقطه کوما نباید فاصله گذاشته شود.

املاي برخی واژه‌ها، پیشوندها و پسوندها

- "می" همیشه جدا از واژه، پس از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (مانند می‌رود، می‌گوید، می‌شود).

- "تر" و "ترین" همواره جدا از واژه، پیش از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (به استثنای بیشتر، کمتر، مهمتر و بهتر).

- نشانه جمع "ها" می‌تواند به صورت سرهم یا جدا نوشته شود. اما در مواردی که واژه قبل از "ها" به چند دندانۀ یا ط یا ظ یا ه ختم می‌شود همواره جدا از واژه پیش از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (مانند کوه‌ها، خیاط‌ها).

- برای کلمات مختوم به های غیرملفوظ، در حالت مضاف، از علامت "ء" (یای کوتاه) استفاده شود (مانند نامه‌ او، خواسته‌ تو، نوشته‌ ما).

- همزه‌گذاری در کلمات همزه‌دار رعایت شود (مانند تأیید، رئیس، مسئله، مؤسسه و جزء).

استفاده از واژگان و معادل‌های صحیح

نشریه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ایران عبارات، معادل‌ها و واژگان زیر را مورد استفاده قرار می‌دهد. از کلیه نگارندگان محترم خواهشمند است نسبت به تهیه مقاله با استفاده از واژگان و معادل‌های صحیح اقدام فرمایند.

مقالاتی که بر اساس راهنمای تهیه مقاله برای مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ایران تهیه نشده و با مندرجات این راهنما مطابقت نداشته باشند، مورد بررسی قرار نخواهند گرفت.

بنویسیم	ننویسیم
می‌باشد، می‌باشند	است، هستند
لذا	بنابراین
می‌گردد، می‌گردند	می‌شود، می‌شوند
گردید، گردد، گردیدند	شد، شود، شوند
می‌نماید، می‌نمایند	می‌کند، می‌کنند
تغییر ژنتیک یافته، تغییر یافته ژنتیکی	ترازیخته
ترانس ژنیک، ترازیخت	
دستکاری شده ژنتیکی	
Transgenic	
Transformation	ترازیزش، ترازیختی
Transgene	تراژن
To transform	برای ترازیختی
Probe، پروب	کاوشگر
Marker، مارکر	نشانگر
Primer، پرایمر، راه‌انداز	آغازگر
Terminator، ترمیناتور، پایان دهنده، خاتمه دهنده	پایانبر
فرار ژن	مهاجرت ژنی، انتقال ژن،
Promoter، پروموتور	پیشبر
پلی‌مورفیسم، چند شکلی	تفاوت

اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن منتون ردوکتاز و میزان منتول در گیاه دارویی نعنای فلفلی

The effect of manganese and salicylic acid on gene expression of Menthone reductase and menthol content in *Mentha piperita*

دیاکو رسولی^{۱*}، محمود سلوکی^۲، براتعلی فاخری^۲، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^۳
Diako Rasouli^{1*}, Mahmood Solouki², Barat Ali Fakheri², Sedigheh Esmaeilzadeh
Bahabadi

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه زابل

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل

1- M.S.c of Agriculture Biotechnology, Department of Plant Breeding and
Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

2- Associated Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty
of Agriculture, University of Zabol.

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences,
University of Zabol.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: diakorasouli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

به منظور بررسی اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن منتون ردوکتاز (MR) و میزان منتول در گیاه نعنای فلفلی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل زمان (۱، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار) و تیمار (منگنز با غلظت ۵۰۰ میکرومولار و اسید سالیسیلیک با غلظت یک میلی مولار) انتخاب شدند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد اثر منگنز و اسید سالیسیلیک در طول سه زمان تأثیر معنی داری بر بیان ژن MR و میزان منتول داشتند. کمترین میزان بیان ژن MR و میزان منتول تحت تأثیر منگنز در روز پنج بعد از اعمال تیمار بود که اختلاف معنی داری با شاهد داشت. بیشترین میزان بیان ژن MR و میزان منتول نیز تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد. نتایج اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک نشان داد که اسید سالیسیلیک تا حدودی باعث کاهش سمیت ناشی از منگنز هم در بیان ژن MR و هم در میزان منتول شد. نتایج کلی این آزمایش بیانگر آن بود که ارتباط مستقیمی بین ژن MR و میزان منتول در گیاه نعنای فلفلی وجود داشت، به طوری که با گذشت زمان با افزایش بیان ژن MR تحت تأثیر اسید سالیسیلیک میزان منتول نیز افزایش یافت در حالی که تحت تأثیر منگنز هم بیان ژن MR و هم میزان منتول کاهش نشان داد. از طرفی مشاهده شد که اسید سالیسیلیک به عنوان یک هورمون قوی عمل کرده و باعث تعدیل اثر منگنز در بیان ژن MR و میزان منتول در گیاه نعنای فلفلی شد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
منتول ردوکتاز
منتون
Mentha piperita

مقدمه

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. متعلق به خانواده Lamiaceae است. این گیاه گونه‌ای هیبرید است و از تلاقی بین گونه‌های *M. spicata* و *M. aquatica* حاصل شده است. بومی مناطق معتدله دنیا به ویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال آفریقا است، اما امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود (Singh et al., 2011). نعناع فلفلی محتوی ۱/۲ تا ۱/۵ درصد روغن‌های فرار است که ترکیب‌های اصلی آن را منتول، منتون متوفوران، متیل استات و غیره تشکیل می‌دهد. (Klayman, 1985).

منتول جزء اصلی اسانس نعناع فلفلی است و شناخته شده‌ترین مونوترپن است که هم به عنوان یک ترکیب خالص از مواد تشکیل دهنده و هم یک جزء از روغن‌های ضروری گیاهان گونه *Mentha* از خانواده Lamiaceae است (Bauer et al., 1997). منتول دارای خاصیت تسکین دهنده است و برای دردهای موضعی مفید و ضد عفونی کننده است (Macro and Barbera, 1990).

در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها موسوم به مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) منتول طی هشت مرحله تولید می‌شود که ابتدا ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل الیل دی فسفات (DMAPP) بوسیله آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS) به ژرانیل دی فسفات (GDP) تبدیل می‌شود و سپس بوسیله آنزیم لیمون سنتاز (LS) حلقوی شده و به لیمون تبدیل می‌شود، لیمون هم طی یک سری واکنش‌های اکسید و احیاء و ایزومریزاسیون به منتون تبدیل می‌شود. منتون هم تحت تأثیر آنزیم منتون ردوکتاز (MR) یا منتول دهیدروژناز که وابسته به NADPH است به منتول تبدیل می‌شود (Croteau et al., 2005). مسیر بیوسنتز اجزاء تشکیل دهنده اسانس در گیاه مورد پژوهش مسیری چند آنزیمی است که فعالیت هر یک از این آنزیم‌ها می‌تواند مقدار هر یک از مواد موجود در اسانس به خصوص ترکیبات اصلی را تحت تأثیر قرار

دهد. عوامل مؤثر بر کیفیت اسانس گیاهان نیز ممکن است با تأثیر بر آنزیم‌های ذکر شده وارد عمل شوند. Kjonaas و همکاران (1982) در پژوهشی به بررسی متابولیسم مونوترپن‌ها و تشکیل منتول و نئو منتول از منتون توسط آنزیم‌های دهیدروژناز در برگ نعناع فلفلی پرداختند و عنوان کردند که منتول اصلی‌ترین ترکیب اسانس نعناع فلفلی بوده که توسط آنزیم منتون ردوکتاز از منتون تولید می‌شود. چگونگی تنظیم روند انباشته شدن مونوترپن‌ها در برگ نعناع نیز از نظر فیزیولوژیک مشخص شده است (Gershenzon et al., 1989). از طرفی مشخصات ملکولی، توالی آمینو اسیدی و نقش آنزیم منتون ردوکتاز نعناع فلفلی در تشکیل منتول برگ مشخص شده است (Davis et al., 2005).

تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تحت کنترل عوامل ژنتیکی است از طرفی عوامل محیطی به ویژه شرایط تنش‌زا مانند فلزات سنگین نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به عهده دارند (Bupesh et al., 2007). منگنز یکی از عناصر ضروری و کم مصرف در تغذیه گیاهان محسوب شده که فراوانی آن در گیاه به صورت فلز سنگین عمل کرده و باعث ایجاد مسمومیت می‌شود (Haji boland and Khosropanah, 2005). از جمله مهمترین علائم مسمومیت منگنز در اندام هوایی توقف رشد، کلروز بین رگبرگی، کاهش کلروفیل و در نتیجه کاهش مواد مؤثره گیاه است (Blamey et al., 1999).

در پژوهش‌های صورت گرفته توسط Grattan و Grieve (1999) مشخص شد که تنش فلزات سنگین باعث برهم زدن تعادل تغذیه-ای و کاهش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود. آن‌ها بیان کردند با تکمیل عناصر مورد نیاز از طریق خاک یا محلول پاشی می‌توان وضعیت رشد و در نتیجه مواد مؤثره گیاه را تا حدی بهبود بخشید. امروزه با توجه به ملاحظات زیست محیطی استفاده از اسید سالیسیلیک برای بهبود خصوصیات کمی، کیفی و شیمیایی محصول‌های زراعی، دارویی و باغی رواج پیدا کرده

فلغلی در سه زمان مختلف بصورت یک، سه و پنج روز بعد از محلول‌پاشی با منگنز و اسید سالیسیلیک برداشت شد و تیمار نیز شامل منگنز به صورت سولفات منگنز ($MnSO_4$) در غلظت ۵۰۰ میکرومولار (hashemi et al., 2012) و اسید سالیسیلیک در غلظت یک میلی مولار (sayyari et al., 2009) بود. همچنین به منظور بررسی اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک ابتدا منگنز و به فاصله یک روز بعد، اسید سالیسیلیک اعمال و در سه زمان مختلف برداشت شد. آب مقطر نیز به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج متول

برای استخراج و اندازه‌گیری متول، بوته‌ها در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در سایه خشک شوند و سپس با استفاده از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری شدند. تعیین متول با استفاده از دستگاه GC/Mass انجام شد. از هر نمونه خشک شده ۱۰۰ گرم آسیاب شد و به مدت دو ساعت با استفاده از روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری (Gerhart) و درصد آن تعیین شد. ترکیب‌های تشکیل‌دهنده فرجه تجاری توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنج جرمی (GC/MS) (کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Agilent 7890 متصل شده با طیف سنج جرمی (Mass) مدل Agilent 5975) ستون HP-5MS و نیمه قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میکرون، دتکتور MS، گاز حامل هلیوم (He)، سرعت جریان گاز حامل یک میلی‌لیتر بر دقیقه، برنامه حرارتی ۶۰-۲۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد) در مؤسسه دانش پژوهان تهران تجزیه شد. پس از تزریق اسانس به دستگاه‌های نامبرده، با استفاده از زمان بازداری ترکیب‌ها (tR)، اندیس بازداری (RT) طیف جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه نسبت به شناسایی متول اقدام شد.

است. اسید سالیسیلیک به خاطر نقش‌های متنوع تنظیم‌کنندگی در سوخت‌وساز گیاه و القاء بیان ژن یک هورمون گیاهی قوی شناخته شده است که به‌عنوان یک مولکول سیگنالی نقش کلیدی مهمی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی، متابولیت‌های ثانویه و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارد (He et al., 2005). بنابراین در این تحقیق اثر منگنز به عنوان یک قلمز سنگین و اسید سالیسیلیک به عنوان یک القاء کننده گیاهی، بر بیان ژن متون ردوکتاز که در مسیر بیوستز متول دخالت دارد مورد پژوهش قرار گرفت. به‌طور کلی هدف از این تحقیق بررسی رابطه مقدار متول با بیان ژن متون ردوکتاز تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک است.

مواد و روش‌ها

کشت ریزوم

جهت بررسی اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن متون ردوکتاز و میزان متول در گیاه دارویی نعنای فلغلی آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در پاییز ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری (بیوستر) دانشگاه زابل انجام شد. ریزوم‌های نعنای فلغلی از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد. ریزوم‌های جوان در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۰×۲۵ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده زیست فناوری کشت شوند. کشت ریزوم‌ها در عمق یک سانتی‌متری از سطح خاک صورت گرفت. هر گلدان حاوی سه تا چهار ریزوم بوده و خاک گلدان‌ها نیز مخلوط مساوی از خاک برگ و خاک هوموس بود. گلدان‌ها در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. آبیاری بصورت روزانه طوری که خاک گلدان‌ها مرطوب باشد صورت گرفت. پس از دو تا سه ماه گیاه نعنای فلغلی آماده محلول‌پاشی و برداشت شد (soltani et al., 2008).

فاکتورهای آزمایش شامل زمان و تیمار بود که بخش هوایی نعنای

نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo, Wilmington, USA) به روش طیف سنجی انجام شد. پس از طیف سنجی به منظور همسان سازی غلظت cDNAهای تولید شده، رقیق سازی cDNAها با آب مقطر فاقد DNase به غلظت تقریبی ۳۰۰ ng/μl صورت گرفت و غلظت نهایی توسط نانودراپ تایید شد.

توالی ژن MR و ژن B-actin به عنوان ژن مرجع (Housekeeping gene) از NCBI دانلود شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن های MR و B-actin با استفاده از نرم افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotide Properties Calculator انجام گرفت.

درصد کمی این ترکیب نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرافها محاسبه شد (Ozturk et al., 2004).

مطالعه بیان ژن منتون ردوکتاز

استخراج RNA از برگ های نعنای فلفلی بر اساس دستورالعمل پیشنهادی از کیت CinnaPure RNA (شرکت سیناژن، ایران) صورت گرفت. کمیت RNA کل به وسیله اسپکتوفتومتر و کیفیت آن توسط الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. سنتز cDNA (دی.ان.ا. معکوس) با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit شرکت ویوانتیس انجام گرفت.

کمیت سنجی cDNAهای ساخته شده با استفاده از دستگاه

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن های منتون ردوکتاز و بتا اکتین

Table 1- Specific primers designed genes of mentone reductase and beta-actin

ژن	توالی آغازگرها	دمای اتصال	طول قطعه پی.سی.آر	کد دسترسی
Gene	Primer sequence	Annealing temperature	Length of PCR product	Accession number
منتون ردوکتاز	F: 5'CGGGTTTCGAGATATGCAGGCAG 3' (22mer) R: 5' GCAACAGCGCTAGCAGGGTCAG 3' (22mer)	58	204	AY288138.1
بتا اکتین	F: 5' GACCACCTCATGAAGATCTTAACC 3' (24mer) R: 5' ATTCTCGTAGTCCAAAGC3' (18mer)	58	138	AW255057.1
MR				
B-actin				

بسط ترکیبی بود. الگویابی منحنی ذوب از ۵۰ تا ۹۹ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام شد. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی وجود داشت که اغلب تفاوت آنها کمتر از ۰/۵ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real time PCR داده های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta Ct$ برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش ها با سه تکرار و سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه ای در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

تکثیر ژن های MR و B-actin به منظور اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس دستورالعمل پیشنهادی کیت HotTaq EvaGreen qPCR Mix (شرکت سیناژن، ایران) صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسینس در نتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-3000 Corbett Research) انجام شد.

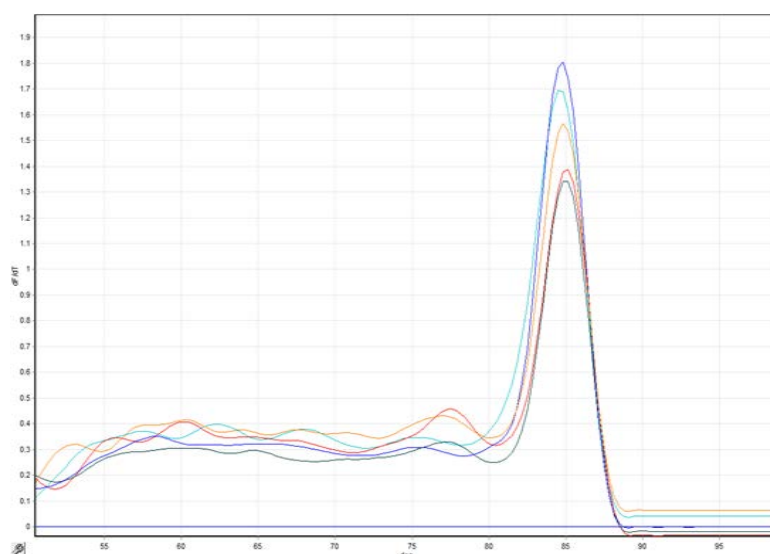
برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از Real time PCR یکسان و شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه جهت فعال سازی ابتدایی آنزیم طی ۴۰ دوره، سپس ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه به منظور واسرشت شدن، ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت

نتایج

نتایج تجزیه و تحلیل در Real Time PCR

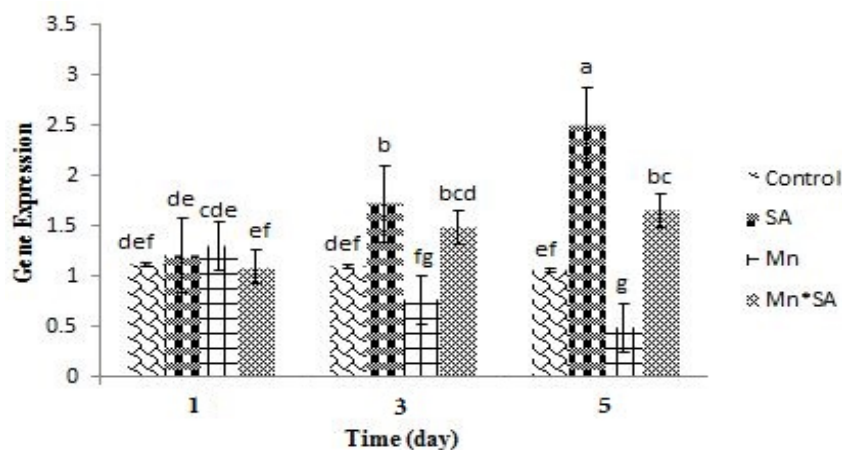
تغییرهای بیان ژن منتون ردوکتاز در سه زمان مختلف تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک اندازه‌گیری شد. منحنی تکثیر ژن‌های MR و B-actin با استفاده از Real Time PCR نشان دادند که تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچگونه آلودگی صورت گرفته است (شکل ۱).

اثر اسید سالیسیلیک و منگنز بر بیان ژن MR در طول سه زمان نشان داد بیشترین میزان بیان ژن تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در پنج روز بعد از اعمال تیمار بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. کمترین بیان ژن نیز تحت تأثیر منگنز در پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن MR نسبت به شاهد شد (شکل ۲).



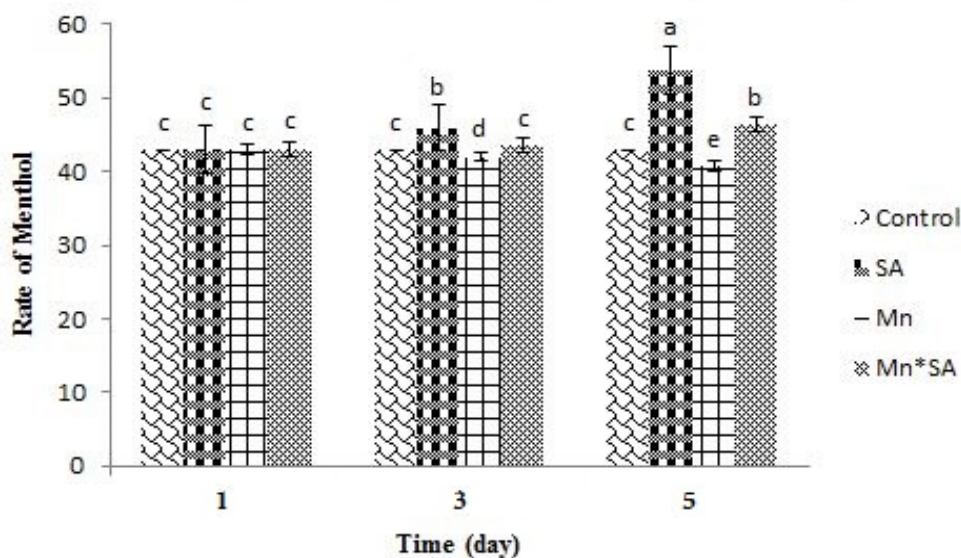
شکل ۱- منحنی ذوب ژن MR. هر Peak نمایانگر یک محصول PCR است که اختصاصی بودن محصول را نشان می‌دهد.

Figure 1- The melting curve of MR gene. Each Peak represents a PCR product that indicates specificity of the product.



شکل ۲- بیان ژن MR تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

Figure 2- Gene expression of menthone reductase under manganese and salicylic acid at different times. Similar letters are not significantly different at 5% probability.



شکل ۳- مقدار منتول تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

Figure 3- Rate of menthol under manganese and salicylic acid at different times. Similar letters are not significantly different at 5% probability.

بحث و نتیجه گیری

همان‌طور که در شکل دو مشاهده شد اسید سالیسیلیک به‌عنوان القاء‌کننده بیان ژن عمل کرده و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR در پنج روز بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد شد، درحالی‌که منگنز به عنوان فلز سنگین کاهش معنی‌دار بیان ژن MR در

همان‌طور که در شکل دو مشاهده شد اسید سالیسیلیک به‌عنوان القاء‌کننده بیان ژن عمل کرده و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR در پنج روز بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد شد، درحالی‌که منگنز به عنوان فلز سنگین کاهش معنی‌دار بیان ژن MR در

بیان ژن MR تأثیر مستقیمی در تولید منتول داشته است، مطابقت دارد. Zarinkamar و همکاران (2012) پژوهشی را با عنوان بیان ژن لیمون ستناز تحت غلظت‌های مختلف منگنز در گیاه زیره انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که منگنز در غلظت‌های پایین (۲۰ و ۴۰ ppm) باعث افزایش بیان ژن لیمون ستناز می‌شود درحالی‌که در غلظت بالا (۱۶۰ ppm) باعث کاهش معنی‌دار بیان آن ژن می‌شود. در این بررسی نیز با توجه به بالا بودن غلظت منگنز و در نتیجه سمی بودن آن به عنوان فلز سنگین، مشاهده شد که این عنصر باعث کاهش بیان ژن MR و در نتیجه میزان منتول گیاه نعنای فلفلی شد. در توجیه این نتیجه این‌گونه می‌توان بیان کرد که با توجه به این‌که منگنز (در غلظت‌های بسیار پایین) به عنوان یک ریزمغذی بر بیوسنتز لیمون که ابتدایی‌ترین مونوترپن حلقوی در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها بوده و نقش پیش‌ساز جهت تولید بخش عمده‌ای از ترکیب‌های ترپنی دارد، به اثبات رسیده است (Maruyama et al., 2001)، اما در این بررسی احتمالاً به دلیل غلظت بالای منگنز و در نتیجه سمی بودن آن به عنوان فلز سنگین در ترکیب بیوسنتزی مونوترپن‌ها و به طبع آن کاهش میزان منتول نقش عکس را بر بیوسنتز مونوترپن‌ها داشته و در نتیجه باعث کاهش بیان ژن MR و میزان منتول شده است.

همچنین بررسی نتایج بیان ژن MR در گیاه *M. Piperita* تحت تأثیر اسید سالیسیلیک نشان داد که این هورمون در پنج روز بعد از اعمال تیمار، نقش القاء‌کننده داشته و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR نسبت به شاهد شد. بیان ژن MR تحت تأثیر اسید سالیسیلیک به عنوان یک ماده علامت‌رسان کلیدی که در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاهان شرکت می‌کند، افزایش یافت (Durner et al., 1997). اسید سالیسیلیک در تنظیم و ایجاد علامت‌هایی برای تجلی ژن‌ها در زمان پیری در گیاه *Arabidopsis thaliana* (Morris et al., 2000) و همکاران (2001) در پژوهشی نشان دادند اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود. با توجه به نقش اسید سالیسیلیک در القاء بیان ژن در این تحقیق نیز

مشاهده شد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن MR شد. مقایسه بیان این ژن با میزان منتول نشان داد که با افزایش بیان این ژن تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در سه و پنج روز بعد از اعمال تیمار، میزان منتول هم افزایش یافت. در اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن MR در سه و پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که اسید سالیسیلیک تا حدودی از اثر منفی منگنز بر بیان ژن MR کاسته و باعث تعدیل سمیت ناشی از منگنز شد به‌طوری‌که در میزان منتول نیز این افزایش مشاهده شد که با پژوهش Hashemi و همکاران (2012) مطابقت دارد.

پژوهش‌ها نشان داده است که عوامل محیطی و استرس‌زا همواره ترکیب شیمیایی و اسانس گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Zheljzkov and Warman, 2003). در تحقیق حاضر هر چند منگنز باعث افزایش کلی اسانس شد اما این تنش باعث کاهش میزان منتول (بیشترین ترکیب اسانس نعنای فلفلی) اسانس شد که می‌توان دلیل آن را کاهش بیان ژن متون ردوکتاز تحت تأثیر غلظت بالای منگنز دانست. غلظت بالای منگنز ممکن است با کاهش محتوای کلروفیل و یا فتوسنتز همراه شده (Chatterjee et al., 2006) و بدین ترتیب از یک‌سو به کاهش رشد و از سوی دیگر به کاهش میزان فراهم شدن برخی پیش‌سازهای ترکیب‌های فنلی مورد نیاز مانند منتول برای سنتز اسانس‌ها، منتهی شود.

در این تحقیق مشخص شد بیان ژن MR تأثیر مستقیمی با تولید منتول در گیاه نعنای فلفلی دارد به‌طوری‌که با افزایش بیان ژن MR میزان منتول نیز افزایش یافت در حالی که با کاهش بیان این ژن درصد منتول نیز کاهش نشان داد. همچنین با توجه به این‌که تنش ناشی از فلزات سنگین به خصوص منگنز به‌عنوان یک عامل سمی و محدودکننده در بیان ژن و تولید اسانس است بنابراین مقابله با این تنش‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده که در این تحقیق با توجه به خواص القاء‌کنندگی و هورمونی اسید سالیسیلیک، نقش این ترکیب بر تعدیل تنش حاصل و همچنین افزایش بیان ژن و تولید منتول ضروری بوده و توانسته اثرات مخرب منگنز را مهار

افزایش تولید آن را از طریق افزایش بیان ژن متون ردوکتاز تحت تأثیر الیستورهای دیگر در پژوهش‌های آینده پیشنهاد نمود.

کند. بنابراین با در نظر گرفتن خواص دارویی متون و ارزش اقتصادی آن در صنایع داروسازی، بهداشتی و آرایشی می‌توان

منابع

- Bauer K, Garbe D and Surburg H. 1997.** Common fragrance and flavor materials. Wiley-VCH, New York, NY, pp 50-54.
- Blamey FPC, Joyce DC, Edwards DG and Asher CJ. 1999.** Role of trichomes in sunflower tolerance to manganese toxicity. *Journal of Plant and Soil Science* 91(2): 171-180.
- Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshumar A, Sureshkumar P and Murali K.S. 2007.** Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (Peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 89(1): 62-73.
- Chatterjee C, Gopal R and Dube BK. 2006.** Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Science Horticulturae* 108: 1-6.
- Croteau RB, Davis EM, Ringer KL and Wildung MR. 2005.** (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92(12): 562-577.
- Davis EM, Ringer KL, McConkey ME and Croteau R. 2005.** Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant physiology* 137(3): 873-881.
- Durner J, Shah J, Klessig DF. 1997.** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Science* 7: 266-274.
- Gershenzon J, Maffei M and Croteau K. 1989.** Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichome of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant physiology* 89: 1351-1357.
- Grattan SR and Grieve CM. 1999.** Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Science Horticulturae* 78: 127-157.
- Haji boland R and Khosropanah MK. 2005.** Manganese toxicity tolerance in plants, sunflower, rice and maize in hydroponic conditions. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 9(4): 91-108. [In Farsi with English abstract]
- Hashemi SH, Asrar Z and Pourseydi SH. 2012.** Effect of Pretreatment of seeds with salicylic acid on manganese toxicity in *Lepidium sativum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(2): 248-259. [In Farsi with English abstract]
- He Y, Liu Y, Cao W, Huai M, Xu B and Huang B. 2005.** Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Journal of Crop Science* 45(3): 988-995.
- Kjonaas R, Martinkus-Taylor C and Croteau R. 1982.** Metabolism of monoterpenes: Conversion of l-menthone to l-menthone and neomenthol by stereospecific dehydrogenases from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant physiology* 69: 1013- 1017.
- Klayman DL. 1985.** Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 228(4703): 1049-1055.
- Maruyama T, Ito M, Kiuchi F and Honda G. 2001.** Molecular cloning, functional expression and characterization of d- Limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24(4): 373-377.
- Macro J.A. and Barbera O. 1990.** Natural products from the genus *Artemisia* L. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 7: 201- 264.
- Morris K and Mackerness SAH. 2000.** Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23(5):677-685.
- Ozturk A, Unlukara A, Ipek A and Gurbuz B. 2004.** Effects of Salt Stress and Water Deficit on Plant Growth and Essential oil Content of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Pak. J. Bot* 36(4): 787-792.
- Sayyari M, Babalar M, Kalantari, S, Serrando M and Valero D. 2009.** Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology Technology*, 53: 152-154.
- Singh R, Shushni AM, Belkheir A. 2011.** Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry* 1: 1-5.
- Soltani F, Sharifi M, Khajeh K, Yousefzadi M. 2008.** Study of essential oil composition, menthone reductase activity and antimicrobial activity of *Mentha piperita* in two stages of growth. *Iranian Journal of Biology* 21 (5): 62-70. [In Farsi with English abstract]
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M. 2001.** Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European. Journal of Biochemistry* 268(14): 4086-4094.
- Zarinkamar F, Ghannadnia M, Haddad R. 2012.** Limonene synthase gene expression under different concentrations of manganese in *Cuminum cyminum* L. *African Journal of Plant Science* 6(6): 203-212.
- Zheljaskov VR, Warman PH. 2003.** Application of high Cu compost to Swiss chard and basil. *The Science of the Total Environment* 302(1): 13-26.

بهینه‌سازی بیان موقت ژن به واسطه آگروباکتریوم در بادام

Optimization of transient expression by Agrobacterium in almond

ندا میرآخورلی^{۱*}، افسانه حیدری ریحانی^۲، بهروز شیران^۳ و سعدالله هوشمند^۴
Neda Mirakhorli^{1*}, Afsane Heydari Reyhani², Behrooz Shiran³ and Sa'dollah
Hooshmand⁴

- ۱- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۳- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۴- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

- 1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 2- MS.c of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nedamirakhorli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

از آنجاکه انتقال دایم ژن و تولید گیاه تراریخته به‌ویژه در گیاهان چندساله مانند بادام لازمی صرف وقت و هزینه است، بهینه‌سازی عوامل مختلف اثر گذار در تراریزش گیاهان، مورد توجه قرار می‌گیرد. بیان موقت ژن با استفاده از آگروباکتریوم (آگرواینفیلتریشن) یک راهکار مفید برای بررسی عملکرد ژن در سیستم‌های بیانی متفاوت است. از آنجاکه بهینه‌کردن فاکتورهای مؤثر در روش‌های تراریزش لازمی برنامه‌های انتقال ژن است، این پژوهش با هدف توسعه یک سیستم کارآمد برای بیان موقت به‌واسطه آگروباکتریوم در برگ‌های بادام، جهت پیش‌بینی سریع عملکرد سیستم‌های تظاهر و پروتئین نو ترکیب در بادام انجام شد. ژن گزارشگر لیکیناز برای ارزیابی عواملی که سطح بیان موقت را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌کاربرده شد. مزیت اصلی استفاده از این ژن، سادگی کار، حساسیت بالا و ایمنی زیستی آن است. سه سیستم تظاهر مختلف حامل ژن لیکیناز، که تحت تأثیر عناصر تنظیمی متفاوت قرار داشتند به‌واسطه دو سویه آگروباکتریوم LBA4404 و GV3501 با استفاده از سرنگ بدون سوزن به برگ‌های رقم‌های مامایی و شاه‌رود ۱۲ بادام انتقال داده شد. بعد از سه روز میزان پروتئین فعال اندازه‌گیری شد. آزمون‌های آماری نشان داد که بیشترین میزان تولید پروتئین در برگ‌های رقم مامایی با استفاده از سیستم تظاهری که موجب تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود، با کاربرد سویه LBA4404 به‌دست می‌آید. از این‌رو سیستم تظاهر مربوطه و سویه باکتری LBA4404 و رقم مامایی بادام جهت دستیابی به بادام تراریخته پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آگرواینفیلتریشن
آگروباکتریوم
بادام
بیان موقت
سیستم تظاهر

مقدمه

گیاه بادام (*Prunus dulcis*) متعلق به تیره گلسرخیان و جنس *Prunus* و زیر جنس *amygdalus* در بیابان‌ها و شیب‌های مرکزی و جنوب غربی آسیا رشد می‌کند (Jalilimarandi, 2009). سالیان درازی است که درخت بادام به‌عنوان یک گیاه با ارزش در دنیا شناخته شده است. مهمترین عوامل محدود کننده‌ی رشد، که از اهداف اصلاحی این گیاه محسوب می‌شود عبارتند از: حساسیت به سرما در گل‌ها، توسعه زود هنگام میوه‌ها و خودباروری (Imani and MahammadKhani, 2011). بهبود ژنتیکی در گونه‌های درختی و درختان میوه به وسیله روش‌های اصلاح سنتی یک فرآیند سخت و وقت‌گیر است که در طی فرآیند تولید و زایش طولانی مدت این گیاهان حاصل می‌شود (Miguel and Olivera, 1997). با توجه به مشکلات روش‌های سنتی اصلاح نباتات، تولید گیاهان تراریخته مورد توجه قرار می‌گیرد و برای بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن، روش‌های بیان موقت پیشنهاد می‌شود. آزمون‌های موقت با استفاده از آلودگی با آگروباکتریوم، آگرواینفیلتریشن نام دارد. این روش یک روش بیان موقت است که به تازگی توسعه یافته و روشی ساده و سریع است و برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های بیگانه، واکنش‌های فوق حساسیت، خاموش‌سازی ژن، بررسی فعالیت پروموتور و شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری به کار می‌رود (Wu gong and Xue Bao, 2002). توسعه یک روش انتقال ژن کارآمد برای گونه‌ها به مقدار زیادی به بهینه‌کردن فاکتورهای مؤثر بر بیان ژن بستگی دارد (Canli and Tian, 2009) که با بیان موقت امکان بهینه‌سازی بعضی از عوامل مؤثر در انتقال دایم در مدت زمان کوتاه‌تری میسر می‌شود. از جمله این عوامل می‌توان به نوع پلاسמיד، سویه آگروباکتریوم، رقم گیاهی، مدت زمان تلقیح و فاکتورهای محیطی اشاره کرد (Urtibia et al., 2008; Tian et al., 2008, Song and Sink, 2005). بررسی و بهینه‌سازی این عوامل احتمال دارد باعث افزایش کارایی دستورالعمل‌های رایج در گونه‌های مورد علاقه شود (Gill et al., 2004). از آنجاکه یک ژن می‌تواند در سیستم‌های گوناگونی بیان شود، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین امری ضروری است. جهت توسعه سیستمی با کارایی بالا در بیان

پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته به عناصر تنظیم کننده بیان ژن نیاز است که علاوه بر کنترل رونویسی و ترجمه، جایگاه ساخت پروتئین نوترکیب در سلول نیز، کنترل شود (Mozafari et al., 2013). از این‌رو بهینه‌سازی سازه حامل ژن‌های هدف، به منظور افزایش سطح رونویسی و جمع‌آوری محصول انجام می‌شود (Sheludko, 2008). عامل مؤثر دیگر سویه باکتریایی است. از آنجاکه متغیرهای بسیاری باعث تفاوت در توانایی پیوند باکتری به سلول گیاهی می‌شوند یا بر سازوکار انتقال T-DNA اثر می‌گذارند، بعضی سویه‌های آگروباکتریوم نسبت به سایر سویه‌ها بیماری‌زایی بیشتری دارند که بسته به گونه گیاهی متفاوت هستند (Nam et; Yanofsky et al., 1985). از این‌رو کاربرد سویه‌های مختلف نتایج متفاوتی را در میزان بیان ایجاد خواهد کرد. بین ارقام گیاهی مورد استفاده نیز ممکن است به علت اختلاف در تلفیق پایدار تفاوت در میزان بیان مشاهده شود. از آنجاکه در روش بیان موقت دو موجود زنده شرکت دارند، کارایی تراریزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. به‌طوری که برخی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به سویه‌های خاص باکتری حساسیت کمتر یا بیشتری نشان می‌دهند (Sheludko, 2008).

در این پژوهش، به منظور دستیابی به شرایط بهینه‌ی انتقال موقت ژن در گیاه بادام و تولید پروتئین نوترکیب در برگ این گیاه، اثر عوامل مختلف بر میزان بیان ژن *licBM2* تحت سه سیستم تظاهر بررسی شد. ژن *licBM2* به‌عنوان نسل جدیدی از گزارشگرها مورد استفاده قرار گرفته است. این گزارشگر بر اساس آنزیم متحمل به حرارت لیکیناز (β -1,3-1,4-gluconase) باکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* به‌دست آمده است که پیوندهای مجاور β -۱,۳ و β -۱,۴ را در پلی‌گلوکان‌ها تجزیه می‌کند. در اثر تجزیه مواد پلی‌ساکاریدی مثل لیکینان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می‌شوند که میزان آن‌ها را می‌توان به‌طور کمی و کیفی به کمک مواد رنگی اندازه‌گیری و مشخص کرد (Komakhin et al., 2005). در این پژوهش ژن *licBM2* داخل ناقل pBISN1-IN (accession number EU886197) (Abdeev et al., 2008) که تحت کنترل عناصر تنظیم کننده مختلف قرار دارد، با استفاده از دو سویه GV3501 و LBA4404 آگروباکتریوم از طریق آگرواینفیلتریشن به برگ‌های دو رقم مامایی و شاهرود ۱۲

روز کلونی‌های نو ترکیب، از طریق واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ژن *LicBM2* مورد تأیید قرار گرفتند. اندازه باند مورد انتظار ۷۰۰ جفت باز بود (شکل ۲).

اگر واینفیلتریشن

در این روش سوسپانسیونی از آگروباکتریوم تهیه شد و از روزنه‌های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن، تنها با ایجاد فشار و انتشار سلول‌های آگروباکتریوم از طریق مایع میان بافتی به درون برگ تزریق شد (Wroblewski et al., 2005). جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، کشت شبانه آگروباکتریوم به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن (۵۰ میلی گرم در لیتر) و ریفامپیسین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) حاوی هر کدام از کانسترکت‌های ژن مورد نظر به صورت جداگانه، به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه انجام شد. فاکون‌های حاوی کشت شبانه پس از این مدت سانتریفیوژ شدند. رسوب آگروباکتریوم حاصل در محلول Infiltration medium (10 mM MES, 10 mM MgSO₄, pH 5.6) حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن و ریفامپیسین به مدت پنج-شش ساعت کشت مجدد شد. سپس در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در محلول Induction medium: (10.5 g/L K₂HPO₄, 4.5g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L NaCitrate, 1g/L glucose, 1 g/L fructose, 4 g/L glycerol, 10 mM MgSO₄, 10 mM MES pH) معادل ۵/۶ حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد تا زمانی که OD₆₀₀=0.4 به دست آمد (Lee M.W. and yang et al., 2006) و در نهایت به برگ سه هفته‌ای گیاه بادام درحالی که به گیاه مادری متصل بودند تزریق شد. بعد از سه روز که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، استخراج پروتئین از برگ انجام شد.

استخراج آر.ان.ا و تأیید رونویسی ژن

به منظور ارزیابی بیان ژن، آر.ان.ای برگ‌های تزریق شده رقم مامایی که با سویه LBA4404 تراریخته شده بودند استخراج شد و از نظر کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. هشت برگ برای هر کدام از سه ساختار پلاسمیدی به این منظور مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار

گیاه بادام انتقال یافت و میزان پروتئین فعال حاصل از بیان موقت ژن اندازه‌گیری و به عنوان معیار انتخاب بهترین تیمار برای دستیابی به بیشترین میزان بیان ژن در بادام تراریخته استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعدادی نهال بادام گونه *Prunus dulcis* (Mill) رقم شاه‌رود ۱۲ و مامایی که از ارقام متداول کشت در منطقه هستند و از نظر ژنتیکی به طور کامل یکسان، سالم و ثبت شده بودند، از مرکز تحقیقات شهرکرد در گلدان‌های ده کیلوگرمی حاوی نسبت مساوی خاک، کود، شن کشت و در گلخانه نگهداری شدند. به منظور تزریق از برگ‌های جوان در حدود سه هفته‌ای استفاده شد و برای هر تیمار (رقم گیاه، سویه باکتری، سیستم تظاهر) هفت تکرار در نظر گرفته شد.

ترکیبات پلاسمیدی

ژن *LicBM2* تحت سه سیستم تظاهر مختلف در پلاسمید *pBISN1-IN* (Abdeev et al., 2008) به بادام منتقل شد. وجود عناصر کنترل کننده مختلف تظاهر ژن در این سه سیستم باعث تجمع پروتئین در مناطق مختلف سلولی می‌شوند. اولین سیستم به دلیل داشتن توالی KDEL (Munro and Pelham, 1987) و توالی رهبر LeB4 (Baumlein et al., 1986) به دست آمده از گیاه لوبیا باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. در سیستم شماره دو به دلیل وجود توالی رهبری که از گیاه هویج گرفته شده است (Abdeev et al., 2003) پروتئین به آپوپلاست ترشح می‌شود و اما در سیستم سوم از هیچ توالی رهبری استفاده نشده، بنابراین پروتئین در ریتوزول باقی می‌ماند (شکل ۱).

باکتری‌های مورد استفاده

سویه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده جهت انتقال ژن هدف به برگ‌های بادام از طریق روش اگر واینفیلتریشن، سویه‌های LBA4404 (Hoekema et al., 1983) و GV3501 (Koncz and Schell, 1986) بودند.

سلول مستعد سویه‌های آگروباکتریوم به روش الکتروپوریشن بر اساس روش ویجیل و گلازبروک (۲۰۰۲) تهیه شد و با سه ساختار پلاسمیدی مختلف تراریخته شدند. پس از سه - چهار

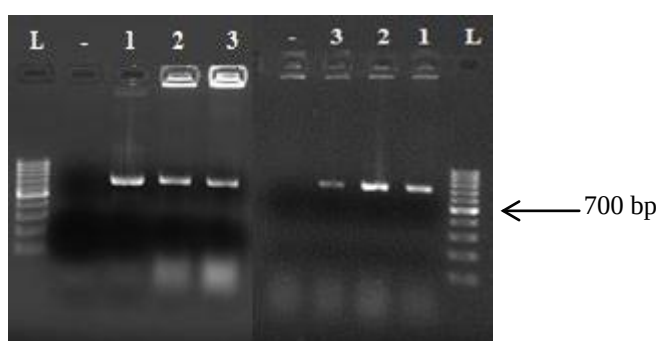
گرفتند، حدود ۲۰۰ میلی گرم بافت برگی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده و به پودر نرم و یکنواختی تبدیل شد. استخراج آران با روش روبیوپینا و زاپاتا پیرزا (۲۰۱۱) انجام شد (Rubio-Piña J.A and Zapata-Pérez O, 2011). سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت (Produced code: RTPL12) (vivantis) انجام گرفت. با توجه به این که سایز رشته اول cDNA ژن *LicBM2* برای تکثیر در واکنش پی.سی.آر بزرگ است، لازم بود تا برای قطعه‌ای کوچک از توالی ژن *LicBM2* طراحی آغازگر

انجام شود تا با تکثیر این قطعه در واکنش پی.سی.آر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده امکان تایید حضور ژن *LicBM2* فراهم شود. به منظور طراحی آغازگر از سایت Primer 3 با آدرس <http://primer3.wi.mit.edu> استفاده شد (جدول ۱). تأیید حضور قطعه ۱۴۶ جفت بازی با استفاده از RT-PCR و ۴۰ سیکل حرارتی ۹۴، ۵۷ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و از آغازگرهای ژن *LicBM2* برای تکثیر قطعه ۱۴۶ جفت بازی استفاده شد.

ساختمان پلاسمیدی ۱	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s	LeB4	<i>LicBM2</i>	KDEL	PA	RB
ساختمان پلاسمیدی ۲	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s	LS	<i>LicBM2</i>		PA	RB
ساختمان پلاسمیدی ۳	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s		<i>LicBM2</i>		PA	RB

شکل ۱- شکل شماتیک ناحیه T-DNA در سه ترکیب پلاسمیدی: P35 s پیشبر 35 s ویروس موزاییک گل کلم (CaMV35s)؛ LeB4: پپتید رهبر ژن لگومین B گیاه لوبیا که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود؛ KDEL: توالی هدایت‌گر پروتئین به شبکه آندوپلاسمی؛ LS: توالی کد کننده پپتید رهبر گیاه هویج که باعث ترشح پروتئین در منطقه آپوپلاستی می‌شود؛ PA: سیگنال پلی‌آدنیلایسون؛ Pnos: پیشبر ژن *nptII*؛ ژن مقاومت به کانامایسین؛ nos: پایانبر مربوط به ژن *nos*؛ ترکیب پلاسمیدی ۱: باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود؛ ترکیب پلاسمیدی ۲: باعث تجمع پروتئین در آپوپلاست می‌شود؛ ترکیب پلاسمیدی ۳: باعث تجمع پروتئین در سیتوپلاسم می‌شود (Mirakhorli et al, 2010).

Figure 1- schematic figure of T-DNA region in three plasmid construct; P35 s: The constitutive *Cauliflower Mosaic Virus* 35S promoter, LeB4: leader peptide from bean that caused protein accumulation in endoplasmic reticulum, KDEL: leader sequence that leads protein into endoplasmic reticulum, LS: leader peptide coding sequence from carrot that caused protein discharge into apoplastic region, PA: polyadenylation signal, Pnos: nos gene promoter, *nptII*: kanamycin resistance gene, nos: nos gene terminator; plasmid 1: construct causes accumulation protein in endoplasmic reticulum, plasmid 2: construct causes accumulation protein in apoplast, plasmid 3: construct causes accumulation protein in cytoplasm.



شکل ۲- تایید کلونی‌های نو ترکیب *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و GV3501 به روش PCR colony: سمت چپ: L: سایز نشانگر؛ ۱، ۲ و ۳ به ترتیب پلاسمید ۱، ۲ و ۳ انتقال داده شده به سویه LBA4404؛ -: کنترل منفی. سمت راست: L: سایز نشانگر؛ ۱، ۲ و ۳ به ترتیب پلاسمید ۱، ۲ و ۳ انتقال داده شده به سویه GV3501؛ -: کنترل منفی

Figure 2- PCR colony gel of recombinant *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and GV3501 strains; left side: L: size marker, 1, 2, And 3: LBA4404 strain transformed by plasmid 1, 2, And 3, -: negative control. Right side: L: size marker 1, 2, And 3: GV3501 strain transformed by plasmid 1, 2, And 3, -: negative control.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای قطعه ۱۴۶ جفت بازی از ژن *LicBM2*Table 2- designed Primers for the 146bp gene fragment of *LicBM2*

آغازگر برگشت	آغازگر رفت	اندازه محصول پی.سی.آر (جفت باز)
ACAGGACCTTCGGACAACAA	TCCTGGGAAGCATCGAATCC	۱۴۶ جفت باز

استخراج پروتئین

هرکدام از گلدان‌های حاوی برگ‌های تزریق شده، پس از سه روز به آزمایشگاه منتقل شدند، برگ‌های تزریق شده از گیاه جدا شدند و برای استخراج پروتئین با کمک ازت مایع در هاون چینی پودر شدند. ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج Tris-HCl ۱۵۰ میلی‌مولار با pH معادل هشت به صورت جداگانه در میکروتیوب‌های حاوی هرکدام از برگ‌های پودر شده ریخته شد و سپس ورتکس شد (میزان بافر استخراج ۱/۲ حجم هرکدام از برگ‌ها بود). نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ گرم در سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شد. محلول رویی رسوب که حاوی شیر گیاه است به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و در نهایت میکروتیوب‌های حاوی شیر گیاه به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (Fido et al., 2004).

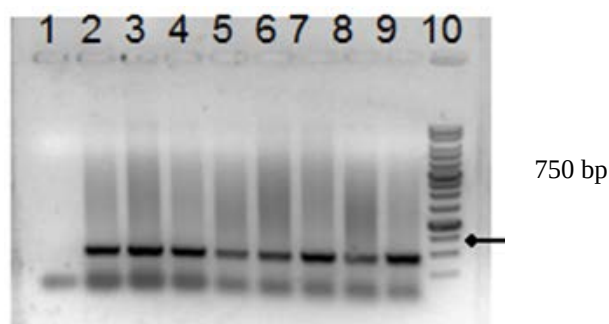
ارزیابی پروتئین

به منظور بررسی میزان دقیق تظاهر ژن *LicBM2* میزان پروتئین فعال به روش کاهش گلوکز (Miller, 1959) اندازه‌گیری شد. آنزیم لیکیناز محصول ژن *LicBM2* خاصیت آنزیمی دارد و

پلی‌ساکاریدهای حاوی پیوندهای ۱ و ۳، ۱ و ۴ بتا گلوکان‌ها را می‌شکند و قندهای احیاکننده آزاد می‌کند که میزان آن را با استفاده از مواد رنگی (دی.ان.اس) می‌توان اندازه گرفت و به این ترتیب می‌توان سطح بیان ژن را تخمین زد و مقدار پروتئین فعال را به دست آورد. در این پژوهش با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به دست آمده از برگ‌های تزریق شده، آزمون کاهش گلوکز انجام گرفت و از آنجاکه طی مراحل آزمایش اثر گلوکز خود گیاه در مقایسه با نمونه‌ی شاهد صفر شده بود، بنابراین گلوکز تولیدی در اثر فعالیت آنزیم لیکیناز (*licBM2*) به وجود آمده است.

نتایج و بحث

پس از انتقال پلاسמידها به آگروباکتریوم تأیید ترایخته بودن کلونی‌های ظاهر شده از طریق واکنش پی.سی.آر کلونی انجام گرفت. به نحوی که حضور باند ۷۰۰ جفت بازی ترایخته بودن کلونی‌ها را تأیید کرد (شکل دو). همچنین حضور ژن در گیاه نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۳).



شکل ۳- ژل پی.سی.آر ژنومی: تأیید حضور ژن *licBM2* در برگ‌های تزریق شده؛ ستون ۱: شاهد منفی، برگ تزریق نشده، ستون ۲-۸: ژنوم برگ تزریق شده، ستون ۹: آگروباکتریوم ترایخته شاهد مثبت، ستون ۱۰: نشانگر

Figure 3- Agarose gel electrophoresis of genomic DNA PCR reactions: 1: not transformed leaf as – control, 2-8: transformed leaves, 9: transformed *Agrobacterium* as + control, 10: DNA ladder.

تأیید رونویسی از ژن

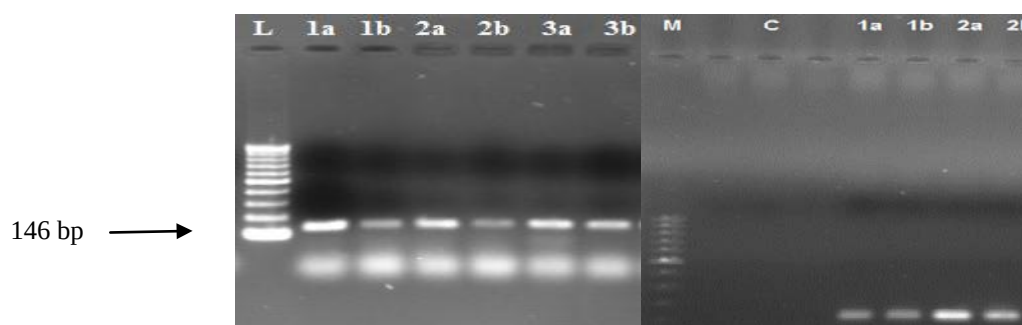
سنتز cDNA مربوط به آر.ان.ای‌های استخراج شده از نمونه برگ‌های بادام رقم مامایی پس از ۲۴ ساعت از زمان تزریق انجام شد و سپس به منظور تأیید رونویسی از ژن *LicBM2*، پی.سی.آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای قطعه‌ای ۱۴۶ بازی انجام شد. محصول پی.سی.آر بر روی ژل آگارز سه درصد بارگذاری شد. وجود باند ۱۴۶ جفت بازی در نمونه‌های برگ تأیید کننده رونویسی از ژن *LicBM2* بود (شکل ۴).

استخراج و ارزیابی پروتئین فعال

پس از استخراج پروتئین محلول نمونه‌ها (Fido et al., 2004)، پروتئین فعال در برگ‌های هر دو رقم گیاه که از انتقال سه ترکیب مختلف پلاسمیدی از طریق دو سویه LBA4404 و GV3501 به سلول‌های گیاه به دست آمده بود به صورت جداگانه مورد بررسی

قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با طرح فاکتوریل در قالب طرحی به طور کامل تصادفی با هفت تکرار برای هر تیمار با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس بین فاکتورهای مورد استفاده در این آزمایش در سطح یک درصد اختلاف معنی دار نشان داد. اما اثرهای متقابل فاکتورهای مورد استفاده معنی دار نشد. این امر نشان می‌دهد که هرکدام از فاکتورها به طور مستقل عمل کرده و بر سایر فاکتورها اثری ندارد.

آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را بین ترکیب پلاسمیدی یک با دو ترکیب پلاسمیدی دیگر نشان داد (نمودار ۱). این ترکیب پلاسمیدی موجب تجمع پروتئین نو ترکیب در شبکه آندوپلاسمی می‌شود.



شکل ۴- الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل ۳ درصد، M & L: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون (1a و 1b): نمونه برگ‌های تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۱؛ ستون (2a و 2b): نمونه برگ‌های تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۲. ستون (3a و 3b): نمونه برگ‌های تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۳. C: کنترل منفی.

Figure 4- Electrophoresis of RT-PCR products on 3% agarose gel, M&L: size marker, 1a, 1b: leaf sample transformed by plasmid1, 2a, 2b: leaf sample transformed by plasmid2, 3a, 3b: leaf sample transformed by plasmid3. C: negative control.

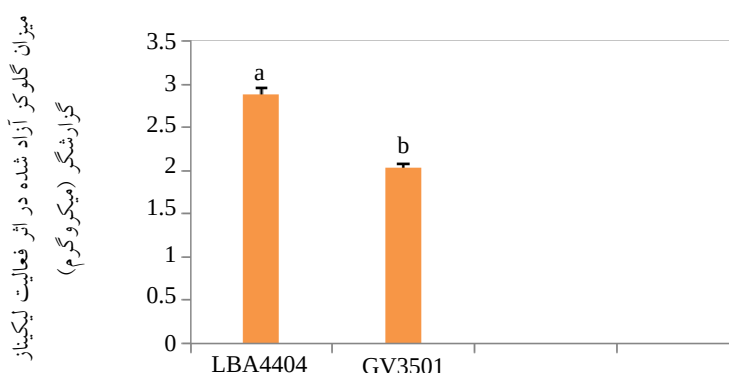
جدول ۲- تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم لیکیناز (میکروگرم در میکرولیتر)

Table 2- Variance analysis of enzyme activation (microgram per microliter)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
رقم	1	0.91**
پلاسمید	2	1.41**
سویه	1	1.50**
پلاسمید × رقم	2	0.28 ns
رقم × سویه	1	0.14 ns
پلاسمید × سویه	2	0.21ns
پلاسمید × رقم × سویه	2	0.09ns
خطا	72	0.11

۱. * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌دار

2. *and ** respectively Significant at the 5and1percent levels, and ns not statistically significant



نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم لیکیناز (میکروگرم) در برگ با استفاده از ترکیب‌های پلاسمیدی مختلف

Diagram 1- glucose level mean comparison (µg/µl) in leaves by different plasmids

این دو سیستم وجود نداشته است (Jha *et al.*, 2012) نیز در پژوهش خود تجمع بالایی از پروتئین نوترکیب بازدارنده آلفا- پروتئیناز را در استفاده از سیگنال پپتید شبکه آندوپلاسمی در مقایسه با سیگنال پپتیدهای آپوپلاست و واکوئل به دست آوردند و نتیجه گرفتند شبکه آندوپلاسمی مکان مناسب‌تری برای تولید پروتئین نوترکیب است.

عامل دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت سویه‌های باکتریایی بود. نتیجه‌های ارایه شده در نمودار دو نشان می‌دهد که میزان گلوکز آزاد شده در نتیجه استفاده از سویه LBA4404 بیشتر بوده است.

زمینه ژنتیکی سویه‌های آگروباکتریوم به طور قابل ملاحظه سطح بیان موقت را تحت اثر قرار می‌دهد (Gill *et al.*, 2004). سویه LBA4404 که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت یکی از سویه‌هایی است که به طور گسترده در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود و در گونه‌های *prunus* به طور موفقیت آمیز نتیجه داده است (Machado, 1992). (Bhatnagar *et al.*, 2004) نیز برای ارزیابی پارامترهای مؤثر بر کارایی بالای انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم در توت سیاه پس ارزیابی بیان موقت حاصل از به‌کارگیری سویه‌های A281، LBA4404 و GV2260 نتیجه گرفتند سویه LBA4404 نسبت به سایر سویه‌ها کارآمدتر بوده است.

سومین فاکتور مورد بررسی رقم بادام مورد استفاده بود. نتایج ارایه شده در نمودار سه بیانگر این است که بیان ژن در رقم مامایی

اگرچه از هدف‌گیری پروتئین بیشتر به عنوان تسهیل‌کننده تخلیص پروتئین‌های نوترکیب یاد می‌شود، اما روش هدف‌گیری پروتئین نوترکیب می‌تواند برای افزایش عملکرد پروتئین‌های نوترکیب هم استفاده شود. در این روش با ذخیره شدن پروتئین نوترکیب در اجزای سلولی فرآیندهای بسته‌بندی، سر هم شدن و تغییرهای پس از ترجمه آن‌ها هم تحت اثر قرار می‌گیرد که در نهایت همه این فاکتورها پایداری پروتئین و در نتیجه عملکرد را تحت اثر قرار می‌دهد (Jha *et al.*, 2012). در پژوهش ما نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان گلوکز آزاد شده که در واقع میزان بیان ژن گزارشگر را نشان می‌داد، نشان داد که سیستم بیانی که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود، بیشترین میزان گلوکز و در نتیجه بالاترین میزان بیان ژن گزارشگر را دارد که دلیل آن عدم وجود پروتئینازها در شبکه آندوپلاسمی است که باعث می‌شود پروتئین هضم نشود. به نظر می‌رسد که شبکه‌ی آندوپلاسمی با ایجاد یک محیط حفاظت‌کننده در مقابل اکسیداسیون و حضور چاپرون‌ها برای تا خوردگی صحیح پروتئین‌ها و دارا بودن فضای بزرگ برای تجمع پروتئین مکان مناسبی برای هدف‌گیری پروتئین‌های نوترکیب باشد (Jha *et al.*, 2012). بین سیستم تظاهری که باعث ترشح پروتئین به آپوپلاست شده است و سیستمی که باعث باقی ماندن پروتئین در سیتوزول شده است اختلاف معنی‌داری از نظر میزان گلوکز مشاهده‌نشده که دلیل این امر، مدت زمان کوتاه تظاهر ژن در این تکنیک (۷۲ ساعت) است. زیرا زمان کافی جهت مشخص شدن اختلاف بین

نسبت به رقم شاهرود ۱۲ بیشتر بوده است (نمودار ۳).

نوع رقم نیز به‌عنوان یک فاکتور مؤثر بر بیان موقت می‌تواند مورد ارزیابی قرارگیرد. از آنجاکه در آزمون‌های بیان موقت دو موجود زنده شرکت دارند، کارآیی تراریزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. به‌طوری‌که برخی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به سویه‌های خاص باکتری حساسیت کمتر یا بیشتری نشان می‌دهند. چنین اختلافی ممکن است به دلیل تفاوت در توانایی سویه‌های باکتری در آلوده کردن گیاه میزبان، تفاوت در ساختار ناقل T-DNA باکتریایی، عدم سازگاری بین گیاه و آگروباکتریوم که واکنش‌های فوق حساسیت را به‌دنبال دارد ایجاد شود (Nam et al., 1997). در پژوهش انجام‌شده رقم مامایی بادام نسبت به رقم شاهرود ۱۲ سطح بالاتری از بیان را نشان داد. در پژوهش (Yasmin and Debener, 2010) به منظور انتخاب ژنوتیپ برتر برای بیان ژن در گل با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن از کالتیوارهای هیبرید 91&100-5، هیبرید دیپلوئید 88&124-46، Heck enzauber, parisercharme و Marvel استفاده کردند. نتایج بیان موقت نشان داد گل‌های کالتیوار Marvel و parisercharme بیشترین میزان بیان را داشتند. با بررسی فاکتورهای مورد استفاده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت در صورت استفاده از ساختار پلاسمیدی شماره ۱ در ترکیب با سویه LBA4404 و رقم مامایی می‌توان سطح بالایی از بیان موقت را در مقایسه با سایر تیمارهای به‌کار برده شده در این پژوهش در بادام به‌دست آورد. در این بررسی ژن گزارشگر *LicBM2* مورد استفاده قرار گرفت. *LicBM2* می‌تواند به‌عنوان یک ژن گزارشگر با حساسیت بالا و

کار آسان برای انتخاب تراریخته‌ها و بررسی بیان ژن انتقال یافته مورد استفاده قرار گیرد (Salehijozani et al., 2007). مزیت این گزارشگر به دلیل ایمنی زیستی محصولات تراریخته است. زیرا با توجه به ملاحظات ابراز شده در مورد مقاومت به آنتی‌بیوتیک، پیشنهاد شده است که تاجایی که امکان دارد از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان نشانگر استفاده نشود و به جای آن از ژن‌های متابولیکی به‌عنوان نشانگر انتخاب‌گر لاین‌های تراریخته استفاده شود. ژن‌هایی که در فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارند تفاوت عمده‌ای با سیستم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند زیرا در این سیستم از پیش ماده‌هایی استفاده می‌شود که پس از ورود به سلول، به مولکول‌هایی تبدیل می‌شوند که باعث مزیت رشدی سلول‌های تراریخته می‌شوند. این روش چنان‌که به نظر می‌آید فراوانی تراریزش بیشتری داشته و به نظر می‌رسد که در بین گونه‌های گیاهی قابلیت استفاده گسترده‌ای داشته باشد (Salehijozani et al., 2010). نتایج نشان می‌دهد بیان موقت ژن نشانگر *LicBM2* در گیاه بادام با موفقیت انجام شد. بنابراین استفاده از ژن نشانگر *LicBM2* می‌تواند روش جدیدی برای بررسی میزان بیان ژن‌های نو ترکیب در گیاهان تراریخته‌ی بادام باشد. گیاهان تراریخته‌ای که جهت رفع مشکلات باغداری بادام از جمله حساسیت به سرما، بیماری‌ها و خودناباروری (Imani and MahammadKhani, 2011) می‌توانند تولید شوند و شناسایی سیستم تظاهر موفق در این گیاه می‌تواند هزینه و زمان مصرفی در جهت تولید بادام تراریخته را در این گیاه درختی کاهش بدهد. مزیت اصلی استفاده از ژن نشانگر *LicBM2* ایمنی زیستی، دقت و حساسیت بالا، سادگی کار و قابل اطمینان بودن آن است.

منابع

Abdeev RM, Goldenkova IV, Musiyshuk KA, Piruzian ES. 2003. Expression of a thermostable bacterial cellulase in transgenic tobacco plants. Russian Journal of Genetics 39:300-305.
Baumlein H, Wobus U, Pustell J, Kafatos FC. 1986. The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. Nucleic acids research 14:2707-2720.

Bhatnagar S, Khurana P. 2004. Evaluation of parameters for high efficiency gene transfer via *Agrobacterium tumefaciens* and production of transformants in Indian Mulberry, *Morusindica* ev.k2.plant biotechnology 21(1): 1-8.
Canli FA, Tian L. 2009. Assessment of regeneration and transient expression factors for agrobacterium-mediated transformation of *Prunu salicina* Lindl. European Journal Horticultural

Science 74 (2). S. 66–72.

Fido RJ, Mills ENC, Rigby NM, Shewry PR. 2004. Protein extraction from plant tissues. Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa 244:21-28.

Gill ISM, Singh Z, Agres V. 2004. Factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation in fruit and nut crops– An overview. Food Agriculture Environment Journal 2: 327–347.

Jalilimarandi M. 2009. Cultivation of temperate fruits. Entesharat jahad Daneshgahi, 2th.ED. Azarbayjangeharbi, Iran (In Farsi with English abstract).

JhaS, Agarwal S, Sanyala I, Jain GK, Amlaa DV. 2012. Differential subcellular targeting of recombinant human α_1 -proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants. Plant Science 196: 53–66.

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179–180.

Imani A, MahamadKhani Y. 2011. Characteristics of almond selections in relation to Late Frost Spring. International Journal of Nuts and Related Sciences 2(2): 77-80.

Komakhin RA, Abdeeva IA, Salehijozani GR, Goldenkova IV, Zhuchenko AA .2005. Thermostable lichenase as a translational reporter. Russian Journal of Genetics 41:23-31.

Koncz C, Schell J. 1986. The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Molecular Genetics and Genomics Journal 204: 383–396.

Lee MW, Yang Y. 2006. Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. Methods in Molecular Biology Clifton Then Totowa 323:225-229.

Machado M. 1992. The use of transgenic approach to improve resistance in perennial fruit crops. International Association of Peacekeeping Training Centres News letter 67:5–16.

Mannan A, Noor Seyyed T, Mirza B. 2009.

Factors Affecting *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L. Pak. J. Bot 41(6): 3239-3246.

Miguel CM, Olivera MM. 1997. Transgenic almond (*prunus dulcis* Mill). Plants obtained by agrobacterium-mediated transformation of leaf explants. Plant cell reports 18: 387-393.

Miller GL. 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31:420-428.

Mirakhorli N, Abdeeva I. 2010. New Expression system for transient assay of gene function in lettuce. 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Bologna, Italy, 24-27 April 2010, p.107.

Mozafari M, Mirakhorli N, Shiran B, Khoddambashi M. 2013. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating gene expression systems in common bean. Modern genetic. 8(3): 273-284 (In Farsi with English abstract).

Munro S, Pelham HRB. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48:899-907.

Nam J, Matthyse AG, Gelvin SB. 1997. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in TDNA integration. The Plant Cell Online 9:317-333.

Rubio-Piña J.A, Zapata-Pérez O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. Electronic Journal of Biotechnology 15:1-8.

Salehijozani GHR, Sefinezhad A, Goldenkova IV, Piruzian ES. 2007. Lichenase new reporter protein for studying modify and wild cry3a genes expression in and eukaryote prokaryote cells. Modern genetic 2(2) 17-27. (In farsi with English abstract).

Salehijozani GHR, Tohidfar M, Sadeghi A. 2010. Biosafety of genetically Modified Plants. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract).

Sheludko YV. 2008. Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. Recent Patents on Biotechnology 2:198-208.

Song GQ, Sink KC. 2005. Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for *agrobacterium tumefaciens* transformation of sour cherry (*prunus cerasus*) cultivar Montmorency. *Scientia horticulture* 106: 60-69.

Tian L, Canli FA, Meerja F, Sibbald S, LAC J. 2008. Improvement of European Plum (*Prunus domestica* L.) Genetic transformation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology. Biol.* doi: 10.1007/s11626-008-9108-y

Urtibia C, Devia J, Castro A, Zamora P, Aguirre C, Tapia E, Barba P, Dell'Orto P, Moynihan MR, Petri C, Scorza RR. Prieto H. 2008. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Prunus salicina*. *Plant Cell Reports* 27: 1333–1340.

Weigel D, Glazebrook J. 2002. Arabidopsis: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory

Pr.

Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R 2005. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato, and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 3:259–273.

Wu gong SH, XueBao CH 2002. Agroinfiltration, a useful technique in plant molecular biology research. *Institute of microbiology* 18 (4): 411-4.

Yanofsky M, Lowe B, Montoya A, Rubin R, Krul W, Gordon M, Nester E. 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics* 201:237–246.

Yasmin A, Debener T. 2010. Transient gene expression in rose petals via Agrobacterium infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102:245-250.

بیان متفاوت ژن *NPR1* و برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری زایی در

پاسخ به مصرف اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات در برنج

Different expression pattern of *NPR1* and some of pathogenesis related genes in response to salicylic acid and methyl jasmonate treatment in rice

ژاله حکمتی^۱، علی اعلمی^{۲*}، محمدمهدی سوهانی^۲، رضا شیرزادیان خرم‌آباد^۲ و سیده حمیده کاروانکش^۳

Zhale Hekmati¹, Ali Aalami^{2*}, Mohamad Mehdi Sohani², Reza Shirzadian Khorramabadi² and Seyede Hamide Karvankesh³

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانش آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

1- PhD Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

2- Assistant Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

3- Graduated M.S.c. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_aalami@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

مسیرهای انتقال پیام توسط اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات به صورت آنتاگونیست یا در بعضی موارد هم‌افزا عمل می‌کنند، تنظیم تداخل این دو مسیر سبب ایجاد مقاومت در گیاهان در مقابل حمله پاتوژن‌ها می‌شود. ژن تنظیمی *NPR1* نقش مؤثری را در تنظیم تداخل مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات به عهده دارد، فعال شدن *NPR1* وابسته به میزان این دو هورمون در گیاه است. بر این اساس در این پژوهش اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر الگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری زایی شامل *PR1*، دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) با استفاده از روش Real time PCR در دو رقم خزر و هاشمی در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد ژن‌های مورد بررسی با مصرف اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات در ژنوتیپ‌ها و زمان‌های مختلف، الگوی تظاهر متفاوتی داشتند که نشان دهنده وجود مسیرهای تنظیمی مرتبط بین این دو هورمون کلیدی در القای ژن‌های دفاعی است. بیان تمام ژن‌های مورد بررسی در رقم مقاوم خزر افزایش یافت درحالی‌که در رقم هاشمی الگوی بیان ژن *PR1* تغییری نشان نداد و بیان سایر ژن‌های مورد بررسی نیز از سطوح پایینی برخوردار بود. همچنین افزایش بیان ژن *NPR1* در پاسخ به تیمار با اسیدسالیسیلیک در زمان‌های زودتری نسبت به تیمار با متیل جاسمونات اتفاق افتاد. در کل اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات منجر به تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف شد، که احتمال دارد نتیجه آن در ژنوتیپ مقاوم، شکل‌گیری سیستم دفاعی مناسب در گیاه است.

واژه‌های کلیدی

اسید سالیسیلیک

آنتوگونیست

برنج

ژن‌های مرتبط با بیماری زایی

متیل جاسمونات

مقدمه

گیاهان در طول حیات خود مورد حمله تعداد زیادی از پاتوژن‌ها، علف‌خوارها و پارازیت‌ها قرار می‌گیرند که جهت مقابله با آن‌ها پاسخ‌های دفاعی متعددی را فعال می‌کنند (Koorneef and Pieterse, 2008). از این پاسخ‌های دفاعی می‌توان به مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic acquired resistance: SAR) اشاره کرد که سبب تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و واکنش فوق حساسیت در گیاه می‌شود که منجر به نکروزه شدن محل آلودگی شده و به این ترتیب از گسترش بیماری جلوگیری می‌کند، هورمون اسیدسالیسیلیک عامل کلیدی در شکل‌گیری این نوع مقاومت محسوب می‌شود (Durrant and Dong, 2004)، نوع دیگری از پاسخ‌های دفاعی مقاومت القایی سیستمیک (Induced systemic resistance: ISR) است که در نتیجه ایجاد زخم و آسیب به بافت‌های گیاه که به‌طور معمول توسط حشرات مکنده به‌وجود می‌آید، تولید می‌شود، هورمون‌های اتیلن و متیل جاسمونات در شکل‌گیری این نوع مقاومت مؤثر هستند (Kessler and Baldwin, 2002). بر طبق گزارش‌های متعدد نقش کلیدی هورمون‌های اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن در پاسخ‌های دفاعی و مقاومت در مقابل بیماری‌ها و آفات مشخص شده است (Von Dahl and Baldwin, 2007; Van Loon et al., 2006). به‌طور کلی می‌توان گفت پاتوژن‌های بیوتروف بیشتر نسبت به مقاومت القا شده توسط مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک حساس هستند و پاتوژن‌های نکروتروف و حشرات علف‌خوار توسط مقاومت القا شده به‌وسیله متیل جاسمونات و اتیلن سرکوب می‌شوند (Glazebrook, 2005)، البته استثنایی هم در این زمینه وجود دارد (Thaler et al., 2004).

پژوهش‌های بیان ژن نشان می‌دهد که بین مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن برهمکنش وجود دارد که این برهمکنش می‌تواند از نوع مثبت یا منفی باشد، به این معنی که این هورمون‌ها می‌توانند اثرهای یکدیگر را تقویت و یا تضعیف کنند (De Vos et al., 2005). یکی از مثال‌های شناخته شده، تداخل مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات است (Beckers and Spoel, 2006)، در پژوهشی که روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شد فعال شدن مسیر دفاعی اسید سالیسیلیک

از طریق آلودگی با پاتوژن بیوتروف *Pseudomonas syringae* منجر به حساسیت این گیاه به پاتوژن نکروتروف *Alternaria brassicicola* که توسط مسیر دفاعی متیل جاسمونات سرکوب می‌شود، شد (Spoel et al., 2007). با این‌که پژوهش‌های بسیاری اثر آنتاگونیستی و تضعیف‌کننده بین این دو هورمون را نشان می‌دهد، اثر هم‌افزایی و تقویت‌کننده نیز بین این دو هورمون مشاهده شده است (Van Wees et al., 2000; Mur et al., 2006). اسیدسالیسیلیک بیان ژن‌های دفاعی را از طریق پروتئین تنظیمی *NPR1* (Non-expressor of pathogenesis related genes 1) که یک ملکول کلیدی واسطه‌ای مقاومت اکتسابی سیستمیک در تک‌په‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها است، افزایش می‌دهد (Dong, 2004). میزان اسیدسالیسیلیک پس از آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد، که این امر منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه می‌شود که نتیجه آن انتقال *NPR1* از سیتوپلاسم به هسته است. *NPR1* در هسته به همراه فاکتورهای رونویسی سبب بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای مقاومت در گیاه می‌شود (Pieterse and Vanloon, 2004)، از جمله این ژن‌ها می‌توان به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins: PRPs) اشاره کرد، که بسیاری از آن‌ها دارای فعالیت‌های ضد میکروبی هستند (Van Loon et al., 2006). موتاسیون در ژن *NPR1* منجر به عدم تولید محصولات مسیر اسیدسالیسیلیک و در نتیجه حساسیت گیاه به پاتوژن‌های بیوتروف می‌شود (Dong, 2004). از طرف دیگر در پژوهشی که روی گیاه برنج انجام شد، مشاهده شد که افزایش بیان ژن *OsNPR1*، و فعال شدن *NPR1* در سیتوسول مانع ادامه مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات و بیان ژن‌های این مسیر می‌شود که این امر سبب حساسیت گیاه به حشرات علف‌خوار می‌شود (Yuan et al., 2007).

بر این اساس با توجه به نقش کلیدی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات در فرآیند دفاع گیاهی و رفتار متفاوت آن‌ها بر تظاهر ژن‌های درگیر، در پژوهش حاضر الگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و برخی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در نتیجه محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات در دو رقم بومی و اصلاح شده برنج مورد مقایسه

و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش ارقام هاشمی (رقم بومی و رایج منطقه) و خزر (رقم اصلاح شده) مورد بررسی قرار گرفت. براساس پژوهش‌های مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت (Momeni et al. 2006)، رقم خزر مقاوم به بیماری شایع بلاست و رقم هاشمی به این بیماری حساس است. قبل از کاشت، بذرها ضدعفونی شده و سپس در گلدان‌های حاوی خاک استریل کشت شدند.

تیمار گیاهان: برای اعمال تیمار از گیاهچه‌های برنج در مرحله سه‌برگی و قبل از ظهور برگ چهارم استفاده شد. برای این منظور از محلول اسیدسالیسیلیک (مرک-آلمان) با غلظت مؤثر دو میلی‌مولار و محلول متیل جاسمونات (دویچه‌فا-هلند) با غلظت مؤثر ۰/۱ میلی‌مولار به صورت محلول پاشی در شرایط کنترل شده دمایی 22 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی استفاده شد (Daw et al. 2008; Taheri and Tarighi, 2010). بدین صورت که ابتدا گیاهان کشت شده در گلدان به سه گروه مجزا با فاصله تقسیم و گروه اول با محلول اسیدسالیسیلیک و گروه دوم با محلول متیل جاسمونات و گروه سوم که نمونه‌های شاهد محسوب می‌شدند با آب مقطر محلول پاشی شدند. سپس

نمونه‌گیری در پنج مرحله زمانی شامل صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار (Daw et al. 2008) انجام شد. در هر نمونه‌گیری ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ‌ی جدا شده، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش Real Time PCR: جهت بررسی بیان ژن‌ها در دو نمونه تیمار و شاهد مربوط به دو رقم هاشمی و خزر، استخراج آر.ان.اِ. براساس دستورالعمل کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن) انجام شد. کیفیت و کمیت آر.ان.اِ. استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تأیید شد و پس از آن برای از بین بردن آلودگی‌های دی.ان.ای ژنومی، نمونه‌ها با DNase تیمار و سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت Fermentas K1621 انجام شد. پس از ساخت cDNA واکنش‌های کنترل مثبت و منفی به منظور بررسی صحت ساخت cDNA و عدم وجود آلودگی‌های ژنومی صورت گرفت و پس از تأیید cDNA ساخته شده، میزان بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای مقاومت شامل ژن تنظیم کننده مسیرهای پیام رسان، *NPR1*، سه پروتئین مهم مرتبط با بیماری‌زایی (PRP) از جمله *PR1*، دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) بررسی شد جهت نرمال‌سازی داده‌ها نیز از ژن 18S ریبوزومی به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Primers used in this study

ژن Gene	توالی آغازگر Sequence of primer (5'-3')	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	منبع References
18S rRNA	F: 5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3' R: 5'-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'	58	(Jain et al. 2006)
OsNPR1	F: 5'-TGGCAGGTGAGAGTCTACGA-3' R: 5'-AGGTGGATTTGCACCAGAAC-3'	57	(Sugano et al. 2010)
OsPR1	F: 5'-CGCTGTGTGTTTGTGTTATGTC-3' R: 5'-CGTGGTTTTGTCTTTATTTCAATCC-3'	58	(Mitsuhara et al. 2008)
PDF1.2	F: 5'-ATCACCCCTTATCTTCGCTGC-3' R: 5'-TGCTGGGAAGACATAGTTGC-3'	57	(Qu et al. 2010)
Thi2.1	F: 5'-GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC-3' R: 5'-GGTGACAGTCTCAGCTTCCT-3'	56	(Sadati et al. 2012)

درجه با توقف پنج ثانیه‌ای در هر مرحله برای تهیه منحنی ذوب نمونه‌ها در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از Real Time PCR براساس روش $\Delta\Delta Ct$ (Hunt, 2006) با داده‌های ژن مرجع نرمال شدند سپس این داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل اسپلایت در زمان در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی تجزیه شد که پلات اصلی ترکیب دو عامل ژنوتیپ (هاشمی و خزر) و اسپری پاشی (اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات) و پلات فرعی زمان‌های نمونه‌گیری بودند. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش توکی در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS نسخه نه صورت گرفت.

واکنش‌های Real Time PCR با استفاده از محلول SYBR Green ساخت شرکت Fermentas در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، ۶/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، دو میکرولیتر آغازگر پیشرو (۰/۳ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر آغازگر پسرو (۰/۳ میکرومولار) و ۲ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ نانوگرم)، انجام شد. چرخه دمایی و برنامه زنجیره‌ای پلیمریزاسیون شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه (پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی (ده ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه در دمای اتصال تعیین شده در جدول یک) و بسط آغازگر (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در پایان یک چرخه حرارتی از دمای ۶۰ الی ۹۵

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژنهای مورد مطالعه تحت تیمار متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در دو رقم برنج خزر و هاشمی

Table 2- Analysis of variance for expression of the studied genes under methyl jasmonate and salicylic acid treatments in two rice cultivars of Khazar and Hashemi

منبع تغییرات Source of variation	میانگین مربعات MS			
	<i>NPR1</i>	<i>PR1</i>	<i>PDF1.2</i>	<i>Thi2.1</i>
ژنوتیپ Genotype	2795.06 **	10465.22500**	19758.02500**	78411.02500**
محلول پاشی Spraying	13.94*	0.62500 ^{n.s}	1946.02500**	1525.22500**
محلول پاشی در ژنوتیپ Spraying*Genotype	2235.02500**	0.62500 ^{n.s}	950.62500**	1221.02500**
خطای اول Error 1	5.82500	5.82500	3.55833	9.62500
زمان Time	6768.53750**	2539.68750**	3367.46250**	9456.16250**
زمان در ژنوتیپ Time*Genotype	1860.91250**	1920.78750**	3170.46250**	5658.83750**
زمان در محلول پاشی Time*Spraying	5264.91250**	1297.81250**	3923.21250**	8253.91250**
زمان در ژنوتیپ در محلول پاشی Time*Genotype*Spraying	6887.08750**	1288.81250**	3504.56250**	10380.08750**
زمان در تکرار Time*Replication	16.28750 ^{n.s}	17.91250 ^{n.s}	21.68750 ^{n.s}	35.08750**
خطای ۲ Error 2	10.3875	6.92917	5.37083	5.7708

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

نتایج و بحث

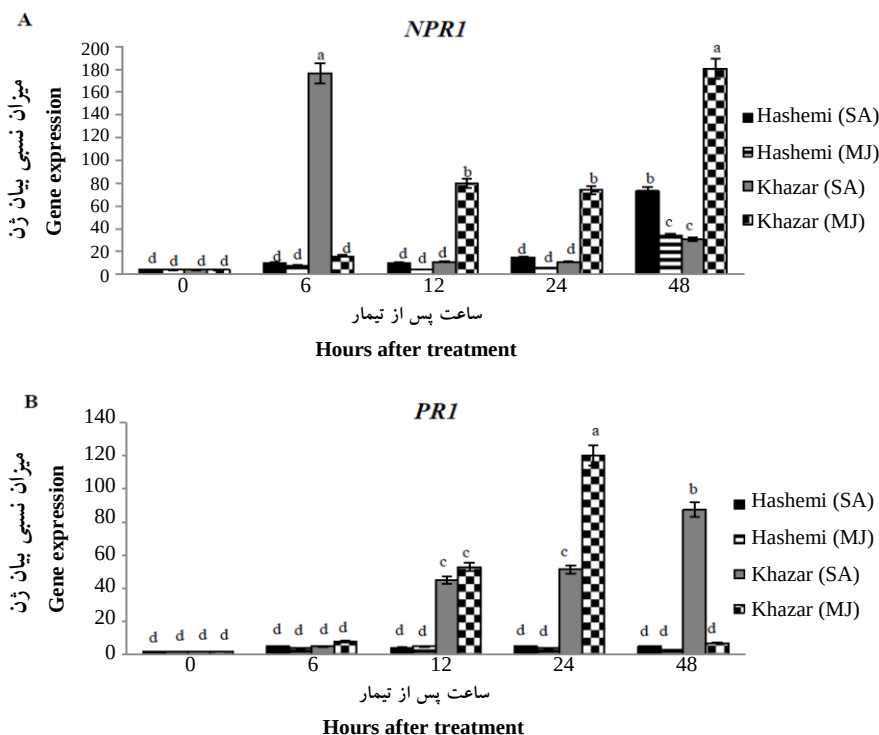
نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌های مورد پژوهش براساس داده‌های Real Time PCR نشان داد (جدول ۲)، اثر متقابل ژنوتیپ با محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات در زمان‌های مورد بررسی برای چهار ژن یاد شده دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است که این نشان دهنده وجود برهمکنش و رفتار متفاوت ژنوتیپ‌ها در پاسخ به مصرف اسیدسالیسیلیک و یا متیل جاسمونات در زمان‌های فوق است. بر این اساس جهت ارزیابی دقیق‌تر اثر (هم‌افزایی یا آنتاگونیست) این دو ترکیب در القای ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، بیان هر ژن در دو ژنوتیپ و در زمان‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند.

بررسی اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر الگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و *PR1*: نتایج حاصل از داده‌های Real Time PCR نشان دهنده تفاوت معنی‌دار الگوی بیان ژن *OsNPR1* در رقم خزر و هاشمی در زمان‌های مختلف است، به نحوی که بیشترین میزان بیان این ژن در رقم خزر در زمان شش ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک اتفاق افتاد در حالی که در رقم هاشمی میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۱A)، از آنجا که *NPR1* پروتئین تنظیمی مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک با واسطه اسیدسالیسیلیک محسوب می‌شود افزایش بیان این ژن پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک قابل انتظار است، مقاومت ذاتی رقم خزر و به احتمال زیاد دارا بودن مقادیر بیشتری از اسیدسالیسیلیک درونی (Silverman et al., 1995) باعث می‌شود که افزایش بیان این ژن در رقم خزر در زمان زودتری نسبت به هاشمی اتفاق بیافتد.

نتایج حاصل از تیمار با متیل جاسمونات متفاوت بود به طوری که افزایش بیان ژن *OsNPR1* در رقم خزر از شش ساعت پس از تیمار آغاز شد و ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید، در رقم هاشمی نیز بیشترین میزان بیان این ژن ۴۸ ساعت پس از تیمار مشاهده شد (شکل ۱A). گزارش‌ها نشان می‌دهد که تیمار گیاه برنج با متیل جاسمونات سبب افزایش بیان ژن (Phenyl alanine ammonia lyase) *PAL* و نیز افزایش فعالیت آنزیم *PAL* می‌شود (Bi et al. 2007). این آنزیم، آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانویید

است که مسیر اصلی سنتز اسیدسالیسیلیک محسوب می‌شود البته سایر ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدها نیز در این مسیر ساخته می‌شوند (Hayat et al. 2010). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هورمون متیل جاسمونات با القا بیان ژن *PAL* و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز سبب تولید اسیدسالیسیلیک شده و به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان ژن *NPR1* به تدریج و در ۴۸ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات به حداکثر می‌رسد، به این ترتیب همکاری مثبت و اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات با اسیدسالیسیلیک در جهت فعال کردن مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک مشاهده می‌شود. در گزارش‌های قبلی نیز تیمار گیاه برنج با اسیدسالیسیلیک یا بنزوئیدایازول (آنالوگ اسیدسالیسیلیک) سبب افزایش بیان ژن *OsNPR1* و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن شد (Sugano et al. 2010)، در پژوهش دیگری که در گیاه برنج انجام گرفت مشخص شد بیان ژن *OsNPR1* در موتانت‌های *cea62* که مقادیر بالایی اسیدجاسمونیک تولید می‌کنند نسبت به نوع وحشی افزایش چشم‌گیری داشت (Liu et al. 2012).

تجمع اسیدسالیسیلیک سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه شکستن پل‌های دی‌سولفیدی در فرم الیگومری *NPR1* و تبدیل شدن آن به فرم مونومری و فعال شدن *NPR1* در سیتوسول می‌شود (Pieterse and Van Loon, 2004)، *NPR1* در سیتوسول از طریق تداخل در کمپلکس یوبی کوئیتین لیگاز (SKP1, SCFCOI1 (CDC53p/CUL1 F-boxCOI1، سبب ممانعت از ادامه مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات و بیان ژن‌های مرتبط با آن می‌شود، این کمپلکس نقش کلیدی در انتقال پیام توسط متیل جاسمونات دارد (Xu et al. 2002). به این ترتیب اسیدسالیسیلیک از طریق *NPR1* سیتوپلاسمی، اثر آنتاگونیستی خود را بر مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات اعمال می‌کند (Spoel et al. 2003). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که *OsNPR1* در حالت مونومری و فعال، فقط در سیتوپلاسم اثر ممانعت کننده بر مسیر متیل جاسمونات دارد، این پروتئین پس از فعال شدن جهت القا مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک به هسته منتقل شده و به همراه فاکتورهای رونویسی TGA سبب بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شود، بنابراین در هسته تهدیدی برای مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات محسوب نمی‌شود (Yuan et al. 2007).



شکل ۱- اثر اسیدسالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MJ) بر الگوی بیان ژن‌های *NPR1* و *PR1* در ارقام برنج (حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 1- Effect of salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) on the expression of the genes *NPR1* and *PR1* in rice cultivars (Common letters are not significantly different at probability level of 5%)

متیل جاسمونات در رقم خزر با یکدیگر هم‌نویی دارند. در مقابل الگوی بیان این ژن در رقم حساس هاشمی در زمان‌های مختلف پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این موضوع تأیید کننده این واقعیت است که الگوی بیان این ژن‌ها تا حد زیادی به ماهیت ژنتیک گیاه میزبان وابسته است (شکل ۱B). *PR1* بلافاصله بعد از حمله پاتوژن، افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک و فعال شدن *NPR1* و ورود آن به هسته بیان می‌شود و به‌عنوان نشانگری برای مقاومت اکتسابی سیستمیک شناخته شده است (Van Loon and Van Strien, 1999). در گزارشی تیمار گیاه برنج با اسیدسالیسیلیک سبب افزایش بیان *OsPR1* شد، از طرف دیگر کاربرد اسیدجاسمونیک و اسیدآبسیزیک روی گیاهان تیمار شده با اسیدسالیسیلیک به‌طور مؤثری سبب کاهش بیان این ژن شد، اما کاربرد اسیدجاسمونیک و اسیدآبسیزیک هرکدام به تنهایی سبب افزایش بیان ژن *PR1* شد این نتایج اثرهای آنتاگونیستی بین مسیرهای سیگنالینگ اسیدسالیسیلیک و اسیدجاسمونیک را نشان

همانطور که در شکل ۱A مشاهده می‌شود در ساعت‌های اولیه، اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونیت رفتار متضادی (آنتاگونیستی) در الگوی بیان این ژن ایجاد نکردند به‌نحوی که، در ساعاتی که برای یک ترکیب افزایش بیان وجود دارد در همان زمان برای ترکیب دیگر بیان معنی‌داری مشاهده نمی‌شود اما به تدریج با گذشت زمان (ساعت ۴۸) الگوی بیان به سمت هم‌افزایی تمایل یافته است که این موضوع ممکن است به دلیل انتقال این پروتئین به هسته و کاهش فراوانی آن در سیتوپلاسم باشد.

در این پژوهش بررسی بیان ژن *PR1* پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که بیان این ژن در رقم مقاوم خزر از زمان شش تا ۴۸ ساعت پس از تیمار به تدریج افزایش یافت به طوری که در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید، نتایج حاصل از تیمار با متیل جاسمونات نیز نشان داد که بیان این ژن در رقم مقاوم خزر روند صعودی را طی کرد ولی در ۲۴ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید و سپس کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد مسیر بیان این ژن از طریق اسیدسالیسیلیک و

داد (Agrawal et al, 2001). در پژوهشی دیگر که روی گیاه برنج انجام شد بیان ژن *OsPR1* پس از تیمار گیاه با سالیسیلیک اسید یا متیل جاسمونات افزایش یافت (Mitsuahara et al, 2008). از آنجاکه تیمار با اسیدسالیسیلیک سبب افزایش بیان *NPR1* و فعال شدن آن شده و این پروتئین تنظیمی به همراه فاکتور رونویسی TGA سبب رونویسی ژن *OsPR1* می‌شود، روند صعودی بیان ژن *OsPR1* پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک قابل انتظار است. پژوهش‌های انجام شده، افزایش بیان این ژن را پس از تیمار گیاه برنج با متیل جاسمونات نشان می‌دهد (Agrawal et al, 2008 Mitsuahara et al, 2001)، در این پژوهش نیز بیان ژن *PR1* تا ۲۴ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات افزایش یافت اما پس از آن، از آنجاکه میزان اسیدسالیسیلیک افزایش یافته است (به دلیل اثر هم‌افزایی و همکاری مثبت متیل جاسمونات با اسیدسالیسیلیک که سبب افزایش بیان ژن *PAL* و در نتیجه افزایش سنتز اسیدسالیسیلیک می‌شود)، اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک بر متیل جاسمونات اعمال شده و مانع ادامه مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات و بیان ژن‌های این مسیر می‌شود، به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان ژن *OsPR1* در ۴۸ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات در رقم خزر کاهش می‌یابد.

بررسی اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر الگوی بیان ژن‌های دیفنسین و تیونین: در این پژوهش بررسی بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* که به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شماره ۱۲ (*OsPR12*) منسوب است، نشان داد بیان این ژن در رقم مقاوم خزر شش ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک افزایش یافت و پس از ۱۲ ساعت به حداکثر خود رسید و پس از آن کاهش یافت (شکل ۲۸).

گزارش‌های حاصل از بررسی مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات نشان می‌دهد که ژن‌های *COI1* (Coronatine insensitive1) *MPK4* (Mitogen-activated protein kinase4) و *SSI2* (Suppressor of SA insensitivity2) نقش کلیدی در این مسیر دارند، این ژن‌ها در پایین دست متیل جاسمونات قرار گرفته‌اند و پس از افزایش متیل جاسمونات بیان شده و سبب بیان ژن‌های دیفنسین و تیونین می‌شوند. موتاسیون در این ژن‌ها، مانع

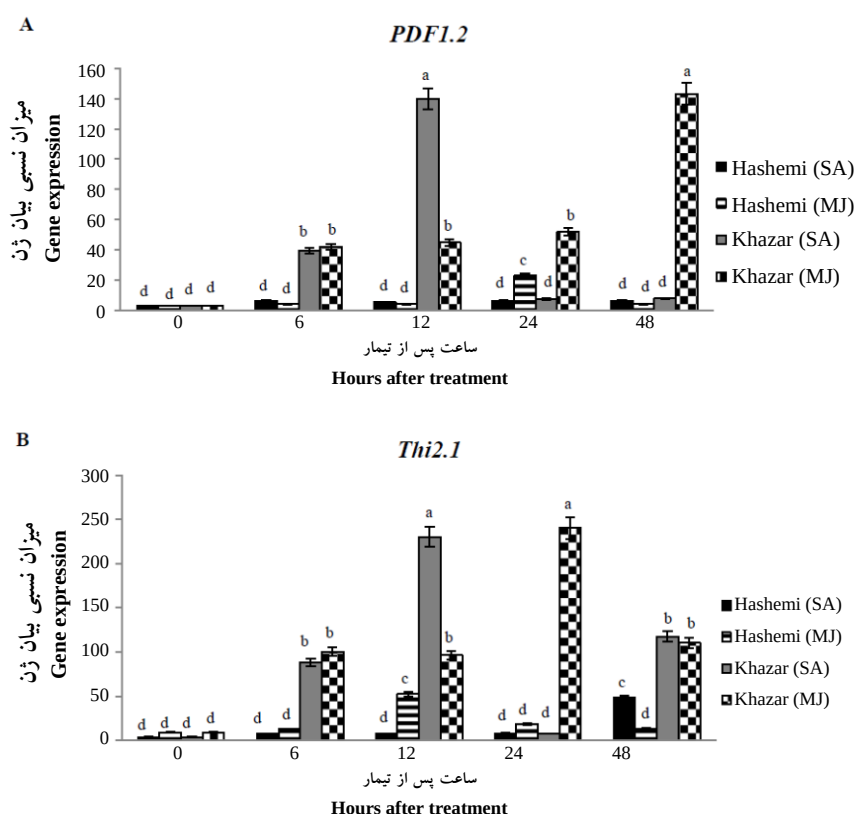
ادامه مسیر انتقال پیام متیل جاسمونات و بیان ژن‌های دفاعی این مسیر و در عوض فعال شدن مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک می‌شود، به عبارتی دیگر این ژن‌ها تنظیم کننده منفی برای اسیدسالیسیلیک محسوب شده و مانع مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک می‌شوند و از این طریق اثر آنتاگونیستی متیل جاسمونات را روی اسیدسالیسیلیک اعمال می‌کنند (Kunkel and Brook, 2002). رقم خزر به دلیل مقاومت ذاتی دارای مقادیر بالایی از متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک است، در ابتدا همکاری مثبت این دو سبب افزایش بیان دیفنسین می‌شود ولی به دلیل تیمار اسیدسالیسیلیک میزان بیان *NPR1* افزایش یافته و پس از مدتی (۲۴ ساعت پس از تیمار) فرم فعال آن در سیتوسول تجمع پیدا می‌کند و از طریق اختلال در عمل کمپلکس یوبی کوئیتین لیگاز SCF^{COI1} مانع ادامه مسیر توسط *COI1* و بیان ژن دیفنسین می‌شود و به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان این ژن در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار کاهش یافته است.

نتایج حاصل از تیمار با متیل جاسمونات روند صعودی بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* را در رقم مقاوم خزر نشان داد به طوری که ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید در رقم محلی حساس هاشمی تفاوت معنی‌داری در الگوی بیان این ژن پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات مشاهده نشد (شکل ۲۸). از آنجاکه متیل جاسمونات از طریق القا ژن‌های *COI1*، *MPK4* و *SSI2* سبب بیان ژن دیفنسین می‌شود، روند صعودی بیان این ژن پس از تیمار با متیل جاسمونات امری قابل انتظار است. از طرفی به دلیل این که گیاه را با متیل جاسمونات تیمار کرده‌ایم، اثر ممانعت کننده ژن‌های فوق بر اسیدسالیسیلیک مانع از شکل‌گیری *NPR1* و اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک بر متیل جاسمونات می‌شود در نتیجه بیان ژن دیفنسین تا ۴۸ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات به تدریج افزایش می‌یابد. دیفنسین با تحریک پاتوژن‌ها در گیاه تولید شده (Zimmerli et al, 2004) و میزان بیان آن با اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن تنظیم می‌شود، بیان ژن دیفنسین در گیاه آراییدوپسیس پس از افزایش غلظت داخلی اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن که در نتیجه حمله پاتوژن‌ها اتفاق می‌افتد، افزایش می‌یابد (Glazebrook et al).

کمپلکس یوبی کوئیتین لیگاز SCF^{COI1} می‌تواند عامل کاهش بیان ژن تیونین ۲۴ ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک در رقم خزر باشد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن تیونین پس از تیمار با متیل جاسمونات نشان دهنده افزایش بیان این ژن در ارقام خزر و هاشمی بود به طوری که بیان این ژن در رقم خزر ۲۴ و در هاشمی ۱۲ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید (شکل ۲B). به دلیل این که متیل جاسمونات سبب القا بیان ژن‌های بالادست تیونین و دیفنسین یعنی ژن‌های *COI1*، *MPK4* و *SSI2* می‌شود، افزایش بیان ژن تیونین پس از تیمار با متیل جاسمونات قابل انتظار است. از خصوصیت‌های اصلی تیونین‌ها فعالیت‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی آن‌ها است. گزارش‌های زیادی حاکی از این است که گیاهان تراریختی که حاوی ژن تیونین هستند در مقابل حمله پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند.

2003). در گزارشی دیگر نیز میزان بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* پس از آلودگی با عامل بیماری بلاست *Magnaporthe grisea* در ارقام خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) افزایش داشت و افزایش بیان این ژن در رقم خزر بیشتر از رقم طارم بود (Sadati et al. 2012).

بررسی بیان ژن تیونین، منسوب به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شماره ۱۳ (*OsPR13*) در هر دو رقم خزر و هاشمی پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک افزایش پیدا کرد به طوری که در رقم مقاوم خزر، بیشترین میزان افزایش بیان ژن در زمان ۱۲ ساعت پس از تیمار و در رقم حساس هاشمی حداکثر میزان بیان این ژن ۴۸ ساعت پس از تیمار بود، البته میزان افزایش بیان در خزر نسبت به هاشمی بیشتر بود (شکل ۲B). همانطور که در بررسی بیان ژن دیفنسین اشاره شد تجمع *NPR1* فعال در سیتوسول پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک با اختلال در عمل



شکل ۲- اثر اسیدسالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MJ) بر الگوی بیان ژن‌های دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) در ارقام برنج (حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 2- Effect of salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) on the expression of the genes *PDF1.2* and *Thi2.1* (Common letters are not significantly different at probability level of 5%)

نقش کلیدی دارند (Pandey and Somssich, 2009).

در این پژوهش نیز اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی بین این دو هورمون با دخالت ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی فوق سبب افزایش و کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام خزر و هاشمی شد. در این بررسی مشخص شد بیان تمام ژن‌ها در رقم مقاوم خزر پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک یا متیل جاسمونات افزایش یافته و این افزایش در مقایسه با رقم هاشمی از سطح بالاتری برخوردار بود که این نتایج به احتمال زیاد با مقاومت ذاتی رقم خزر به بیماری بلاست در ارتباط است. درحالی‌که در رقم هاشمی الگوی بیان ژن *OsPR1* و دیفنسین پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد و افزایش بیان سایر ژن‌های *NPR1* و تیونین نیز از سطوح پایینی برخوردار بود. از طرف دیگر همانطور که مشاهده شد افزایش بیان ژن‌های مورد بررسی پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک در زمان‌های زودتری نسبت به تیمار با متیل جاسمونات اتفاق افتاد، این امر به احتمال زیاد نقش مؤثرتر اسیدسالیسیلیک را در شکل‌گیری پاسخ‌های دفاعی مرتبط با ژن‌های مورد بررسی، نسبت به متیل جاسمونات مشخص می‌کند. به‌طورکلی همانطور که اشاره شد اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات منجر به تغییرهای بیان ژن‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف شد. به دلیل دخالت تعداد زیادی از ژن‌های تنظیمی و فاکتورهای رونویسی در تنظیم تداخل مسیرهای انتقال پیام، شناخت دقیق این مسیرها به راحتی امکان‌پذیر نیست و نیازمند بررسی‌های بیشتر است. بنابراین توصیه می‌شود در پژوهش‌های آتی جهت تعیین روابط آنتاگونیستی و هم‌افزایی بین هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات، بیان سایر ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل، مورد بررسی قرار گیرد.

برای مثال افزایش بیان ژن تیونین جو در توتون تراریخته سبب مقاومت به *Pseudomonas syringae* و در برنج تراریخته سبب مقاومت به برخی از بیماری‌های باکتریایی شد (Iwai et al., 2002). در ضمن در بررسی دیگری که روی گیاه برنج انجام شد مشخص شد که بیان ژن تیونین *Thi2.1* در هر دو رقم خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) پس از آلودگی با قارچ بلاست افزایش یافت (Sadati et al., 2012). آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها همچنین کاربرد خارجی ترکیب‌هایی مانند اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات میزان بیان این ژن‌ها را تغییر می‌دهد که این اختلاف در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس متفاوت است (Sels et al., 2008).

پاسخ‌های دفاعی در گیاهان توسط شبکه وسیعی از مسیرهای انتقال پیام شکل می‌شود که هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات از عوامل اصلی دخیل در شکل‌گیری این پاسخ‌ها هستند. برهمکنش‌های پیچیده بین هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات تا حدودی شناخته شده است و شامل اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی است (Peng et al., 2012). همانطور که قبل از این اشاره شد از عوامل دخیل در برهمکنش بین مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات پروتئین تنظیمی *NPR1* است که اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک را بر متیل جاسمونات اعمال می‌کند، از طرفی ژن‌های *MPK4*، *COI1* و *SSI2* نیز نقش مؤثری در شکل‌گیری اثر آنتاگونیستی متیل جاسمونات علیه اسیدسالیسیلیک دارند. از جمله عوامل دیگری که در تنظیم تداخل مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات نقش دارند، فاکتورهای رونویسی *WRKY* هستند که در مسیرهای متعدد زیست‌شناسی به خصوص در پاسخ به تنش‌های زیستی و در شکل‌گیری مقاومت علیه پاتوژن‌ها

منابع

- Agrawal G, Rakwal R, Jwa N, Agrawal V. 2001. Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 1095-1103.
- Beckers GJM, Spoel SH. 2006. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant*

Biology 8: 1-10.

- Bi HH, Zeng RS, Su LM, An M, Lu SM. 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Journal of Chemistry Ecology* 33: 1089-1103.
- Daw DB, Zang LH, Wang ZZ. 2008. Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants. *Australasian Plant Pathology* 37: 637-644.
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van

- Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Me'traux JP, Van Loon LC, Dicke M. 2005.** Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 923-937.
- Dong X. 2004.** *NPR1*, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7:547-552.
- Durrant WE, Dong X. 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review. Phytopathology*. 42: 185-209.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Me'traux JP, Zhu T, Katagiri F. 2003.** Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* 34: 217-228.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43: 205-227.
- Hunt M. 2006.** Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina. (Access on line: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>).
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010.** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Iwai TH, Kaku R, Honkura S, Nakamura H, Ochiai T, Sasaki Y. 2002.** Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15: 515-521.
- Jain M, Nijhawan A, Tiagi AK, Purana PJ. 2006.** Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 646-651.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002.** Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review. Plant Biology* 53: 299-328.
- Koornneef A, Pieterse C. 2008.** Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Kunkel BN, Brooks D. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5:325-331.
- Liu X, Li F, Tang J, Wang W, Zhang F, Wang G, Chu J, Yan C, Wang T, Chu C, Li C. 2012.** Activation of the Jasmonic Acid Pathway by Depletion of the Hydroperoxide Lyase OsHPL3 Reveals Crosstalk between the HPL and AOS Branches of the Oxylin Pathway in Rice. *Plos one* 7(11): 1-14.
- Mitsuhashi I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y. 2008.** Characteristic expression of 12 rice *PR1* family gene in response to pathogen infection, wounding and defense related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279: 415-427.
- Momeni A, Padasht Dehkaie F, Mousa nejad S, Javan nikkhah M. 2006.** Determination of reducing resistance component in selected cultivar of rice. *Agricultural knowledge* 16(3), 135-144 (In Farsi with English abstract).
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140: 249-262.
- Pandey SP, Somssich IE. 2009.** The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* 150:1648-1655.
- Pieterse C, Van loon LC. 2004.** *NPR1*: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7:456-464.
- Qu NA, Gan W, Bi D, Xia S, Li X, Zhang Y. 2010.** Two BTB proteins function redundantly as negative regulators of defense against pathogens in Arabidopsis. *Botany* 88:953-960.
- Sadati Z, Ghanbari MA, Babaiezed V, Rahimian H. 2012.** The antimicrobial peptides thionin and defensin are involved in rice resistance against *Magnaporthe grisea* fungus. In: 12th Genetic congress. Iran, Tehran Shahid Beheshti University (In Farsi with English abstract).
- Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle M. 2008.** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:941-950.
- Silverman P, Seskar M, Kanter D, Schweizer P, Metraux J. P, Raskin I. 1995.** Salicylic acid in rice biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiology* 108: 633-639.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Me'traux JP, Brown R, Kazan K. 2003.** *NPR1* modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770.
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X. 2007.** Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 18842-18847.
- Sugano Sh, Chang J, Miyazawa S, Masumoto C, Yazawa K, Hayashi N, Shimono M, Nakayama A, Miyao M, Takatsuji H. 2010.** Role of *OsNPR1* in rice defense program as revealed by genome wide expression analysis. *Plant Molecular Biology* 74:549-562.
- Taheri P, Tarighi S. 2010.** Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology* 167: 201-208.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004.** The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135: 530-538.

Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.

Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. 2006a. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11: 184-191.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006b. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* 44: 135-162.

Van Wees SCM, De Swart EAM, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 8711-8716.

Von Dahl CC, Baldwin IT. 2007. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions. *Plant Growth Regulator*. 26: 201-209.

Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D. 2002. The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:1919-1935.

Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D, He Z. 2007. Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal* 5: 313-324.

Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert L, Somerville S. 2004. Host and nonhost pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 40: 633-646.

تجزیه بیوانفورماتیکی ESTهای جداسازی شده از گیاه

Aeluropus littoralis تحت تنش شوری

Bioinformatical analysis of Isolated ESTs from *Aeluropus littoralis* under salinity stress

امین ابراهیمی^۱، رضا معالی امیری^{۱*}، قربانعلی نعمت زاده^۲ و هوشنگ علیزاده^۱

Amin Ebrahimi¹, Reza Maali-Amiri¹, Ghorban Ali Nematzadeh² and Hoshang Alizadeh¹

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری

1- PhD Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2- Professor, Sari University of Agriculture science and Natural Resources, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی نیاز به منابع ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد دارد. گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) مدل مناسبی برای پژوهش‌های ژنتیکی و درک ملکولی ساز و کارهای تحمل به شوری در تک‌په‌ای‌ها است. به خصوص این‌که درصد بالای همولوژی با ژن‌های برنج دارد. در این بررسی ۱۵۰ EST که تحت تنش شوری از گیاه آلوروپوس لیتورالیس جداسازی شده بود را از بانک‌های اطلاعاتی دریافت و بعد از حذف توالی‌های تکراری، عملکرد احتمالی و شباهت آن‌ها با داده‌های موجود در بانک داده‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که ۷۱ EST با توالی‌های پروتئینی موجود در بانک داده‌ها شباهت داشت و عملکرد آن‌ها نیز مشخص شد درحالی‌که ۱۴ EST با داده‌های موجود در بانک داده‌ها شباهت داشت اما عملکرد آن‌ها در بانک داده‌ها مشخص نبود و همچنین ۷ EST نیز با هیچکدام از پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها شباهت نداشته و عملکرد آن‌ها ناشناخته باقی ماند. نتایج هم‌ردیفی ESTهای بررسی شده از نظر عملکردی نشان داد که ESTهای ایزوله شده، در ۱۹ گروه مختلف قرار گرفتند. ۱۶ EST در انتقال مواد (از گروه ژن‌های ترانسپورتر) در گیاه فعالیت داشته، ۱۳ ESTها در گروه پروتئین‌های ریبوزومی بوده که در ساختار ریبوزوم و عمل ترجمه دخالت دارند. سایر ESTها نیز در فعالیت‌هایی از قبیل تنظیم فعالیت کانال‌های سلولی، ویرایش آر.ان.ا. و تقسیم سلولی دخیل هستند. در مجموع نتایج پژوهش نشان داد که با توجه به درصد بالای همولوژی آلوروپوس لیتورالیس با ژن‌های برنج در مقایسه با سایر گیاهان، مهندسی ژنتیک در این گیاه می‌تواند به تعیین تفاوت تحمل به شوری بین گیاهان گلایکوفیت و هالوفیت کمک کند.

واژه‌های کلیدی

آلوروپوس لیتورالیس
بانک داده‌ها
بیوانفورماتیک
تنش شوری
EST

مقدمه

تنش‌های محیطی علت اصلی کاهش محصول‌های زراعی در جهان بوده تا جایی که میزان عملکرد را تا بیش از ۵۰ درصد کاهش می‌دهند. تنش شوری از چالش‌های اساسی در کشاورزی محسوب شده و گیاه را از رسیدن به پتانسیل ژنتیک تولید، باز داشته و بهره‌وری زراعی را محدود می‌سازد (Chinnusamy et al., 2004; Mahajan and Tejaei, 2005). پیش‌بینی می‌شود که افزایش شوری در زمین‌های زیر کشت در جهان، سبب از بین رفتن ۲۰ درصد از این نواحی تا ۲۵ سال آینده و تا ۳۰ درصد تا میانه قرن ۲۱ شود (Wang et al., 2003). به منظور سازگاری (Acclimation) و پاسخ‌های دفاعی، گیاهان (به‌عنوان موجودات غیرمتحرک) نمی‌توانند موقعیت مکانی خود را مانند دیگر موجودات زنده تغییر دهند اما فرآیند تکامل در آن‌ها ساز و کارهایی تعبیه کرده که به آن‌ها در حفظ و پایداری عملکرد کمک می‌کند (Rahaei et al., 2009). از این جمله می‌توان به ساز و کارهای مقاومت (Resistance)، تحمل (Tolerance) و اجتناب (Avoidance) اشاره کرد که سبب تغییرهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغییر در وضعیت تظاهر ژن شده که به طور بالقوه می‌توانند توارثی نیز هستند. یعنی محیط به طور دایم در حال تغییر بوده و گیاهان نیز خود را با این تغییرات تنظیم می‌کنند. بنابراین امروزه سازگاری گیاهان به عوامل محیطی مانند شوری تمرکز مهم پژوهش‌های زیستی بوده زیرا تحت شرایط حاد، ساز و کارهای دخیل در سازگاری و ادامه حیات گیاه اطلاعات مهمی عرضه می‌کند. جالب این که ساز و کارهای توارثی پاسخ به تنش در یک گیاه ممکن است با ساز و کارهای گیاه دیگر متفاوت باشد (Abarsaji, 1998; Rahaei et al., 2009). پژوهشگران اصلاح نباتات در بهره‌برداری از خاک‌های زراعی شور، سعی در معرفی گیاهان شورزی یا هالوفیت (Halophyte) به‌عنوان جایگزین گیاهان زراعی (استفاده از گیاهان بومی مناطق شور) دارند، زیرا ایجاد نوعی رابطه هم‌زیستی با شرایط خاص اکوسیستم‌های مناطق شور ضروری بوده و با کمترین دخالت در محیط می‌توان به حداکثر استفاده از این مناطق دست یافت (Ren et al., 1992; Hasegawa et al., 2000).

تلاش‌های گسترده‌ای در دهه‌های گذشته در رابطه با اصلاح

ژنوتیپ‌های بومی متحمل به شوری، ژنوتیپ‌های علوفه‌ای و زراعی به‌عمل آمده است (Noe and Zedler, 2000) و در راستای چنین اهدافی، انتخاب گونه‌های مناسب که بتواند عوامل تنش‌زای اقلیمی و خاکی مناطق مختلف را به خوبی تحمل کرده و علاوه بر ایجاد پوشش سبز مناسب در حاشیه کویرها و مناطق مختلف، علوفه کافی جهت تعلیف احشام را فراهم کند و از همه مهمتر جهت حفظ آب و خاک مناطق حساس به فرسایش مؤثر واقع شوند، بسیار دارای اهمیت بوده است (Mahmoudi et al., 1983). آلوروپوس (*Aeluropus litoralis*) گیاهی هالوفیت با فرمول کروموزومی $2n=14$ است. مقدار دی.ان.ا. هسته‌ای این گیاه در حدود ۰/۷ پیکوگرم که به طور تقریبی معادل ۳۴۲Mb در ژنوم هاپلوئید است. سیستم فتوسنتز در این گیاه از نوع C4 بوده و در نتیجه سبب انعطاف‌پذیری بیشتر آن در مواجهه با تنش‌های خشکی و شوری می‌شود. این گیاه دارای خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی برجسته‌ای بوده که از نظر کاربرد در مرتع‌داری و کشاورزی بسیار مهم است (Zouari et al., 2007). گیاه آلوروپوس از گونه‌های شورزی بومی ایران، می‌تواند در خاک‌های شور با هدایت الکتریکی ۱۷/۵ تا ۶۲ میلی‌موس بر سانتی‌متر (دسی‌زیمنس بر متر) رشد کند. این گیاه نمک خاک را جذب کرده و به سمت بالا انتقال داده و سرانجام از طریق برگ‌ها، که دارای تارهای نمکی هستند، به بیرون از گیاه هدایت می‌کند (Abarsaji, 1998).

اصلاح گیاهان زراعی، نیازمند منابع ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد بوده، بنابراین شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن‌ها در سطح مولکولی بسیار دارای اهمیت است. به همین دلیل گیاهانی نظیر آلوروپوس می‌توانند مدل‌های طبیعی الهام‌بخش به‌نژادی مولکولی در سایر گیاهان استراتژیک باشند (Nassiri et al., 2011). از mRNAهای بیان شده (ESTها) در بافت‌های مختلف و در شرایط گوناگون، می‌توان اقدام به تشکیل کتابخانه‌های cDNA کرد و به بررسی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری پرداخت به طوری که امروزه ESTها به‌عنوان منبع مهم در شناسایی ژن‌های جدید استفاده می‌شود، اما با این وجود ژن‌هایی وجود دارند که در بافت‌های خاص یا مرحله خاصی از رشد گیاه بیان نشده و ممکن است در

حذف شدند. سپس آن دسته از توالی‌های پروتئینی در برنامه BLASTX که با ESTهای مورد نظر ما (بلندترین ESTها) شباهت بالا و معنی‌داری داشتند (10^{-10} EValue) انتخاب شدند و این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal W (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) با یکدیگر هم‌ردیف و توالی‌های هم‌ردیف شده با کمک برنامه MEGA5 براساس الگوریتم NJ خوشه‌بندی و درخت تکاملی آن‌ها ترسیم شد.

نتایج و بحث

نتایج هم‌ردیفی نشان داد که ۷۱ EST (۷۷ درصد) ایزوله شده از گیاه آلروپوس با پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها شباهت داشته و عملکرد آن‌ها نیز مشخص شد با این وجود ۱۴ EST (۱۵ درصد) با داده‌های موجود در بانک داده‌ها شباهت داشته اما عملکرد آن‌ها در بانک داده‌ها مشخص نشده بود. همچنین ۷ EST (هشت درصد) نیز با هیچکدام از ESTهای موجود در بانک داده‌ها شباهت نداشته و عملکرد آن‌ها هم ناشناخته باقی ماند (شکل ۱).

(Zouari et al; 2007) با جداسازی و توالی‌یابی ESTهای گیاه آلروپوس تحت تنش شوری گزارش کردند که ۶۸ درصد از ESTهای مورد بررسی با پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها همانندی داشته و دارای کارکرد مشخصی بودند درحالی‌که دیگر ESTها عدم همانندی یا عملکرد ناشناخته‌ای داشتند. گروه‌بندی ESTها نشان داد که بیشترین همانندی آن‌ها با ESTهای گیاه برنج موجود در بانک داده‌ها بوده (۲۶ EST یا ۲۹ درصد) درحالی‌که کمترین میزان همانندی با *Aegilops tauschii* مشاهده شد (تنها با یک EST یا یک درصد). درصد بالای ESTهای برابر با توالی‌های برنج (نسبت به سایر گیاهان) می‌تواند علاوه بر نزدیکی ژنوم گیاه برنج در اثر وجود تعداد زیاد ESTهای برنج در پایگاه داده‌ها نیز باشد (Wang, 2007). علاوه بر این ۷۰ درصد از ESTهای بررسی شده با ESTهای گیاهان تک‌لپه‌ای شباهت نشان داد.

کتابخانه cDNA نیز یافت نشوند (Rahaei et al., 2009; Naghavi et al., 2011). امروزه از پایگاه‌های داده EST (Expression sequence tag) به‌عنوان منابع غنی، برای شناسایی ژن‌ها و مقایسه توالی در بین گونه‌ها استفاده می‌شود و از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهایی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی، فیزیکی و نیز بررسی بیان ژن‌ها نیز استفاده می‌شود. از داده‌های مربوط به توالی ESTها می‌توان برای همسانه‌سازی سریع ژن هدف به‌وسیله RT-PCR (Reverse-transcription PCR) و تشکیل کتابخانه cDNA استفاده کرد (Jin, 2006) یا به کمک پایگاه‌های داده و نرم‌افزارها به ژن‌های خاص دست یافت (Naghavi et al., 2011). هدف از این پژوهش، تجزیه و تحلیل ESTهای جدا شده از گیاه *A. littoralis* ایزوله شده تحت تنش شوری با استفاده از پایگاه‌های داده، شناسایی عملکرد احتمالی و بررسی میزان شباهت آن‌ها با داده‌های موجود در بانک‌های داده بود.

مواد و روش‌ها

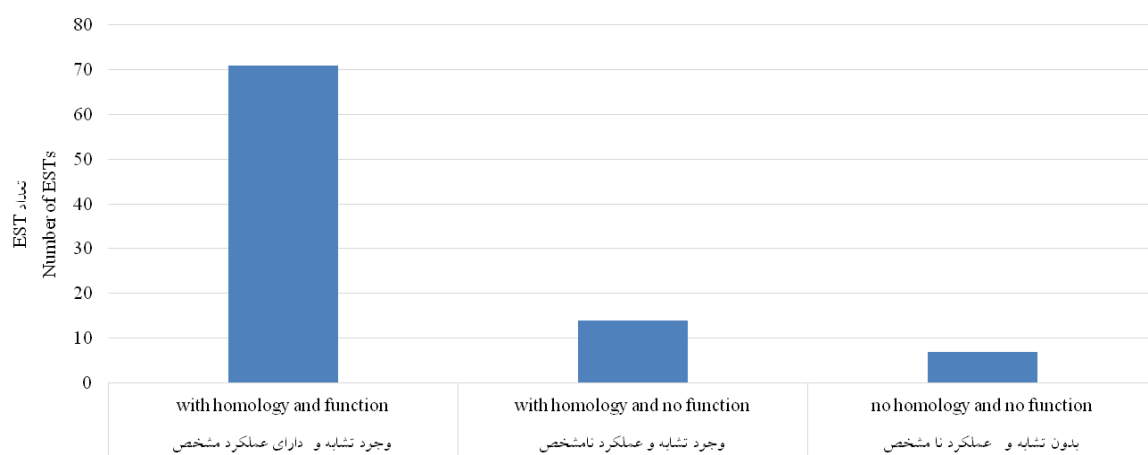
در این آزمایش از ۱۵۰ EST گیاه آلروپوس *A. littoralis* موجود در بانک‌های اطلاعاتی استفاده شد که تحت تنش شوری و به‌وسیله روش cDNA-AFLP در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان جداسازی شده بود. برای جلوگیری از تکراری بودن آن‌ها، این ESTها طی دو مرحله غربال شدند. در مرحله اول برای حذف توالی‌هایی با طول کمتر از ۲۰۰ جفت باز به‌صورت دستی اقدام شد و در مرحله دوم به منظور حذف ESTهای مشابه یا دارای نواحی همپوشان از برنامه (CAP3 Huang & Madan., 1999) استفاده شد، به‌طوری‌که در مجموع فقط ۹۲ EST برای تجزیه و تحلیل انتخاب شدند (جدول ۱). سپس توالی‌های انتخاب شده در پایگاه داده‌های NCBI با استفاده از برنامه‌های BlastX و BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) بررسی شدند.

همچنین به کمک نرم‌افزار ORF Finder NCBI، چارچوب قرائت بازها (ORF (Open reading frame)) در تعدادی از توالی‌ها (بلندترین ESTها) مشخص شده و در بین آن‌ها بلندترین ORFها (bp) (به منظور ترجمه) انتخاب شدند. ORFهایی با طول کوتاه‌تر که نمی‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک پروتئین فعال ترجمه کرد

جدول ۱- شماره دسترسی ESTهای ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI و طول آنها (bp)

Table 1- Accession number of registered ESTs in NCBI database and their length (bp).

طول Length	شماره دسترسی Accession number	طول Length	شماره دسترسی Accession number	طول Length	شماره دسترسی Accession number	طول Length	شماره دسترسی Accession number
458	JZ19105.1	512	JK671259.1	230	JK671254.1	261	JK671242.1
403	JZ191060.1	284	JZ191048.1	360	JK671261.1	312	JZ191047.1
500	JZ191072.1	200	JK671234.1	292	JK671262.1	211	JK671209.1
265	JZ191069.1	663	JK671260.1	214	JK671201.1	213	JK671255.1
292	JZ191076.1	353	JZ191077.1	244	JK671195.1	213	JK671266.1
353	JZ191080.1	212	JZ191088.1	240	JK671190.1	391	JK671253.1
384	JZ191086.1	237	JZ191090.1	225	JK671216.1	349	JK671176.1
255	JK671244.1	260	JZ191082.1	354	JK671212.1	200	JK671258.1
350	JZ191043.1	302	JK671192.1	204	JK671218.1	260	JZ191052.1
352	JZ191074.1	236	JZ191093.1	309	JZ191045.1	207	JZ191089.1
200	JK671200.1	352	JK671251.1	261	JZ191050.1	208	JK671187.1
200	JK671182.1	706	JK671248.1	269	JZ191053.1	247	JK671236.1
576	JK671250.1	277	JZ191085.1	235	JZ191081.1	230	JK671267.1
331	JK671246.1	612	JK671263.1	353	JZ191087.1	266	JK671232.1
432	JK671264.1	322	JZ191044.1	392	JZ191067.1	232	JK671257.1
363	JK671249.1	259	JZ191056.1	361	JZ191064.1	201	JK671211.1
344	JK671222.1	323	JZ191075.1	260	JZ191051.1	203	JK671215.1
239	JK671226.1	435	JZ191061.1	247	JZ191055.1	496	JK671231.1
510	JK671238.1	391	JZ191062.1	386	JZ191068.1	365	JZ191042.1
512	JK671245.1	363	JZ191063.1	289	JK671223.1	306	JZ191046.1
344	JK671256.1	307	JZ191079.1	523	JZ191071.1	566	JZ191047.1
306	JK671217.1	307	JZ191078.1	607	JZ191070.1	357	JZ191065.1
663	JK671260.1	649	JK671233.1	225	JK671216.1	350	JZ191066.1



شکل ۱- گروه‌بندی ESTهای ایزوله شده از گیاه آلوروپوس براساس وجود یا عدم وجود تشابه و عملکرد آنها در مقایسه پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها.

Figure 1- Characterized ESTs isolated from *Aeluropus* based on existence or absence of similarity and function compared to proteins in data bank.

بودند. اگرچه نتایج اولیه نشان داد که چنین توالی‌های ژنی می‌توانند در تحمل به تنش‌های شوری و خشکی گیاه نقش داشته باشند، اما نیاز به تجزیه و تحلیل دقیق‌تری بود. نتایج نشان داد که ۱۶ EST (۱۷ درصد) در انتقال مواد (به‌عنوان ژن ترانسپورتر) در گیاه فعالیت داشته درحالی‌که ۱۳ درصد ESTها در دسته پروتئین‌های ریبوزومی و در ساختار ریبوزوم و عمل ترجمه دخالت دارند. سایر ESTها نیز در فعالیت‌هایی از قبیل تنظیم فعالیت کانال‌های سلولی (JZ191087.1)، ویرایش آر.ان.ا. (JZ191093.1) و تقسیم سلولی دخیل بودند (شکل سه).

پژوهش‌های گذشته نیز شباهت ESTهای گیاه آلروپوس (بیشترین میزان شباهت در بین سایر موجودات) را با پروتئین‌های برنج گزارش کرده بودند (Zouari et al., 2007). چنین نتایجی در گیاهان دیگر نیز به اثبات رسیده به‌طوری‌که (Wang et al., 2007) نشان دادند که ESTهای گیاه *Puccinellia tenuiflora* (گیاهی تک لپه از خانواده گرامینه) با توالی‌های پروتئینی در تک لپه‌ای‌ها به‌ویژه گیاه برنج شباهت دارد. نتایج عملکرد هم‌ردیفی ESTهای بررسی شده نشان داد که ESTهای ایزوله شده، در ۱۹ گروه مختلف قرار گرفتند (شکل دو) در حالی‌که ۲۱ EST (۲۲ درصد) نیز فاقد عملکرد مشخص



شکل ۲- مقایسه تطبیقی ESTهای مورد بررسی با پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها با استفاده از قواعد هم‌ردیفی.

Figure 2- Comparison of investigated ESTs with proteins in database using blast rules of alignment.

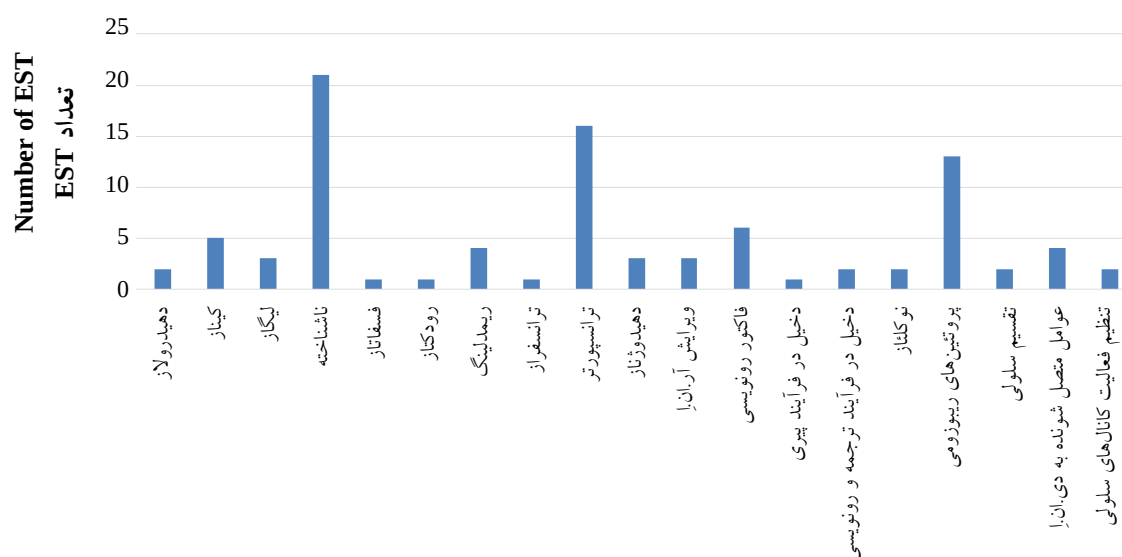
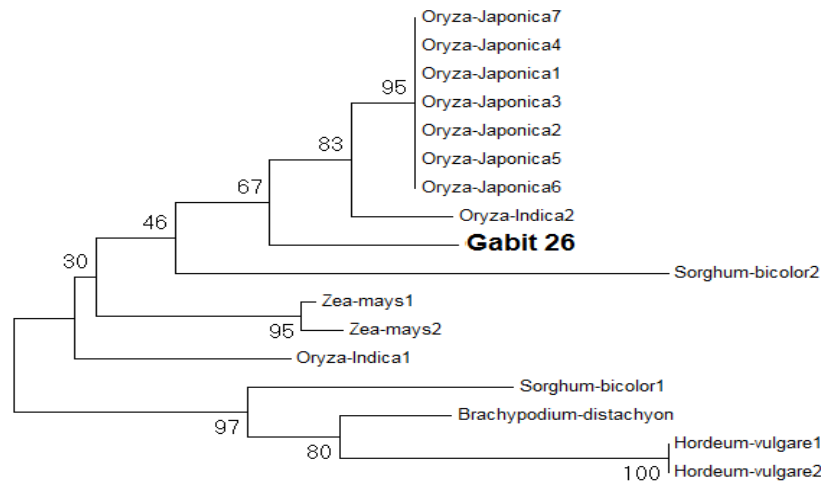


Figure 3- Putative function of investigated ESTs after blast with proteins in data bank.

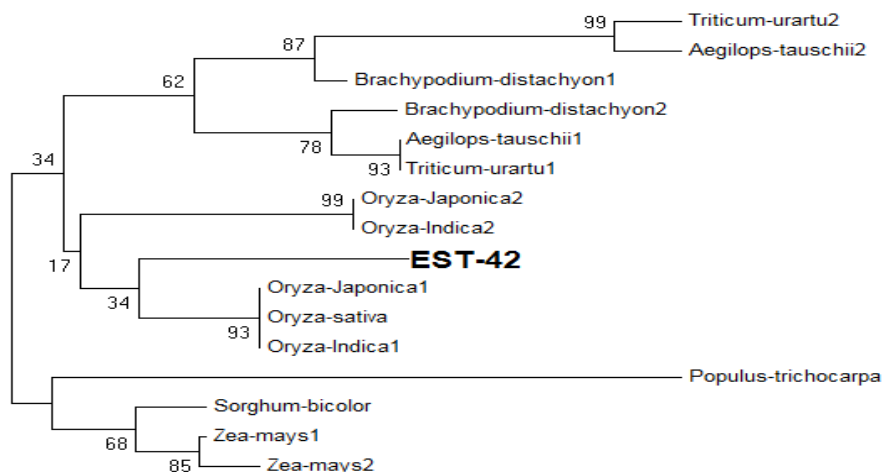
شکل ۳- کارکرد پیشنهادی ESTهای مورد بررسی بعد از انجام آزمون هم‌ردیفی با پروتئین‌های موجود در بانک داده‌ها



شکل ۴- نمایش درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های موجود در پایگاه داده‌ها (نتایج حاصل از BlastX) به همراه (JZ191067.1)

GABIT26 با استفاده از برنامه Clustal W, MEGA 5 و الگوریتم NJ.

Figure 4- Phylogenetic tree of proteins in database (BlastX results) with GABIT26 (JZ191067.1) using Clustal W, MEGA 5 and Algorithm NJ.



شکل ۵- نمایش درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های موجود در پایگاه داده‌ها (نتایج حاصل از BlastX) به همراه EST42

(JK671250.1) با استفاده از برنامه Clustal W, MEGA 5 و الگوریتم NJ.

Figure 5- Phylogenetic tree of proteins in database (BlastX results) with EST42 (JK671250.1) using Clustal W, MEGA 5 and Algorithm NJ.

نقش احتمالی پیام‌رسانی مثل فسفاتازها (JK671236.1)، پروتئین کینازها (JK671176.1 و JK671258.1)، پروتئین‌های متصل شونده به GTP (JK671226.1) شناسایی شدند. مولکول‌های پیام‌رسان ذکر شده به طور معمول با عوامل رونویسی هسته بر هم کنش داشته و سبب بیان دسته خاصی از ژن‌ها می‌شوند به همین دلیل درک پیام تنش و تبدیل آن‌ها به پاسخ‌های مناسب برای سازگاری و بقا گیاهان حیاتی خواهد بود. کینازها نقش بسیار قابل

در گزارش (Zouari et al; 2007) مشخص شده که برخی از ESTها در سوخت و ساز اولیه، سنتز پروتئین، رونویسی، سرنوشت پروتئین، تسهیل انتقال، جایابی زیرسلولی، ارتباطات سلول بر ساز و کار پیام‌رسانی، انتقال انرژی، محافظت سلول و پروتئین‌های نیازمند کوفاکتور نقش داشتند. نتایج مقایسه تطبیقی و هم‌ردیفی تعدادی از ESTهای بررسی شده در این پژوهش نشان می‌دهد که برخی از ترانسکریپت‌ها، کد کننده پروتئین‌هایی با

جمله ESTهای این پژوهش (JZ191077.1) برقرار می‌کند. بیان ساکارز سیتاز در تنش‌های خشکی در گندم افزایش می‌یابد. این ژن نقش تعیین‌کننده در پیر شدن دانه نیز دارد (Way, 2005). براساس نتایج آزمایشگاهی، انتشار ساکارز به ساقه سبب بهبود دانه‌بندی ذرت تحت تنش خشکی می‌شود.

بنابراین کمبود منبع قند عامل بسیار مهمی است که دانه‌بندی و از بین رفتن تخمدان را در تحت تنش کنترل می‌کند. کمبود آسمیلات‌ها و در برخی از موارد دسترسی به نیتروژن اصلی‌ترین دلیل کم شدن نمو دانه است.

اگر سرعت پیر شدن دانه تنظیم نشود، در نهایت وزن دانه کاهش می‌یابد. منبع جایگزین آسمیلات‌ها، ذخایر ساقه پس از گرده‌افشانی هستند که به شکل قند، نشاسته و فروکتان به صورت یک بافر در شرایطی که ستر قندهای فتوسنتزی به دلیل تنش خشکی و القا پیری کاهش یافته شرکت می‌کنند.

این گیاه قادر است میزان زیادی بذر تحت تنش شوری و خشکی تولید کند بنابراین به نظر می‌رسد مدل مهمی در کشف و بررسی ژن‌های مؤثر در پیر شدن دانه تحت شرایط شوری و خشکی باشد (Sreenivasulu et al., 2007).

دسته‌های مختلف چاپرون (Chaperones)، پروتئاز (Protease)، جلوگیری کننده‌های پروتئاز موجود در کتابخانه‌های تنش آبی و شوری، نشان دهنده تنظیم تخریب و تاخوردگی پروتئین‌هایی است که در تنظیم پاسخ گیاه به تنش نقش دارند (Sahi et al., 2006). از جمله این دسته‌ها که در ESTهای این پژوهش نیز دیده شده، می‌توان به آنزیم‌های Ubiquitin-conjugation (JK671253.1)، HSP70 (JK671211.1) و WD40 (JK671231.1) اشاره کرد.

عملکرد تعدادی از ESTها به علت عدم همانندی با پروتئین‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی (با عدم همانندی معنی‌دار) ناشناخته باقی ماند.

شناسایی نقش این دسته از ESTها در ایجاد تحمل به شوری در آلورپوس نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. در حقیقت این دسته از ESTها ممکن است در برگیرنده منابع جدید ژنتیکی تحمل به تنش شوری باشند (Zouari et al., 2007).

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داد که در اغلب

توجهی در دریافت پیام گیاه در مواجهه با انواع تنش‌های زنده و غیرزنده دارند (Vinocur & Altman, 2005). پروتئین کینازها و فسفاتازها اصلی‌ترین نقش‌های تنظیم فسفر در محیط‌های طبیعی و تغییرهای لازم در شرایط نامطلوب را برای سلول برعهده دارند. تجزیه توالی ESTها با نگاه تکاملی نشان می‌دهد که کلاس‌های مختلف فسفاتازها در گیاهان وجود دارند (Chinnusamy et al., 2005; Brock et al., 2010).

حفاظت فعال پلی‌ریبوزوم‌ها در طول پس آیش (Dessication) از شاخص‌های سطوح تحمل در گیاه است. به نظر می‌رسد که آن‌ها در بازسازی دستگاه سنتز پروتئین‌ها تحت تنش نقش دارند. در مجموع مشخص شد که ۱۳ درصد از ESTها (از جمله JZ191056.1 و JZ191087.1) در دسته پروتئین‌های ریبوزومی بودند (Wood et al., 2000).

یکی از راهبرهای مهم در تحمل به تنش‌های محیطی، برگشت مجدد هموستازی یونی و اسمزی در شرایط تنش است (Wang, 2003). ژن‌های بسیاری از ناقل‌های یونی همانند ناقل‌های پتاسیم HAK2 (JK671222.1)، ناقلین ABC (JK671238.1) در نمونه‌های بررسی شده دیده شدند.

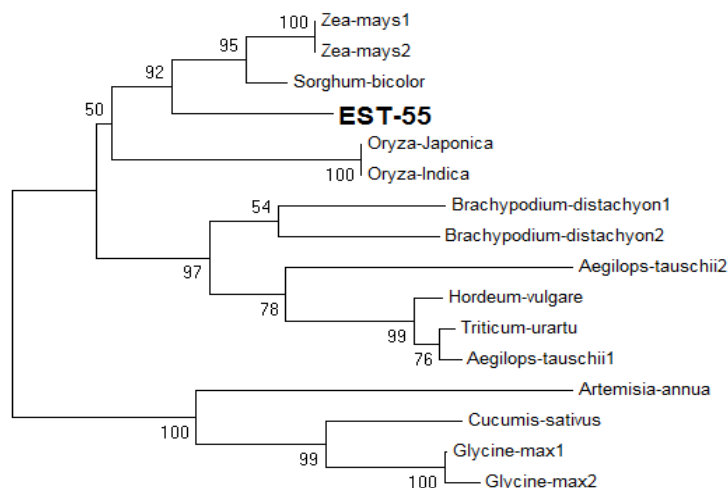
آلورپوس به عنوان یک گیاه شورزی در مواجهه با تنش شوری قادر است با حفظ نسبت مطلوب Na^+/K^+ در سیتوپلاسم، ماشین متابولیکی سلول را تا حد ممکن از اثرهای سو یون‌های سدیم و کلر محافظت کند. جلوگیری از ورود یون و کده‌بندی کردن یون در واکوئل، توانایی انباشت عناصر ضروری به‌ویژه پتاسیم در حضور غلظت‌های بالای یون سدیم و تنظیم دقیق میزان تعرق، تنفس، فتوسنتز ساز و کارهایی هستند که در مدیریت نسبت مطلوب Na^+/K^+ در سیتوپلاسم سلول‌های این گیاه اثرگذار هستند (Ueda et al., 2002).

در این میان کده‌بندی و انباشت یون سدیم در واکوئل از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به واسطه فعالیت مجموعه‌ای از کانال‌های یونی و ترانسپورترها انجام می‌شود (Munns & Tester, 2008).

در تنش شوری، گیاه هموستازی اسمزی خود را با تجمع اسمولیت‌هایی مانند قندها، قند الکل‌ها و قندهای پیچیده مانند تری‌هالوز-۶- فسفات سیتاز، ساکارز سیتاز، دلتا پیرویلین-۵- کربوکسیلاز سیتاز و پروتئین‌های غشای پلاسمایی MIP (از

در واقع توالی‌هایی با طول بیشتر، می‌توانند به طور بالقوه به عنوان ژن‌های منتخب در جداسازی کامل و انتقال به سایر گیاهان به کار گرفته شوند (Rahaei et al., 2009; Naghavi et al., 2011).

موارد ESTهای مورد بررسی با گیاه برنج و در مواردی (به نسبت کمتر) نیز با گیاه ذرت در یک گروه قرار گرفتند. چنین نتایجی می‌تواند تأییدی بر نتایج قبلی مبنی بر همانندی بالای ژنوم برنج و گیاه آلوپوس باشد (شکل‌های ۴-۶).



شکل ۶- نمایش درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های موجود در پایگاه داده‌ها (نتایج حاصل از BlastX) به همراه EST55 (JK671263.1) با استفاده از برنامه Clustal W، MEGA 5 و الگوریتم NJ.

Figure 6- Phylogenetic tree of proteins in database (BlastX results) with EST55 (JK671263.1) using

Clustal W, MEGA 5 and Algorithm NJ.

رفع این کاستی شده به طوری که نتایج حاصل از بررسی صحیح این توالی‌ها می‌تواند در نهایت منجر به شناسایی ترانسکریپتوم موجود مورد بررسی شود (Nagaraj et al., 2006).

تجزیه و تحلیل EST در شناسایی ژن، تشخیص ساختار و تفسیر ژنوم و شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی مؤثر است. همچنین این‌گونه تجزیه‌ها در بررسی ترانسکریپتوم و پروتئوم مفید هستند، هر چند که کشف ژن‌های فعال براساس توالی‌های EST نیازمند پژوهش‌های متعددی است (Lee et al., 2005).

اولین مرحله برای شناخت و گروه‌بندی پاسخ‌های پیچیده ژنتیک تنش در گیاهان، کشف سریع ژن‌ها با استفاده از توالی‌یابی ناقص کلون‌های cDNA غربال شده یا همان ESTها در سطح وسیع است. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل تنش با هدف استفاده از آن‌ها در تولید ارقام متحمل به تنش، نیازمند ژنوتیپ‌هایی است که پایه ژنتیک مشابهی داشته اما از تحمل مختلفی برخوردار هستند. توسعه چنین لاین‌های تقریباً ایزوژنی نیازمند چندین سال تلاقی برگشتی همراه با انتخاب است. راه جایگزین برای رسیدن به این

در مجموع، ESTهای مورد بررسی در این پژوهش دارای همانندی‌هایی با ترانسکریپت‌های شناخته شده مرتبط با تحمل به تنش‌های شوری، خشکی، دما (با شماره دسترسی JK671211) و تنش‌های زیستی (با شماره دسترسی JZ191075) در این مقاله بحث نشد) بوده و از سویی دیگر بیان ژن‌های دریافت پیام تنش منجر به پاسخ‌های سازگاری کل گیاه از نظر ملکولی، بیوشیمیایی، سلولی فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌شود. عملکرد و پایداری گیاهان همیشه به واسطه تنش‌های مختلف محیطی در معرض تهدید است و به همین علت پژوهش‌های زیادی در ارتباط با بررسی پاسخ گیاهان از نقطه نظر ژنتیک و فیزیولوژیکی جهت شناسایی ساز و کارهای تحمل به تنش انجام شده است. اما این مهم، هنوز نیازمند فهم عمیق‌تر از ساز و کارهای سلولی و مولکولی پاسخ به تنش و تحمل آن در گیاه است (Rahaei et al., 2009; Mohsenzadeh et al., 2006).

داده‌های خام EST حاوی اطلاعات زیستی ناچیزی هستند. تجزیه و تحلیل این داده‌ها با استفاده از ابزارهای محاسباتی ویژه سبب

سازوکارهای تحمل به تنش شوری و خشکی در تک لپه‌ای‌ها است. با توجه به این که درصد بالای همولوژی با ژن‌های برنج دارد، مهندسی ژنتیک در این گیاه می‌تواند به تعیین تفاوت تحمل به شوری بین گیاهان گلائیکوفیت (*Glycophyte*) و هالوفیت کمک کند (Zouari et al., 2007).

منابع

Abarsaji Gh. 1998. Identify and evaluate some of the ecophysiological characteristics of saline and alkaline Aeluropus pastures north of Gorgan. Research and development journal 21:25-46. (In Farsi with English abstract).

Brock AK, Willmann R, Kolb D, Grefen L, Lajunen HM. 2010. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. Plant Physiology 153:1098-1111.

Chen X, Kanokporn T, Zeng Q, Wilkins TA, Wood AJ. 2002. Characterization of the V-H⁺ ATPase in the resurrection plant *Tortola ruralis*: accumulation and polysomal. Journal of Experimental Botany 53:367-372.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J.K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science 45:437-448.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu Y.K. 2004. Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plant. Journal of Experimental Botany 55: 225-236.

Hasegawa P.M, Bressan R.A, Zhu J.K, Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant Molecular Biology 51: 463-499.

Hong-bo S, Li C, Z Chang-Xing, Xian-an L, Jean-Marcel R. 2006. Plant gene regulatory network system under abiotic stress. Acta Biologica 50:1-9

Huang X, Madan A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. Genome Research 9: 868-877.

Jin H. 2006. Comparative EST profiles of leaf and root of *Leymus chinensis*, a xerophilous grass adapted to high pH sodic soil. Plant Science 170:1081-1086.

Lee Y, Tsai J, Sunkara S, Karamycheva S, Perte G, Sultana R, Antonescu V, Chan A, Cheung F, Quackenbush J. 2005. The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 33:D71-4.

Mahajan S, Tejaei N. 2005. Cold, Salinity and drought Stress: An overview. Archives of Biochem. Biophy. 444: 139-158.

Mahmoudi A, Ei Sheikh, Abdulbaset S. 1983. Germination of two Halophytes: *Haloepelis Perfoliata*

هدف، شناسایی ژن‌هایی است که در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش (ژنوتیپ‌های متحمل با زمینه‌های متفاوت ژنتیک) و تحت شرایط تنش بیان می‌شوند اما در ژنوتیپ‌های حساس به تنش تظاهر نمی‌یابند (Rahaei et al., 2009).

گیاه آلوروپوس به عنوان مدلی مناسب برای بررسی‌ها در مقیاس وسیع با استفاده از ابزارهای نوین ملکولی به منظور فهم بهتر

and Limonium axillare from Saudi Arabia Journal of Arid environment. 6: 87-98.

Modarresi M, Nematzadeh G.A, Moradian F, Alavi SM. 2011. Identification and Cloning of the Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene from Halophyte Plant *Aeluropus littoralis* Russian Journal of Genetic 48:118-122. (In Farsi with English abstract).

Mohsenzdeh S, Malbobi M.A, Rzavi K, Farrahi S. 2006. Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* to water deficit. Environmental and Experimental Botany. 56:412-322. (In Farsi with English abstract).

Munns, R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Plant Biology 59: 651-681.

Nagaraj HS, Gasser RB, Ranganathan S. 2006. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. Briefings in Bioinformatics 8: 6-21.

Naghavi M.R, Malbobi M.A, Rashidi Momfared S. 2011. Bioinformatics. Tehran University (In Farsi with English abstract).

Nassiri N, Shokeri A, Nematzadeh GH.A. 2011. Cloning and characterization of enzyme H⁺-ATPase C subunit of gene vacuoles halophyte *Aeluropus Littoralis*. New Cell Biotechnology Molecular 5:15-23.

Noe G.B, Zedler JB. 2000. Differential effects of four abiotic factors on the germination of salt marsh annuals. American Journal Botany. 87: 1679-1692

Rahaei M, Naghavi M.R, Abdmishani S. 2009. Identification and expression pattern of genes involved in drought stress in wheat using RT-PCR methods and electronic Nanobarcode. Tehran University. Iran.

Ren J, Xing Z, Shunguo Y. 1992. The ecological role of *Puccinella chinampoensis* on saline in arid inland regions of Chin. In: G.P.Chapman(Ed), Desertified Graslands, Their Biology and Management. Linnean Society Symposium Series, Academic Press, New York. 111-127.

Sahi C.H, Singh A, Blumwaldb E, Grover A. 2006. Beyond Osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. Physiologia Plantarum. 127: 1-9.

Sreenivasulu N, Sopory S.K, Kishor PB. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene. 388:

1-13.

Ueda A, Shi W, Nakamura T, Takabe T. 2002. Analysis of salt-inducible genes in barley roots by differential display. *Journal Plant Research* 115:119-130.

Vinocur B, Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 123-132.

Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant response to drought Salinity and extreme Temperatures: towards genetic engineering For Stress tolerance: *Planata*. 34: 218- 234.

Wang Y. 2007. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass *Puccinellia tenuiflora*. cDNA library. *Plant Physiology*. 164: 78-89.

Way H. 2005. Identification of differentially expressed genes in wheat undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridization approach. *Plant Science* 168: 661-670.

Wood A.J, Duff R.J, Olivier M.J. 2000. The translation apparatus of *Tortula ruralis*: polysomal retention of transcripts encoding the ribosomal proteins RPS14, RPS16 and RPL23 in desiccated and rehydrated gametophytes. *Journal of Experimental Botany* 51:1655-1662.

Zhu JK. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion Plant Biology* 6: 441-445.

Zouari N, Rania S, Thierry L, Jalel A, Xavier S, Mohamed J, Khaled M, Afif H. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene* 404: 61-69.

ردیابی مولکولی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از

خاک‌های دارای پوشش گیاهی مختلف

Molecular detection of the *Bacillus thuringiensis* native isolates from the soils with different vegetations

فاطمه گرایلی مرادی^۱، محمود محمدی شریف^{۲*}، علیرضا هادی‌زاده^۲ و ولی‌الله بابایی‌زاد^۲
Fatemeh Graily Morady¹, Mahmoud Mohammadi Sharif^{2*}, Alireza Hadizadeh² and Valiollah Babaeizad²

۱- کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم

کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1- M.Sc of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msharif1353@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) از خاک اکوسیستم‌های مختلف شهرستان‌های استان مازندران جداسازی و ژن *Cry1* عامل تولید پروتئین مؤثر بر روی حشره‌ها، در آن‌ها ردیابی شد. از ۱۲۸ نمونه خاک مورد بررسی، تعداد ۴۹۱ سویه باسیلی شکل به کمک بازدارندگی انتخابی استات‌سدیم جداسازی شد. با استفاده از فاز کنتراست میکروسکوپ نوری، ۲۹۳ باکتری تولیدکننده اسپور، ۸۵ باکتری تولیدکننده اسپور و Cap و ۱۱۳ باکتری تولیدکننده اسپور، Cap و کریستال شناسایی شدند که به ترتیب ۵۹/۶۷، ۱۷/۳۱ و ۲۳/۰۱ درصد از کل سویه‌های جداسازی شده را تشکیل می‌دادند. بررسی مولکولی ژن *Cry1* و ۱۴ زیر گروه ژنی آن با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. در ۱۵ جدایه ژن *Cry1* در اندازه مورد انتظار شناسایی شد. در بررسی تعیین زیرگروه‌های ژنی، ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها یافت شدند اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. در برخی از سویه‌ها ژن‌های *Cry1D*، *Cry1E* و *Cry1J* در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. این سویه‌ها ممکن است محتوی یک ژن و یا ژن‌های جدیدی باشند. یافتن سویه‌های بومی با ژن‌های مؤثر در مناطق مختلف و کاربرد آن در مهندسی ژنتیک می‌تواند در مدیریت حشره‌های آفت در آینده مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی

باکتری تولیدکننده اسپور

پروتئین کریستالی

ژن *Cry1*

سویه باسیلی

Bacillus thuringiensis

مقدمه

استفاده مداوم از حشره‌کش‌های سنتزی موجب بروز مقاومت در آفت‌های کشاورزی و آلودگی‌های زیست محیطی شده است. از این رو نیاز به کاربرد حشره‌کش‌های سازگار با محیط برای کاهش مقاومت حشرات آفت ضرورت یافته است (Neema et al., 2010). از طرف دیگر، تمایل به کاربرد عوامل میکروبی به‌عنوان حشره‌کش افزایش یافته که یکی از موفق‌ترین این عوامل، باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) است (Obeidat et al., 2004).

باکتری *B. thuringiensis* یک باکتری میله‌ای شکل، هوازی و اسپورزاست که از طریق تولید یک یا تعداد بیشتری کریستال کنار اسپوری (Parasporal Crystal) در طی دوره اسپورزایی، قابل شناسایی است. این کریستال‌ها ساختارهایی پروتئینی هستند که دلتا-اندوتوکسین (δ -Endotoxin) نامیده شده و به‌صورت اختصاصی روی بسیاری از حشرات مختلف آفت سمی هستند. دو نوع دلتا-اندوتوکسین به‌صورت پروتئین‌های کریستالی (Cry) اختصاصی و پروتئین‌های سیتولیتیک (Cyt) غیر اختصاصی وجود دارد (Martinez et al., 2004).

در سال ۱۹۸۹، چهار دسته از ژن‌های Cry و دو دسته از ژن‌های Cyt توصیف شدند (Hofte & Whiteley, 1989). ژن‌های Cry1 پروتئین‌هایی را رمزگردانی می‌کنند که روی راسته‌ی بالپولکداران (Lepidoptera) سمیت دارند؛ ژن‌های Cry2 روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان (Diptera)؛ ژن‌های Cry3 روی راسته‌ی سخت بالپوشان (Coleoptera)؛ و ژن‌های Cry4 روی راسته‌ی دوبالان فعالیت دارند (Kaelin et al., 1994; Crickmore et al., 1998).

از سال ۱۹۸۰، استفاده از Bt به علت کاربرد آن در مهندسی ژنتیک (گیاهان تراریخته) به سرعت افزایش یافت (Rolle, 2004). افزایش فشار انتخابی و تداوم استفاده از یک نوع خاص توکسین منجر به بروز سطوحی از مقاومت در حشره‌های آفت شد. بدین ترتیب برنامه‌های غربالگری در سراسر جهان برای شناسایی سویه‌های جدید با فعالیت حشره‌کشی روی طیف وسیعی از حشرات آفت افزایش یافت (Neema et al., 2010).

باکتری Bt از منابع مختلفی جداسازی شده است (خاک، لاشه

حشره‌ها، برگ‌های تازه یا پوسیده، محصولات انباری)، اما نمونه‌های خاکی فراوان‌ترین و متنوع‌ترین منبع Bt هستند (Aramideh et al., 2010). شناسایی ژن‌های بومی با پتانسیل حشره‌کشی بالا در سویه‌های مختلف و همچنین با دامنه میزبانی جدید و امکان انتقال آن‌ها در سویه‌های نوترکیب از طریق مهندسی ژنتیک و روش‌های انتقال ژن می‌تواند کمک شایانی برای کنترل میکروبی حشره‌های آفت و کاهش ظهور مقاومت در آن‌ها باشد.

هدف پژوهش حاضر جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی باکتری Bt از خاک‌های چهار زیست بوم مختلف در استان مازندران و شناسایی ژن‌های Cry1 مؤثر روی بالپولکداران است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌های بومی باکتری Bt

نمونه‌ها از خاک‌های چهار زیست بوم مختلف شامل: زراعی، باغی، شهری و بدون پوشش از ۱۶ شهرستان استان مازندران برداشت و در مجموع ۱۲۸ نمونه خاک جمع‌آوری شد.

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی سدیم استات استفاده شد (Travers et al., 1987). اساس این روش بر قابلیت استات سدیم برای جلوگیری از جوانه‌زنی اسپورهای Bt استوار است. در صورت کشت نمونه در محیط کشت حاوی استات سدیم تمامی اسپورها به‌جز اسپورهای Bt جوانه می‌زنند. پس از آن با شوک حرارتی اسپورهای جوانه‌زده از بین برده شده و اسپورهای مقاوم و جوانه‌زده Bt سالم باقی می‌مانند. در ادامه محلول حاوی این اسپورها در محیط فاقد استات سدیم کشت داده می‌شوند. برای انجام مراحل ذکر شده یک گرم از نمونه به مدت سه ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB محتوی استات سدیم ۰/۲۵ مولار (pH: ۶/۸) کشت داده‌شد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت داده‌شده تحت تأثیر شوک حرارتی ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه‌زده سایر باکتری‌ها از بین رفته و تنها اسپورهای مقاوم و جوانه‌زده Bt باقی می‌مانند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt (T3, LBA) و CCY (کشت داده‌شدند (جدول ۱). پس از گذشت سه الی پنج

محلول TE (محتوی Tris به غلظت ۱۰ میلی مولار و EDTA به غلظت یک میلی مولار) حل شد (Rolle et al., 2005).

رديابي مولکولي ژن *Cry1* و زیرگروه‌های آن

در این پژوهش ژن *Cry1* و ۱۴ زیرگروه آن (*Cry1Ab*, *Cry1Aa*, *Cry1F*, *Cry1E*, *Cry1D*, *Cry1C*, *Cry1B*, *Cry1Ad*, *Cry1Ac*, *Cry1G*, *Cry1H*, *Cry1I*, *Cry1J* و *Cry1K*) با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر (ساخت شرکت BIONEER، کره جنوبی) (Seifinejad et al., 2008) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (Polymerase Chain Reaction) (PCR) بهینه شده برای ژن‌های *Cry1* در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر از دی.ان.ا، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP (غلظت نهایی: ۰/۲ میلی مولار)، ۰/۲ میلی مولار آنزیم Taq DNA Polymerase (مقدار نهایی: یک واحد)، دو میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها (غلظت نهایی ۰/۸ میکرومولار)، یک میکرولیتر از $MgCl_2$ (غلظت نهایی: دو میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی.سی.آر (مقدار نهایی ۱ X) و ۱۴/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مراحل واکنش به ترتیب شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، پیوند به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۴۵ درجه سانتی گراد و مرحله طولانی شدن به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و طولی شدن نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود.

پس از انجام پی.سی.آر، محصول واکنش با استفاده از ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شد و الگوهای باندي به دست آمده مشاهده و ثبت شد.

نتایج و بحث

با استفاده از شیوه انتخابی استات سدیم و براساس شکل ظاهری کلنی *Bt* (کلنی‌های سفید مات) از ۱۲۸ نمونه خاک زراعی، باغی، شهری و بدون پوشش تعداد ۴۹۱ جدایه گزینش و سپس با استفاده از شیوه رنگ آمیزی کوماسی بلو و براساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری *Bt* (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) شناسایی شدند (شکل ۱). بر این اساس، در این مرحله ۲۹۳

روز از کشت، کلنی‌های باکتری براساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و در داخل آب نمک ۰/۹ درصد در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

شناسایی میکروسکوپی

سویه‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت ال.بی.ا تک کلون شدند. پس از گذشت سه الی پنج روز از کشت، با استفاده از شیوه رنگ آمیزی کوماسی بلو (Coomassie blue) از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و براساس شاخص‌های میکروسکوپی *Bt* (تولید اسپور، کلاهک (Cap) و کریستال) شناسایی شدند. شناسایی میکروسکوپی سویه‌های *Bt* به طور عمومی از طریق فاز کنتراست (Contrast phase) میکروسکوپ نوری (Nikon، مدل Eclipse E600) برای تشخیص کریستال‌ها (به رنگ تیره) و اسپورها (در فاز روشن) انجام می‌شود (Kaur, 2006).

جداسازی دی.ان.ای باکتری

باکتری‌های جداسازی شده روی محیط کشت ال.بی.ا تکثیر شدند. مقداری از نمونه کشت شده داخل یک میلی لیتر از محلول یک حاوی Tris (۰/۰۱ مولار با pH: ۸)، EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (۰/۰۱ مولار) و NaCl (۱ مولار) قرار گرفت و سانتریفوژ شد. سپس به پلت (Pellet) ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج Tris (۰/۰۲۵ مولار با pH: ۸)، EDTA (۰/۰۱ مولار)، ساکارز ۲۵ درصد و لایزوزایم (Lysozyme) (چهار میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دو حاوی NaOH (۱۰ مولار به میزان میلی لیتر)، SDS (Sodium dodecyl sulfate) (۱۰ درصد به میزان ۱۰ میلی لیتر) و آب مقطر استریل (۸۸ میلی لیتر) به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از NaCl (پنج مولار) به آن اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی گراد باقی ماند. سپس نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد و به مقدار ۲/۵-۱/۵ برابر محلول برداشته شده به آن اتانول سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) اضافه و سانتریفوژ شد. پلت با اتانول ۷۰ درصد دو بار شست و شو شد و پس از خشک کردن آن، در

باکتری تولیدکننده‌ی اسپور، ۸۵ باکتری تولیدکننده‌ی اسپور و Cap و ۱۱۳ باکتری تولیدکننده‌ی اسپور، Cap و کریستال (در اصطلاح باکتری‌های تولیدکننده‌ی کریستال) شناسایی میکروسکوپی شدند که به ترتیب ۵۹/۶۷، ۱۷/۳۱ و ۲۳/۰۱ درصد از کل سویه‌های جداسازی شده را تشکیل می‌دهند. همچنین با بررسی موارد ذکر شده در بین چهار پوشش گیاهی، خاک‌های باغی با ۲۹/۱۳ درصد دارای بیشترین درصد سویه‌های تولیدکننده پروتئین‌های کریستال بودند (جدول ۳).

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده محیط‌های کشت باکتری *Bacillus thuringiensis*

Table 1- The components of media for culture of *Bacillus thuringiensis*

محیط کشت	اجزای محیط کشت
LB مایع	تریپتون (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، NaCl (۵ گرم)، اسنات سدیم (۳۴ گرم) (pH ۷/۸) بر لیتر
LBA	تریپتون (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، NaCl (۵ گرم)، آگار (۱۵ گرم) بر لیتر
T3	تریپتون (۳ گرم)، تریپتوز (۲ گرم)، عصاره مخمر (۱/۵ گرم)، فسفات سدیم (۶ گرم) (pH ۷/۸)، MnCl ₂ (۰/۰۰۵ گرم)، آگار (۱۵ گرم) بر لیتر
CCY	۱ ml/L + LBA از محلول نمکی (HCl (۰/۰۱ M)، ZnCl ₂ (۰/۰۰۵ M)، MgCl ₂ (۰/۰۵ M)، MnCl ₂ (۰/۱ M)، CaCl ₂ (۰/۲ M)، FeCl ₃ (۰/۰۰۵ M))

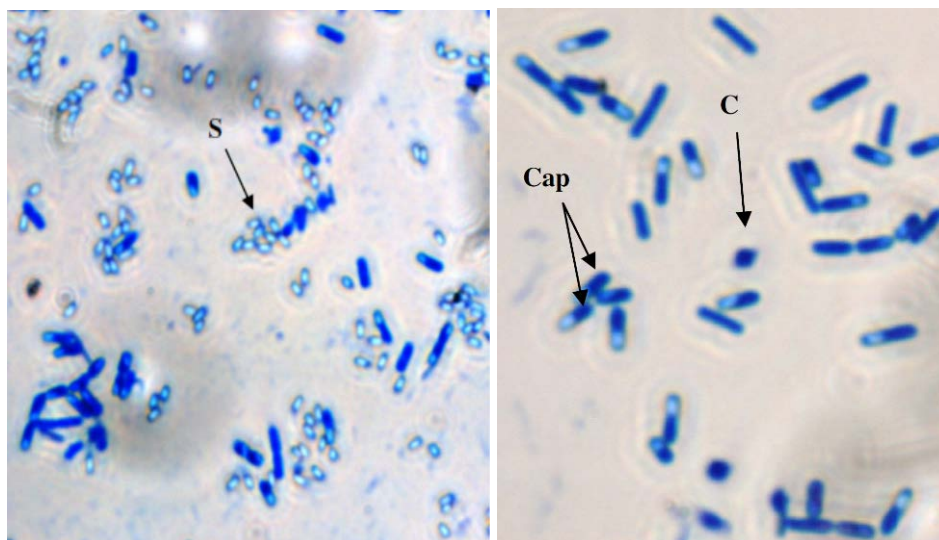
جدول ۲- ویژگی‌های آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای تکثیر ژن *Cry1* و زیر مجموعه‌های آن در باکتری *Bacillus thuringiensis*

Table 2- Characteristics of general and specific primers for amplification of *cry1* and its subset genes in *Bacillus thuringiensis**

شماره دسترسی بانک ژن	اندازه‌ی محصول ((Base pair)bp)	ژن	موقعیت در توالی	توالی**	آغازگر
	1500-1600	<i>Cry1</i>	726	5'-tracrhtddbdgtattagat-3'	<i>Cry1(F)</i>
			2268	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
M11250	1268	<i>Cry1Aa</i>	1023	5'-ttccctttattgggaatgc-3'	<i>Cry1Aa(F)</i>
			2268	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
M13898	1371	<i>Cry1Ab</i>	940	5'-cggtactcatagaggagaa-3'	<i>Cry1Ab(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
M11068	844	<i>Cry1Ac</i>	1452	5'-ggaaacttttttaaatgg-3'	<i>Cry1Ac(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
M73250	1212	<i>Cry1Ad</i>	1057	5'-accgtagtactcaacta-3'	<i>Cry1Ad(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
X06711	1323	<i>Cry1B</i>	1063	5'-ggctaccaataactctatta-3'	<i>Cry1B(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
X07518	1176	<i>Cry1C</i>	1160	5'-atttaattacgtggtgttg-3'	<i>Cry1C(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
X54160	1138	<i>Cry1D</i>	1126	5'-caggccttgacaattcaaat-3'	<i>Cry1D(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
X53985	1137	<i>Cry1E</i>	1155	5'-tagggataaatgtagtacag-3'	<i>Cry1E(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
M63897	967	<i>Cry1F</i>	1302	5'-gatttcaggaagtgtatcat-3'	<i>Cry1F(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
Z22510	1128	<i>Cry1G</i>	1300	5'-gggttctcaaagatccgtgta-3'	<i>Cry1G(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
Z22513	572	<i>Cry1H</i>	1696	5'-actcttttcacaccaataac-3'	<i>Cry1H(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
X62821	1000	<i>Cry1I</i>	1027	5'-acaatttacagcttattaag-3'	<i>Cry1I(F)</i>
			2141	5'-ctacatgttacgctcaatat-3'	<i>Cry1I(R)</i>
L32019	1106	<i>Cry1J</i>	1162	5'-gcgcttaataatattcacc-3'	<i>Cry1J(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>
U28801	1043	<i>Cry1K</i>	1245	5'-tgatatgatatttcgtaacc-3'	<i>Cry1K(F)</i>
				5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	<i>Cry1(R)</i>

* برگرفته از (Seifinejad et al, 2008)

** IUB codes: b= g+t+c, d= g+a+t, k= g+t, m= a+c, r= a+g, y= c+t



شکل ۱- کریستال (c)، اسپور (s) و کلاهک (cap) سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* (بزرگنمایی $\times 1000$)

Figure1. Crystal (c), spore (s) and cap of native isolates of *Bacillus thuringiensis* ($\times 1000$)

جدول ۳- توزیع سویه‌های تولیدکننده اسپور، کلاهک و کریستال باکتری *Bacillus thuringiensis* در اکوسیستم‌های مختلف

Table 3- Distribution of spore, cap and crystal forming isolates in different ecosystems

انواع اکوسیستم	تعداد کل سویه‌ها	تعداد سویه‌های تولیدکننده اسپور	تعداد اسپور و Cap	تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال	درصد سویه‌های تولیدکننده کریستال نسبت به تعداد کل سویه‌های هر اکوسیستم
باغ	127	70	20	37	29.13
شهری	146	83	28	35	23.97
زراعی	122	78	20	24	19.67
بدون پوشش	96	62	17	17	17.7

شناسایی سویه‌های *B. thuringiensis* دارای ژن *Cry1*

برای کاهش خطای شناسایی میکروسکوپی و اطمینان بیشتر، هم دی.ان.ا سویه‌های تولیدکننده کریستال (۱۱۳ سویه) و هم سویه‌های تولیدکننده اسپور و کلاهک (۸۵ سویه) استخراج و برای انجام آزمایش‌های بعدی آماده شد. پس از بهینه‌سازی و انجام مراحل استخراج دی.ان.ا، این جدایه‌ها با استفاده از آغازگر *Cry1* تحت انجام واکنش پی.سی.آر قرار گرفتند. از بین آن‌ها ۱۵ سویه حاوی ژن *Cry1* در اندازه‌های مورد انتظار (۱۶۰۰-۱۵۰۰ جفت باز) بودند و پنج سویه دیگر نیز قطعات کوچکتر از انتظار (۵۰۰-۶۰۰ جفت باز) تولید کردند که نیازمند توالی‌یابی و بررسی‌های بیشتر است.

با بررسی چگونگی پراکنش این ۱۵ سویه در زیست بوم‌های

مختلف، خاک‌های مناطق زراعی و شهری هرکدام دارای پنج سویه (۳۳/۳۳ درصد) دارای ژن *Cry1* و خاک‌های باغی و بدون پوشش به ترتیب دارای سه (۲۰ درصد) و دو سویه (۱۳/۳۳ درصد) دارای ژن *Cry1* بودند.

بررسی زیرگروه‌های ژن *Cry1*

پتانسیل سمیت سویه‌های Bt به نوع و زیرگروه‌های ژن *Cry* آن وابسته است (Apaydin et al., 2008). در (جدول چهار) زیرگروه‌های ژن *Cry1* در این ۱۵ سویه براساس الگوهای باندي به دست آمده ارایه شده است.

در این بررسی، ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها یافت شدند اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. در برخی از سویه‌ها ژن‌های

زیست بوم مشاهده نشدند و تنها ژن‌های *Cry1Ad*, *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها و ژن‌های *Cry1D* و *Cry1J* به ترتیب در سه و یک سویه از این زیست بوم مشاهده شدند (جدول ۴). سویه UR-AM3 با پنج ژن *Cry1* مختلف، متنوع‌ترین نیمرخ ژنی این زیست بوم بود.

از سه سویه‌ی متعلق به زیست بوم باغ دو نوع نیمرخ ژنی مختلف نسبت به یکدیگر شناسایی شد (جدول ۴). در سویه‌های این زیست بوم تنها چهار ژن مختلف مشاهده شد (*Cry1Ac*, *Cry1Ad*, *Cry1D* و *Cry1I*) (شکل ۳).

در زیست بوم بدون پوشش نیز که تنها دارای دو سویه‌ی دارای ژن *Cry1* بود، هر دو نوع سویه نیمرخ ژنی متفاوتی از یکدیگر داشتند (جدول چهار). در این زیست بوم پنج ژن مختلف مشاهده شد (*Cry1Ad*, *Cry1Ac*, *Cry1B*, *Cry1D* و *Cry1I*) (شکل ۴). روی هم رفته تمامی ژن‌های متعلق به سویه‌های این زیست بوم‌ها را می‌توان در سه گروه اصلی جای داد. ۱- ژن‌هایی که با بیشترین فراوانی و در تمامی زیست بوم‌ها یافت می‌شوند. این ژن‌ها شامل: *Cry1Ad*, *Cry1Ac*, *Cry1D* و *Cry1I*. ۲- ژن‌هایی که تنها در یک یا دو زیست بوم مشاهده شدند. بدین ترتیب که ژن‌های *Cry1Ab*, *Cry1C*, *Cry1E* و *Cry1H* تنها در زیست بوم زراعی و ژن *Cry1J* تنها در زیست بوم شهری و ژن *Cry1B* نیز تنها در زیست بوم‌های زراعی و بدون پوشش مشاهده شدند. ۳- ژن‌هایی که در هیچ یک از زیست بوم‌ها یافت نشد، شامل: *Cry1Aa*, *Cry1F*, *Cry1G* و *Cry1K* (شکل ۵).

در این پژوهش ۴۹۱ سویه باکتری باسیلی شکل از خاک‌های چهار نوع زیست بوم مختلف جداسازی شد که ۲۳ درصد (۱۱۳ سویه) آن‌ها تولید پروتئین‌های کریستال می‌کردند.

امروزه در سراسر جهان مجموعه‌های بزرگی از سویه‌های *Bt* نگهداری می‌شود. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری *Bt* نشان داد که ۲۰ تا ۹۶ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به صورت تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده‌ی کریستال بودند (Travers et al., 1987). در پژوهشی دیگر برای جداسازی باکتری *Bt*، از ۵۳۰ نمونه از خاک‌های مناطق مختلف در کره جنوبی ۵۸ سویه *Bt* جداسازی کردند (Kim et al., 1998b).

Cry1D, *Cry1E* و *Cry1J* در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. این سویه‌ها ممکن است محتوی یک ژن جدید یا ژن‌هایی باشند که برای کنترل بیولوژیک حشره‌ها و مدیریت مقاومت امیدبخش باشند. در برآورد فراوانی هر یک از ژن‌ها (شکل ۲) تکثیر مثبت بدون لحاظ اندازه قطعه، مبنا قرار گرفت.

نیمرخ‌های (Profile) مختلف ژن *Cry1*

آگاهی از نیمرخ‌های ژنی مختلف در باکتری *Bt* می‌تواند احتمال به کارگیری آن‌ها را در برابر طیف وسیعی از حشره‌های آفت افزایش داده و باعث کارایی بیشتر برنامه‌های مبتنی بر کاربرد *Bt* شود. نتایج نشان داد که این ۱۵ سویه دارای هفت نوع نیمرخ ژنی متفاوت هستند. فراوان‌ترین نوع توالی ژنی *Cry1* در این سویه‌ها محتوی ژن‌های *Cry1Ad*, *Cry1Ac*, *Cry1D* و *Cry1I* و همچنین *Cry1Ac*, *Cry1Ad* و *Cry1I* است که هر کدام در پنج سویه (۳۳/۳۳ درصد) دیده شد (جدول ۵). همچنین متنوع‌ترین توالی ژنی در سویه AG-NH1 (۶/۶۶ درصد) که محتوی هشت ژن *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1Ad*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1H* و *Cry1I* مشاهده شد.

تنوع نیمرخ‌های ژنی در زیست بوم‌های مختلف

با بررسی پنج سویه‌ی دارای ژن *Cry1* متعلق به خاک‌های زراعی سه نوع نیمرخ ژنی متفاوت از یکدیگر به دست آمد. همچنین ژن‌های *Cry1Ac* (پنج سویه)، *Cry1Ad* (پنج سویه)، *Cry1D* (پنج سویه)، *Cry1I* (پنج سویه) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1B* (دو سویه)، *Cry1Ab* (یک سویه)، *Cry1C* (یک سویه)، *Cry1E* (یک سویه) و *Cry1H* (یک سویه) کم‌ترین فراوانی را در این زیست بوم نشان دادند. ژن‌های *Cry1Aa*, *Cry1F*, *Cry1G* و *Cry1J* و *Cry1K* نیز در هیچ یک از سویه‌های این زیست بوم مشاهده نشد (جدول چهار).

در زیست بوم شهری نیز همانند زیست بوم زراعی از پنج سویه دارای ژن *Cry1*، سه نوع نیمرخ ژنی مختلف نسبت به یکدیگر شناسایی شد. اما تعداد ژن‌های مختلف *Cry1* در خاک این زیست بوم نسبت به خاک زیست بوم زراعی تنوع کمتری را نشان داد. برای مثال، ژن‌های *Cry1Ab*, *Cry1Aa*, *Cry1B*, *Cry1C* و *Cry1E*، *Cry1G*, *Cry1H* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌های این

جدول ۴- ویژگی‌های *Cry1* و ژن‌های مربوط به آن در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* ردیابی شده در خاک‌های استان مازندران

Table 4- Characterization of *Cry1* and its related genes in the detected Bt isolates of Mazandaran province soil samples

ردیف	نام سویه	<i>Cry1Aa</i>	<i>Cry1Ab</i>	<i>Cry1Ac</i>	<i>Cry1Ad</i>	<i>Cry1B</i>	<i>Cry1C</i>	<i>Cry1D</i>	<i>Cry1E</i>	<i>Cry1F</i>	<i>Cry1G</i>	<i>Cry1H</i>	<i>Cry1I</i>	<i>Cry1J</i>	<i>Cry1K</i>
۱	**AG-JR1	+	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۲	AG-JR2	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۳	AG-BS1	-	-	+	+	+	-	±	±	-	-	-	+	-	-
۴	AG-NK1	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۵	AG-NH1	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+	+	-	-
۶	UR-AM1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
۷	UR-AM2	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۸	UR-AM3	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-
۹	UR-BB1	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۱۰	UR-GH1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
۱۱	GD-BS1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
۱۲	GD-BS2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
۱۳	GD-RS1	-	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
۱۴	NV-MA1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
۱۵	NV-FK1	-	-	+	-	+	-	±	-	-	-	-	+	-	-

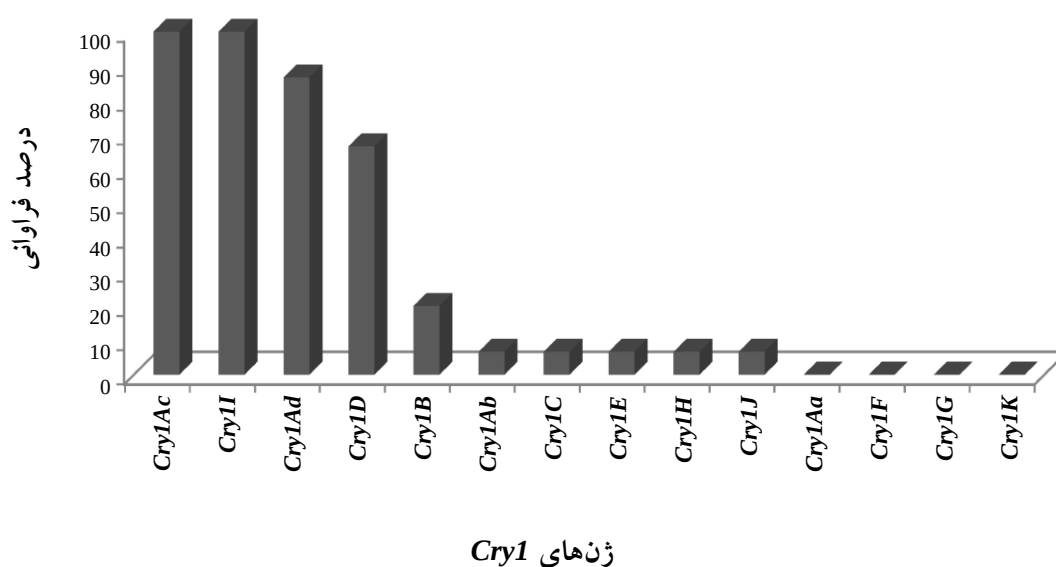
*علامه +، -، ± به ترتیب به معنی: بدون تکثیر، تکثیر ژن در اندازه مورد انتظار و تکثیر ژن در اندازه غیرقابل انتظار

**علامه AG: خاک‌های زراعی، UR: شهری، GD: باغی، NV: بدون پوشش، JR: شهرستان جویبار، BS: بابلسر، NK: نکا، NH: نوشهر، AM: آمل، BB: بابل، GH: قائم‌شهر، RS: رامسر، MA: محمودآباد و FK: فریدون‌کنار

*The marks, -, + and ± mean: no amplification, amplifying the expected fragment and amplifying unexpected fragment, respectively.

**The Isolates: AG: Crop, UR: Urban, GD: Orchard and NV: Non-Vegetation soils

JR: Juybar, BS: Babolsar, NK: Neka, NH: Nowshahr, AM: Amol, BB: Babol, GH: Ghaemshahr, RS: Ramsar, MA: Mahmoud abad, FK: Fereydunkenar



شکل ۲- فراوانی انواع ژن‌های *Cry1* در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* به‌دست آمده از نمونه‌های خاک

Figure 2- *Cry1* genes abundance in detected *Bacillus thuringiensis* isolates of soil samples

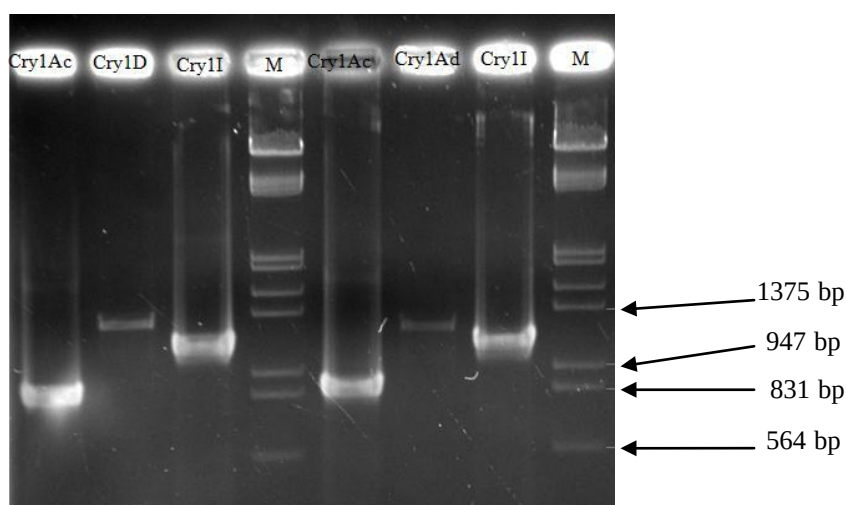
کم‌ترین فراوانی مشاهده شد (Ammoun et al., 2013). در هند نیز با بررسی سویه‌های Bt مؤثر روی حشره‌های راسته‌های بالپولکداران و سخت بالپوشان، ژن *CryII* با بیشترین فراوانی (۷/۰۵ درصد) مشاهده شد (Pooja et al., 2013). در پژوهش مشابهی در ایران از ۷۰ سویه Bt، ۳۴ سویه (۴۹ درصد) دارای ژن *CryI* بودند. ژن *CryII* (۱۰۰ درصد) دارای بیشترین فراوانی بوده و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* یافت نشدند (Seifinejad et al., 2008) که نتایج نزدیک‌تری با پژوهش حاضر داشت. همانگونه که از نتایج استنباط می‌شود محتویات ژنتیک بر خلاف شباهت‌های جزئی تفاوت‌های بسیاری با یکدیگر دارند. مقایسه این نتایج نشان دهنده آن است که نواحی جغرافیایی مختلف بر روی تنوع محتویات ژن *Cry* در سویه‌های باکتری Bt اثر می‌گذارد (Apaydin et al., 2005). در کنار آن می‌توان به نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها اشاره کرد که در طی این فرآیند تبادل ژنتیک بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نو ترکیبی با محتویات ژنتیک جدیدی می‌شود. از این رو تنوع در سویه‌های مختلف باکتری Bt و محتویات ژنوتیپی آن‌ها ممکن است به این حقیقت که بیشتر ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های آفت‌کش این باکتری روی پلازمیدهای کروموزوم اضافی قابل انتقال قرار دارد، مرتبط باشد. قرار گرفتن آن‌ها روی این پلازمید اجازه‌ی انتقالشان را طی این فرآیند بین سویه‌های سازگار می‌دهد که منجر به تولید سویه‌هایی با محتویات ژنوتیپی جدیدی از توکسین‌های مختلف می‌شود (Makhdoom, 1998). از دیگر موارد این که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده ژن *Cry1C* به طور معمولی با ژن *Cry1D* همراه بوده است و همچنین این موضوع در پژوهش (Seifinejad et al., 2008) در ایران نیز مشاهده شد. اما در این پژوهش اگرچه ۱۰ سویه دارای ژن *Cry1D* هستند ولی تنها در یک سویه با ژن *Cry1C* همراه بودند (جدول ۵). بنابراین ممکن است این پیشنهاد به اندازه‌ی کافی قابل دفاع نباشد، همچنان‌که در پژوهش‌های دیگری نیز به این موضوع اشاره شده است (Armengol et al., 2007; Martinez et al., 2005). در مقابل در پژوهش ما ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1Ad* در ۱۳ تا از ۱۵ سویه (۸۶/۶۶ درصد) همراه با هم مشاهده شده و نشان داد که این دو ژن پیوند بیشتری با یکدیگر دارند (جدول ۵).

در تونس، در میان ۷۴ سویه باسیلوس جدا شده از خاک‌های مختلف ۲۰ سویه Bt جداسازی شد (Cherif et al., 2001). در جنوب ایالات متحده مرکزی از ۴۱۳ نمونه خاک و گرد و خاک انبار حبوبات، ۲۵ سویه Bt به‌دست آمد که ۲۱ سویه آن از خاک جداسازی شده بود (Ejiofor & Johnson, 2002). در پژوهشی در ایران از ۲۲۹۲ نمونه‌ی خاکی از مزارع ۲۸ استان مختلف ایران، ۲۸۴۴۵ کلنی باسیلی شکل جدا کردند که از بین آن‌ها ۱۲۸ سویه، تولید کریستال می‌کردند (Salehi Jouzani et al., 2008). تمامی نتایج نشان دهنده آن است که در پژوهش‌های انجام شده برای ردیابی این باکتری دستاوردهای متغییری داشته است. نتیجه مشترک بیشتر پژوهش‌ها، فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی مناطق مختلف است که این مطلب در پژوهش حاضر نیز تایید شد. براساس نتایج مولکولی به‌دست آمده در پژوهش حاضر از ۱۵ سویه دارای ژن *Cry1* ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1D* و *Cry1I* دارای بیشترین فراوانی و سایر ژن‌ها با فراوانی کمتری مشاهده شدند (شکل ۲). در پژوهشی از ۱۶۳ سویه Bt جداسازی شده از انبار غلات ژن *Cry1Ab* (۴۷ درصد) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1G* (دو درصد) و *Cry1E* (یک درصد) دارای کم‌ترین فراوانی بودند (Kim et al., 1998a). همین پژوهشگران در پژوهش دیگری از ۵۸ سویه Bt جداسازی شده از خاک، ژن‌های *Cry1C* (۵۷ درصد) و *Cry1Ab* (۴۵ درصد) فراوان‌ترین ژن‌ها بودند و ژن‌های *Cry1E* و *Cry1F* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند (Kim et al., 1998b). در عربستان سعودی نیز سویه‌های باکتری Bt از خاک و اجساد لاروهای *Spodoptera littoralis* از استان مکه جداسازی شدند. در این غربالگری بر مبنای شیوه‌های مورفولوژیک و مولکولی هشت سویه Bt یافت شد که تمامی آن‌ها دارای ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry4A* و *Cry4B* و سه سویه از آن‌ها دارای ژن‌های *Vip3A* بودند که نشان دهنده قابلیت احتمالی مؤثر بودن آن‌ها روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان بود (Abulreesh et al., 2012). در کشور سوریه از ۴۰ سویه Bt جداسازی شده از لاروهای آلوده، در تمامی سویه‌ها ژن‌های *Cry1Aa* و *Cry1Ac* مشاهده شدند. پس از آن ژن‌های *CryII* (۳۷ سویه) و *Cry1Ab* (۳۴ سویه) با بیشترین فراوانی و ژن *Cry1D* (چهار سویه) با

جدول ۵- نیمرخ ژنی *Cry1* در سویه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های استان مازندران

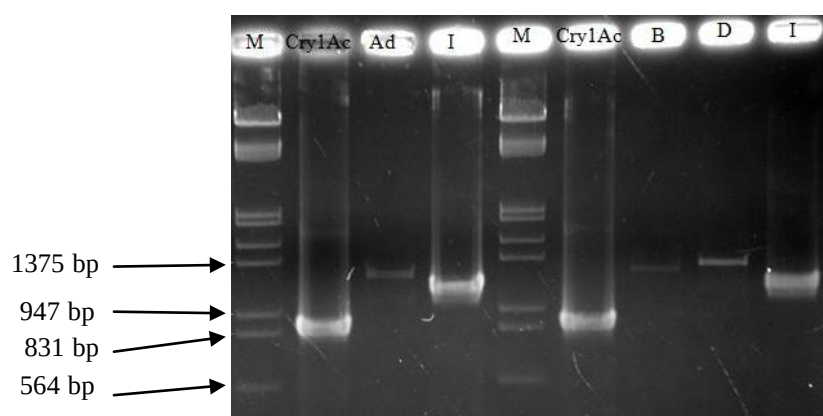
Table 5- *Cry1* gene profiles in isolated *Bacillus thuringiensis* strains from soil samples of Mazandaran province

ردیف	نیمرخ‌های ژنی	تعداد سویه	فراوانی (درصد)
1	<i>Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1H, Cry1I</i>	1	6.66
2	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1D, Cry1E, Cry1I</i>	1	6.66
3	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1D, cry1I, Cry1J</i>	1	6.66
4	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1D, Cry1I</i>	5	33.33
5	<i>Cry1Ac, Cry1B, Cry1D, Cry1I</i>	1	6.66
6	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1I</i>	5	33.33
7	<i>Cry1Ac, cry1D, Cry1I</i>	1	6.66



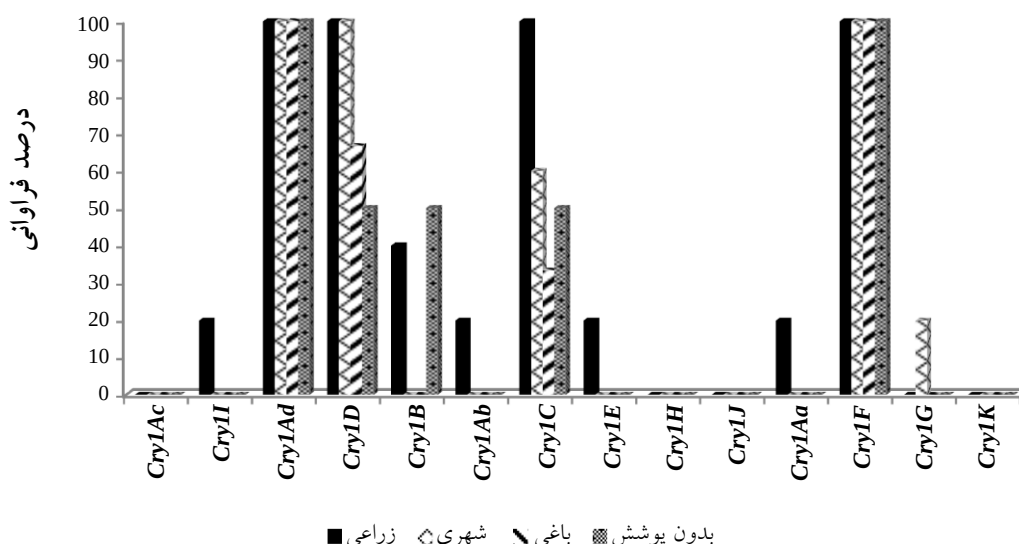
شکل ۳- نیمرخ ژنی سویه‌های *GD-BS2* (سمت راست) و *GD-RS1* (سمت چپ) (M: نشانگر مولکولی وزنی)

Figure 3- Gene profile of *GD-BS2* (right) and *GD-RS1* (left) strains (M: Molecular weight marker)



شکل ۴- نیمرخ ژنی سویه‌های *NV-FK1* (سمت راست) و *NV-MA1* (سمت چپ) (M: نشانگر مولکولی وزنی)

Figure 4- Gene profile of *NV-FK1* (right) and *NV-MA1* strains (left) (M: Molecular weight marker)



شکل ۵- توزیع ژن‌های *Cry1* اختصاصی بالپولکداران در اکوسیستم‌های مختلف

Figure 5- The Lepidopteran-specific active *Cry1* genes distribution in different ecosystems.

زیست سنجی با استفاده از این سویه‌ها روی یک یا چند آفت از خانواده بالپولکداران، توصیف دقیق‌تری از قابلیت کاربرد عملی آن‌ها در اختیار خواهد گذاشت که امید است پس از طی مراحل تکمیلی، در برنامه‌های کنترل میکروبی و مدیریت مقاومت آفت‌ها در آینده مورد استفاده قرار گیرند.

در این پژوهش ۴۹۱ سویه باکتری باسیلی شکل از خاک‌های چهار نوع زیست بوم مختلف جداسازی شد که ۲۳ درصد (۱۱۳ سویه) آن‌ها تولید پروتئین‌های کریستال می‌کردند.

امروزه در سراسر جهان مجموعه‌های بزرگی از سویه‌های Bt نگهداری می‌شود. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt نشان داد که ۲۰ تا ۹۶ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به‌صورت تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده کریستال بودند (Travers et al., 1987). در پژوهشی دیگر برای جداسازی باکتری Bt، از ۵۳۰ نمونه از خاک‌های مناطق مختلف در کره جنوبی ۵۸ سویه Bt جداسازی کردند (Kim et al., 1998b).

در تونس، در میان ۷۴ سویه باسیلوس جدا شده از خاک‌های مختلف ۲۰ سویه Bt جداسازی شد (Cherif et al., 2001). در جنوب ایالات متحده مرکزی از ۴۱۳ نمونه خاک و گرد و خاک انبار حبوبات، ۲۵ سویه Bt به‌دست آمد که ۲۱ سویه آن از خاک

در این پژوهش براساس شاخص‌های میکروسکوپی بیشترین تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال در خاک‌های باغ (۲۹ درصد) و کم‌ترین آن در خاک‌های بدون پوشش گیاهی (۱۷ درصد) مشاهده شد. براساس شاخص‌های مولکولی بیشترین تعداد و تنوع از زیر گروه‌های ژنی *Cry1* در خاک‌های زراعی و کم‌ترین تعداد سویه دارای این ژن نیز همچنان در خاک‌های بدون پوشش مشاهده شد. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که خاک‌های باغی و زراعی به دلیل برخورداری از پوشش گیاهی و در پی آن تنوع زیستی مناسب برای حشرات و میکروارگانیسم‌های خاک و در نتیجه فراوانی میزبانی بیشتر برای این باکتری، منبع مناسب‌تری برای جداسازی باکتری Bt پیشنهاد می‌شوند.

نتیجه مشترک بین مشاهده‌های میکروسکوپی و مولکولی نشان داد که خاک‌های بدون پوشش گیاهی نتایج رضایت‌بخشی را در رابطه با وجود این باکتری در خاک‌های این نوع از زیست بوم از خود نشان نداده است و به‌عنوان منبعی مناسب برای جداسازی این باکتری پیشنهاد نمی‌شود.

علاوه بر این وجود چندین نیم‌رخ ژنی در این ۱۵ سویه (بین سه تا هشت زیر مجموعه مربوط به *Cry1*) و همچنین وجود ژن‌های بومی در این سویه‌ها نشان دهنده قابلیت مناسب آن‌ها به‌عنوان یک آفت‌کش زیست بومی است. در ادامه انجام آزمایش‌های

جداسازی شده بود (Ejiofor & Johnson, 2002).

در پژوهشی در ایران از ۲۲۹۲ نمونه‌ی خاکی از مزارع ۲۸ استان مختلف ایران، ۲۸۴۴۵ کلنی باسیلی شکل جدا کردند که از بین آن‌ها ۱۲۸ سویه، تولید کریستال می‌کردند (Salehi Jouzani et al., 2008).

تمامی نتایج نشان دهنده آن است که در پژوهش‌های انجام شده برای ردیابی این باکتری دستاوردهای متغیری داشته است. نتیجه مشترک بیشتر پژوهش‌ها، فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی مناطق مختلف است که این مطلب در پژوهش حاضر نیز تایید شد.

براساس نتایج مولکولی به‌دست آمده در پژوهش حاضر از ۱۵ سویه دارای ژن *Cry1*، ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1I*، *Cry1Ad* و *Cry1D* دارای بیشترین فراوانی و سایر ژن‌ها با فراوانی کمتری مشاهده شدند (شکل ۲).

در پژوهشی از ۱۶۳ سویه *Bt* جداسازی شده از انبار غلات ژن *Cry1Ab* (۴۷ درصد) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1G* (دو درصد) و *Cry1E* (یک درصد) دارای کم‌ترین فراوانی بودند (Kim et al., 1998a). همین پژوهشگران در پژوهش دیگری از ۵۸ سویه *Bt* جداسازی شده از خاک، ژن‌های *Cry1C* (۵۷ درصد) و *Cry1Ab* (۴۵ درصد) فراوان‌ترین ژن‌ها بودند و ژن‌های *Cry1E* و *Cry1F* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند (Kim et al., 1998b). در عربستان سعودی نیز سویه‌های باکتری *Bt* از خاک و اجساد لاروهای *Spodoptera littoralis* از استان مکه جداسازی شدند. در این غربالگری بر مبنای شیوه‌های مورفولوژیک و مولکولی هشت سویه *Bt* یافت شد که تمامی آن‌ها دارای ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry4A* و *Cry4B* و سه سویه از آن‌ها دارای ژن‌های *Vip3A* بودند که نشان دهنده قابلیت احتمالی مؤثر بودن آن‌ها روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان بود (Abulreesh et al., 2012). در کشور سوریه از ۴۰ سویه *Bt* جداسازی شده از لاروهای آلوده، در تمامی سویه‌ها ژن‌های *Cry1Aa* و *Cry1Ac* مشاهده شدند. پس از آن ژن‌های *Cry1I* (۳۷ سویه) و *Cry1Ab* (۳۴ سویه) با بیشترین فراوانی و ژن *Cry1D* (چهارسویه) با کم‌ترین فراوانی مشاهده شد (Ammoun et al., 2013). در هند نیز با بررسی سویه‌های *Bt* مؤثر روی حشرات راسته‌های

بالپولکداران و سخت‌بالپوشان، ژن *Cry1I* با بیشترین فراوانی (۷/۰۵ درصد) مشاهده شد (Pooja et al., 2013).

در پژوهش مشابهی در ایران از ۷۰ سویه *Bt*، ۳۴ سویه (۴۹ درصد) دارای ژن *Cry1* بودند. ژن *Cry1I* (۱۰۰ درصد) دارای بیشترین فراوانی بوده و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* یافت نشدند (Seifinejad et al., 2008) که نتایج نزدیک‌تری با پژوهش حاضر داشت.

همانگونه که از نتایج استنباط می‌شود، محتویات ژنتیک بر خلاف شباهت‌های جزئی تفاوت‌های بسیاری با یکدیگر دارند. مقایسه این نتایج نشان دهنده آن است که نواحی جغرافیایی مختلف بر روی تنوع محتویات ژن *Cry* در سویه‌های باکتری *Bt* اثر می‌گذارد (Apaydin et al., 2005). در کنار آن می‌توان به نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها اشاره کرد که در طی این فرآیند تبادل ژنتیک بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نو ترکیبی با محتویات ژنتیک جدیدی می‌شود. از این رو تنوع در سویه‌های مختلف باکتری *Bt* و محتویات ژنوتیپی آن‌ها ممکن است به این حقیقت که بیشتر ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های آفت‌کش این باکتری روی پلازمیدهای کروموزوم اضافی قابل انتقال قرار دارد، مرتبط باشد. قرار گرفتن آن‌ها روی این پلازمید اجازه‌ی انتقالشان را طی این فرآیند بین سویه‌های سازگار می‌دهد که منجر به تولید سویه‌هایی با محتویات ژنوتیپی جدیدی از توکسین‌های مختلف می‌شود (Makhdoom, 1998).

از موارد دیگر این است که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده ژن *Cry1C* به طور معمول با ژن *Cry1D* همراه بوده است و همچنین این موضوع در پژوهش (Seifinejad et al., 2008) در ایران نیز مشاهده شد. اما در این پژوهش اگرچه ده سویه دارای ژن *Cry1D* هستند ولی تنها در یک سویه با ژن *Cry1C* همراه بودند (جدول ۵). بنابراین ممکن است این پیشنهاد به اندازه‌ی کافی قابل دفاع نباشد، همچنان‌که در پژوهش‌های دیگری نیز به این موضوع اشاره شده است (Armengol et al., 2007; Martinez et al., 2005). در مقابل در پژوهش ما ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1Ad* در ۱۳ تا از ۱۵ سویه (۸۶/۶۶ درصد) همراه با هم مشاهده شده و نشان داد که این دو ژن پیوند بیشتری با یکدیگر دارند (جدول ۵).

که خاک‌های بدون پوشش گیاهی نتایج رضایت‌بخشی را در رابطه با وجود این باکتری در خاک‌های این نوع از زیست بوم از خود نشان نداده است و به‌عنوان منبعی مناسب برای جداسازی این باکتری پیشنهاد نمی‌شود.

علاوه بر این وجود چندین نیمرخ ژنی در این ۱۵ سویه (بین سه تا هشت زیر مجموعه مربوط به *Cry1*) و همچنین وجود ژن‌های بومی در این سویه‌ها نشان دهنده قابلیت مناسب آن‌ها به‌عنوان یک آفت‌کش زیستی بومی است. در ادامه انجام آزمایش‌های زیست سنجی با استفاده از این سویه‌ها روی یک یا چند آفت از خانواده بالپولکداران، توصیف دقیق‌تری از قابلیت کاربرد عملی آن‌ها در اختیار خواهد گذاشت که امید است پس از طی مراحل تکمیلی، در برنامه‌های کنترل میکروبی و مدیریت مقاومت آفت‌ها در آینده مورد استفاده قرار گیرند.

در این پژوهش براساس شاخص‌های میکروسکوپی بیشترین تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال در خاک‌های باغ (۲۹ درصد) و کم‌ترین آن در خاک‌های بدون پوشش گیاهی (۱۷ درصد) مشاهده شد. براساس شاخص‌های مولکولی بیشترین تعداد و تنوع از زیر گروه‌های ژنی *Cry1* در خاک‌های زراعی و کم‌ترین تعداد سویه دارای این ژن نیز همچنان در خاک‌های بدون پوشش مشاهده شد.

بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که خاک‌های باغی و زراعی به دلیل برخورداری از پوشش‌های گیاهی و در پی آن تنوع زیستی مناسب برای حشره‌ها و میکروارگانیسم‌های خاک و در نتیجه فراوانی میزبانی بیشتر برای این باکتری، منبع مناسب‌تری برای جداسازی باکتری Bt پیشنهاد می‌شوند.

نتیجه مشترک بین مشاهدات میکروسکوپی و مولکولی نشان داد

منابع

Abulresh, H. H, Osman, G. E. H and Assaedi, A. S. A. 2012. Characterization of Insecticidal Genes of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Arid Environments. *Indian Journal of Microbiology* 52: 500-503.

Ammoun, H, Ismail, H, Al-bedda, A, Abou Baker, N and Harba, M. 2013. Characterization of lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from infected larvae. *Biocontrol Science and Technology* 23: 607-623.

Apaydin, O, Cinar, C, Turanli, F, Harsa, S and Gunes, H. 2008. Identification and bioactivity of native strains of *Bacillus thuringiensis* from grain-related habitats in Turkey. *Biological Control* 45: 21-28.

Apaydin, O, Yenidunya, A. F, Harsa, S and Gunes, H. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 285-292.

Aramideh, S, Saferalizadeh, M. H, Pourmirza, A. A, Rezazadeh Bari, M, Keshavarzi, M and Mohseniazar, M. 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1224-1229.

Armengol, G., Escobar, M. C., Maldonado, M. E. and Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against Dipteran and Lepidopteran insects. *Journal of Applied Microbiology* 102: 77-88.

Cherif, A, Ouzari, H, Daffonchio, D, Cherif, H, Ben Slama, K, Hassen, A, Jaoua, S and Boudabous, A.

2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 32: 243-247.

Crickmore, N, Zeigler, D. R, Feitelson, J, Schnepf, E, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813.

Ejiofor, A. O and Johnson, T. 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28: 284-290.

Hofte, H and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53: 242-255.

Kaelin, P, Morel, P and Gadani, F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma sericome* (F.). *Applied and Environmental Microbiology* 60: 19-25.

Kaur, S. 2006. Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 233-253.

Kim, H. S, Lee, D. W, Woo, S. D, Yu, Y. M and Kang, S. K. 1998a. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from granary in Korea. *Current Microbiology* 37: 52-57.

Kim, H. S, Lee, D. W, Woo, S. D, Yu, Y. M and Kang, S. K. 1998b. Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Current*

Microbiology 37: 195-200.

Makhdoom, R. 1998. Cloning and sequencing of the delta endotoxin gene from locally isolated *Bacillus thuringiensis* toxic against spotted bollworm. Ph. D. Thesis, University of the Punjab, 160 p.

Martinez, C, Ibarra, J. E and Caballero, P. 2005. Association analysis between serotype, *cry* gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 91-97.

Martinez, C, Porcar, M, Lopez, A, Escudero, I. R, Perez-Liarena, F. J and Caballero, P. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against Lepidopteran insects. Entomologia Experimentalis et Applicata 111: 71-77.

Neema, P. M, Girija, D, Aparna, C and Firoz, P. M. 2010. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* from the Western Ghats of Kerala. Asian Journal of BioScience 4: 278-285.

Obeidat, M, Hassawi, D and Ghabeish, I. 2004. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller. African Journal of Biotechnology 3: 622-626.

Pooja, A. S, Krishnaraj, P. U and Prashanthi, S. K. 2013. Profile of *cry* from native *Bacillus thuringiensis*

isolates and expression of *cry1I*. African Journal of Biotechnology 12: 3545-3562.

Rolle, R. L. 2004. Proteinacious and genomic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates collected in the Tennessee geographical region. Ph. D. thesis, Tennessee State University, 302 p.

Rolle, R. L, Ejiofor, A. O and Johnson, T. L. 2005. Determination of the plasmid size and location of δ -endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. African Journal of Biotechnology 4: 580-585.

Salehi Jouzani, G, Pourjan Abad, A, Seifinejad, A, Marzban, R, Kariman, K and Maleki, B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from diverent ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 83-94.

Seifinejad, A, Salehi Jouzani, G. R, Hosseinzadeh, A and Abdmishani, C. 2008. Charactrization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological Control 44: 216-226.

Travers, R. S, Martin, P. A. W and Reichelderfer, C. F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* Applied and Environmental Microbiology 53: 1263-1266.

بررسی ساختار جایگاه تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی

Study of *cry1Ab* transgene locus structure in transgenic rice (*Oryza sativa* L., cultivar Tarom Molaii)

هاجر یحیائی پور^۱، بهزاد قره یازی^{۲*}، سیداحمد سادات نوری^۳، علی ایزدی دربندی^۴ و قربانعلی نعمت زاده^۵

Hajar Yahyaiipoor¹, Behzad Ghareyazie^{2*}, S.Ahmad Sadatnoori³, Ali Izadi Darbandi⁴ and Ghorban Ali Nemat Zade⁵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- استاد گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۴- دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۵- استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1- M.Sc, plant breeding, College of Aburaihan, University of Tehran.

2- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

5- Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ghareyazie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

واژه‌های کلیدی

ردیف مجاور تراژن

ایمنی زیستی

برنج تراریخته

cry1Ab

میزان بیان تراژن و پایداری آن تحت تأثیر عواملی مثل ساختار کاست بیانی، الگوی تلفیق و ساختار جایگاه تراژن قرار می‌گیرد. ساختار جایگاه تراژن در سازوکارهای بیان آن اهمیت دارد. در این بررسی سعی شده است با جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن مشخص شود. برنج تراریخته طارم مولایی که از تراریزش همزمان دو پلاسمید pCIB4421 و pChitIHygII تولید شده دارای الگوی تلفیق ساده با بیان پایدار طی چندین نسل است. جهت بررسی ساختار جایگاه تراژن، ابتدا با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از انتهای ۳' و ۵' ژن مقاومت به امپی‌سیلین، انتهای ۳' ژن *cry1Ab* و انتهای ۵' پیشبر PEPC بر روی پلاسمید pCIB4421 و انجام پی.سی.آر، حدود محل شکست پلاسمید تعیین شد. سپس با توجه به محل احتمالی شکست برای جداسازی نواحی مجاور آن از دو راهبرد پی.سی.آر یکطرفه شامل TAIL-PCR و Splinkerette PCR استفاده شد. ردیف یابی قطعات تکثیر شده و بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که محل شکست در نسخه‌ی کامل ۱۴۸ نوکلئوتید بعد از انتهای ۳' ژن مقاومت به امپی‌سیلین است و ۱۴۹۶ نوکلئوتید از نواحی پایین دست محل شکست و ۳۱۱ نوکلئوتید از نواحی بالا دست جداسازی شد. نتایج همردیف سازی این توالی‌ها با توالی پلاسمیدهای pCIB4421 و pChitIHygII و ژنوم برنج در پایگاه NCBI نشان داد که توالی پایین دست مخلوطی از قطعات پلاسمید و ژنوم برنج و توالی بالا دست نیز قطعات ناپیوسته‌ای از توالی پلاسمیدهای منتقل شده است.

مقدمه

بیان پایدار تراژن لازمه کاربرد موفق مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاهان زراعی است. پژوهش‌ها نشان داده است که میزان و پایداری بیان تراژن تحت تأثیر عواملی مثل ساختار (configuration) کاست بیانی، تعداد نسخه تلفیق شده از تراژن، موقعیت و الگوی تلفیق تراژن قرار می‌گیرد (Day et al.2000; Zhong 2001; Kohli et al.2003; Li et al.2008). اختلاف سطوح بیان تراژن در یک جمعیت از گیاهان تراریخته حاصل از یک آزمایش مشابه در هر دو سیستم متداول انتقال ژن (بمباران ذره‌ای و انتقال به کمک اگروباکتریوم) رخدادی معمول است (Day et al.2000). پژوهشگران باید جمعیت بزرگی از گیاهان تراریخته را به دقت غربال کنند تا یک یا تعداد کمی گیاه که تنها صفت مورد نظر را در سطحی قابل قبول بیان می‌کند انتخاب کنند. همچنین تراژن ممکن است طی نسل‌های بعدی و یا تحت تأثیر شرایط محیطی خاموش شود (Zhong 2001). بنابراین شناسایی و حذف تراریخته‌هایی با بیان ناپایدار مرحله‌ای ضروری در پروژه انتقال ژن است (Kohli et al.2003) خصوصیات دی.ان.ای ژنومی مجاور تراژن می‌تواند روی بیان آن اثر بگذارد. بررسی‌ها بر روی پتونیا و توتون تراریخته نشان داد وجود توالی‌های پروکاریوتی، ریزوماهواره‌های غنی از GA، بقایای رتروالمنت و توالی‌های تکراری پشت سر هم (tandem repeat array) در توالی ژنومی مجاور، عناصر اولیه در خاموشی تراژن هستند (Pröls and Meyer 1992; Iglesias 1997). در مقابل حضور MARها (Matrix attachment regions) در مجاورت جایگاه تراژن (Transgene locus) با برخی تلفیق‌های دارای بیان پایدار مرتبط بود (Iglesias et al.1997). تجزیه مولکولی ساختار محل تلفیق در برنج‌های تراریخته تولید شده به روش زیست پرتابی (بیولیستیک) (biolistic) نشان داد که توالی‌های غنی از AT و تکرارهای تلومریک در مجاورت جایگاه‌های دارای بیان پایدار وجود دارد (Takano et al.1997). علاوه بر توالی‌های ژنومی مجاور محل تلفیق، ساختار جایگاه تراژن و الگوی تلفیق آن نیز در کمیت و پایداری بیان آن مؤثر هستند (Kohli et al.2003). هم در انتقال مستقیم ژن و هم انتقال به کمک اگروباکتریوم، جایگاه‌های تراژن تولید شده در تراریخته‌های حاصل از یک آزمایش مشابه، از نظر اندازه و

پیچیدگی متفاوت هستند. ساختار جایگاه به‌ویژه در انتقال مستقیم از یک نسخه‌ی کامل تا الگوهای پیچیده‌ای شامل چندین نسخه کامل، تکرارهای پشت سر هم و یا معکوس، توالی‌های کوتاه شده و یا بازآرایی شده و قطعات ژنومی میزبان پراکنده، متغیر است (Pawlowski et al.1998). مشاهده شده است به‌طور معمول جایگاه‌هایی با ساختار ساده بیان پایداری دارند، هر چه سازماندهی ساختار جایگاه پیچیده‌تر باشد احتمال بیان مطلوب آن طی نسل‌های آینده کاهش می‌یابد (Svitashev et al.2002). ساختار جایگاه تراژن ممکن است از طرق مختلف مانند خاموشی وابسته به همولوژی، تحریک متیلاسیون خود بخودی و تولید آر.ان.ای همسو و غیرهمسوی ناقص (Aberrant RNA) منجر به خاموشی تراژن شود. تجزیه ساختار جایگاه در لاین‌های آرابیدوپسیس و برنج تراریخته تولید شده به روش زیست پرتابی به وضوح نشان داد که مکان‌هایی شامل ساختارهای داخلی پیچیده مستعد خاموشی مبتنی بر متیلاسیون در اثر وجود توالی‌های تکراری مشابه هستند (Assaad et al.1993; Kumpatla and Hall 1999). بررسی ساختار جایگاه تراژن و سازماندهی آن به درک ساز و کارهای تلفیق تراژن کمک خواهد کرد (Kohli et al.2003) و درک کامل این ساز و کارها، دانش لازم جهت مدیریت ساختار جایگاه تراژن برای تولید مکان‌های تراژن ساده و کامل و سرانجام تلفیق مستقیم تراژن در مکان مورد نظر را فراهم می‌آورد (Svitashev et al.2004; Somers and Makarevitch 2004). در این بررسی سعی شده است تا با جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن به‌عنوان یک جایگاه دارای الگوی تلفیق ساده با بیان پایدار و عملکرد عالی طی چندین نسل مشخص شود. این برنج تراریخته به روش زیست پرتابی و با انتقال همزمان دو پلاسمید pCIB4421 ناقل ژن *cry1Ab* و پلاسمید pChitIHygII ناقل ژن نشانگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز تولید شد. تجزیه سادرین این گیاه نشان دهنده الگوی تلفیق ساده و بررسی نحوه‌ی توارث ژن *cry1Ab* در نسل T1 و T2 بیانگر وجود تنها یک جایگاه از این ژن در آن است (Ghareyazie et al.1997). همچنین اثرهای تلفیق تراژن بر روی ژن‌های میزبان نیز یکی از ملاحظه‌های مطرح شده در مورد گیاهان تراریخته است.

تراژن وارد شده نباید روی بیان ژنهای میزبان اثر منفی داشته باشد، چون جایگاه تلفیق تراژن در روشهای رایج امروزی نمی تواند از قبل تعیین شود و از آنجا که تلفیقهای پایدار و مطلوب در نواحی غنی از ژن رخ می دهند این ملاحظه ابراز شده که ممکن است در نتیجه ورود تراژن برخی ژنهای داخلی میزبان تخریب شده باشند. بنابراین تعیین جایگاه دقیق تلفیق، امکان شناسایی اثرهای ناشی از ورود تراژن بر روی ژنهای میزبان را نیز فراهم می آورد.

مواد و روشها

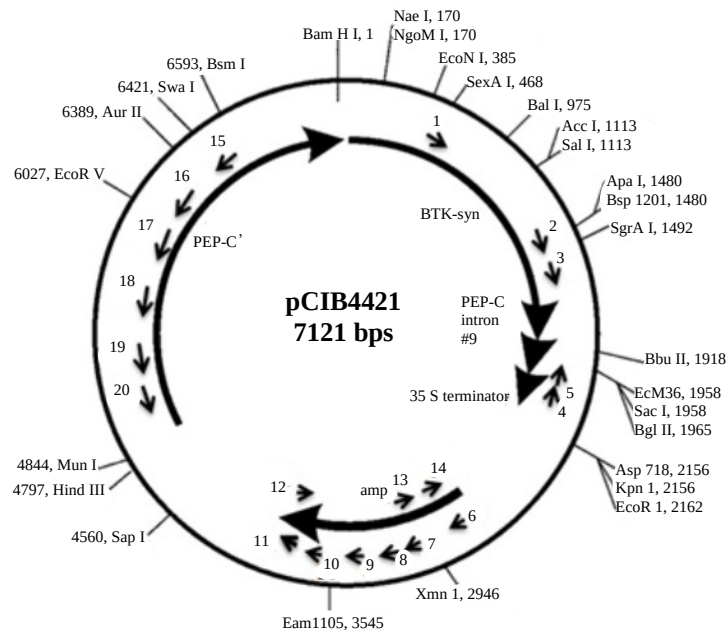
استخراج دی.ان.ا و تعیین حدود محل وقوع نوترکیبی بین پلاسמיד pCIB4421 با ژنوم برنج دی.ان.ای ژنومی از بافت برگ گیاهان تراریخته و شاهد به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد و به منظور تعیین محل

شکست پلاسמיד از پی.سی.آر استاندارد با الگوی دی.ان.ای پلاسמיד pCIB4421 و گیاه تراریخته و مقایسه الگوهای بانندی به دست آمده استفاده شد. برای انجام پی.سی.آر آغازگرهایی از انتهای ۳' ژن *cryIAb* (Bt)، انتهای ۳' و ۵' ژن مقاومت به امپی سیلین (*amp*) و انتهای ۵' پیشبر PEPC طراحی شد (شکل ۱). توالی آغازگرها در جدول یک آورده شده است. برنامه پی.سی.آر شامل واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای مناسب بسته به دمای ذوب دو آغازگر مورد استفاده و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بازای هر یک کیلو جفت باز از اندازه محصول مورد نظر و در ادامه بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه (یک چرخه) بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1- sequences of primers used in this study

شماره آغازگر در شکل ۱	توالی sequence	شماره آغازگر در شکل ۱	توالی sequence
1	GGCGGCGAGAGGATCGAGAC Forward	13	CCGCTGTTGAGATCCAGTTC Reverse
2	ACCCCTTCAACTTCAGCAAC Forward	14	CACCCAAGTATCTTCAGCA Reverse
3	GCAACGAGGTGTACATCGAC Forward	15	GAAGAGAGAGGTGGATTTGG Reverse
4	AAACCAGCAACTCACTGCAC Reverse	16	CCTATCCACTCTGCTATGTGTTT Reverse
5	TGGTTCCTGATCGATGACTG Reverse	17	GTTCTTGCAAGTTGATCTATTCCAG Reverse
6	GCCTTCCTGTTTTTGCTCAC Forward	18	GGTCTGTTTGTCTGTTTTCTCTG Reverse
7	GCTTTTTTGCACACATGGGGG Forward	19	GTTTACAGTGGATAAAGTACAAACAG Reverse
8	TGAATGAAGCCATACCAAACGAC Forward	20	CTCACAACAGTTTGAAGTAAACGAC Reverse
9	CAATTAATAGACTGGATGGAGGC Forward	-	(A/T/ C/G)TCGA(C/G)T(A/T)T(C/G)G(A/T)GTT AD1
10	GATAAATCTGGAGCCGGTGAG Forward	-	(A/T/C/G)GTCGA(C/G)(A/T)GA(A/T/C/G)A(A/T)GAA AD2
11	ATGGTAAGCCCTCCCGTATC Forward	-	(A/T)GTG(A/T/C/G)AG(A/T)A(A/T/C/G)CA(A/T/C/G)GA AD3
12	ATACGGGAGGGCTTACCATC Reverse		



شکل ۱- موقعیت تقریبی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر بر روی پلاسمید pCIB4421

Figure 1- relative position of primers used in this study on plasmid pCIB4421

مرحله اول بود به جز آغازگر اختصاصی و الگوی واکنش، که از آغازگرهای داخلی (۷ و ۸) یا (۱۷ و ۱۸) در شکل ۱ به ترتیب در مرحله دو و سه استفاده شد و محصول مرحله اول پس از این که ۵۰ برابر رقیق شد به عنوان الگو در واکنش مرحله دوم مورد استفاده قرار گرفت و به همین ترتیب محصول مرحله دو به عنوان الگو در واکنش مرحله سه استفاده شد. برنامه زمانی مورد استفاده در هر سه مرحله براساس مقاله لیو و همکاران (Liu et al.1995) بود. برای تفکیک محصول پی.سی.آر از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد و محصول مرحله دوم و سوم در کنار هم بارگذاری شد.

روش انجام Splinkerette PCR

مراحل انجام این روش شامل اتصال الیگونوکلوئوتیدهای سازگار ساز، هضم آنزیمی، اتصال سازگار ساز به قطعات دی.ان.ای ژنومی، واکنش تکثیر مرحله اول و واکنش تکثیر مرحله دوم بود. تمامی این مراحل براساس دستورالعمل مقاله پاتر و لو (Potter and Lou 2010) انجام شد. توالی رشته‌های سازگار ساز و آغازگرهای ویژه سازگار ساز نیز از همین منبع انتخاب شد (شکل دو). آنزیم‌های برشی مورد استفاده شامل *Hind III* و *EcoR I* بود که هر یک از این آنزیم‌ها دارای یک جایگاه شناسایی

تکثیر نواحی مجاور محل تلفیق

برای جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق از دو روش پی.سی.آر یک طرفه شامل TAIL-PCR (پی.سی.آر ترکیبی نامتقارن دمایی Thermal Asymmetric Interlaced PCR) و Splinkerette PCR استفاده شد.

روش انجام TAIL-PCR

برای انجام TAIL-PCR از دو طرف ناحیه احتمالی محل ادغام پلاسمید سه آغازگر اختصاصی به صورت داخلی طراحی شد، این آغازگرها بر روی شکل یک با شماره‌های (۷، ۸ و ۹) و (۱۶، ۱۷ و ۱۸) نشان داده شده است. آغازگرهای تصادفی اختیاری (AD3، AD2 and AD1) براساس مقاله لیو و همکاران (Liu et al.1995) انتخاب شد و توالی آن‌ها در جدول یک آورده شده است. واکنش TAIL-PCR طی سه مرحله انجام شد. مخلوط واکنش مرحله اول شامل بافر پی.سی.آر با غلظت نهایی ۱x، ۱/۵ میلی-مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی-مولار مخلوط dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر اختصاصی خارجی (۷ یا ۱۹ در شکل ۱)، ۲/۵ میکرومولار از یکی از آغازگرهای AD، یک واحد آنزیم دی.ان.ای پلیمرز Taq (سیناژن) و ۲۰ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. اجزای واکنش مرحله دوم و سوم مانند

(۱۴) در هضم با آنزیم *Bgl* II، آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در هضم با آنزیم *Hind* III و آغازگرهای (۲ و ۳) و (۱۳ و ۱۴) در هضم با آنزیم *EcoR* I به عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از صحت انجام واکنش استفاده شد. فاصله این آغازگرها تا محل شناسایی آنزیم‌های برشی مورد استفاده مشخص بود.

بر روی پلاسمید pCIB4421 بودند (شکل ۱). دو آغازگر اختصاصی به صورت داخلی از دو سمت ناحیه احتمالی ادغام پلاسمید طراحی شد. از آغازگرهای (۱۰ و ۱۱) در جدا سازی توالی مجاور ۳' و از آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در تکثیر ناحیه مجاور ۵' کاست ژنی *cry1Ab* استفاده شد. از آغازگرهای (۱۳ و ۱۴)

رشته بالایی سازگار

5-GATCCCACTAGTGTGCGACACCAGTCTC

3-GGTGATCACAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGTGCCAGAGGATCGTTGCCAATGAGAAGC-5

رشته پایینی سازگار

3-CCAGAGAGGATCGTTGCCAATGAGAAGC-5

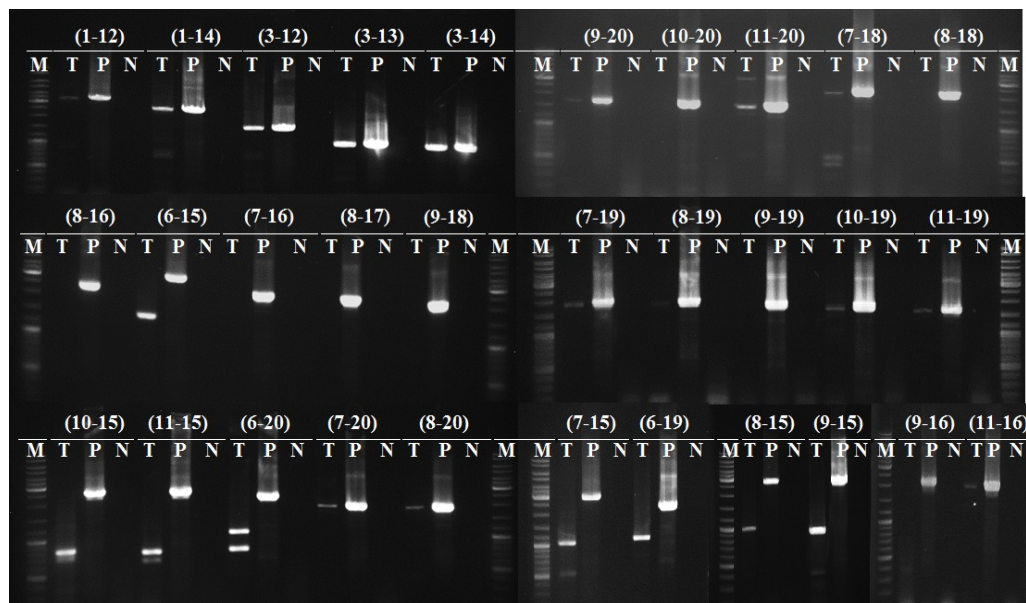
3-CAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGTG-5

آغازگر ۲

آغازگر ۱

شکل ۲- ساختار و توالی واحد Splinkerette و آغازگرهای ویژه آن (Potter and Lou 2010)

Figure 2- structure and sequence of Splinkerette unit and sequence of its specific primers



شکل ۳- الگوی تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و مقاومت به امپی سیلین و ناحیه بین ژن مقاومت به امپی سیلین و پیشبر PEPC، (T) گیاه تراریخته، (P) پلاسمید pCIB4421، (N) گیاه غیر تراریخته، (M) ladder mix از شرکت Fermentas، اعداد داخل پرانتز ترکیب آغازگری مورد استفاده را نشان می‌دهد. شماره آغازگرها مطابق شکل ۱ است.

Figure 3- amplification pattern of the region between the *cry1Ab* and *ampR* genes and between the *ampR* and PEPC, (T) transgenic plant, (P) pCIB4421 plasmid, (N) non-transgenic plant, (M) ladder mix (Fermentas). Numbers. in parentheses indicate the primer combinations. primers are numbered according to Figure 1.

توالی‌ها با توالی پلاسمیدهای pCIB4421، pChitIHygII و توالی ژنوم برنج با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) انجام شد.

نتایج و بحث

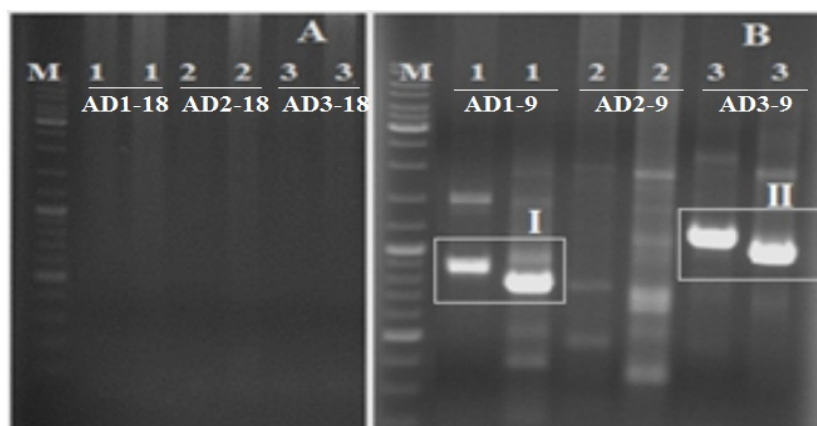
تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و امپی‌سیلین روی پلاسمید و گیاه تراریخته با استفاده از پنج ترکیب آغازگری انجام شد و در همه‌ی موارد اندازه قطعات تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه تراریخته به طور کامل یکسان و مطابق با فاصله بین دو آغازگر پیشرو و برگشتی مورد استفاده بر روی پلاسمید بود (شکل ۳). این مشاهده بیانگر آن بود که حداقل یک نسخه سالم از این قسمت از پلاسمید به گیاه منتقل شده است. تکثیر ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC با استفاده از ۲۶ ترکیب آغازگری انجام شد. در ده مورد طول قطعه تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه یکسان بود، در هشت مورد اندازه قطعات تکثیر شده روی گیاه تراریخته کوچک‌تر از اندازه مورد نظر بود و در هشت مورد دیگر این ناحیه بر روی گیاه تراریخته تکثیر نشد (شکل ۳). براساس تفاوت الگوی تکثیر بر روی پلاسمید و گیاه در ناحیه اخیر، نتیجه‌گیری شد که محل وقوع نوترکیبی بین پلاسمید و گیاه نقطه‌ای در این ناحیه یعنی بین ناحیه رمز کننده ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC باشد.

در جدا سازی توالی‌های مجاور ۳ محل شکست پلاسمید دو تکثیر صحیح حاصل از آغازگرهای (AD1-9) و (AD3-9) با اندازه‌های ۷۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز (به ترتیب شماره I و II در شکل چهار) به دست آمد. این قعات ردیف‌یابی شد و هم‌ردیف سازی آن‌ها با توالی پلاسمیدهای منتقل شده و ژنوم برنج انجام شد. با طراحی آغازگر از انتهای توالی حاصل از (AD3-9) و تکثیر مجدد ردیف‌های کناری با روش TAIL-PCR، ۹۰۰ نوکلئوتید در ادامه توالی قبلی ردیف‌یابی شد.

در جدا سازی نواحی مجاور ۵ کاست ژنی *cry1Ab* از ترکیب آغازگر ۱۸ با آغازگرهای AD تکثیری حاصل نشد که علت آن می‌تواند این باشد که هیچ یک از آغازگرهای AD مورد استفاده در فاصله قابل تکثیر با آغازگر اختصاصی قرار نگرفتند.

روش انجام پی.سی.آر معکوس ((I-PCR (Inverse PCR) آنزیم *Bgl* II برای این قسمت انتخاب شد و با توجه به جایگاه شناسایی این آنزیم بر روی پلاسمید (شکل ۱) و ناحیه احتمالی ادغام پلاسمید از آغازگرهای (۴ و ۵)، (۱۰ و ۱۱)، (۲ و ۳) و (۱۹ و ۲۰)، در واکنش‌های تکثیر اول و دوم استفاده شد. مقدار ۵ میکروگرم از دی.ان.ای ژنومی با ۳۰ واحد آنزیم برشی در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس برای اتصال درون مولکولی مقدار ۵۰ نانوگرم از دی.ان.ای هضم شده با ۵ واحد آنزیم T4 دی.ان.ای لیگاز (Fermentas) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ده دقیقه در ۲۲ درجه نگهداری شد و واکنش در ۷۰ درجه به مدت پنج دقیقه متوقف شد. در پی.سی.آر مرحله اول از ترکیب آغازگرهای خارجی (۱۰-۴) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۳' و (۱۹-۲) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۵' استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر پی.سی.آر با غلظت نهایی ۱x، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، ۱ واحد آنزیم دی.ان.ای پلیمراز Taq (سیناژن) و ۲۰ نانوگرم از دی.ان.ای حلقوی شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. پی.سی.آر طبق برنامه پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و در ادامه ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه (برای هر دو ترکیب آغازگرها) و چهار دقیقه در ۷۲ درجه و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه (یک چرخه) بود. یک میکرولیتر از محصول مرحله اول به عنوان الگو در واکنش مرحله دوم استفاده شد. برنامه‌ی زمانی پی.سی.آر و اجزای واکنش در این مرحله به جز آغازگرها مانند مرحله اول بود. ترکیب آغازگرهای داخلی (۲۰-۳) و (۱۱-۵) در این مرحله به ترتیب جایگزین ترکیبات (۱۹-۲) و (۱۰-۴) مورد استفاده در مرحله اول شدند.

جدا سازی و خالص سازی قطعات انتخاب شده از روی ژل با استفاده از کیت خالص سازی high pure PCR product purification (Roche Applied Science, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و پس از همسانه سازی در ناقل pGEM-T Easy Vector (Promega) برای توالی‌یابی به شرکت sequetech کالیفرنیا فرستاده شدند و بررسی مشابهت این



شکل ۴- نتایج حاصل از TAIL-PCR، (A) تکثیر ناحیه مجاور انتهای ۵'، (B) تکثیر ناحیه مجاور انتهای ۳'، دو شماره مشابه در کنار هم نشان دهنده محصول مرحله دوم و سوم است. (M) ladder mix از شرکت Fermentas

Figure 4- The results of TAIL-PCR. (A) amplification of 5' flanking sequence, (B) amplification of 3' flanking sequence, tow similar numbers indicate products of secondary and tertiary reactions. (M) ladder mix (Fermentas)

شکست کاست ژنی *cry1Ab*، با ژنوم برنج همولوژی نشان دادند. قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی با دو قسمت مجزا از ژنوم میتوکندری برنج (موقعیت‌های: 341813-1422900-423121, NC_011033: 342034) دارای ۹۸ درصد تطابق (Identity) است همچنین این قطعه دارای ۹۷ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره ۹ (موقعیت: 5271486-5271707, NC_008402.2) است. قطعه ۱۸۱ دارای ۹۹ درصد تطابق با ژنوم میتوکندری (موقعیت: 336174-335993, NC_011033.1) است، همچنین ۷۴ نوکلئوتید ابتدای همین قطعه دارای ۹۶ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره چهار (موقعیت: 34148722-34148799, NC_008397.2) است. قطعه ۴۰ نوکلئوتیدی نیز مشابه توالی ژنوم میتوکندری است. با توجه به این‌که ژن *cry1Ab* با نسبت ۳:۱ (۳: حضور ژن به ۱: عدم حضور آن) به ارث می‌رسد (Ghareyazie et al. 1997) جایگاه تلفیق آن باید روی کروموزوم هسته‌ای باشد نه میتوکندری. مشخص شده است که حدود ۱۳۱kb از دی.ان.ای میتوکندری در ژنوم هسته‌ای برنج پراکنده است که به‌عنوان توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای (NUMTs (sequences (NUMTs)) خوانده می‌شوند، پژوهش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که انتقال دی.ان.ای اندامک‌های سیتوپلاسمی به هسته فرآیندی مداوم است و هنوز ادامه دارد (Huang et al. 2004; Kleine et al. 2009). اغلب درج‌های پایدار توالی‌های اندامک در نواحی کروماتینی باز (Open

اما با روش Splinkerette PCR، ۱۰۳۲ نوکلئوتید بعد از انتهای ۵' آغازگر شماره ۲۰ جداسازی شد (شکل ۵). نتایج هم‌ردیف سازی توالی‌های مجاور ۳' و ۵' با پلاسمیدهای pCIB4421 و pChitHygII و ژنوم برنج در شکل شش آورده شده است. برای اثبات این‌که آیا توالی‌های به‌دست آمده ردیف‌های مجاور نسخه کامل است یا مربوط به بخشی دیگر از جایگاه تراژن است از روش I-PCR استفاده شده است. اگر این توالی‌ها بلافاصله در مجاورت نسخه کامل قرار گرفته باشند پس از هضم با آنزیم برشی Bgl II و انجام پی.سی.آر معکوس، اندازه محصول حاصل از بسط آغازگرهای ۳ و ۲۰ باید ۱۲۶۷ جفت باز و اندازه محصول حاصل از آغازگرهای ۵ و ۱۱ باید بزرگتر از ۱۷۰۰ جفت باز باشد. نتایج I-PCR این فرضیات را تایید کرد (شکل ۷). هم‌ردیف سازی این توالی‌ها با توالی‌های حاصل از TAIL-PCR (قطعه حاصل از ترکیب آغازگرهای AD3-9) و Splinkerette PCR نشان دهنده انطباق کامل آن‌ها با یکدیگر بوده است و منجر به ردیف‌یابی ۹۷ جفت باز دیگر از انتهای ۳' کاست بیانی *cry1Ab* شد. بنابراین قطعه حاصل از آغازگرهای (AD1-9) مربوط به بخشی دیگر از ساختار جایگاه تراژن است. با توجه به نتایج پی.سی.آرهای یک‌طرفه مشخص شد که محل شکست پلاسمید در نسخه کامل ۱۴۸ نوکلئوتید بعد از انتهای ۵' ژن مقاومت به امپی‌سیلین است (شکل ۶). سه قطعه با اندازه‌های ۲۲۱، ۱۸۱ و ۴۰ نوکلئوتید از توالی مجاور ۳' نقطه

chromatin region) که نواحی فعال ژنوم هستند اتفاق می افتد، مشاهده شده است که جایگاه تلفیق تراژن هایی که دارای بیان بالا و پایداری هستند نیز اغلب در نواحی غنی از ژن است. بنابراین به احتمال زیاد منشا قطعه ۲۲۱ کروموزوم شماره نه است و قطعه ۱۸۱ نیز ممکن است حاصل ترکیب قطعات غیر پیوسته ای از یک کروموزوم و یا کروموزوم های مختلف همراه با بازآرایی های متعدد باشد. البته تفسیر این گونه مشاهدات باتوجه به حضور تعداد زیاد توالی های میتوکندریایی هسته ای و بازآرایی هایی که طی فرآیند تلفیق رخ می دهد و همچنین آرایش فضایی کروماتین درون هسته در لحظه تراریزش که ممکن است بخش های دور از هم یک کروموزوم و یا بخش هایی از کروموزوم های مختلف در کنار هم قرار گیرند (Morikawa et al. 2002)، مشکل است. به عنوان مثال در یک لاین تراریخته گندم با مقایسه سیگنال های FISH و fiber-FISH مشاهده شد که سیگنال های متافاز در مرحله ایتترفاز به یکدیگر نزدیک و حتی گاهی به یک سیگنال تبدیل می شوند (Abranches et al. 2000). حضور توالی اندامک درون جایگاه تراژن در برخی گیاهان تراریخته تجاری مانند ذرت تراریخته Mon863 و خربزه درختی تراریخته واریته SUNUP نیز گزارش شده است. در ذرت تراریخته Mon863 توالی میتوکندریایی در هر دو انتهای ۵' و ۳' جایگاه تراژن وجود دارد و مشخص نشده که آیا این توالی ها از قبل در محل تلفیق وجود داشته و یا این که حضور آن نتیجه تراریزش است (European Food Safety Authority 2010). در خربزه درختی واریته SUNUP نیز از شش توالی مجاور (مربوط به ۳ جایگاه تراژن) پنج مورد حاوی قطعاتی از دی.ان.ای کلروپلاست هسته ای (Nuclear Plastid DNA (NUPTs)) بودند (Ming et al. 2008). حضور توالی میتوکندری و کلروپلاست به ترتیب در لاین های تراریخته برنج (Takano et al. 1997) و آراییدوپسیس (Morikawa et al. 2002) نیز گزارش شده است. بنابراین حضور توالی اندامک درون جایگاه تراژن یک پدیده معمول است و مشکلی در ارزیابی های ایمنی زیستی ایجاد نمی کند (Council of the European communities 2004).

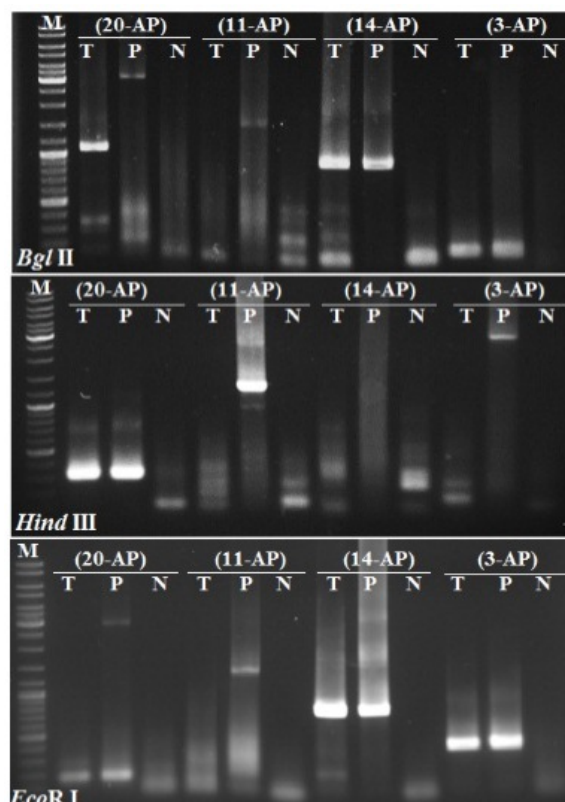
در مجموع ۱۷ قطعه از قسمت های مختلف پلاسمید و سه قطعه

از ژنوم برنج در توالی های مجاور جداسازی شده مشاهده شد که شامل ۱۰ اتصال بین دو قطعه از تراژن (T/T) و پنج اتصال بین دی.ان.ای میزبان و تراژن (T/C) است (شکل شش). بررسی های زیادی نشان می دهد که سازوکار اولیه در شکل گیری جایگاه تراژن اتصال دو انتهای آزاد به واسطه میکروهمولوژی یا نو ترکیبی های غیر معمول ((IR (Illegitimate recombination)، به ویژه از طریق مسیر ترمیمی SDSA (synthesis-dependent strand annealing) است (Gorbunova and Levy 1999; Svtashev et al. 2002). در توالی های مجاور کاست ژنی *cry1Ab*، از ده اتصال T/T، سه مورد و از پنج اتصال T/C، نیز چهار مورد شامل میکروهمولوژی بودند و در محل اتصال قطعات ۴۰ و ۱۴۸ (شکل ۶) توالی مورد توافق توپوایزومراز II (5'-GTNWAYATTNATNNG-3'، Sander and Hsieh 1985) وجود دارد. با توجه به این که توالی های مجاور ۳' جدا سازی شده مخلوطی از قطعات ناپیوسته ای از تراژن و دی.ان.ای میزبان است که از طریق IR به هم متصل شده اند، به نظر می رسد که این قسمت از جایگاه *cry1Ab* نتیجه مسیر ترمیمی SDSA باشد.

در تولید برنج تراریخته طارم مولایی پلاسمید pChitIHygII حامل ژن های هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*)، تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر tml و ژن کیتیناز جو تحت پیشبر اکین و پایانبر nos، همزمان با پلاسمید pCIB4421 به گیاه منتقل شد. قطعه ای به طول ۸۰ نوکلئوتید در توالی مجاور ۵' کاست ژنی *cry1Ab* مطابق با توالی پایانبر tml است، این مشاهده می تواند بیانگر ترکیب قسمت هایی از این دو پلاسمید با یکدیگر باشد.

بررسی توارث دو ژن *cry1Ab* و *hpt* نشان داد که این دو ژن با هم به ارث می رسند و در نتیجه بر روی یک کروموزوم تلفیق شده اند (Ghareyazie et al. 1997). دو پلاسمید pChitIHygII و pCIB4421 دارای حدود ۲/۶ kb توالی مشترک هستند.

توالی بین ژن مقاومت به امپی سیلین و پیشبر PEPC از پلاسمید pCIB4421 که در نواحی مجاور ۵' مشاهده شده است به طور کامل مشابه توالی های مجاور پایانبر tml در پلاسمید pChitIHygII است.



شکل ۵- نتایج Splinkerette PCR. (T) گیاه تواریخته، (P) پلاسمید pCIB4421، (N) گیاه غیر تواریخته، (M) ladder mix از شرکت Fermentas. اعداد داخل پرانتز ترکیب آغازگرهای مورد استفاده است: (AP) آغازگر ویژه سازگارساز، شماره‌های (۳، ۱۱، ۱۴ و ۲۰) مربوط به آغازگرهای اختصاصی هستند (شماره‌ها مطابق شکل ۱).

Figure 5- The results of Splinkerette-PCR. (T) transgenic plant, (P) pCIB4421 plasmid, (N) non transgenic plant, (M) ladder mix (Fermentas), Numbers. in parentheses indicate primers used in PCR. (AP) adaptor specific primer, numbers (3, 11, 14 and 20) are gene specific primers (numbering. according to figure 1).

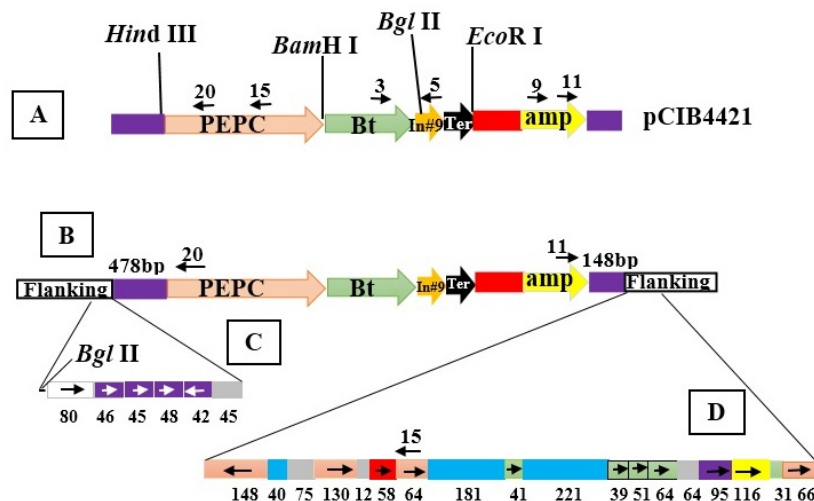
پلاسمید pChitHygII باشند که به‌عنوان فیلر دی.ان.ا در محل شکستگی درج شده‌اند. البته تفسیر و درک بهتر رخدادهای مشاهده شده تنها پس از توالی‌یابی کامل جایگاه امکان پذیر خواهد بود. (Ghareyazie 1996) ساز و کار تلفیق تراژن را در چهار لاین تواریخته برنج حاصل از تراریزش هم‌زمان دو پلاسمید pTRA132 و pCa1GC مورد بررسی قرار داد و با استفاده از تجزیه‌های سادرن بلات، پی.سی.آر و توالی‌یابی نشان داد که دو پلاسمید قبل از تلفیق با یکدیگر ترکیب می‌شوند. بررسی جایگاه تراژن در یک لاین تواریخته یولاف حاصل از تراریزش هم‌زمان دو پلاسمید نیز نشان داد که دو پلاسمید در یک مکان تلفیق شده‌اند (Makarevitch et al. 2003). به‌طور کلی تعداد نسخه‌ی تراژن، دست نخوردگی (Intactness) و بازآرایی‌های مربوط به آن‌ها و چگونگی جهت‌گیری آن‌ها نسبت به هم از مهمترین

بررسی توالی مجاور ۵' نشان داد که از ۷۲۰ نوکلئوتیدی که بعد از انتهای ۳' آغازگر شماره ۲۰ دست نخورده باقی مانده است، ۴۷۸ نوکلئوتید متعلق به ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشر PEPC است (شکل ۶) قطعه ۴۸ نوکلئوتیدی نشان داده شده در شکل شش بر روی پلاسمید pCIB4421 تنها دارای چهار نوکلئوتید فاصله با قطعه ۴۷۸ است و قطعه ۴۶ جفت بازی در شکل ۶ بر روی پلاسمید pCIB4421 به طور کامل مشابه بخشی از توالی قطعه ۴۷۸ جفت بازی است.

این نتایج را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که بین قطعات ۴۷۸ و ۴۲ بر روی پلاسمید pCIB4421 یک شکست رخ داده و دی.ان.ای تک رشته‌ای حاصل از تجزیه انتهایی به توالی همولوگوس خود در پلاسمید pChitHygII متصل شده و ترمیم شکستگی انجام شده است. بر این اساس احتمال دارد قطعات ۴۲ و ۴۵ مربوط به

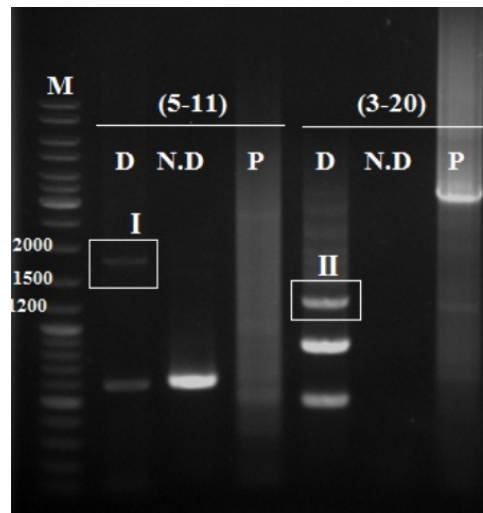
باشد. بدون شک درک بیشتر این سازوکارها و مسیرهای درگیر در تلفیق دی.ان.ای بیگانه می‌تواند کمک کند تا پیچیدگی ساختار جایگاه را بتوان کنترل کرد و بر نقش اثرهای محل و ساختار جایگاه بر پایداری بیان چیره شد (Huang et al.2004). بهترین روش برای شناسایی این سازوکارها و اثرها، مقایسه ساختار و محل تلفیق جایگاه‌های تراژن در گیاهان مختلف دارای بیان بالا و پایدار تراژن در نسل‌های پیشرفته با جایگاه‌های تراژن در گیاهانی که بیان مطلوب ژن را در نسل‌های اولیه از دست داده‌اند، است و در این راستا برنج تراریخته طارم مولایی می‌تواند منبع ارزشمندی برای پژوهش در زمینه درک دقیق‌تر عوامل پایداری بیان تراژن باشد.

جنبه‌های ساختار جایگاه تراژن هستند که می‌توانند سطح بیان و پایداری آن را تحت تأثیر قرار دهند (Pecinka et al.2005; Yang et al.2006; Kohli et al.2006). برنج تراریخته طارم مولایی در تجزیه سادرن بلات الگوی تلفیق ساده‌ای را نشان داد که شامل سه نسخه از ژن *cry1Ab* بود (Ghareyazie et al.1997). حفظ بیان بالای تراژن در طی بیش از ۱۰ نسل نیز احتمال دارد در نتیجه ساختار ساده جایگاه آن باشد. بررسی بخشی از توالی‌های مجاور این جایگاه نشان می‌دهد که دارای خصوصیات مشترکی مانند حضور توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای با جایگاه‌های تراژن در برخی گیاهان تراریخته تجاری است و این می‌تواند تایید کننده حضور یک ساز و کار محافظت شده در سلول گیاه برای تلفیق پایدار دی.ان.ای بیگانه درون ژنوم



شکل ۶- تصویر شماتیک ساختار توالی‌های مجاور ۳' و ۵' کاست ژنی *cry1Ab*. (A) ساختار خطی پلاسمید pCIB4421، رنگ بنفش مربوط به ناحیه بین ژن امپی‌سیلین و پیشبر PEPC است. پیکان‌ها نشان دهنده آغازگرها هستند و شماره آن‌ها مطابق شکل ۱ است. (B) ساختار جایگاه *cry1Ab*، شامل نسخه کامل و توالی‌های مجاور آن. (C) توالی مجاور ۵'، این قسمت به روش Splinkerette PCR ایزوله شده است. قسمت‌های مشابه با پلاسمید با رنگ‌های مشابه نشان داده شده‌اند و قسمت‌های خاکستری بخشی از توالی را نشان می‌دهد که با پلاسمیدهای pCIB4421، pChitIHygII و ژنوم برنج همولوژی نداشته است. قطعه ۸۰ نوکلئوتیدی بخشی از پلاسمید pChitIHygII است. پیکان‌های رسم شده در داخل مستطیل‌ها نشان دهنده جهت توالی (مستقیم یا معکوس) و اعداد زیر هر مستطیل بیانگر تعداد نوکلئوتیدهای آن قطعه است. (D) ساختار توالی مجاور ۳'، این قسمت به روش TAIL-PCR ایزوله شده است. رنگ آبی نشان دهنده توالی ژنوم برنج است، سایر علامت‌گذاری‌ها مانند شکل C است.

Figure 6- Schematic of the structure of 3' and 5' flanking sequences of *cry1Ab* locus. (A) Linear map of pCIB4421 plasmid, the violet color indicates region between ampR and PEPC, arrows represent primers (numbering according to figure 1). (B) Structure of *cry1Ab* locus includes intact copy and its flanking regions. (C) 5' flanking sequence, this section is isolated by splinkerette PCR; parts which are similar to plasmid are shown with same colors. The gray boxes indicated unknown sequence. 80 nucleotides fragment is a part of pChitIHygII plasmid. Arrows inside the boxes indicate orientation of transgene insertion. Numbers below each box indicate the numbers of nucleotides that fragment. (D) 3' flanking sequence, this section is isolated by TAIL-PCR, the blue color represents genomic DNA of rice, and other marks are similar to figure c.



شکل ۷- نتایج I-PCR، (D) دی.ان.ای ژنومی هضم شده، (N.D) دی.ان.ای ژنومی هضم نشده، (P) پلاسمید pCIB4421، اعداد داخل پرانتز شماره آغازگرهای مورد استفاده و مطابق با شکل ۱ است. (I) تکثیر توالی مجاور ۳' کاست ژنی *cry1Ab*، (II) تکثیر توالی مجاور ۵' کاست ژنی *cry1Ab*.

Figure 7- The results of I-PCR. (D) digested genomic DNA, (N.D) undigested genomic DNA, (P) pCIB4421 plasmid, Numbers in parentheses indicate the primers used in PCR. Primers are numbered according to figure 1. (I) amplification of 3' flanking sequences of *cry1Ab* cassette, (II) amplification of 5' flanking sequences of *cry1Ab* cassette.

منابع

- Abranches R, Santos AP, Wegel E; Williams S, Castilho A, Christou P, Shaw P, Stoger E. 2000. Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. *Plant Journal* 24: 713-723.
- Assaad FF, Tucker KL, Signer ER. 1993. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 22: 1067-1085.
- Council of the European communities. 2004. Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing directive. *Official Journal of the European Communities* 106: 1-38.
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes and Development* 14: 2869-2880.
- European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-RX-MON863) for renewal of the authorization for continued marketing of existing feed materials, feed additives and food additives produced from maize MON863 under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *EFSA Journal* 2010 8 (03): 1562.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khosh GS, Bennett J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA*

(b) gene. *Molecular Breeding* 3: 401-414.

Ghareyazie B. 1996. Transformation of indica and other rices (*Oryza sativa* L.): genetic integration, expression, inheritance and enhanced insect resistance. Ph.D. thesis. University of the Philippines at Los Banos, Los Banos, Laguna, Philippines.

Gorbunova V, Levy AA. 1997. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends in Plant Science* 4: 263-269.

Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. 2004. Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 9710-9715.

Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Flant T, Matzke AJ. 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *The Plant cell* 9(8): 1251-1264.

Kleine T, Maier UG, Leister D. 2009. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annual Review of Plant Biology* 60:115-138.

Kohli A, Melendi PG, Abranches R, Capell T, Stoger E, Christou P. 2006. The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. *Plant Signaling & Behavior* 1(4):185-195.

Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P. 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular*

Biology 52: 274-258.

Kumputla SP, Hall TC. 1999. Organization complexity of a rice transgene locus susceptible to methylation-based silencing. *Life* 48: 459-467.

Li J, Brunner AM, Meilan R, Strauss SH. 2008. Stability of transgenes in trees: expression of two reporter genes in poplar over three field seasons. *Tree Physiology* 29: 299-312.

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8(3): 457-463.

Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA. 2003. Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant molecular Biology* 52: 421-432.

Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis K, Salzberg SL, Feng L, Jones MR, Skelton RL, Murray JE, Chen C, Qian W, Shen J, Du P, Eustice M, Tong E, Tang H, Lyons E, Paull RE, Michael TP, Wall K, Rice DW, Albert H, Wang M, Zhu YJ, Schatz M, Nagarajan N, Acob RA, Guan P, Blas A, Wai CM, Ackerman CM, Ren Y, Liu C, Wang J, Wang J, Na J, Shakirov EV, Haas B, Thimmapuram J, Nelson D, Wang X, Bowers JE, Gschwend AR, Delcher AL, Singh R, Suzuki JY, Tripathi S, Neupane K, Wei H, Irikura B, Paidi M, Jiang N, Zhang W, Presting G, Windsor A, Navajas-Perez R, Torres MJ, Feltus FA, Porter B, Li Y, Burroughs AM, Luo M, Liu L, Christopher DA, Mount SM, Moore PH, Sugimura T, Jiang J, Schuler MA, Friedman V, Mitchell-Olds T, Shippen DE, Pamphilis CW, Palmer JD, Freeling M, Paterson AH, Gonsalves D, Wang L, Alam M. 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452(7190):991-996.

Morikawa H, Sakamoto A, Hokazono H, Irifune K, Takahashi M. 2002. Mechanism of transgene integration into host genome by particle bombardment.

Plant Biotechnology 19(4):219-228.

Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA. 1998. Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Molecular Biology* 38: 597-607.

Pecinka A, Kato N, Meister A, Probst AV, Shubert I, Lam E. 2005. Tandem repetitive transgenes and fluorescent chromatin tags alter local interphase chromosome arrangement in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 118:3751-8.

Potter CJ, Lou L. 2010. Splinkerette-PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5: e 10168.

Pröls F, Meyer P. 1992. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia* hybrid. *Plant Journal* 2: 465-475.

Sander M, Hsieh TS. 1985. *Drosophila* topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acid Research* 13:1057-1072.

Somers DA, Makarevitch I. 2004. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Current Opinion in Biotechnology* 15: 126-131.

Svitashv SK, Pawolowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA. 2002. Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* 32: 433-445.

Takano M, Egawa H, Ikeda JE, Wakasa K. 1997. The structures of integration sites in transgenic rice. *The Plant Journal* 11(3): 353-361.

Yang G, Lee Y, Jiang Y, Kumputla SP, Hall TC. 2005. Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. *Plant Molecular Biology* 58:351-366.

Zhong G. 2001. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. *Euphytica* 118:137-144.

The effect of manganese and salicylic acid on gene expression of Menthone reductase and Menthol content in *Mentha piperita*

Diako Rasouli^{1*}, Mahmood Solouki², Barat Ali Fakheri² and Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi³

1- MS.c of Agriculture Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

2- Associated Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol.

* Corresponding Author, Email: diakorasouli@yahoo.com

ABSTRACT

The effect of manganese and salicylic acid on gene expression of Menthone Reductase (MR) and menthol content in *Mentha piperita* were investigated. The research was conducted by a factorial experiment design in a randomized complete block with three replications. The experimental factors include the treatments by manganese (500 μ M) and salicylic acid (1 mM) and time (1, 3 and 5 days) after spraying. The results of ANOVA indicated that the manganese and salicylic acid treatments had significant effect on gene expression of Menthone Reductase and menthol over all three times after spraying. The lowest gene expression of MR and menthol caused by manganese at 5 days after spraying was significantly different from control. The maximum gene expression of MR and menthol content was achieved by salicylic acid at 5 days after spraying. The analysis of the interaction of manganese and salicylic acid showed that salicylic acid reduced the manganese toxicity to some extent in the expression levels of MR and the menthol content. The results of this experiment showed that a direct correlation exists between the MR expression and the amount of menthol in peppermint, so that over time by increasing the MR expression, the amount of menthol was also increased by salicylic acid while the expression of MR and the amount of menthol was decreased by manganese. However, it was observed that salicylic acid acts as a powerful hormone and stabilizes the effect of manganese on MR gene expression and menthol content in peppermint plant.

Key Words

Gene expression, Menthol Reductase, Menthol, *Mentha piperita*.

Optimization of transient expression by *Agrobacterium* in almond

Neda Mirakhorli^{1*}, Afsane Heidari Reyhani², Behrooz Shiran³ and SA 'dollah Hooshmand⁴

1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

2- MS.c of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

*Corresponding Author, Email: nedamirakhorli@yahoo.com

ABSTRACT

Since permanent transfer of genes and transgenic plant production, particularly in perennial plants such as almonds are time and cost consuming, optimization of various factors affecting the transgenic plants is critical. Transient genetic expression using *Agrobacterium* (Agroinfiltration) in plant is a useful tool to study gene function indifferent gene expression systems. Since optimization of factors that could affect the transgenic methods is necessary for gene transfer programs, Because This study was aimed at developing an efficient system for transient expression via *Agrobacterium* in almond leaves for rapid prediction of systems performance. Here the lichenase reporter gene was used to assess the parameters influencing the level of transient expression. The main advantages of using this gene include easy operation, high sensitivity and biosafety. Three different constructs carrying lichenase gene and different regulatory elements were infiltrated into leaves of mamaei and shahrood 12 cultivars, by two *Agrobacterium* strains, LBA4404 and GV3501, using syringe without needle. After three days, the amount of active protein was measured. Statistical analysis showed that the highest amount of protein was obtained in the leaves of mamaei cultivar transformed by the expression system causing accumulation of proteins in the endoplasmic reticulum by LBA4404 strain. So for rapid production of recombinant protein in Almond, the agroinfiltration method by using the related expression system, LBA4404 strain and mamaei cultivar, is recommended.

Key Words

Transient expression, Agroinfiltration, *Agrobacterium*, Expression system, Almond.

Different expression pattern of NPR1 and some of the pathogenesis-related genes in response to salicylic acid and methyl jasmonate treatment in rice

Zhale Hekmati¹, Ali Aalami^{2*}, Mohamad Mehdi Sohani², Reza Shirzadian Khorramababd² and

Seyede Hamide Karvankesh³

1- PhD Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

2- Assistant Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

3- Graduated M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

* Corresponding Author, Email: ali_aalami@guilan.ac.ir

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) and Jasmonic acid (JA) signaling pathways are mutually antagonistic and sometimes synergistic. This regulatory cross talk may have evolved to allow plants to fine-tune the induction of their defenses in response to different plant pathogens. *NPR1* plays a significant role in regulating the interaction of salicylic acid and methyl jasmonate pathway. In fact, *NPR1* activation depends on the levels of these two hormones in plant. Therefore, antagonistic and synergistic effects of salicylic acid and methyl jasmonate spraying were investigated on the expression of the genes *NPR1*, *Thionin*, *PDF1.2* and *PR1* using Real time PCR technique in two rice cultivars Khazar (resistant to blast) and Hashemi (susceptible to blast) at 0, 6, 12, 24 and 48h after spraying. Results showed that the studied genes had different expression patterns in different genotypes and times after spraying, in response to salicylic acid and methyl jasmonate, indicating an association between regulatory pathways of these hormones and induction of the defense related genes. The expression of the studied genes was increased by SA and MJ treatment in khazar, while no significant differences were observed among different times after SA and MJ treatment for *PR1* in Hashemi. The expression of the other genes was also low in this cultivar. In general, it could be concluded that antagonistic and synergistic effects of SA and MJ lead to changes in the expression of the genes studied at different times after spraying and in the formation of the immune system in resistance genotype.

Key Words

Methyl jasmonate, Pathogenesis related genes, Rice and Salicylic acid.

Bioinformatical analysis of Isolated ESTs from *Aeluropus littoralis* under salinity stress

Amin Ebrahimi¹, Reza Maali-Amiri^{1*}, Ghorban Ali Nematzadeh² and Hoshang Alizadeh¹

1- PhD Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Professor, Sari University of Agriculture science and Natural Resources, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, Iran

* Corresponding Author, Email: rmamiri@ut.ac.ir

ABSTRACT

Biotechnology needs the genetic resources to establish the sustainable tolerance to salinity stress in GMO plants. *Aeluropus littoralis* is known as a good model plant for understanding the genetic and molecular mechanism of salt resistance in monocots. This plant has a high genetical homology with rice. In this study, 150 ESTs were isolated from *A. littoralis*. Firstly, repeated sequences were eliminated and then the possible function and similarity of the remained ESTs were compared with other ESTs of different plants using international genetic databases. Results of this study showed that, 71 of the selected ESTs were similar to the ESTs in the databases and their function have been determined. Moreover, 14 ESTs were similar to the ESTs in the databases but their functions have not been determined yet. Seven ESTs did not show any similarity. Alignment analysis showed that the isolated ESTs were categorized in 19 different groups. 16 ESTs acted as a transporter, 12 ribosomal proteins and the other ESTs were related to channel transfer regulators, RNA editing and cell division. By the relatively high level of homology with rice genes, the genetic studies on *Aeluropus* could help in determining the differences in salt-tolerance between glycophyte and halophyte grass

Key Words

Aeluropus littoralis, Databank, Bioinformatics, Salinity stress and EST.

Molecular detection of native isolates of *Bacillus thuringiensis* from soils samples with different vegetations

Fatemeh Graily Morady¹, Mahmoud Mohammadi Sharif^{2*}, Alireza Hadizadeh² and Valiallah

Babaeizad²

1- M.Sc of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* Corresponding Author, Email: msharif 1353@yahoo.com

ABSTRACT

Native isolates of *Bacillus thuringiensis* were obtained from soil samples of various ecosystems in Mazandaran province and *Cry1*, the insecticidal protein-encoding gene, was detected in the isolates. About 491 bacilliform isolates were obtained from 128 soil samples through sodium acetate inhibition procedure. Two hundred ninety one spore-forming, 85 spore and cap-forming and 113 spore, cap and crystal forming bacteria representing 59.67, 17.31 and 23.01% Of the isolated strains were identified by phase contrast microscopy. Molecular identification of *Cry1* and its 14 related genes were carried out by 14 pairs of gene-specific primers. Fifteen isolates contained the *Cry1* gene in the expected size. *Cry1Ac* and *Cry1I* were detected in all of the isolates but *Cry1Aa*, *Cry1F*, *Cry1G* and *Cry1K* were not entirely found. *Cry1D*, *Cry1E* and *Cry1J* were amplified in some of the isolates in different sizes: this could be attributed to the fact that they might have contained one or more new *Cry* genes. Detecting the effective genes of native Bt strains and their application in genetic engineering can be a useful component in future of insect pest management system.

Key Words

Crystal protein, *Cry1* gene, *Bacillus thuringiensis*.

Study of *cry1Ab* transgene locus structure in a transgenic rice (*Oryza sativa* L., cultivar Tarom Molaii)

Hajar Yahyaiipoor ¹, Behzad Ghareyazie ^{2*}, S.Ahmad Sadatnoori ³, Ali Izadi Darbandi ⁴ and
Ghorban Ali Nemat Zade ⁵

1- M.Sc, plant breeding, College of Aburaihan, University of Tehran.

2- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

5- Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* Corresponding Author, Email: ghareyazie@yahoo.com

ABSTRACT

The level and stability of transgene expression can be influenced by factors such as structure of expression cassette, integration pattern and locus structure. The structure of transgene locus is important in its expression mechanisms. The aim of this experiment was to characterize the *cry1Ab* transgene locus structure in a transgenic rice (*Oryza sativa*, cultivar Tarom Molaii). This transgenic rice, co-transformed with two different plasmids (pCIB4421 and pChitIHygII), had a simple integration pattern and stable expression over several generations. In order to characterize the *cry1Ab* transgene locus structure, the exact insertion site was identified using specific primers corresponding to 3' and 5' ends of *ampR* gene, 3' end of *cry1Ab* gene and 5' end of PEPC promoter on pCIB4421 plasmid. Then, DNA sequences of the flanking insertion sites were amplified using two methods of one-side PCR including TAIL-PCR and Splinkerette PCR. Sequencing of the PCR products and bioinformatics analysis revealed that pCIB4421 plasmid break for insertion was 148 bp after 3' end of *ampR* gene. A fragment corresponding to 1499bp downstream sequences and 311 bp upstream of insertion site were isolated. BLAST search was performed against the pCIB4421, the pChitIHygII and *Oryza sativa* genome. Downstream sequences of the insertion site was scrambled fragments of delivered DNA and rice genome, however the upstream of the insertion site was non-continuous fragments of the delivered DNA.

Key Words

Biosafety, *cry1Ab* transgene, Flanking sequence of transgene, Transgenic rice.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol.3, No.1, Issue 5, Spring and Summer 2014

Copyright and publisher

BIOSAFETY SOCIETY OF IRAN

Managing Director: B. Ghareyazie

ghareyazie@yahoo.com

Editor-In-Chief: M. Omid

momidi@ut.ac.ir

Secretary of the Editorial Board: S. Kahak& M.majdi

s.kahak@yahoo.com

m.majdi84@yahoo.com

Address: Pajouhesh Blvd., 17 Km of Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran

P.O.Box.14155-6343

Tel:(+98)2144580375

gebs.j.bs@gmail.com