مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره سوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سردبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و **اجرایی**: دکتر الهام باقری و مهندس مهدیه مجدی

هیات تحریریه

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

صفحه آرایی: دکتر الهام باقری **ویرایش علمی و ادبی:** دکتر مقصود پژوهنده

ویرایش خلاصه های انگلیسی: Prof. Kenneth E. Richards

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 وتخلیص 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 به‌سمت 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

بسم الله الرحمن الرحیم

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصل‌نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره سوم، شماره ۲، شماره پیاپی ۶، پاییز و زمستان ۱۳۹۳

فهرست مطالب

- **مقاله‌های پژوهشی**

	صفحات
۱- **ارزیابی قند کل و قندهای محلول در سیب زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب زمینی** سید حمید میررکنی، حسن رهنما و حسن زینالی	۶۷-۷۵
۲- **بررسی اثر سازگاری سویه در بیان موقت مبتنی بر روش اگروباکتریوم در ارقام خربزه** صهبا طوسی، فرهاد شکوهی فر، سعید ملک زاده شفارودی و عبدالرضا باقری	۷۶-۸۶
۳- **مطالعه بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان** فرامرز هوشیاردل، حمید حاتمی ملکی، رضا درویش زاده و مراد جعفری	۸۷-۹۵
۴- **انتقال و بیان ژن انسولین نوترکیب منومر در گیاه آرابیدوپسیس** بهناز حسینی و غلامرضا شریفی سیرچی	۹۶-۱۰۵
۵- **شناسایی، همسانه سازی وتعیین توالی ژن MT ND2 در مرغ‌های بومی خراسان** حمیدرضا ایزدنیا، مجتبی طهمورث پور و محمدرضا نصیری صفحات	۱۰۶-۱۱۳
۶- **بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت (Barbus grypus) در رودخانه کرخه واقع در استان خوزستان و گونه پرورشی آن با استفاده از نشانگر ریزماهواره** محبوبه کرمی نسب، زینب حسین نیا، حامد کلنگی میاندره و علی شعبانی	۱۱۴-۱۲۳

English Abstracts

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۷۵-۶۷

ارزیابی قند کل و قندهای محلول در سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی

Evaluation of total carbohydrate and soluble sugars in transgenic potato resistant to potato tuber moth

سید حمید میرکنی[۱،۲]،حسن رهنما [۱،*]،حسن زینالی[۲]

H. Mirrokni [1,2], H. Rahnama *[1], H. Zeinali [1]

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲)

چکیده

طبق قوانین سازمان‌های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری‌سازی محصولات تراریخته و فراورده‌های آن، باید ارزیابی‌های ایمنی دقیقی بر روی آن‌ها با یک روش مقایسه‌ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین‌های تراریخته با رقم زراعی غیرتراریخته از نظر محتوی متابولیتی و ترکیبات آنها است. این بررسی به منظور شناسائی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دستورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژنوم دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می گیرد. این فرایند به اصل ضرورتاً یکسان (این‌همانی) معروف است. در این مطالعه تلاش شد میزان قند کل و همچنین قندهای محلول مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در سیب‌زمینی‌های تراریخت مقاوم به بید سیب‌زمینی که در سال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تولید شده بودند مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از ۴ لاین تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی که در آزمایش-های زیست‌سنجی مقاومت بالایی از خود نشان داده‌اند استفاده شد. این سیب‌زمینی‌ها از تاریخ فوق در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شده‌اند. نمونه‌های تراریخته به همراه گیاه شاهد به منظور تولید غده به گلخانه منتقل شده و از نمونه‌های نور دیده و نور ندیده غده‌ها و همچنین از نمونه-های برگی این گیاهان جهت آنالیز متابولیت‌ها استفاده شد. برای اطمینان از حضور تراژن در گیاهان و مواد گیاهی بررسی های مولکولی بر روی آنها انجام گرفت و نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن *cry*1Ab در همه نمونه‌های تراریخته مورد ارزیابی حضور دارد. در بررسی میزان قند کل مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد از لحاظ میزان قند کل موجود در بافت‌ها وجود ندارد و همچنین ارزیابی قندهای محلول نیز نشان داد که میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد و در نتیجه با توجه به ترکیبات مورد بررسی و همچنین قوانین نظارتی کدکس ایمنی سیب‌زمینی‌های تراریخته از لحاظ این صفات مورد تائید بوده و مصرف آنها بدون خطر است.

واژه‌های کلیدی

ژن ***cry1Ab***
سیب‌زمینی تراریخته
قند کل
قندهای محلول

مقدمه

سیب زمینی از جنس سولانوم و خانواده سولاناسه، تنها عضوی است که اهمیت برجسته ای از نظر کشاورزی دارد به طوری که بعد از غلات منبع اصلی کربوهیدرات را تشکیل می دهد (Yaghbani and Mohammadzadeh, 2006). به علت دارا بودن نشاسته، محتوای ویتامینی و پروتئینی و نیز عملکرد بالا بعد از گندم و برنج به عنوان سومین منبع مهم غذایی در دنیا است (Visser *et al*. 2009; FAO, 2005).

با وجود اهمیت بالای سیب‌زمینی در نظام غذایی و صنعتی، متاسفانه این محصول نظیر دیگر محصولات و حتی بیشتر در معرض حمله آفات و آلودگی با عوامل بیماریزای گیاهی و علف‌های هرز می‌باشد (Ghasimi Hagh *et al*. 2009). بر اساس آمار مرکز تحقیقات بین المللی سیب‌زمینی، در بین آفات خسارت زای سیب‌زمینی، بید سیب‌زمینی با نام علمی (*Phthorimaea operculella* (Zeller سالانه در دنیا در حدود ۳,۳۲۴,۰۰۰ هکتار از اراضی سیب‌زمینی کاری را از بین می‌برد. پتانسیل برداشت سالانه از این اراضی در حدود ۵۰,۸۳۳,۲۰۰ تن محصول سیب‌زمینی است (www.cipotato.org).

تولید سیب‌زمینی مقاوم به بید سیب‌زمینی با اصلاح سنتی به دلیل محدودیت‌های اصلاح سنتی و نیز عمدتا به دلیل عدم وجود ژرم‌پلاسم مقاوم به آفت در سیب‌زمینی و گونه‌های خویشاوند موفقیت‌آمیز نبوده است. بنابراین، یک راهکار مناسب برای بهبود مدیریت تلفیقی آفات، توسعه ارقام مقاوم به بید سیب‌زمینی با تکیه بر مهندسی ژنتیک است (Rondon *et al*. 2007). بهره گیری از زیست فناوری نوین برای تولید مواد غذایی، فرصت‌ها و چالشهای جدیدی را فرا روی توسعه و سلامتی انسان گشوده است. این امر از یک سو، افزایش بازدهی تولید و کاهش مصرف عوامل آلاینده و مخرب محیط زیست را به همراه داشته و می‌تواند برای امنیت غذایی جمعیت روز افزون جهان، به ویژه کشورهای در حال توسعه از اهمیت فراوانی برخوردار باشد. از نگاه دیگر، استفاده از فنون جدید مهندسی ژنتیک امکان ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و تولید غذاهای فراسودمند (Functional food) را به طور گسترده ای فراهم آورده است.

البته همزمان با ورود مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی در زنجیره غذایی انسان، نگرانی‌هایی در ارتباط با خطرات بالقوه ناشی از تولید و مصرف این گونه مواد ایجاد، و پرسش‌های متعددی را در زمینه احتمال بروز عوارض نامطلوب مانند حساسیت، افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات مخرب محیطی و انتقال افقی ژن‌ها (Horizontal gene transfer) در جامعه مطرح نموده است. به دلیل اهمیت موضوع، کمیته‌های بین‌المللی مسئولیت قانون گذاری و تعیین سیاست‌های لازم برای تضمین ایمنی مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی را بر عهده گرفته و در این راستا راهبردها و دستورالعمل‌های متعددی مطرح شده است. براساس قوانین موجود برآورد ایمنی این محصولات مبتنی بر اثبات برابری همه جانبه آنها با انواع اصلاح نشده و همچنین انجام آزمون‌های اختصاصی در زمینه حساسیت‌زایی پروتئین‌ها، سمیت متابولیت‌ها و ماده غذایی می‌باشد (Hashemi and Shoja Sadat, 2010). طبق قوانین سازمان های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری سازی محصولات تراریخته و فراورده‌های آن، باید ارزیابی‌های ایمنی دقیقی بر روی آنها با یک روش مقایسه‌ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی غذائی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین‌های تراریخته با ارقام غیرتراریخته آن است. این بررسی به منظور شناسائی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دستورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژن دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می‌گیرد. این فرایند به اصل تشابه ضروری (این همانی Substantial equivalence) معروف است (OECD, 2001a; Kok and Kuiper, 2003) اصل "تشابه ضروری" که از دهه ۱۹۹۰ در چند شورای بین المللی (FAO/WHO, 2005; WHO, 1995; OECD, 2001a,b) مطرح شده است، یک عنصر کلیدی در ارزیابی ایمنی غذاهای حاصل از موجودات مهندسی شده ژنتیکی می‌باشد. این مفهوم برای شناسائی شباهت‌ها و تفاوت‌های بین غذاهای تراریخته و همتاهای سنتی آنها که دارای سابقه مصرف ایمنی هستند، استفاده می‌شود و راهنمای اصلی در فرایند ارزیابی ایمنی محسوب می‌شود (FAO/WHO, 2000). جنبه‌های تعیین کننده متعددی وجود دارد که باید در کاربرد عملی

این مفهوم مورد توجه قرار گیرد که در نهایت منجر به شناسائی اثرات ناخواسته می‌گردد.

هرگونه تغییر در لاین تراریخته باید در محدوده تغییرات مجاز در بین ارقام غیر تراریخته باشد. به همین دلیل، سازمان‌های نظارتی در بسیاری از کشورهای دنیا نتایج مربوط به بررسی و مقایسه ترکیبات محصولات تراریخته با رقم غیرتراریخته را جهت ارزیابی ایمنی محصول تراریخته و صدور مجوز رهاسازی تجاری آنها لازم می‌دانند. این مقایسه مورد به مورد بوده و قابل تعمیم به ارقام تراریخته مشابه نیست.

راهکارهای مختلفی جهت مقایسه لاین‌های تراریخته و غیرتراریخته بکار گرفته شده است که هر کدام از این راهکارها از یک جهت به این مقایسه می‌پردازند. مهمترین این روش‌ها متابولومیکس، پروتئومیکس و ژنومیکس است که هر کدام از این روش‌ها پیامدهای حضور ژن خارجی را در سطوح مختلف ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس مورد ارزیابی قرار می‌دهند. هرچند توانائی روش‌های ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس برای تشخیص اثرات آنها تحت مطالعه می‌باشد، آنالیز ترکیبات کلیدی و ضدغذائی از اهداف ارزیابی ترکیبات محسوب می شود (Cellini *et al.* 2004).

بنظر میرسد که در حال حاضر استفاده از راهنمای موجود OECD به عنوان مبنائی برای ارزیابی مطالعات متابولومیکس می‌تواند بسیار مفید باشد. در نسخه سال ۲۰۰۲ این راهنما مشخص شده است که با آنالیز ترکیبات ذکر شده در فهرست این راهنما می‌توان تشابه رقم مورد مطالعه را با ارقام طبیعی تعیین نمود (OECD, 2002a,b). بنابراین، هدف ارزیابی ایمنی غذاهای جدید (از جمله غذاهای حاصل از فناوری تراریخته) اثبات این موضوع است که غذای جدید سطح ایمنی مشابه والد طبیعی خود (در صورت وجود) داشته و همچنین هیچ خطر اضافه یا جدیدی برای سلامت مصرف کننده ندارد. اثرات نامطلوب قابل پیش‌بینی و غیر قابل پیش‌بینی ممکن است سلامت فراورده را اثبات کند یا نکند اما برای ارزیابی مخاطرات احتمالی باید این کار انجام شود.

در نهایت اینکه، برای رهاسازی یک محصول تراریخته لازم است ارزیابی تشابه ضروری در آن انجام شود. اسناد و مدارک حاصل همراه با سایر بررسی‌های انجام شده تکمیلی در خصوص پروتئومیکس، ژنومیکس و ارزیابی های حیوانی و غیره برای ارائه به سازمان‌های نظارتی و تصمیم گیر در زمینه تجاری سازی محصولات تراریخته ضروری می‌باشد.

این تحقیق پس از اثبات وجود ژن انتقالی *cry1Ab* با هدف مقایسه قند کل و همچنین قندهای محلول همچون ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی و گیاه شاهد غیرتراریخته انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مقدمات کار جهت تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب زمینی با استفاده از ژن *cry1Ab* درسال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج انجام پذیرفت. برای هدفمند کردن بیان ژن‌ها و تولید سیب‌زمینی Bt ایمن‌تر از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی، از پیشبر (Phosphoenolpyruvate carboxylase) PEPC گیاه ذرت (*Zea mays*) که سبب بیان ژن در بخش‌های سبز گیاه می‌شود، استفاده شده است. برای انتقال سازه مولکولی pBPECry1Ab به گیاه سیب زمینی از اگروباکتریوم تومه فاشینز سویه AGLo1 استفاده شد (Ghasimi Hagh *et al.* 2009).

بعد از ۴ دوره کشت سیب‌زمینی‌های کنترل و تراریخته که شامل لاین‌های B2, B8, B11, B12 بودند در محیط مایع درون شیشه‌ای به شرایط گلخانه‌ای انتقال یافت و در شرایط گلخانه‌ای به مرحله غده دهی رفتند. بعد از طی شدن مراحل رشد برگ‌های میانی از بوته جدا شده و بلافاصله در ازت مایع قرار داده و بعد به فریزر ۸۰- انتقال یافتند. غده‌ها نیز پس از جمع آوری، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای بیان این ژن از پیشبری استفاده شده است (پیشبر PEPC) که تنها در بافت‌های سبز و تحت نور بیان می‌شود. به منظور بیان و تولید پروتئین Cry1Ab در یک تیمار، مقداری سیب‌زمینی تراریخته در معرض نور کنترل شده قرار داده شد تا پروتئین بیان شود اما با توجه به تولید همزمان آلکالوئیدها در سیب‌زمینی، این نور دهی به میزانی بود که درصد آلکالوئیدها از مقدار استاندارد بیشتر نشود (Fridman, 2006).

بنابراین نیمی از آنها به مدت یک هفته در شرایط نور و نیمی دیگر در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

بررسی ثبات ژن *cry1Ab*

استخراج DNA از برگ و غده های نور دیده و نور ندیده سیب-زمینی‌های مورد بررسی به روش دلاپورتای تغییر یافته (Dellaporta *et al.* 1983) انجام شد و کیفیت و کمیت DNA استخراجی به وسیله ژل الکتروفورز و اسپکتوفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. آزمون PCR بر روی این ژن با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *cry1Ab* (آغازگر مستقیم:-5´-GGC-GGC-GAG-AGG-ATC-GAG-AC-3´ منطبق بر نوکلئوتیدهای۷۳– ناحیه رمزکننده و آغازگر معکوس-5´-TCG-GCG-GGA-CGT-TGT-TGT-TC-3´ منطبق بر نوکلئوتیدهای ۱۲۷۶- ناحیه رمزکننده) انجام شد. شرایط انجام PCR شامل یک چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و نهایتا یک چرخه اضافی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه (طویل شدن نهایی) بود که در دستگاه (PCR BIO-RAD) انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و TAE 1X برده شد و توسط دستگاه Gel-Doc عکسبرداری صورت گرفت.

جهت بررسی تعداد نسخه ژنی در لاین های تراریخت از روش سادرن بلاتینگ استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های DNA استخراج شده با آنزیم *Eco*RI هضم شده و برروی ژل آگارز الکتروفورز شدند. انتقال DNA به غشای نایلونی باردار مثبت با استفاده از روش مویین انجام شد (Smabrook and Russell, 2001). آشکارسازی نمونه ها با استفاده از پروب ژن *cry1Ab* نشان دار شده با DIG با استفاده از کیت DIG DNA labeling and detection kit (شرکت Roche) و براساس دستورالعمل موجود صورت گرفت.

اندازه‌گیری قندهای محلول (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) با استفاده از دستگاه HPLC

۰/۰۲ گرم از نمونه تر وزن شد و در ازت مایع پودر شد و درون تیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ (v/v) روی هر نمونه اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس تکان شدید داده شد و سپس نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و فالکون‌ها درون آون یا خشک‌کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا الکل نمونه‌ها به طور کامل تبخیر شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۴۷ میلی‌لیتر هیدروکسیدباریم ۰/۳ نرمال و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات‌روی ۵٪ به هر کدام از نمونه‌های خشک شده اضافه و نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ جدا و درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. همچنین ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل جهت اندازه گیری قند کل درون ویال‌های جدا ریخته شد.

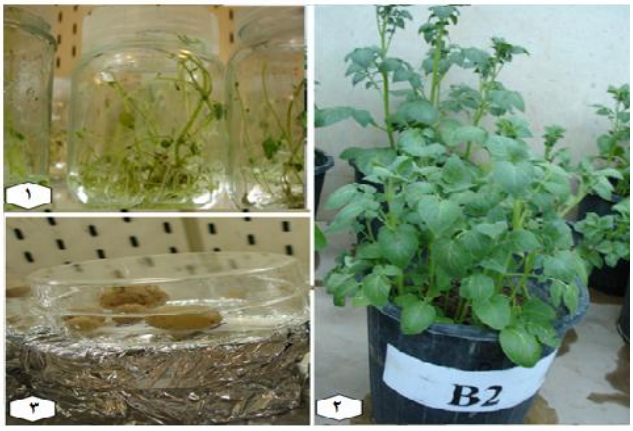
در نهایت فالکون‌ها در دستگاه آون یا خشک‌کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و فاز آبی به‌طور کامل تبخیر شد و یک میلی‌لیتر آب با درجه خلوص HPLC به هر نمونه اضافه شد. محلول‌ها با فیلتر سر سرنگی نوع ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شدند و در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. برای اندازه گیری قندهای محلول از دستگاه HPLC استفاده شد. بدین منظور از ستون تفکیک Eurokat H-10 µm ابعاد ۸ × ۳۰۰ میلی‌متر، میزان جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و استفاده از آب مقطر با درجه خلوص HPLC با pH ۲/۵ به عنوان فاز متحرک (با استفاده از اسیدسولفوریک اسیدیته کاهش داده شد) و شناساگر RI استفاده شد.

اندازه‌گیری قند کل

۲ میلی‌لیتر از محلول آماده شده (در دستورالعمل قندهای محلول به روش HPLC) به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ به محلول درون فالکون مرحله قبل اضافه و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ (v/v) به محلول بالا اضافه شد و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Schlegel, 1956).

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل A در ۳ سطح (برگ، غده‌های نور دیده و غده‌های تاریکی) و عامل B در ۵ سطح (کنترل، B12, B11, B8, B2) انجام شد. تمامی آزمایش ها با سه تکرار بود. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Microsoft Excel استفاده شد. همچنین مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد صورت گرفت.



شکل ۱: مراحل مختلف رشد و نگهداری گیاهان تراریخته. ۱: کاشت و نگهداری گیاهان در شرایط درون شیشه ای **۲: انتقال گیاهان به گلدان و نگهداری در گلخانه ۳: قرار دادن غده‌ها در شرایط نور و تاریکی.**

Figure 1: Different stages of development and maintenance of transgenic plants. 1- Plant culture at in vito condition 2- Plant growth in greenhouse condition 3- Light treatment of potato tubers.

نتایج و بحث

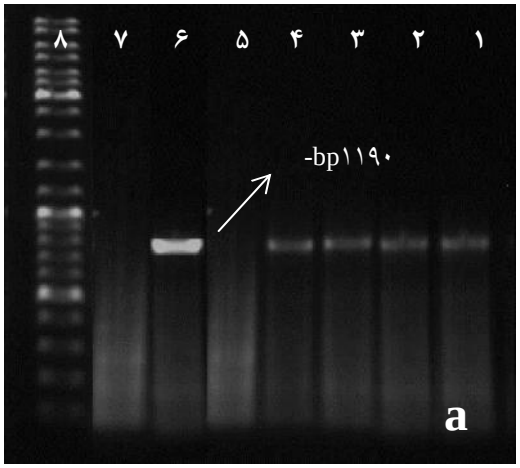
سیب‌زمینی های کنترل و تراریخته B2, B8, B11, B12 در محیط مایع درون شیشه کشت شده و پس از واکشت شدن به شرایط گلخانه‌ای انتقال یافت و پس از آن نیمی از غده‌ها به مدت یک هفته در شرایط نور و نیمی دیگر در شرایط تاریکی قرار گرفتند (شکل ۱).

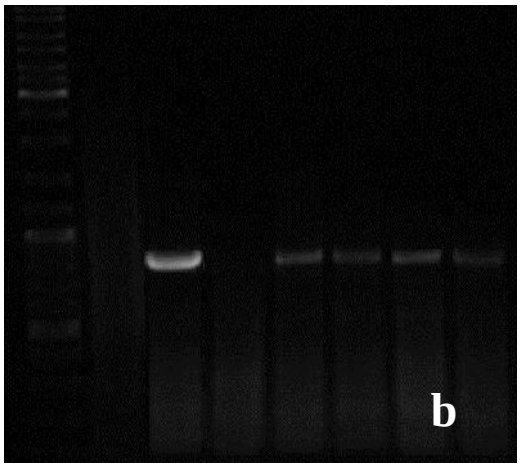
تشخیص ژن *cry*1Ab در سیب‌زمینی‌های تراریخته

ثبات ژن در نمونه‌های تراریخت در مهندسی ژنتیک از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی ثبات ژن *cry1Ab* در برگ و غده گیاهان تراریخت به وسیله تجزیه و تحلیل PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این دو ژن انجام گرفت. تجزیه و تحلیل PCR، حضور ژن را در گیاهان تراریخته موجود پس از ۴ دوره کشت تایید کرد. شکل ۲ نمونه‌ای از الگوی نتایج PCR را برای ژن *cry*1Ab نشان می‌دهد. گیاهان تراریخت همانند پلاسمید نوترکیب pBPEPcry1Ab به عنوان شاهد مثبت، نواری به طول ۱۱۹۰ جفت باز متعلق به ژن *cry1Ab* را نشان دادند. این نتیجه، تاییدی بر ثبات حضور ژن هدف در گیاهان تراریخته بوده و می‌تواند نشان دهنده وجود حداقل یک نسخه از ژن *cry1Ab* در ژنوم گیاهان باشد. گیاه شاهد و نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی هیچ نواری نشان ندادند که دلیلی بر صحت و درستی PCR است. براساس نتایج به دست آمده، هم غده و هم برگ ارقام تراریخته سیب‌زمینی برای ژن انتقالی PCR مثبت بودند که این می‌تواند بیانگر ثبات وجود ژن *cry1Ab* پس انتقال به سیب‌زمینی باشد. بررسی حضور ژنهای *cry1Ab* در گیاهان ذرت تراریخت با استفاده از PCR نشان داده است که این ژن در DNA ژنومی آرد نمونه های تراریخت قابل ردیابی است در حالی که در نمونه های غیرتراریخت حضور این ژن تایید نشده است (Giuliani *et al.* 2007). نتایج حاصل از آزمون سادرن نشان داد که چهار لاین تراریخت سیب زمینی مستقل از هم هستند. نتایج این آزمون مشخص کرد که لاین B2 حداقل دارای ۴ نسخه، لاین B8 حداقل دارای ۲ نسخه، لاین B11 حداقل دارای سه نسخه و لاین B12 هم حداقل دارای ۲ نسخه از ژن *cry1Ab* در خود دارند.

اندازه‌گیری قندهای محلول (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) با استفاده از دستگاه HPLC

جدول تجزیه واریانس قندهای محلول نشان داد که برای هیچ-کدام از قندها، عامل B و اثر متقابل معنی دار نشده است و به



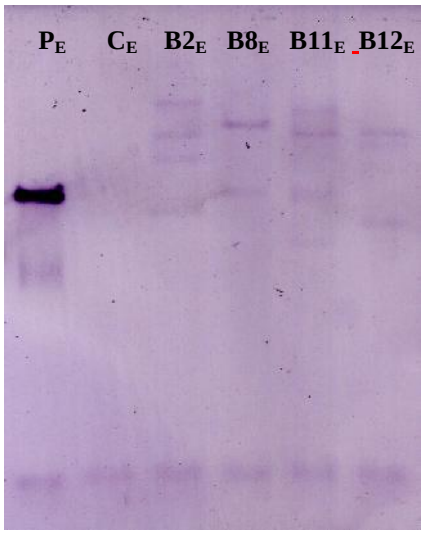


شکل۲ : نتایج PCR برای تشخیص ژن *cry1Ab* در **نمونه‌های برگ** (a) **و غده (b)** ۱- کنترل منفی (آب)، ۲- کنترل مثبت (پلاسمید)، ۳- کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت) ۷-۴- گیاهان تراریخت.

Figure 2: Detection of *cry1Ab* gene (1190 bp) by PCR analysis in leves (a) and tubers (b). 1- negative control (water), 2- positive control (plasmid), 3- negative control (non-transgenic plant), 4-7- transgenic plants.

این نتیجه می‌رسیم که بین ارقام تراریخته و گیاه شاهد با میانگین‌های ساکارزبه ترتیب سطح‌ها (۵/۷۵، ۵/۸۹، ۶/۰۴، ۵/۶۳ و ۵/۸۲) میلی مولار، گلوکز به ترتیب سطح‌ها(۸/۸۶، ۸/۸۷، ۸/۶۸، ۸/۷۳ و ۸/۰۴) میلی مولار و فروکتوز به ترتیب سطح ها (۱۱/۷۴، ۱۱/۴۵، ۱۰/۴۴، ۱۱/۵۵ و ۱۱/۱۴) میلی مولار تفاوت معنی داری از لحاظ غلظت قندهای محلول ذخیره شده در آن‌ها نیست (جدول ۱).

همچنین جدول تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف میزان قند فروکتوز بین برگ ،غده‌های نور دیده و غده‌های تاریکی با میانگین‌های به ترتیب (۱۱/۵۱، ۱۰/۶۹ و ۱۱/۵۹) معنی‌دار نیست



شکل ۳: تجزیه و تحلیل سادرن گیاهان تراریخت سیب‌زمینی حاوی ژن *cry1Ab*. PE پلاسمید هضم شده با آنزیم *Eco*R1، C_E گیاه غیرتراریخت هضم شده با آنزیم *Eco*R1، $B2_E$، $B8_E$، $B11_E$ و $B12_E$ به‌ترتیب گیاهان تراریخت لاین B2، B8، B11 و B12 هضم شده با آنزیم *Eco*R1.

Figure 3: Southern analysis of transgenic potato harboring *cry1Ab* gene. PE, Plasmid digested by *Eco*RI: CE, non-transgenic DNA digested by *Eco*RI: B2E, B8E, B11E, B12E, transgenic DNA digested by *Eco*RI.

جدول۱- جدول تجزیه واریانس غلظت ساکارز درگیاهان شاهد و تراریخته سیب زمینی

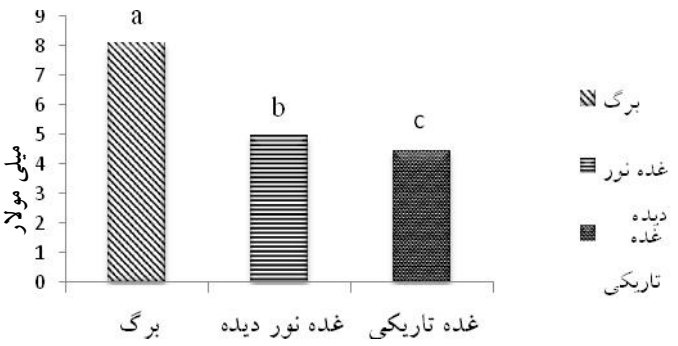
Table 1: Variance analysis of sucrose content in transgenic and non-transgenic potatoes

منابع تغییر	df	میانگین مربعات		
		ساکارز	گلوکز	فروکتوز
A	۲	۵۹/۱۱۸**	۱۶۸/۵۵۶**	۲/۷۲۹ns
B	۴	۰/۲۱۵ns	۰/۲۳۸ns	۲/۳۳۲ns
A×B	۸	۰/۲۰۲ns	۰/۰۸۱ns	۰/۸۸ns
خطا	۲۰	۰/۴۰۴	۰/۲۴۱	۱/۳۹۲

ns : معنی دار نیست. **: درسطح یک درصد معنی دار است. عامل A : ۳ سطح (برگ،غده های نور دیده و غده های تاربکی) ، عامل B : در ۵ سطح (کنترل،B2,B8,B11,B12)

** Significant at the 1 percent levels, and ns: not statistically significant. A: 3 level (Leaves, light treated tubers, dark treated tubers); B: 5 levels (Contro, B2, B8, B11, B12)

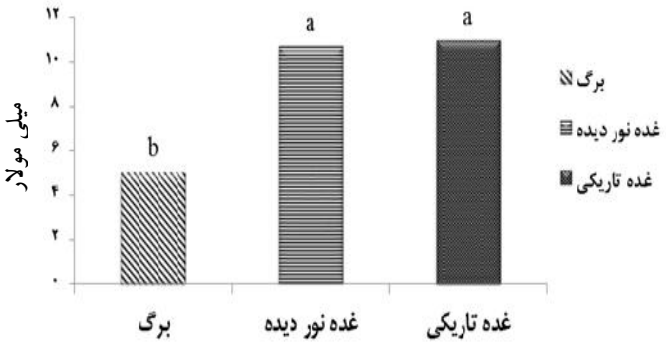
ولی این اختلاف برای قندهای ساکارز و گلوکز معنی دار بود که نشان می‌دهد بین بافت‌های مختلف گیاهی میزان غلظت این دو قند متفاوت می‌باشد، در نتیجه میانگین‌های اثر این عامل با روش دانکن برای ساکارز و گلوکز با یکدیگر مقایسه شد.



نمودار ۱: مقایسه میانگین غلظت ساکارز موجود در بافت‌های مختلف گیاه

Diagram 1: Sucrose level mean comparison (mM) in different tissues of plants.

نمودار مقایسه میانگین غلظت ساکارز به روش دانکن نشان می‌دهد که مقدار ساکارز موجود در برگ از غده‌ها بیشتر بوده و بعد از برگ‌ها، ساکارز غده‌های نور دیده از غده‌های تاریکی بیشتر بوده و میزان آن‌ها در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارد (نمودار۱).



نمودار ۲: مقایسه میانگین غلظت گلوکز موجود در بافت‌های مختلف گیاه

Diagram 2: Glucose level mean comparison (mM) in different tissues of plants.

نمودار مقایسه میانگین غلظت گلوکز نشان می‌دهد که مقدار گلوکز موجود در برگ کمتر بوده و با غده ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشته ولی بین غده‌های نور دیده با غده‌های تاریکی میزان گلوکز آنها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارد (نمودار۲).

بررسی قندهای محلول در سیب‌زمینی تراریخته و شاهد نشان داده است که قندهای محلول در گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی دار ندارد (Louise *et al.* 2006). بررسی این‌همانی گندم‌های تراریخته هم نشان داده است که لاین‌های تراریخته گندم از لحاظ مقدار قندهای محلول با گیاه شاهد یکسان اند و تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (Baker *et al.* 2006).

بررسی قند کل موجود در ارقام تراریخته

پس از اندازه‌گیری مقدار قند کل موجود در ارقام تراریخته و شاهد و تجزیه داده‌ها جدول تجزیه واریانس داده‌های قندهای محلول کل نشان داد که هیچ‌کدام از عوامل معنی دار نیست و به این نتیجه می‌رسیم که بین ارقام تراریخته و گیاه شاهد با میانگین سطح‌ها به ترتیب (۰/۳۳، ۰/۲۹، ۰/۳۰، ۰/۳۸ و ۰/۳۰) تفاوت معنی داری از لحاظ مقدار قند کل ذخیره شده در این گیاهان نیست و همچنین این مقدار بین برگ ،غده های نوردیده و غده‌های تاریکی با میانگین‌های به ترتیب (۰/۳۰، ۰/۳۴ و ۰/۳۳) تفاوت معنی داری ندارند که با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت داشت (جدول ۲).

جدول۲: جدول تجزیه واریانس میزان قند کل درگیاهان شاهد و تراریخته سیب زمینی

Table 2: Variance analysis of total sugar content in transgenic and non-transgenic potatoes

منابع تغییر	df	میانگین مربعات
A	۲	۰/۰۰۹ ns
B	۴	۰/۰۱۵ ns
A × B	۸	۰/۰۰۶ ns
خطا	۳۰	۰/۰۱

ns : معنی دار نیست. عامل A : ۳ سطح (برگ، غده های نور دیده و غده های تاریکی) ، عامل B : در ۵ سطح (کنترل،B12,B11,B8,B2)

ns: not statistical ly significant. A: 3 level (Leaves, light treated tubers, dark treated tubers); B: 5 levels (Contro, B2, B8, B11, B12)

اندازه گیری میزان قند کل بین لاین‌های غده های سیب زمینی تراریخته حاوی ژن *cry* V و غیر تراریخته نشان داد که هیچ تفاوت آماری معنی داری برای قند کل بین سیب زمینی غیر تراریخته و سیب زمینی تراریخته وجود نداشت (Raffat El-Sanhoty *et al.* 2004).

بررسی سیب زمینی تراریخته مقاوم به ویروس Y سیب زمینی و مقایسه آن با ارقام غیر تراریخته نشان داده است که این لاین‌ها از

نظر پارامترهای مورد بررسی مانند پروتئین کل تفاوت معنی داری با ارقام غیر تراریخته خود ندارند (El- Khishin *et al*. 2009).

در مجموع نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که ژن *cry1Ab* در سیب زمینی‌های تراریخته پایدار بوده و از طرفی وجود این ژن میزان سایر ترکیبات مهم سیب زمینی همچون قند کل و قند های محلول در سیب زمینی را تغییر نداده و ایمنی سیب زمینی های تراریخته از لحاظ این دو صفت بررسی شده مورد تایید بوده و مصرف آنها بدون خطر می باشد می‌باشد.

منابع

Baker JM, Hawkins ND, Ward JL, Lovegrove A, Napier JA, Shewry PR, Beale NH. 2006. A metabolomic study of substabtial equivalences of filed grown genetically modified wheat. Plant Biotech J 4: 381-392.

Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AMR, Karenlampi S, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborni HPJM, Pedersen J, Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food and Chemical Toxicology 42: 1089-1125.

El- Khishin D, Abdul Hamid A, El Moghazy G, Metry EA. 2009. Assessment of genetically modified potato lines resistant to potato virus Y using compositional analysis and molecular marker. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 5: 261-271.

FAO/WHO . 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology.

FAO/WHO . 2005. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin; report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on food derived from biotechnology; AO/WHO: Geneva,Switzerland http://www.who.int/foodsafety/biotech/who_study/en/index.html.

Fridman M .2006. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. J. agric. Food chem 54:8655-8681.

GhasimiHagh Z ,Rahnama H , Panahandeh J ,BaghbanKohnehRouz B ,Arab Jafari KM, Mahna N. 2009. Green-tissue-specific, C4-PEPC-promoter-drivenexpressionof *cry*1Ab makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller). Plant Cell Rep 28:1869–1879.

Giuliano Albo A, Mila S, Digilio G, Motto M, Aime S, Corpillo D. 2007. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying *cry*1Ab gene and comparison to the corresponding wild- type. Maydica 52: 443-455.

Hashemi M, Shoja Sadat A. 2010. Genetically modified food: opportunities and challenges. JFST 7: 89-102.

Kok E J, Kuiper H A. 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. Trends in Biotechnology 21: 439-444.

Louise V, Shepherd T, James W, McNicol R, Mark A ,Howard V, Davies V. 2006. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. Transgenic Res 15: 409–425.

OECD. 2001a. Consensus document on key nutrient and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola), series on the safety of novel foods and feeds No. 1., ENV/JM/MONO(2001)13. Organisation for economic cooperation and development, Paris. http:// www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)13.

OECD. 2001b. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients, series on the safety of novel foods and feeds No. 2, ENV/JM/MONO(2001)15. Organisation for economic cooperation and development, paris. olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15.

OECD. 2002a. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. series on the safety of novel foods and feeds No. 3, ENV/JM/MONO(2002)4.Organisation for economic cooperation and development, paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)4.

OECD. 2002b. Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, Anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No. 4, ENV/JM/MONO(2002)5. Organisation for economic cooperation and development, paris. http://www.olis.

oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)5.

Rafaat ElS, Ahamed AAE, Klaus W. 2004. Quality and safety evaluation of genetically modified potatoes Spunta with Cry V gene: Compositional analysis, determination of some toxins, antinutrients compounds and feeding study in rats. Food Technology Research Institute, Agriculture Research center, Giza, Egypt

Rondon SI, DeBano SJ, Clough GH, Hamm PB, Jensen A, SchreiberA Alvarez JM, Thornton M, Barbour J, Dogramaci M. 2007. Biology and management of the potato tuberworm in the pacific northwest. PNW.594

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York .

Schlegel HG. 1956. Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. Planta. 47: 510-515.

Visser RG, Bachem, CWB, DeBer JM, Bryan GJ, Chakrabati SK, Feingold S, Gromadka R. 2009. Sequencing the potato genome: outline and first result to come from elucidation of the sequence of the world third most important food crop. Am. J. Pot. Res 10.1007/s12230-009-9097-8.

WHO. 1995. Application of the Principles of Substantial Equivalence to the Safety Evaluation of Foods or Food Components from Plants Derived by Modern Biotechnology. Report of a WHO Workshop. World Health Organisation, Geneva.

Yaghbani M, Mohamadzadeh J. 2006. Study on physiochemical properties of starch from potato cultivars in Golestan province. IJFST 12: 71-79.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۸۶-۷۶

بررسی اثر سازگاری سویه در بیان موقت مبتنی بر روش اگروباکتریوم در ارقام خربزه (*Cucumis melo* L.)

Evaluation of strain compatibility effects on Agrobacterium-mediated transient expression in melon cultivars

صهبا طوسی [۱]، فرهاد شکوهی‌فر*[۲]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۳]، عبدالرضا باقری[۳]
Sahba Toosi[1], Farhad Shokouhifar[2*], Saeid Malekzadeh Shafaroudi[3], Abdolreza Bagheri[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

1. M.Sc student, Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Faculty Member of Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Faculty Members of Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shokouhifar@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۹)

چکیده

بیان موقت یک ژن اثرگذار در بیماری‌زایی (effector) در گیاه میزبان با استفاده از اگروایجکشن، یک روش قابل قبول برای بررسی نقش ژن در بیماری‌زایی است. در این مطالعه تاثیر دو سویه اگروباکتریوم بر چهار رقم استاندارد و دو رقم محلی خربزه در بررسی بیان موقت مورد ارزیابی قرار گرفت. سازگاری سویه‌های LBA4404 و GV3101 به وسیله تزریق سلولهای باکتری به برگ ارقام خربزه تعیین شد. زنده‌مانی سلول‌های اگروباکتریوم تزریق شده در بافت برگ به وسیله ارزیابی بیان پروکاریوتی ژن GUS ۲۴ ساعت پس از تزریق تعیین شد. سویه LBA4404 پس از انتقال ناقل pCAMBIA3301 دارای ژن GUS اینترون‌دار به عنوان کنترل مثبت برای تایید بیان موقت این ژن در سلول‌های گیاه استفاده شد. انتقال ناقل‌های pBI121 و pCAMBIA3301 به سویه LBA4404 با روش کلنی PCR با آغازگرهای PSh3-F/R تایید شد. راندمان بیان موقت در برگ‌های ارقام خربزه، ۴۸ ساعت پس از اگروایجکشن سویه LBA4404 حامل ناقل pCAMBIA3301 به وسیله سنجش هیستوشیمیایی ژن GUS مشخص شد. برگ‌های تزریق شده با سویه LBA4404 دارای ناقل pBI121 فعالیت ژن GUS را نشان دادند که تایید کننده زنده بودن سلول‌های اگروباکتریوم در برگ ارقام خربزه بود. تمام ارقام ژن GUS را به صورت موقت با استفاده از اگروایجکشن پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان کردند. این نتایج می تواند در مطالعات آینده به منظور بررسی عملکرد ژن‌های اثرگذار منتخب در برهمکنش با ارقام استاندارد خربزه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

ارقام استاندارد خربزه
اگروباکتریوم
بیان موقت
سنجش GUS

مقدمه

بیان موقت یک ژن اثرگذار در بیماری‌زایی در بافت‌های گیاه میزبان روش مفیدی در بررسی نقش آن در فعال سازی سیستم دفاعی گیاه است (Van der Hoorn *et al.* 2000). در روش‌های بیان موقت یک تراژن پس از انتقال به درون سلول‌های گیاه و انتقال به درون هسته برای مدت زمان کوتاه درون سلول‌های گیاه بیان می‌شود. در این روش تلفیق شدن تراژن درون ژنوم جهت بیان آن ضروری نیست و توارث نیز نخواهد یافت (Shokouhifar *et al.* 2014). سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دائمی مزیت‌های فراوانی برای ارزیابی بیان ژن‌ها دارد. از جمله این مزیت‌ها می‌توان به عدم نیاز به باززایی گیاه از سلول تراریخته و کاهش زمان رسیدن به نتیجه بیان ژن اشاره نمود. روش بیان موقت در جهت رفع مشکلات مربوط به تراریختی دائم در مطالعات مختلفی از جمله تجزیه و تحلیل فعالیت پیشبر مورد توجه قرار گرفته است (Wroblewski *et al.* 2005 Yang Y 2000). علاوه بر این بیان موقت در مواردی مانند تجزیه و تحلیل بیان ژن خارجی (Kapila *et al.* 1997)، خاموشی ژن پس از رونویسی (Voinnet *et al.* 2003) روابط متقابل بین ژن‌های مقاومت گیاهی و بیماریزایی پاتوژن (Van der Hoorn *et al.* 2000)، تولید پروتئین (Andrews and Curtis 2005) به کار می‌رود.

روش‌های مختلفی جهت انتقال تراژن به داخل سلول‌های گیاه و بیان موقت آن مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله این روش‌ها می‌توان به اگروانیفیلتراسیون، ریزپرتابی و ناقل‌های ویروسی اشاره کرد. اساس این روش‌ها فیزیکی، شیمیایی یا زیستی است. در روش ریزپرتابی مبنا فیزیکی است مانند استفاده از ذرات بسیار ریز طلا یا تنگستن (Higo *et al.* 2005). در روش‌های شیمیائی به عنوان مثال از پلی اتیلن گلایکول (PEG) جهت انتقال سازه به درون سلول میزبان استفاده می‌شود (Nugent *et al.* 2006). در روش زیستی از سلول اگروباکتریوم (Kapila *et al.* 1997; Yang Y 2000).و یا ناقل ویروسی (Shokouhifar *et al.* 2014) جهت انتقال ژن هدف به درون سلول میزبان و بیان آن استفاده می‌شود.

در این بین روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم به دلیل عدم نیاز به امکانات پیشرفته، در دسترس بودن و سادگی روش، عدم محدودیت اندازه پروتئین مورد نظر در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Shokouhifar *et al.* 2014).

بمنظور بهره گیری از این روش در مطالعات تجزیه و تحلیل بیان تراژن ضروری است ابتدا شرایط بیان موقت در گیاه هدف تعیین شود. تاکنون این روش در گیاهان مختلفی مثل یونجه (D'Aoust *et al.* 2004)، کاهو، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس (Wroblewski *et al.* 2005) بهینه سازی شده است. این روش همچنین برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن در میوه گوجه فرنگی نیز انجام شد و نشان داده شد که تزریق اگروباکتریوم از طریق نوک سرنگ منجر به نفوذ آن و بیان موقت پروتئین در میوه گیاه می‌شود. در برگ لوبیا نیز با توجه به نفوذپذیری بسیار اندک از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم جهت بیان پروتئین خارجی استفاده شده است (Mozafari *et al.* 2013). با توسعه دستورالعمل تراریختی موقت به واسطه اگروباکتریوم در برنج مشخص شد که این روش را می‌توان برای گونه‌های تک لپه ای نیز به کار برد. البته کارایی اگروانیجکشن از میزبانی به میزبان دیگر متفاوت است و در تعدادی از گونه‌ها قابل اجرا نمی‌باشد (Song and Yamaguchi 2003). با این حال بیشترین گزارش‌ها در گونه بنتامیانا توتون *(Nicotiana benthamiana)* بوده است (Wroblewski *et al.* 2005). گونه بنتامیانا برای بیان موقت پروتئین دارای مزیت‌هایی است که از جمله می‌توان به کشت و داشت ساده، سازگاری با سویه‌های معمول اگروباکتریوم، بافت مزوفیل نفوذ پذیر مناسب جهت تزریق سلول‌های اگروباکتریوم، راندمان تراریختی بالا و توان بیان بالای پروتئین خارجی اشاره کرد (Kapila *et al.* 1997). در راندمان بیان موقت عوامل زیادی موثرند نظیر ساختار برگ، سویه باکتری، غلظت استفاده شده از سوسپانسیون باکتری و غیره. در این بین، سازگاری سویه باکتری و گیاه میزبان بر راندمان بیان موقت تاثیر به‌سزایی دارد. بعضی از سویه‌های اگروباکتریوم قدرت تهاجمی متفاوتی برروی یک گونه گیاهی دارند و گونه‌های گیاهی نسبت به سویه خاصی از اگروباکتریوم سطوح مختلفی از

حساسیت را نشان می‌دهند (Anderson and Moore 1979). در آزمایشی که بر روی تعداد زیادی سویه اگروباکتریوم بر روی گیاه گوجه‌فرنگی و داتوره انجام گرفت، مشخص شد که تعدادی از سویه‌ها برروی گوجه‌فرنگی بیماری زا هستند در حالیکه بعضی از سویه‌ها تنها روی داتوره علائم نشان دادند (Anderson and Moore 1979).

از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم برای بررسی برهمکنش ژن‌های مقاومت گیاه و بیماری زای پاتوژن در مطالعات متعددی استفاده شده است (Jones and Dangl 2006). در مطالعه دیگری با بررسی رابطه متقابل ژن‌های Avr/Cf با استفاده از اگروایفیلتراسیون نشان داده شد که مسیرهای هدایت سیگنالی تحت القای ژن‌های مقاومت گیاه و بیماری زای پاتوژن در گونه-های خانواده سولاناسه حفاظت شده است (Van der Hoorn *et al.* 2000). علی‌رغم برتری های این روش و نقش تاثیر گذار آن در مطالعه برهمکنش ژن‌های بیماریزایی و مقاومت، تاکنون گزارشی از استفاده از تزریق اگروباکتریوم در خربزه ارائه نشده است. ضرورت بهره‌گیری از آزمایشات بیان موقت در خربزه سبب شده است تا روش‌های دیگر بیان موقت مانند استفاده از روش ریزپرتابی در مطالعات مختلفی (Mizuno *et al.* 2006; Tan *et al.* 1995; Yamagata *et al.* 2002) مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه ای با هدف بررسی نقش بیماریزایی پروتئین‌های رمز شونده توسط ویروس لکه نکروزی خربزه (MNSV) از روش ویروس و تلقیح آن در گیاه خربزه استفاده شده است (Genoves et al. 2006). با توجه به زمانبر بودن و هزینه‌بر بودن این روش‌ها در صورت بهینه شدن روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم می‌توان مسیر مطالعات برهمکنش ژن های بیماری زایی را تسهیل و تسریع نمود.

به‌منظور مهیا شدن شرایط جهت مطالعه برهمکنش ژن‌های بیماریزایی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) و ژن‌های مقاومت مربوط در ارقام خربزه بهینه سازی روش اگروایجکشن ضروری است. بنابراین در مطالعه حاضر عوامل تاثیر گذار در بیان موقت تراژن با استفاده از روش مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم در بافت برگ ارقام استاندارد (Chikh-Rouhou *et al.* 2008) و محلی حامل ژن‌های مقاومت به *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) ، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتریایی و ناقل‌ها

بذور گیاه توتون *Nicotiana benthamiana*، و خربزه ارقام Charentais-Fom2، Charentais-Fom2، BG5384، M8 و M10 از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جهت بررسی برهمکنش سویه‌های اگروباکتریوم با ارقام خربزه از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌های GV3101 و LBA4404 و جهت بررسی بیان موقت از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. ناقل‌های pCAMBIA3301 (CAMBIA، استرالیا) و pBI121 (Chen *et al.* 2003) تهیه شده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد) به ترتیب حاوی ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز اینترون‌دار و فاقد اینترون در آزمایش‌های بیان موقت به کارگرفته شد (شکل ۱).

آماده سازی ارقام گیاهی

ضدعفونی بذور بر اساس روش چنارانی و همکاران (Chenarani *et al.* 2012) انجام شد. بر این اساس ابتدا پوست بذور حذف و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. آبکشی بذرها سه بار جمعاً به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل و تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. سپس بذور استریل در زیر هود داخل پتری دیش دارای کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شد و به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شدند. بذور جوانه دار شده به درون گلدان حاوی کود ورمی کمپوست و مخلوط ورمی کولیت، پیت ماس و کوکوپیت انتقال یافت. گلدان‌ها در نور مصنوعی با شرایط دمایی ۲۲ درجه و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت مناسب قرار داده شدند.

بررسی برهمکنش دو سویه و سه رقم استاندارد و دو رقم محلی خربزه

به منظور آماده سازی سویه‌های آگروباکتریوم، ابتدا از سویه‌ها کشت تک کلنی بر روی محیط LB حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین به صورت زیکزاکی کشت داده شد. تک کلنی حاصل، در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و سطح برگ در پنج رقم به سوسپانسیون باکتری با ۰/۸ =OD600 آغشته شد. این عمل در دو تکرار و برای هر کدام از سویه‌های باکتری دو مرتبه انجام شد. سپس در فواصل زمانی مختلف از نمونه عکس برداری شد.

انتقال سازه‌ها به سویه باکتری و تایید آن

تهیه سلول‌های مستعد و تراریختی سویه LBA4404 با روش انجماد آنی انجام شد (Weigel and Glazebrook 2005). کلنی-های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR (Sambrook and Russell 2001) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh3-F با توالی 5'- GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AGG A -3' و پرایمر PSh3-R با توالی 5'-AGG ATT CGA TAA CGT GCT GAT GG-3' (Shokouhifar *et al.* 2013a) تایید شدند. محتویات واکنش شامل یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (Ginet Bio)، یک میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲۰۰ میکرو مولار از مخلوط dNTPs (Genet Bio. Co, South Korea)، ۱.۵ میلی مولار MgCl2 و ۵ پیکومول از جفت پرایمر PSh3-F/R در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و با استفاده از نوک سمپلر استریل هریک از کلنی‌های انتخاب شده بعنوان الگو در واکنش اضافه شدند و بصورت همزمان روی محیط LB حاوی کانامایسین کشت شدند. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Personal Thermocycler, MWG Co. Germany) با ۵ دقیقه در ۹۳ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۵ چرخه با برنامه ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد ، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱۰ درصد رنگ Green viewer (Ginet Bio) الکتروفورز و تصویر الگوی باندی تکثیر شده از نمونه با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

سنجش بیان پروکاریوتی ژن GUS دو سویه باکتری

به منظور سنجش بیان پروکاریوتی ژن GUS سویه‌های آگروباکتریوم، ابتدا از تک کلنی سویه‌های حاوی ناقلین pCAMBIA3301 و pBI121 بر روی محیط LB حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین به صورت زیکزاکی کشت داده شد. از تک کلنی حاصل در ۳ میلی لیتر LB مایع حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین حل شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شدند. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، رسوب‌های باکتری در محلول سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیدازی شامل بافر فسفات ۱ مولار تهیه شده از دو نمک Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4، تریتون X-100، EDTA نیم‌مولار، K3Fe(CN)6 ۵ میلی مولار، K4Fe(CN)6 ۵ میلی مولار، مرکاپتواتانول ۰/۷۸ میکرولیتر در میلی لیتر، X-Gluc با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت تیمار شدند.

تصویربرداری

جهت تصویر برداری از میکروسکوپ دیجیتال (Dino-Lite مدل Am-313 T Plus) با بزرگنمایی ۴ استفاده شد. به منظور تصویر برداری از برنامه نرم افزاری اختصاصی دوربین (Dinocapture 2.0) استفاده شد

آماده سازی سوسپانسیون باکتری و تزریق در برگ ارقام

به منظور آماده سازی سلول‌ها جهت تزریق (Yang 2000)، کلنی-های تایید شده در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، در محیط القاء (یک گرم بر لیتر NH4Cl، ۰/۳ گرم بر لیتر $MgSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۱۵ گرم بر لیتر KCl، ۰/۰۱ گرم بر لیتر CaCl2، ۲/ ۵ میلی گرم بر لیتر FeSO4-7H2O، ۲ میلی مولار بافر فسفات، ۲۰ میلی مولار MES، یک درصد ساکارز با اسیدیته ۵.۵) به مدت یک شب و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد معلق شدند.

سلول‌ها سپس با سانتریفیوژ مجدد در ۲۵۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۵دقیقه رسوب داده شدند و سپس در محلول تزریق شامل MgSO4 و MES با اسیدیته ۵/۵ تا حصول OD600= ۰/۸ رقیق شدند. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری درون فضای میان سلولی برگ‌های سالم و متصل به گیاه با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۱ میلی لیتری تزریق شد. گیاهچه‌ها بعد از تزریق بوسیله پوشش‌های پلاستیکی پوشانده شدند و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پوشش‌های پلاستیکی حذف شدند و برگ‌های تزریق شده بعد از ۳ روز جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن GUS مورد استفاده قرار گرفتند .

سنجش هیستوشیمیایی عملکرد ژن GUS

جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت GUS، دیسک‌های برگی به قطر ۱ سانتی‌متر ۴۸ ساعت پس از آلودگی از محل تزریق تهیه شد و یک شب در محلول سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز تیمار شد. کلروفیل دیسک‌های برگی با استفاده از الکل ۷۰ درصد و در دمای۵۰ درجه سانتیگراد در چند مرحله حذف شد (Cervera 2004).

نتایج و بحث

در این مطالعه شرایط بیان موقت با استفاده از روش اگروواینجکشن در ارقام استاندارد و محلی خربزه با دو سویه اگروباکتریوم GV3101 و LBA4404 که از لحاظ قدرت تهاجمی با یکدیگر متفاوت هستند (Wroblewski *et al.* 2005) به همراه دو ناقل pBI121 و pCAMBIA3301 مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور سلولهای آگروباکتریوم روی سطح برگ ارقام استاندارد و محلی خربزه تلقیح شدند. واکنش ارقام در زمان‌های مختلف از ۲ ساعت تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح مشاهده و ثبت شد. نتایج نشان داد واکنش ارقام به دو سویه به طور کامل متفاوت است (شکل ۲).

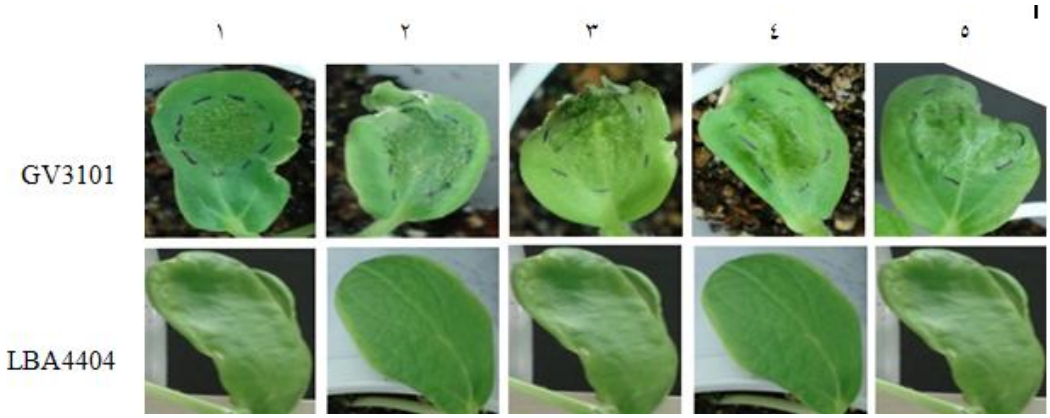
سویه GV3101 در هر دو رقم سبب بروز نکروز شد. شدت واکنش ارقام به سویه GV3101 با گذشت زمان افزایش یافت. در مقابل سویه LBA4404 علائم نکروزه روی ارقام نشان نداد و حتی با گذشت ۷۲ ساعت نمونه‌ها از نظر ظاهری با کنترل تفاوتی نشان ندادند. با هدف بررسی سنجش برهمکنش ژن‌های اثرگذار روی برگ‌های حقیقی، سازگاری سویه با برگ‌های مشابه بررسی شد. نتایج بدست آمده تایید نمود که سویه LBA4404 روی برگ‌های حقیقی نیز سازگار است و علائم نکروز بافت برگ تا ۴۸ ساعت مشاهده نشد. راندمان انتقال ژن در آزمایش‌های بیان موقت تا حد زیادی به چگونگی برهمکنش سویه باکتری و گونه گیاهی بستگی دارد (Van der Hoorn *et al.* 2000; Wroblewski *et al.* 2005; Zottini *et al.* 2008).

در صورتیکه سیستم دفاعی گیاه در پاسخ به آلودگی با یک سویه باکتری فعال شود، سلول‌های مجاور محل تزریق نکروزه شده و در نتیجه امکان انتقال ژن و بیان تراژن وجود نخواهد داشت (Van der Hoorn *et al.* 2000). براساس این نتایج سویه LBA4404 واکنش سازگار با ارقام خربزه مورد مطالعه نشان داد، بنابراین جهت بررسی بیان موقت مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۱- نمای شماتیک منطقه T-DNA سازه‌های pBI121 و pCAMBIA3301 نشان دهنده مجموعه ژن گزارشگر و موقعیت اتصال آغازگرهای اختصاصی و اندازه باند-های قابل تکثیر

LB: مرز چپ، Nos-T: پایان دهنده رونویسی نوپالین سنتاز، *Npt*II : نئومایسین فسفوترانسفراز، Nos-P: پیشبر نوپالین سنتاز، p 35S: پیشبرCaMV 35S، p 2X 35S: پیشبر 2X CaMV35S، Int: اینترون، GUS: ژن بتا گلوکرونیداز، Poly A: دنباله پلی آدنیلاسیون، RB: مرز راست.

Fig. 1. Schematic diagrams of T-DNA region of the pBI121 and pCAMBIA3301 vectors showing the reporter gene: promoter cassettes, primer match sites and the expected size of the amplicons.
LB: left border, Nos-T: nopaline synthase terminator, *Npt*II - neomycin phosphotransferase II, Nos-P - nopaline synthase promoter,P 35S: CaMV 35S promoter, P2X35S: two repeat of CaMV 35S promoter, Poly A: Polyadenylation terminator, RB - right border. pGMP contains CaMV 35S minimal promoter used as negative control.



شکل۲- برهمکنش سویه‌های اگروباکتریوم بر روی ارقام خربزه ۶ ساعت پس از آلودگی.

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب برگ کوتیلدونی ارقام C-F1، C-F2، BG ، M8 و M10 آلوده شده به سویه‌های GV3101 و LBA4404 اگروباکتریوم

Fig. 2: Interaction between *Agrobacterium* strains and melon varieties 6 hours post infection.
1, 2 and 3: *Cucumis melo* var. C-F1, C-F2 and BG, respectively. 4 and 5: Iranian melon cultivars Daragazi and Khatooni.

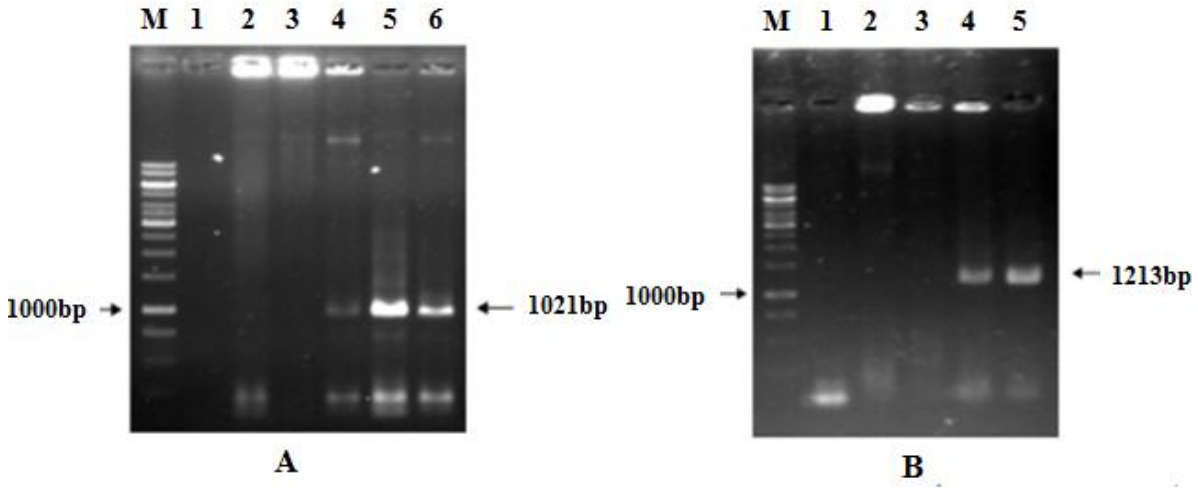
در روش اگرواینجکشن سلول‌های باکتری حامل ناقل بیانی در فضای آپوپلاستی برگ گیاه تزریق می‌شوند. هرچند سازگاری سویه LBA4404 با ارقام در مرحله قبل تایید شد، با این حال ضروری است زنده مانی سلول‌های تزریق شده در بافت برگ ارقام مختلف تایید شود. بدین منظور ناقل pBI121 به سویه LBA4404 منتقل شد. این ناقل دارای ژن گزارشگر GUS فاقد اینترون است (شکل ۱). بنابراین انتظار می‌رود در سلول باکتری ژن گزارشگر GUS بیان شود. در نتیجه در صورت زنده بودن سلول‌ها در ناحیه تزریق بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر GUS به‌صورت تظاهر رنگ آبی تایید می‌شود. سلول‌های اگروباکتریوم حامل با ناقل pBI121 با استفاده از کلنی PCR و به وسیله آغازگرهای اختصاصی Psh3-FR تایید شدند. نتایج کلنی PCR نشان داد در کلنی‌های مثبت، تک باند ۱۰۲۱ جفت بازی معادل باند 1Kb نشانگر وزنی تکثیر شده است (شکل ۳–الف).

قدرت و صحت بیان ژن گزارشگر GUS در سویه تراریخته شده با ناقل pBI121 با سنجش فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در رسوب سلول‌های کشت شده در محیط LB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، فعالیت شدید آنزیم بتا گلوکورونیداز را با بروز رنگ آبی در سلول‌ها نشان داد (شکل ۴– الف) و قدرت بیان این ژن در سویه تراریخته شده تایید شد. در حالیکه سویه LBA4404 فاقد ناقل pBI121 قدرت بیان ژن GUS را نشان نداد (شکل ۴– ب).سلول‌های سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، جهت بررسی زنده مانی آن‌ها پس از تزریق در بافت برگ ارقام مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی LBA4404 پس از آماده سازی در محلول القاء و تلقیح، در بافت برگ ارقام خربزه تزریق شد. همچنین به منظور اطمینان از مرحله تزریق از گیاه توتون رقم بنتامیانا نیز به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در محل تزریق سوسپانسیون باکتری قابل مشاهده است (شکل ۵– الف)، در حالیکه در نمونه‌های تهیه شده از برگ گیاهان بدون تزریق فعالیت درونزاد آنزیم بتا گلوکورونیداز مشاهده نشد (شکل ۵– ج).

فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، تا حدی با یکدیگر تفاوت نشان داد. باکتری تزریق شده در فضای بین سلولی ارقام خربزه را می‌توان علت این تفاوت دانست. در حالیکه شدت بالای فعالیت آنزیمی در ناحیه تزریق در برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا ناشی از حضور بالای سلول‌های اگروباکتریوم در فضای آپوپلاستی است. مقایسه بافت برگ توتون و خربزه به خوبی تایید کننده این تفاوت است. نتایج این آزمایش نشان داد سلول‌های زنده مربوط به سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، در مدت ۴۸ ساعت پس از تزریق در فضای بین سلولی بافت برگ تمامی ارقام خربزه با فراوانی متفاوتی حضور دارند و ژن گزارشگر GUS را حداقل به صورت پروکاریوتی در این فضا بیان کرده اند.

در آزمایش تجزیه و تحلیل بیان موقت، هدف، بیان تراژن در سلول‌های گیاه است. با توجه به یوکاریوتی بودن سلول‌های گیاهی امکان پردازش RNA نسخه برداری شده از تراژن در آن‌ها وجود دارد. در حالیکه سلول‌های پروکاریوتی فاقد این قابلیت می‌باشند. به منظور بررسی امکان انتقال تراژن به سلول‌های بافت برگ ارقام خربزه و بیان آن در گیاه، آزمایشی با استفاده از ناقل pCAMBIA3301 طراحی شد. این ناقل دارای ژن گزارشگر GUS واجد اینترون است (شکل ۱– ب). بنابراین تنها در صورت انتقال ژن گزارشگر به سلول گیاه و بیان یوکاریوتی گیاهی امکان پردازش RNA نسخه برداری شده فراهم می‌شود. بدین منظور ناقل pCAMBIA3301 به سویه LBA4404 منتقل شد و کلنی‌های نوترکیب با استفاده از آغازگرهای Psh3-FR مورد تایید قرار گرفتند. نتایج کلنی PCR تکثیر قطعات اختصاصی با اندازه مورد انتظار ۱۲۱۳ جفت باز را تایید نمود (شکل ۳– ب).

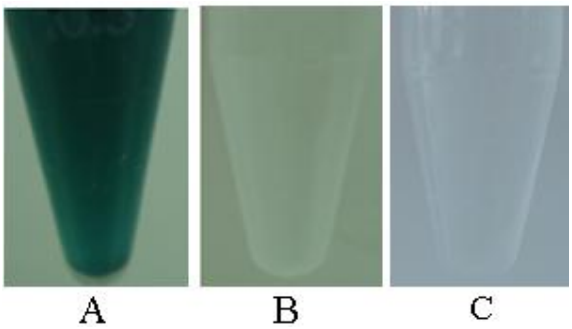
به منظور تایید عدم بیان پروکاریوتی، کشت شبانه سلول‌های اگروباکتریوم سویه LBA4404 حامل ناقل pCAMBIA3301 از نظر فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۳ - تایید کلنی‌های اگروباکتریوم حامل ناقل‌های pCAMBIA3301 و pBI121 با استفاده از کلنی PCR

الف: تائید کلنی‌های نوترکیب حامل سازه pBI121 با استفاده از آغازگرهای PSh3FR (۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳ کلنی‌های فاقد باند منطبق؛ ۴، ۵ و ۶ کلنی‌های نوترکیب، M: نشانگر وزنی 1Kb DNA)؛ ب: تائید کلنی‌های نوترکیب حامل سازه pCAMBIA3301 با استفاده از آغازگرهای PSh3FR (۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳ کلنی‌های فاقد باند منطبق؛ ۴ و۵ کلنی‌های نوترکیب، M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb).

Fig3: Colony PCR analysis of transformed *Agrobacterium* colonies by the pBI121 and pCAMBIA3301 vectors using specific primers (PSh3FR).
A: Lane 1- negative control; 2, 3- false positive colonies; 4, 5, 6- confirmed colonies harboring pBI121showing a specific band in expected size.
B: Lane 1- negative control; 2, 3- false positive colonies; 4, 5- confirmed colonies harboring pCAMBIA3301showing a specific band in expected size.
M: 1 Kb DNA ladder (Fermentas, Canada)



شکل ۴- سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در سویه LBA4404 اگروباکتریوم حامل ناقل‌های pBI121 (A)، pCAMBIA3301 (B) و فاقد ناقل حامل ژن GUS (C).

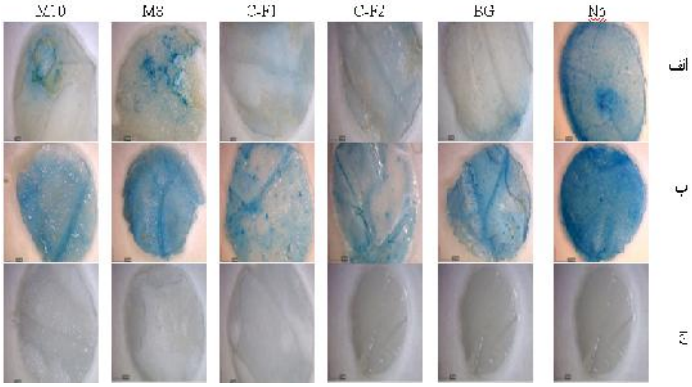
A: فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز ناشی از بیان پروکاریوتی ژن GUS، B: عدم فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در سلول پروکاروتی به دلیل وجود اینترون در توالی ژن GUS، C: سویه LBA4404 فاقد وکتور بیانی.

Fig4: analysis of Beta-glucronidase activity in *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring pBI121 (A), pCAMBIA3301 (B) and LBA4404 lacking GUS gene.
A: showing GUS activity due to prokaryotic GUS expression, B: no recordable GUS activity in prokaryotic cells due to intron-containing GUS, C: Empty LBA4404 strain.

نتایج سنجش فعالیت ژن گزارشگر GUS در این سلول-ها منفی بود (شکل ۴- ب). این نتایج نشان داد سازه pCAMBIA3301 همانگونه که انتظار می‌رفت در سلول‌های باکتری قادر به تولید آنزیم بتا گلوکورونیداز نیست. بنابراین در صورت تزریق این سلول‌ها به بافت برگ و بروز فعالیت آنزیمی انتقال و بیان ژن گزارشگر به سلول گیاه انجام شده است.

سلولهای سویه LBA4404 حامل سازه pCAMBIA3301 پس از آماده سازی در محلول القاء و تزریق در بافت برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا تزریق شد تا صحت سازه و قدرت بیان آن تایید شود. نتایج به خوبی نشان داد رنگ آبی ناشی از بیان موقت ژن گزارشگر GUS از زمان ۴۸ ساعت پس از تزریق در بافت برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا قابل مشاهده است. (شکل ۵- ب). نتایج آزمایش‌های اولیه تایید نمود که سویه LBA4404 در بافت برگ ارقام خربزه به صورت زنده نفوذ کرده و قادر به بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر GUS می‌باشد. از سوی دیگر نشان داده شد سویه حامل pCAMBIA3301 قادر است در بافت برگ گیاه توتون گونه بنتامیانا ژن گزارشگر GUS را پس از انتقال بیان نماید. در آزمایش نهایی امکان بیان موقت ناقل pCAMBIA3301 در سلول‌های ارقام خربزه مورد مقایسه قرار گرفت. بدین منظور سلولهای LBA4404 حامل سازه pCAMBIA3301 پس از آماده سازی در محلول القاء و تزریق در بافت برگ ارقام استاندارد و محلی خربزه تزریق شد. نتایج سنجش هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در دیسک-های برگی تهیه شده از محل تزریق، رنگ آبی را در حاشیه رگبرگ‌ها نشان داد (شکل ۵- ب). در حالیکه در بافت برگ گیاه سالم فعالیت درونزاد ژن گزارشگر GUS مشاهده نشد (شکل ۵- ج). شدت بروز رنگ آبی در ارقام مختلف متفاوت بود. بیشترین و کمترین میزان بیان به ترتیب در رقم M8 و رقم BG5384 مشاهده شد. این تفاوت در دو تکرار مربوط به هر تیمار مشابه بود. به‌نظر می‌رسد تفاوت میزان بیان در نمونه‌های تزریق شده با ناقل pBI121 به دلیل نفوذپذیری متفاوت ارقام باشد. این تفاوت در نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل pBI121 نیز قابل مشاهده بود. نتایج این مطالعه نشان داد سویه LBA4404 قادر است با انتقال منطقه T-DNA به سلول‌های ارقام خربزه مورد مطالعه، ژن گزارشگر GUS را در این سلول‌ها به طور موقت بیان نماید. تفاوت شدت بیان در ارقام مختلف خربزه تا حدی به دلیل نفوذپذیری متفاوت برگ‌ها می‌باشد. چون این تفاوت در نتیجه سنجش نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل سازه pBI121 نیز مشاهده شد. در مطالعات مشابهی که بر روی گونه بنتامیانا توتون (*Nicotiana benthamian*) ، اطلسی (*Petunia hybrid*)، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس انجام شد نشان داده شده است که ساختار برگ تا حد زیادی بر اگرواینفیلتراسیون موثر است. به این صورت که در گونه بنتامیانا توتون (*Nicotiana benthamian* ، اطلسی (*Petunia hybrid*)، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس سوسپانسیون باکتری به راحتی در بافت برگ پخش می‌شود اما در کاهو، فلفل، *Nicotiana tabacum* و پنبه سوسپانسیون باکتری در داخل لایه نازک برگ پخش می‌شود اما مسیر آن توسط رگبرگ‌های برگ محدود می‌شود (Wroblewski et al. 2005). در مطالعه دیگری که چندین رقم توتون به عنوان میزبان بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم استفاده شد، ضرورت استاندارد سازی شرایط اگرواینجکشن با در نظر گرفتن رابطه متقابل سویه باکتری با گونه یا رقم گیاهی نشان داده شد (Bahrabadi et al. 2014). شکوهی‌فر و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مقایسه بافت برگ گیاهان کلزا، توتون و لوبیا دلایل اصلی تفاوت در راندمان بیان موقت را نفوذپذیری بسیار پایین بافت برگ کلزا و لوبیا دانستند. براساس نتایج این مطالعه سویه LBA4404 با ارقام خربزه مورد مطالعه سازگار بود و جهت بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم قابل توصیه است. با توجه به راندمان کم بیان موقت در بافت برگ ارقام به نظر می رسد مشکل اصلی به دلیل نفوذپذیری اندک بافت برگ باشد بنابراین در مطالعات تکمیلی توصیه می‌شود، روش‌های دیگر فیلتراسیون سوسپانسیون

باکتری در بافت برگ و یا تلقیح سطحی روی سطح برگ باید مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۵- سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز ۴۸ ساعت پس از اگرواینجکشن در برگ ارقام خربزه. الف: تزریق سویه LBA4404 حاوی سازه pCAMBIA3301 ، ب: تزریق سویه LBA4404 حاوی سازه pBI121، ج: بدون تزریق سویه بیان کننده عدم بیان داخلی ژن بتاگلوکرونیداز در نمونه‌ها M10 و M8 به ترتیب رقم درگزی و رقم خاتونی، C-F1 ، C-F2 و BG ارقام استاندارد خربزه، Nb: توتون رقم بنتامیانا بعنوان کنترل

Fig 5: Histochemical beta glocronidase assay 48 hours post injection in melon varieties and *N. bentamiana* A and B: injected leaf disks by LBA4404 harboring pCAMBIA3301 and pBI121 respectively, C: mucked injection leaf disks; M10 and M9: Iranian melon cultivars Daragazi and Khatooni, respectively; C-F1, C-F2 and BG: *Cucumis melo* var. Charentais-Fom1, Charentais-Fom2 and BG5384, respectively; *Nb*: *N. bentamiana* as control.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت تامین منابع مالی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم جهت اجرای این تحقیق را مهیا کردند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

Anderson A, Moore L. 1979. Host specificity in the genus agrobacterium. Phytopathology. 69:320-323.

Andrews LB, Curtis WR. 2005. Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. Biotechnology progress. 21:946-952.

Bahrabadi M, Shokouhifar F, Ebrahimi MA. 2014. 13th Iranian Genetics Congress, Tehran.(In Farsi with English abstract).

Cervera M. 2004. Histochemical and fluorometric assays for uida (gus) gene detection. Springer: 286:203-213.

Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular breeding. 11:287-293.

Chenarani Z, Shokouhifar F, Mamarabadi M, Farrokhi N. 2012. Study the effects of explant and medium types in direct regeneration induction in melon *(cucumis melo* l., *cv. Khatooni*). 12th Iranian Genetics Congress, Tehran.(In Farsi with English abstract).

Chikh-Rouhou H, González Torres R, Alvarez J, Pitrat M. 2008. Characterization of the resistance to *fusarium oxysporum* f. Sp. *Melonis* race 1.2 in cucumis melo 'BG-5384'. Centre de Recherche d'Avignon. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet (France).

D'Aoust M, Lerouge P. Busse U. 2004. Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. John Wiley & Sons, NY,1-12.

Genoves A, Navarro JA, Pallas V. 2006. Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. Journal of general virology. 87:2371-2380.

Higo H, Tsuruya K, Mano H, Hasegawa K, Minobe Y. 2005. New chimeric promoter useful for expression of selectable marker genes in rice transformation. Plant Biotechnology. 22:287-294.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature. 444:323-329.

Kapila J, De Rycke R, Vanmontagu M, Angenon G. 1997. An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant science. 122:101-108.

Mizuno S, Hirasawa Y, Sonoda M, Nakagawa H, Sato T. 2006. Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). Plant science. 170:1156-1163.

Mozafari Z, Mirakhorli N, Shiran B, Khodambashi M. 2013. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating gene expression systems in common bean. Modern genetics journal. 8:273-282. (In Farsi with English abstract).

Nugent G, Coyne S, Nguyen T, Kavanagh T, Dix P. 2006. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. Botrytis (cauliflower) using peg-mediated uptake of DNA into protoplasts. Plant science.170:135-142.

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold pring Harbor Laboratory Press, New York.

Shokouhifar F, Abbaspour N, Ghafariania N. 2013a. Construction of a promoterless binary expression vector to analysis regulatory elements in plants. Iranian Journal of Plant Biotechnology Submited.

Shokouhifar F, Mottalebi M, Zamani MR. 2014. Construction of pGCGi an expression vector carries intron containing gus and analysis using micro-bombardment and agroinjection. Iranian Journal of Plant Biology. Submited. (In Farsi with English abstract).

Song G, Yamaguchi K. 2003. Efficient agroinfiltration-mediated transient gus expression system for assaying different promoters in rice. Plant Biotechnology. 20:235-239.

Tan S, Saleh NM, Ichinose Y, Yamada T. 1995. Transient expression of heterologous pal gene in the cells and tissues of muskmelon (Cucumis melo l. Cv. Birdie).In2. UPM-JICA Biotechnology Seminar, Seremban, Negeri Sembilan (Malaysia).

Van der Hoorn RA, Laurent F, Roth R, DeWit PJ. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr 9/Cf-9-induced and Avr 4/Cf-4-induced necrosis. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13:439-446.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal. 33:949-956.

Weigel D, Glazebrook J. 2005. Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. CSH protocols 2006. No 7:1031-1036.

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.

Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, Aizono Y. 2002. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of thecucumisin gene. Journal of Biological Chemistry. 277:11582-11590.

Yang Y LR, Qi M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by Agroinfiltration of tobacco leaves. Plant Journal. 22:543-551.

Zottini M, Barizza E, Costa A, Formentin E, Ruberti C, Carimi F, Schiavo FL. 2008. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant cell reports. 27:845-853.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۹۵-۸۷

مطالعه بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان

Study of Expression of Transcription Factors Associated with Resistance to Black Stem Disease in Sunflower

فرامرز هوشیاردل[۱]، حمید حاتمی ملکی[۲]، رضا درویش زاده[۱*] و مراد جعفری[۱]

Faramarz Hoshyardel[1], Hamid Hatami Maleki[2], Reza Darvishzadeh[1*], Morad Jafari[1]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، استاد و دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه

1- M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Professor and Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnolgy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: : r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۳)

چکیده

ساقه سیاه از جمله مهمترین بیماری‌های قارچی آفتابگردان می باشد که عامل آن *Phoma macdonaldii* است. در این مطالعه، میزان تظاهر ژن‌های عوامل رونویسی HD-Zip، AP2 domain، MYB related، WRKY family و MYB family در ژنوتیپ‌های ENSAT-B5 (حساس به هر ۳ جدایه قارچ عامل بیماری)، AS613 (مقاوم به MP8، MP10 و حساس به MA6) و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 (مقاوم به MA6، MP10 و حساس به MP8) آفتابگردان بعد از آلودگی با جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری و با روش RT-PCR کمی بررسی شد. در میان عوامل رونویسی مورد مطالعه، تظاهر سه عامل رونویسی AP2 domain، WRKY family و MYB family تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات مختلف ژنوتیپ- جدایه نشان ندادند. تظاهر ژن‌های مربوط به دو عامل HD-Zip و MYB related در تمام ترکیبات ژنوتیپ- جدایه به طور معنی داری سرکوب شد اما میزان آن بسته به ترکیب ژنوتیپ- جدایه متفاوت بود. نتایج نشان داد که افزایش در سرکوب ژن HD-ZIP و کاهش در سرکوب ژن MYB-Related در ایجاد مقاومت ژنوتیپ AS613 به جدایه‌های MP8 و MP10 موثر است. در این تحقیق، ایجاد مقاومت در ژنوتیپ جهش یافته نسبت به جدایه های MA6 و MP10 با کاهش سرکوب ژن‌های HD-Zip وMYB related در ارتباط است.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان
ساقه سیاه
عوامل رونویسی
تظاهر ژن

مقدمه

آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) گیاهی دو پایه، یک‌ساله، با مسیر فتوسنتزی سه کربنه از شاخه پیدازادان (Phanerogams)، زیرشاخه نهاندانگان (Angiosperms)، طبقه دولپه‌ای‌ها (Dicotyledon)، تیره آستراسه (Asteracea) و خانواده هلیانته‌آ (Helianteae) با ۲n=۲x=۳۴ کروموزوم است. این گیاه زراعی بیشتر بعنوان منبع پروتئین و روغن گیاهی در بسیاری از کشورها کشت می‌گردد (Hu *et al.* 2010). آفتابگردان به علت داشتن دوره‌ی رشدی کوتاه و سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی، به گیاهی مناسب جهت کشت در نواحی خشک و کم باران تبدیل شده است (Rauf, 2008). علاوه بر تنش‌های غیرزیستی، تنش‌های زیستی بویژه بیماری‌های گیاهی ناشی از عوامل قارچی از علل مهم کاهش محصولات کشاورزی در سراسر جهان می‌باشد. بیماری ساقه سیاه یکی از بیماری‌های مهم در آفتابگردان است که بوسیله قارچ *Phoma macdonaldii* ایجاد می‌شود (Sackston, 1992). این بیماری باعث ایجاد لکه‌های سیاه روی دمبرگ و طول ساقه شده و موجب کاهش ۱۰ الی ۳۰ درصدی عملکرد و همچنین باعث کاهش درصد روغن دانه می‌شود (Carson, 1991). کاهش محصول آفتابگردان بویژه زمانی که عامل بیماری‌زا موجب پیری زودرس گیاه شود، بسیار بالا است (Debaeke and Peres, 2003). همچنین آلودگی با قارچ عامل بیماری در رطوبت بالا و بعد از گلدهی بسیار شدید است (Gulya *et al.* 1997). استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم در مقابل این بیماری، یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل آن است. تاکنون چندین ژنوتیپ آفتابگردان با سطوح مختلف مقاومت به این بیماری مشخص شده است، ولی هنوز ژنوتیپی با مقاومت کامل به بیماری ساقه سیاه شناسائی نگردیده است (Roustaee *et al.* 2000a). مطالعات اولیه نشان داده است که وراثت مقاومت به بیماری فوما در آفتابگردان پیچیده بوده و به صورت چندژنی کنترل می شود (Roustaee *et al.* 2000b). در مطالعات قبلی (Bert *et al.* 2004; Rachid Al-Chaarani *et al.* 2002) QTLهای مختلفی برای مقاومت جزئی به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان شناسایی گردیده است که تائید کننده وجود وراثت چندژنی است.

با توسعه روش‌های مولکولی، مطالعه خصوصیات ژن‌های گوناگون درگیر در مقاومت به بیماری‌ها و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت تسهیل گردیده است. برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری، علاوه بر شناسایی و درک نقش ژن‌های مختلف باید با مکانیسم دفاعی گیاهان نیز آشنا بود. بطور کلی دفاع در گیاهان بر پایه پاسخ‌های دفاعی اولیه و پاسخ‌های القایی استوار است. این واکنش‌های اولیه، آغازگر شبکه‌های پیام‌رسانی بوده که سبب راه اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری می‌شوند (Grover and Gowthaman, 2003). از جمله فعال کننده‌های پاسخ دفاعی گیاه میزبان افزایش بیان ژن‌های مقاومت R می‌باشد که می‌توانند از رشد پاتوژن به سبب القا واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive Response) و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی PR (Pathogenesis Related Proteins) جلوگیری کنند و تولید سالیسیلیک اسید SA (Salicylic acid) ، اتیلن و فیتوالکسین‌ها که از دیگر فعال کننده‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه هستند را افزایش داده و همچنین باعث استحکام دیواره سلولی و افزایش تشکیل لیگنین گردند. این پاسخ‌ها مجموعاً منجر به ایجاد یا افزایش سطح مقاومت به قارچ‌های بیماری‌زا می‌گردد. مشخص شده است که بیان این پروتئین‌ها به شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود (Zhang *et al.* 2013). عوامل رونویسی از اجزای کلیدی در کنترل بیان ژن در همه بافت‌های زنده هستند که تنوع فنوتیپی و سازگاری ارگانیسم‌ها طی تکامل را تعیین می‌کنند (Chew *et al.* 2013). حدود ۱۳۰۰ الی ۱۵۰۰ عامل رونویسی در گیاهان گزارش شده است که برخی از آنها در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Riechmann and Ratclife, 2000; Gof *et al.* 2002). از میان عوامل رونویسی مختلف، پروتئین‌های AP2 Domain (Aharoni *et al.* 2004)، WRKY (Mare *et al.* 2004)، MYB (Yamaguchi and Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle *et al.* 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. تحقیقات مختلفی درباره نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های مختلف صورت گرفته است. در مطالعه ای دیزار و همکاران (۲۰۰۵) نقش این پروتئین‌ها را در تحمل گیاه آرابیدوپسس در برابر تنش خشکی بررسی نمودند. طبق مطالعات یولکر و سومسیچ (۲۰۰۴) مشخص شد که پروتئین‌های WRKY

نقش ویژه‌ای در مسیر پیام رسانی مقاومت بـه بیمـاری‌هـا دارنـد. همچنین، ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) بیان ژن GmERF3 که نـوعی از فاکتور رونویسـی AP2/ERF مـی‌باشـد را در توتـون ترایخـت مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که گیاه تراریخت مـورد نظر مقاومت قابـل تـوجهی نسـبت بـه بیمـاری‌هـای باکتریـایی و قارچی در مقایسه با تیپ وحشـی از خـود نشـان مـی‌دهـد. طبـق مطالعات وانـگ و همکـاران (۲۰۰۷) مشـخص شـد کـه بیـان ژن مربوط به عامل رونویسی WRKY باعث مقاومت به بیماری‌هـا در برنج می‌شود. در تحقیقی که توسط علیان و همکـاران (۲۰۰۶) بـه منظور شناسـایی تغییـر در میـزان رونوشـت ژن‌هـا در لایـن‌هـای آفتـابگردان مقـاوم و حسـاس بـه جدایـه MP6 قـارچ *P. macdonaldii* و با استفاده از تکنیک ریزآرایـه انجـام گرفـت، ۲۰ cDNA مرتبط با پروتئین‌های دفاعی و عوامل رونویسی دخیـل در پیام‌رسانی برای این بیماری شناسایی گردید. در مطالعـه دیگـری، درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) بیان سـه عامـل رونویسـی (HD-ZIP، AP2 Domain و MYB) را در دو ژنوتیپ آفتابگردان (M6-54-1 وAS613) که با ۳ جدایه مختلف قـارچ عامـل سـاقه سـیاه (MA6، MP8 و MP10) تلقیح شده بودنـد را مـورد مطالعـه قـرار دادند. نتایج درویش زاده و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس ژن کنتـرل داخلی Actin نشان داد که بیان دو عامل رونویسـی AP2 domain و MYB-related در ترکیبات مختلـف ژنوتیـپ-جدایـه متفـاوت بوده در حالی که تفاوتی در بیان عامل رونویسی HD-Zip مشاهده نشد. هدف از این تحقیق، بررسی بیان عوامل رونویسی HD-ZIP، AP2 Domain، MYB-related، MYB-family و WRKY-family در ژنوتیپ‌های آفتابگردان آلوده شده با جدایه‌هـای MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری (*P. macdonaldii*) با استفاده از RT-PCR کمی و ژن کنترل داخلی eEFα1 می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌های قارچ عامل بیماری

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل دو ژنوتیپ ENSAT-B5 و AS613 به همراه ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 آفتابگردان بودند که براساس مطالعات قبلی (Darvishzadeh *et al.* 2007) دارای واکنش متفاوت به جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری ساقه سیاه می‌باشند (جدول ۱). با توجه به جدول ۱، ژنوتیپ ENSAT-B5 ژنوتیپ حساس بوده و ژنوتیپ های AS16 و M5-54-1 بسته به نوع جدایه مورد بررسی دارای واکنش متفاوت می باشند. ژنوتیپ M5-54-1 یک لاین جهش یافته توسعه یافته با روش بالک تک‌بذری (Single-seed descent) از نتاج در حال تفرق ژنوتیپ AS613 است که با اشعه γ تیمار شده بود. بذور ژنوتیپ‌ها قبل از کشت به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۶ درصد ضدعفونی شده و با آب مقطر شسته شدند. در مرحله بعد بذور در جعبه پلاستیکی با یک بستر پیت ماس کشت شده و به اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (۱۴ ساعت طول روز، دمای شبانه ۱۸ و روزانه ۲۵ درجه سانتی-گراد، شدت روشنایی ۲۰۰ $\mu Em^{-2} s^{-1}$ که بوسیله لامپ‌های ۶۰۰ وات تامین می‌شدند و رطوبت ۷۵ الی ۸۰ درصد) منتقل شدند (Rustaee *et al.* 2000b). آزمایش بصورت اسپلیت پلات (جدایه در کرت اصلی با ۳ سطح و ژنوتیپ در کرت فرعی با ۳ سطح) با سه تکرار در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی اجرا شد. بعد از ۱۰ روز نگهداری جدایه‌های قارچ در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پکنیوسپور قارچ‌ها مشاهده شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها شامل 10^6 پکنیوسپور در هر میلی‌لیتر آب به همراه آب پرتقال ۵/۰ درصد و ژلاتین ۲۵/۰ درصد در محل اتصال دمبرگ‌های کوتیلدون به هیپوکوتیل گیاهچه‌های آفتابگردان ۴ برگی ریخته شد (Rustaee *et al.* 2000b). طی ۴۸ ساعت اولیه بعد از آلودگی, گیاهچه‌ها با یک پوشش شفاف (Plexiglas) در شرایط رطوبت نزدیک به اشباع پوشانده شدند که محیط مناسب برای توسعه قارچ بود. تیمارهای کنترل در سه تکرار بوسیله ۲۰ میکرولیتر محلول بدون اسپور تلقیح شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه تلقیح شده از ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 تا ۷ روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. در این مدت امکان مشاهده نکروز به صورت واضح در ترکیبات حساس وجود دارد (Roustaee *et al.* 2000b).

جدول ۱- متوسط رتبه بیماری در ژنوتیپ های آفتابگردان آلوده شده با جدایه های *P. macdonaldii* در شرایط کنترل شده (Darvishzadeh *et al.* 2007)

Table 1- Mean disease severity score of sunflower genotypes inoculated with *P. macdonaldii* isolates under controlled conditions (Darvishzadeh *et al.* 2007)

ژنوتیپ آفتابگردان Genotype	جدایه قارچ Isolate		
	MA6	MP8	MP10
AS613	6.74	2.24	3.63
ENSAT-B5	6.78	7.76	7.50
M5-54-1	1.24	6.46	2.21

درصد نکروز در ناحیه دمبرگ کوتیلدون بعد از ۷ روز تلقیح با قارچ عامل بیماری با سیستم ۱ (مقاوم) تا ۹ (حساس) رتبه بندی شد (Roustaee *et al.* 2000b). رتبه ۱ برای درصد نکروز بین ۰-۵، ۲ برای ۶-۱۰ درصد، ۳ برای ۱۱-۲۰ درصد، ۴ برای ۲۱-۳۰، ۵ برای ۳۱-۴۰، ۶ برای ۱۴-۶۰، ۷ برای ۶۱-۸۰، ۸ برای ۸۱-۹۹ و ۹ برای ۱۰۰ درصد نکروز.

Percentage of cotyledon petiole area showing Phoma black stem were scored from 1 (resistant) to 9 (susceptible) as proposed by Roustaee *et al.* (2000b), seven days after inoculation, where 1, 0−5% petiole area with necrosis spreading downward into the stem; 2, 6−10%; 3, 11−20%; 4, 21−30%; 5, 31−40%; 6, 41−60%; 7, 61−80%; 8, 81−99%; and 9, 100%.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در پاتوسیستم آفتابگردان- بیماری ساقه سیاه فوما، مناسب ترین زمان مطالعه سطح بیان ژن ها ۴۸ ساعت بعد از تلقیح می-باشد (Alignan *et al.* 2006). بنابراین ۴۸ ساعت بعد از تلقیح دمبرگ‌های کوتیلدون از تیمارها جمع‌آوری گردید. برای استخراج RNA کل از روش معرفی شده بوسیله Verwoerd و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. cDNA تک رشته‌ایی از RNA تیمار شده با DNase، با استفاده از کیت پیشرفته RT-for-PCR تهیه گردید (BD Biosciences). بدین صورت که مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر RNA کل و ۴۰ پیکومول الیگو T (dT15) در دمای ۷۰ درجه ساتنی گراد بمدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس ۸ میکرولیتر بافر واکنش ۵ برابر، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۶۲۵/۰ mM از هر کدام)، ۱ میکرولیتر (۱ واحد) محدودکننده RNase و ۲ میکرولیتر (۴۰۰ واحد) آنزیم MMLV ترانس‌کریپتاز معکوس اضافه شد و واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ۲۰۰ واحد ترانس‌کریپتاز معکوس MMLV دوباره به واکنش اضافه شد و مخلوط بار دیگر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه قرار داده شد و به دنبال آن واکنش توقف سنتز با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

واکنش Real-time RT-PCR

در این تحقیق به منظور ارزیابی بیان هر یک از عوامل رونویسی در اثر آلودگی با قارچ عامل بیماری، از آغازگرهای طراحی شده توسط درویش زاده و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد (جدول ۲). واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Green دو برابر (Applied Biosystems)، ۳۰۰ نانو مول از هر آغازگر و ۱ میکرولیتر محصول RT (*Reverse Transcription*) رقیق شده انجام گردید. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در دستگاه ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) با استفاده از برنامه: ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد (Alignan *et al.* 2006; Hewezi *et al.* 2008; Poormohammad Kiani *et al.* 2007; Roche *et al.* 2007, 2009). پیرو تکثیر PCR، واکنش ها به منظور تولید منحنی تفکیک تحت تاثیر یک دمای گرادیانت قرار گرفتند. در اینجا تغییرات در میزان فلورسنس به عنوان تابعی از دما تعیین می شود. در این صورت محصولات غیر اختصاصی تشخیص داده می شود. برنامه دمایی تفکیک به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و به دنبال آن ۲۰ دقیقه دمای گرادیانت از ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد می باشد. واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت. جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از Real-Time RT-PCR از ژن eEFα1، به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. در این مطالعه، سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش ۲^{-DDCT} ارائه شده بوسیله Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) انجام گرفت.

جدول ۲- آغازگرهای الیگونوکلوتید مورد استفاده در real-time RT-PCR

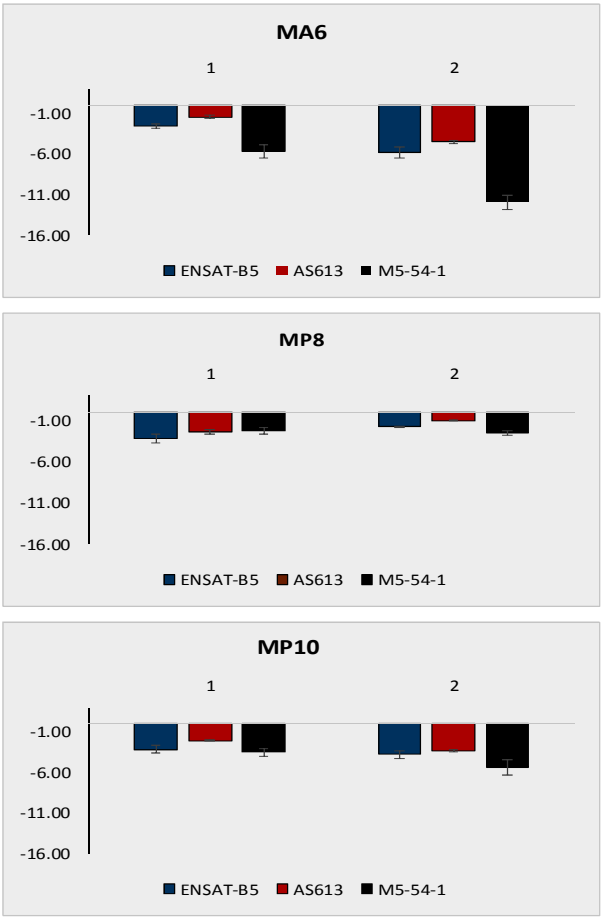
Table 2- Oligonucleoitide primers used for quantitative real time RT-PCR

Primer's PCR Efficiency (%)	Tm	آغازگر برگشتی Reveres primer	آغازگر مستقیم Forward primer	شماره ژن Number of gene	عملکرد Function	نام توالی Name of sequence
93	56	AGGAGTAGCAAGGCACCATCA	CAAGAACTCGGCCAATTCGT	CX946549	AP2 domain transcription factor	DH0AQA11ZA10RM1
93	57	GGATCGCACCTCGTGGTTT	GCAGCACATCGAGGACATCA	CX946945	HD-Zip transcription factor	DH0AQA17ZH04RM1
81	54	CCCTATTCAATTCTTCCACCAAA	TTGGATTGAAGATGTCATCTGTGA	AJ412452	-WRKY family transcription factor	AJ412452
84	57	CGAGCGCAGCAGCATCTA	CCGCCACACGCATTCTCT	CD848175	MYB-related transcription factor	DH0AC002ZF08FM1
88	57	CAAGCCGCTCCACTTCAAAG	CCTCCCTGGCACATGAAGTT	CD850032	-MYB family transcription factor	DH0AC028ZC03FM1
88	55	CATCCTGAAGTGGGAGACGAA	CCAAATCAATGAGCCCAAGAG	AY094064	eEFα1	

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات فنوتیپی (Darvishzadeh *et al.* 2007) ژنوتیپ AS613 به جدایه MA6 حساس بوده ولی به دو جدایه MP8 و MP10 مقاوم می‌باشد (جدول ۱). ژنوتیپ ENSAT-B5 به هر سه جدایه بیماری (MA6، MP8 و MP10) حساس است. ژنوتیپ M5-54-1 که یک لاین جهش یافته از AS613 می‌باشد به جدایه‌های MA6 و MP10 مقاوم بوده ولی به جدایه MP8 حساسیت نشان می‌دهد (جدول ۱). بنابراین ۲ ژنوتیپ اصلی و جهش یافته (AS613 و M5-54-1) واکنش فنوتیپی متقابل به ۲ جدایه MA6 و MP8 دارند. ژنوتیپ AS613 نسبت به جدایه MA6 حساس بوده در حالی که ژنوتیپ جهش یافته آن (M5-54-1) مقاوم می‌باشد از طرف دیگر ژنوتیپ AS613 نسبت به جدایه MP8 مقاوم بوده در حالی که ژنوتیپ جهش یافته آن حساس است (جدول ۱). مقاومت و حساسیت ایجاد شده می‌تواند به علت تغییر ژنتیکی به واسطه جهش باشد. بر اساس مطالعات ژنتیکی نیز پاسخ ژنوتیپ‌های AS613، ENSAT-B5 و M5-54-1 آفتابگردان به آلودگی ناشی از جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه متفاوت می‌باشد (شکل ۱). تجزیه واریانس نتایج حاصل از بررسی بیان عوامل رونویسی نشان داد (جدول ۳) سطح بیان عوامل رونویسی تحت تاثیر جدایه، ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ- جدایه قرار دارند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس بین جدایه‌ها تنها در بیان دو عامل رونویسی AP2 domain و MYB-Related تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳) که این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان عملکرد (بیماری زایی) جدایه-های مختلف باشد. با توجه به جدول ۳، بین ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان از نظر مقدار بیان عوامل رونویسی AP2 domain، HD-Zip، WRKY-family و MYB-related تفاوت بسیار معنی‌دار وجود دارد. در این مطالعه، اثر متقابل ژنوتیپ- جدایه برای دو عامل رونویسی HD-Zip و MYB-Related بسیار معنی‌دار است (جدول ۳). واکنش ژنوتیپ- جدایه در سطح بیان ژن برای فهم مکانیسم پاسخ گیاه در برابر بیماری‌ها مهم می‌باشد و نشان می-دهد که زمینه ژنتیکی میزبان، ژنوتیپ جدایه و نیز تعامل آنها، چه میزان بیان ژن‌ها را در گیاه آفتابگردان تحت تاثیر قرارداده است.

بررسی مقدار بیان ژن‌های مربوط به عوامل رونویسی مورد مطالعه در ۹ ترکیب حاصل از برهم کنش سه جدایه *P. macdonaldii* (MA6, MP8, MP10) با سه ژنوتیپ آفتابگردان (AS613, ENSAT-B5, M5-54-1) نشان داد که از میان عوامل رونویسی مورد مطالعه، بیان دو ژن کدکننده HD-Zip و MYB-Related تفاوت معنی‌دار در میان ترکیبات مختلف نشان می‌دهد بدین صورت که بیان این دو ژن در ترکیبات مختلف ژنوتیپ- جدایه سرکوب می‌شود ولی درجه سرکوب شدن آنها متفاوت می‌باشد (جدول ۳، شکل ۱).



شکل ۱- الگوی بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی HD-Zip (۱)، MYB-related (۲) در ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و لاین جهش یافته M5-54-1 آفتابگردان، تلقیح شده بوسیله سه جدایه ساقه سیاه فوما (MA6، MP8 و MP10)

Figure 1- Expression profile of genes encoding transcription factors HD-Zip (1), MYB-related (2) in original lines 'AS613' , 'ENSAT-B5' and mutant line 'M5-54-1' challenged by three Phoma black stem isolates (MA6, MP8 and MP10)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات سه جدایه قارچ *P. macdonaldii* و سه ژنوتیپ آفتابگردان در بیان ژن های عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه

Table 3- Analysis of variance for the effects of three *P. macdonaldii* isolates and three sunflower genotypes on the expression of transcription factors associated with resistance to black stem disease

Sources of Changes منابع تغییرات Gene ژن	df	MS				
		Rep	Isolate	Rep×Isolate	Genotype	Genotype×Isolate
AP2 domain transcription factor	26	3.26	8.05**	0.47	50.61**	1.83
HD-Zip transcription factor	26	1.06	0.84	0.36	7.89**	4.44**
WRKY-family transcription factor	26	0.65	6.99	3.4	93.3**	4.44
MYB-related transcription factor	26	1.93	72.19**	0.65	33.92**	9.81**
MYB-family transcription factor	26	2.65	2.8	0.22	3.14	2

با توجه به اینکه ژنوتیپ AS613 به جدایه MA6 حساس و به دو جدایه دیگر مقاوم می‌باشد، بررسی بیان عوامل رونویسی HD-Zip و MYB-Related در این ژنوتیپ نشان داد که بیان ژن مربوط به HD-Zip در ترکیب MA6/AS613 نسبت به ترکیبات MP8/AS613 و MP10/AS613 کمتر سرکوب شده و این در حالی است که ژن مربوط به MYB-Related به شدت سرکوب شده است (شکل ۱). بنابراین می‌توان اظهار نمود که افزایش در سرکوب ژن HD-ZIP و کاهش در سرکوب ژن MYB-Related در ایجاد مقاومت ژنوتیپ AS613 به جدایه‌های MP8 و MP10 موثر می‌باشد این موضوع با نتایج بدست آمده توسط درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. بررسی بیان دو ژن مذکور در ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 در پاسخ به جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیان HD-Zip و MYB-Related در ترکیب MA6/M5-54-1 بیشتر سرکوب شده و در ترکیبات MP8/M5-54-1 و MP10/M5-54-1 به نسبت کمتر سرکوب می‌شود (شکل ۱). بنابراین ایجاد مقاومت در ژنوتیپ جهش یافته نسبت به جدایه‌های MA6 و MP10 با کاهش سرکوب در بیان دو ژن مذکور در ارتباط است. از آنجایی که ژنوتیپ جهش یافته M6-54-1 نسبت به لاین مادری AS613 مقاومت بیشتری به جدایه MP10 دارد، دو ژن مذکور در ژنوتیپ جهش یافته بیشتر سرکوب شده است.

در مطالعه دیگری درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) بیان عوامل رونویسی (HD-Zip, AP2-domain, MYB-related) را در ژنوتیپ‌های AS613 و M5-54-1 آفتابگردان در پاسخ به آلودگی با جدایه‌های مختلف قارچ *P. macdonaldii* (MA6, MP8, MP10) با استفاده از Actin به عنوان ژن کنترل داخلی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که بیان دو عامل رونویسی HD-Zip, MYB-related در همه ترکیبات ژنوتیپ-جدایه سرکوب شده و بیان عامل رونویسی AP2-domain افزایش پیدا کرده است که با نتایج حاصل در مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هر دو ژن کنترل داخلی Actin و eEFα1 می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت ارزیابی بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان باشند. انتخاب ژن کنترل داخلی ایده‌ال در یک آزمایش بیان ژن حائز اهمیت است. ژن کنترل داخلی مناسب ژنی است که تظاهر آن تحت تاثیر شرایط آزمایشی قرار نگیرد و همچنین می بایستی در بافت‌های مختلف موجود، تظاهر پایدار داشته باشد (Kozera and Rapacz, 2014). Garg و همکاران (۲۰۱۰) برای انتخاب ژن رفرانس، ۱۲ ژن کاندید شامل اکتین، EF1a، گلایسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز، IF4a، TUB6، UBC، UBQ5، UBQ10، 18SrRNA، 25SrRNA، GRX و HSP90 را در گیاه نخود بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مقادیر بیان EF1a و HSP90 در سراسر اندام های مختلف ثابت باقی می ماند.

در مطالعات دیگر نقش عوامل رونویسی در پاسخ گیاهان به بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمود که توانستند ژن GmERF3، که نوعی عامل رونویسی AP2/EFR می‌باشد را از گیاه سویا به گیاه توتون انتقال دهند و مشاهده نمودند که گیاه گیرنده مقاومت قابل توجهی نسبت به بیماری باکتریایی *Ralstonia solanacearum* و قارچی *Alternata alternaria* نشان داد. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه بیان ژن‌های عوامل رونویسی (bZIP، bHLH، WRKY، MYB و NAC) را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس است. در تعدادی از مطالعات سرکوب عوامل رونویسی در پاسخ به تنش همچون مطالعه اخیر دیده شده است (Janmohammadi and Mahfoozi, 2013). گزارش شده است سرکوب عوامل رونویسی دخیل در تنظیم بیان ژن های مقاومت به سرما کلید حفظ سطح بالای رونوشت ژن‌ها در شرایط تنش است (Agarwal *et al.* 2006; Gao *et al.* 2002; Novillo *et al.* 2004).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عوامل رونویسی، نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌های القا کننده مقاومت گیاه به بیماری ساقه سیاه دارد. تظاهر بیشتر عوامل رونویسی در پاسخ به جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری ساقه سیاه سرکوب می‌شود و بنابراین می‌توان با خاموشی ژن و تولید گیاهان تراریختی که موجب کاهش بیان این فاکتورهای رونویسی می‌شوند، راه را برای کاهش خسارات ناشی از این بیماری در آفتابگردان هموار نمود.

منابع

Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, Arkel GV, Pereira A. 2004. The SHINE Clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. The Plant Cell 16: 2463–2480.

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, Zhu JK. 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. Journal of Biological Chemistry 49: 37636- 37645.

Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L. 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. ***New Phytologist*** 170: 523–536.

Bert PF, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F. 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. Theoretical and ***Applied Genetics*** 109: 865–874.

Carson ML. 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Disease 75: 1150−1153.

Chew W, Hrmova M, Lopato S. 2013. Role of Homeodomain Leucine Zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. International Journal of Molecular Sciences 14: 8122-8147.

Darvishzadeh R, Dechamp-Guillaume G, Hewezi T, Sarrafi A. 2007. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Pathology 56: 654–660.

Darvishzadeh R, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A. 2008. Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower–*Phoma macdonaldii* interactions. Crop Protection 27: 740–746.

Debaeke P, Peres A. 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). Crop Protection 22: 741–752.

Dezar CA, Gago GM, González DH, Chan RL. 2005. Hahb-4, a sunflower Homeobox-Leucine Zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. Transgenic Research 14: 429-440.

Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM, Singh J. 2002. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. Plant Molecular Biology 49: 459-471.

Garg R, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M. 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications 396: 283–288.

Gof SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Tomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). Science 296: 79-92.

Grover A, Gowthaman R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Curr. Sci 84: 330–40.

Gulya T, Rashid KY, Masirevic SM. 1997. Sunflower disease: Phoma black stem. In: Schneiter AA, ed. Sunflower Technology and Production. Madison, WI, USA: ASA, CSSA, SSSA: Agronomy Monograph no 35: 319–22.

Hewezi T, Léger M, Gentzbittel L. 2008. A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower. Annals of Botany 102(1):127-40.

Hu J., Seiler G., and Kole C. 2010. Genetics, genomics and breeding of sunflower. Routledge, USA. Pp: 342.

Janmohammadi M, Mahfoozi S. 2013. Regulatory network of gene expression during the development of frost tolerance in plants. Current Opinion in Agriculture 2(1): 11–19.

Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V, Boltz V, Maher C, Timmermans M, Depege-Fargeix N, Rogowsky P. 2011. Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. Plant Physiology 157: 790–803.

Kozera B, Rapacz M 2014. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet 54: 391-406.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402–408.

Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L. 2004. *HvWRKY38*: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. ***Plant Molecular Biology*** 55: 399–416.

Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 3985-3990.

Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 114(2):193-207.

Rachid Al-Chaarani G, Roustaee A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A. 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theoretical and ***Applied Genetics*** 104: 490–496.

Rahaii M, Gomarian M, Alizadeh H, Melbobi MA, Nagavi MR. 2012. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. Iranian Journal of Crop Sciences 13(3): 580-595. (In Farsi with English abstract)

Rauf S. 2008. Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance. Communications in Biometry and Crop Science 3: 29-44.

Riechmann JL, Ratclife OJ. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. Current Opinion in Plant Biology 3: 423-434.

Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzbittel L. 2009. Real-time PCR monitoring of signal transduction related genes involved in water stress tolerance mechanism of sunflower. Plant Physiology and Biochemistry 47(2): 139-45.

Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzbittel L. 2007. Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. Planta 226(3):601-17.

Roustaee A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G. 2000a. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathology 49: 227–234.

Roustaee A, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A. 2000b. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema L.) in sunflower. Plant Pathology 49: 396–401.

Sackston WE. 1992. On a treadmill: breeding sunflower for resistance to disease. Annual Review of Phytopathology 30: 529−551.

Ulker B, Somssich E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. Current Opinion in Plant Biology 7: 491–498.

Verwoerd TC, Dekker MM, Hockema A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. ***Nucleic Acids Research*** 17: 2362.

Wang HH, Hao JJ, Chen XJ, Hao ZN, Wang X, Lou YG, Peng YL, Guo ZJ. 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. Plant Molecular Biology 65: 799–815.

Yamaguchi-Shinazaki K, Shinozaki K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. ***Trends*** in ***Plant Science*** 10: 88–94.

Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y. 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. Journal of Experimental Botany 13: 3781–3796.

Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. Hournal of Genetics and Genomics 40: 23-35.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۰۵-۹۶

انتقال و بیان ژن انسولین نوترکیب منومر در گیاه آرابیدوپسیس

Transformation and expression of recombinant insulin monomer in Arabidopsis plant

بهناز حسینی[۱]، غلامرضا شریفی سیرچی[۲*]

Behnaz Husseini[1], Gholam Reza Sharifi –Sirchi[2*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- دانشیار گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان

1. Master of Science, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, University of Shahid Bahonar of Kerman.

2. Associate Professor in Biotechnology, Agriculture Department, Agriculture and Natural Science College, University of Hormozgan

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۹ – تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰)

چکیده

گسترش دیابت در جهان با افزایش قابل توجه‌ای در دهه‌های آینده پیش بینی شده است. میزان شیوع این بیماری در کشور ایران نیز هر ساله در حال افزایش است و جان هزاران نفر بیمار را تهدید می‌کند. پروتئین دارویی آسپارت یکی از آنالوگ‌های دارویی اصلی برای درمان دیابت است که نسبت به انسولین لیسپرو زمان اوج سریع‌تری دارد و می‌توان از آن در پمپ‌های انسولین، خودکار انسولین و در روش تزریق استفاده کرد. در این تحقیق ژن آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد و همچنین برای تراریخت کردن گیاه آرابیدوپسیس تالیانا از دو نژاد اگروباکتریوم EHA101 و GV3101 که حاوی پلاسمید دوگانه pJawohl3 حامل ژن انسولین مونومر آسپارت بود، استفاده شد. در این تحقیق گیاهان در مرحله گلدهی توسط اگروباکتریوم با روش غوطه‌ورسازی گل آذین تیمار شدند. صحت حضور ژن انسولین مونومر آسپارت و بیان آن با استفاده از تکنیک استخراج DNA ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از تراریخت شدن گیاه آرابیدوپسیس با پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن انسولین آسپارت نشان داد که آگروباکتری سویه EHA 101 کارایی بالاتری در انتقال ژن دارد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا
اگروباکتریوم
انتقال ژن
انسولین
آسپارت

مقدمه

پاره‌ای از بیماری‌های انسان به دلیل فقدان پروتئین‌ها یا عملکرد نامناسب آن‌ها در بدن بیمار بوجود می‌آیند. بسیاری از این بیماری‌ها را می‌توان با تجویز پروتئین مناسب درمان کرد، اما برای انجام چنین کاری در مرحله اول، پروتئین باید در مقادیر بالا وجود داشته باشد. اگر پروتئین مورد نظر انسانی باشد، بدست آوردن مقادیر مناسب پروتئین مشکل بزرگی محسوب می‌شود (Julian *et al.*2003). پروتئین‌های حیوانی اگر کارایی لازم را برای درمان بیماری‌های انسانی داشته باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما بیماری‌هایی که قابل درمان با پروتئین‌های حیوانی باشند، زیاد نیستند و در اغلب موارد امکان پیدایش عوارضی مثل پاسخ‌های حساسیتی وجود دارد (Chargelegus *et al.* 2000). بنابراین استفاده از سیستم‌های گیاهی برای بیان و تولید داروهای نوترکیب روشی ایمن‌تر و کاراتری است.

دیابت نوعی بیماری است که بدن نمی‌تواند هورمون انسولین را تولید و یا به درستی از آن استفاده نماید. بالغ بر ۳/۶ درصد از جمعیت جهان با دیابت زندگی می‌کنند که سالانه به مقدار زیادی از هورمون انسولین برای درمان این بیماران نیاز می‌باشد (Gurramkonda *et al.* 2010). این در حالی است که هیچ کدام از منابع طبیعی موجود قادر به تأمین این مقدار از انسولین نیستند. انسولین یک هورمون پروتئینی مهم است که باعث تنظیم میزان گلوکز خون در پستانداران می‌شود. امروزه، درمان از طریق تجویز انسولین تنها تیمار مؤثر برای درمان دیابت است، که از طریق تزریق اعمال می‌شود. این عمل (تزریق) سبب ناراحتی افراد و در بعضی موارد سبب عوارض ثانویه (ایجاد بافت اسکار و عفونت‌های پوستی) می‌شود. برای حل این مشکل، چندین روش مختلف در دست تحقیق می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تحویل انسولین به بدن از مسیرهای خوراکی و بینی اشاره کرد (Goldberg *et al.* 2003). هورمون انسولین، پروتئینی شامل زنجیر B با ۳۰ اسیدآمینه و زنجیر A با ۲۱ اسیدآمینه است (Faber *et al.* 1995). در سال ۱۹۲۱ دانشمندان کانادایی با موفقیت انسولین را از پانکراس سگ استخراج کردند. همچنین این دانشمندان در سال ۱۹۳۶ با اضافه کردن پروتئینی به نام پروتامین که در اسپرم ماهی وجود دارد به انسولین، راهی برای آزادسازی کندتر انسولین در خون، پس از تزریق پیدا کردند. در سال ۱۹۵۰ انسولینی با عملکرد کمی سریعتر تولید شد (Liu *et al.* 2003) . در سال ۱۹۷۷ یک گروه پژوهشی با قرار دادن ژن انسولین موش در باکتری، تولید انسولین کردند (Wang *et al.* 2001) تا سال ۱۹۷۹ سیستم تولید انسولین انسانی که بتواند مقادیر زیادی هورمون انسولین را تولید کند وجود نداشت تا این که با استفاده از DNA نوترکیب این کار راه اندازی شد (Murray *et al.* 1971). سرانجام در سال ۱۹۸۰ انسولین انسانی با استفاده از مهندسی ژنتیک تولید شد (Thim *et al.* 1986; Pais *et al.* 2003). تولید پروتئین‌های نوترکیب به عنوان دارو در پزشکی بدلیل اندک بودن میزان پروتئین‌های طبیعی در دسترس و مشکلات مربوط به استفاده از پروتئین‌های دارویی که از منابع طبیعی گرفته شده‌اند، اهمیت بسیاری پیدا کرده‌اند. برای مثال، بسیاری از افراد به دلیل استفاده از فرآورده‌های خونی و یا هورمون‌ها، دچار بیماری می‌شوند. بنابراین سیستم‌های ساده و ارزانی که تولید ایمن‌تر پروتئین‌های نوترکیب را در مقیاس انبوه و قیمت ارزان ممکن سازد بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Winter *et al.* 2001). اما در سال‌های گذشته دانشمندان در پی تغییرات در ساختار بیوشیمیایی انسولین و تولید آنالوگ‌های آن، برای افزایش کارایی و دوام انسولین می‌باشند (Goldberg *et al.* 2003). استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورها برای تولید مقدار زیادی پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شوند. تلاشهای زیادی در جهت تولید انسولین در گیاه انجام شده است که از جمله می توان تولید انسولین در غده‌های سیب زمینی (Arakawa *et al.* 1998)، تولید پروانسولین در کلروپلاست توتون (Ma *et al.* 1997)، انتقال پروانسولین به ذرت و گلرنگ در سال ۲۰۰۷ و انتقال ژن پروانسولین انسانی به توتون و کاهو را نام برد (Mohebodini *et al.* 2009).

در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان، باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان‌تر و ایمن‌تر بودند

(Julian *et al.* 2003). تولید زیست داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت مولکولی گویند. با گسترش سریع فن آوری کشاورزی مولکولی، بسیاری از پروتئین‌های درمانی با ارزش با موفقیت در گیاهان تراریخته تولید شدند. هم اکنون در ایالت کنتاکی آمریکا، گیاه توتون به کارخانه تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده است (Julian *et al.* 2003). در ایالت ویرجینیا ذرت برای معالجه بیماری سیستیک فیبروسیس برداشت می‌شود و در نبراسکا پژوهشگران امیدوارند که در مزارع، محصولاتی جهت درمان بیماری ایدز تولید کنند (Fisher *et al.* 2004). تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب (rAbs)، (Ma *et al.* 1994)، سیتوکنین‌ها اینترلوکین‌ها (Magnuson *et al.* 1998) و واکسن‌های خوراکی (Mason and Arntzen, 1995) از جمله فعالیت‌های دیگر می‌باشد که در این زمینه صورت گرفته است. از مهم‌ترین فعالیت‌های انجام گرفته در زمینه زراعت مولکولی در ایران می‌توان به بیان اینترفرون گامای انسانی در برگ و بذر کلزا (RahimiFar, 2009)، انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی به گیاه توتون (Azhdari, 2009)، تظاهر ژن *PA* از *Bacillus antracis* در کاهوی ایرانی (Honari, 2008)، انتقال ژن پروانسولین انسانی به کاهو و توتون (Mohebodini *et al.* 2009) اشاره کرد. مزیت اصلی گیاهان تراریخت جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، هزینه پایین و تولید در حجم بالا در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی می‌باشد. تخمین زده می‌شود که هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰-۲ درصد هزینه سیستم‌های میکروبی و ۱ درصد کشت‌های سلولی پستانداران باشد (Giddings, 2001). اگر بتوان برخی پروتئین‌های نوترکیب خاص را در قسمت‌های خوراکی مثل دانه و میوه بیان کرد بسیاری از هزینه‌ها کاهش می‌یابد و یا به طور کلی حذف می‌شود. این عمل به ویژه در واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌هایی که برای ایمنی درمانی کاربرد دارند موثر است (Daniell *et al.* 2001).

از زمانی که فریدریخ لیباخ گیاه‌شناس آلمانی ادعا کرد گیاهی عالی و بی نظیر برای پژوهش های ژنتیکی پیدا کرده است بیش از نیم قرن می‌گذرد. این گیاه آرابیدوپسیس تالیانا و از نظر اقتصادی یکی از کم اهمیت‌ترین گیاهان تیره‌ی خردل بود. آرابیدوپسیس یک گیاه کوچک گلدار بومی اروپا، آسیا و شمال غربی آفریقاست (Platt *et al.* 2010). این گیاه یک ساله با طول عمر نسبی کوتاه، یک نمونه رایج برای مطالعه در زیست شناسی گیاهی و ژنتیک است. و دارای کوچک‌ترین ژنوم گیاهی می‌باشد و نیز اولین گیاهی است که ژنوم آن توالی‌یابی کامل شد و مشخص شد که دارای ۱۵۷۰۰۰ میلیون جفت نوکلئوتید و ۵ کروموزوم می‌باشد. اندازه کوچک این گیاه آن را برای کشت در محیط آزمایشگاه مناسب ساخته است. طول عمر کوتاه، خود لقاحی طبیعی و تولید دانه‌های بسیار زیاد، این گیاه را به عنوان یک موجود زنده ژنتیکی، مهم ساخته است (Greilhuber *et al.* 2006).

اهداف این تحقیق کلونینگ ژن انسولین منومر کوتاه اثر آسپارت و ساخت کاست این آنالوگ در یک ناقل دوگانه به منظور بیان آن در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه آرابیدوپسیس تالیانا اکوتیپ کلمبیا صفر (Col-0) جهت بیان ژن انسولین منومر استفاده شد. بذور در گلدان های حاوی ۱/۳ ورمی کولایت + ۲/۳ خاک غنی از مواد آلی کاشته و بر روی آنها پیش تیمار ۴۸ ساعت سرمای ۴ °C و تاریکی اعمال شد. گیاهان در شرایط نوری ۱۵۰ $\mu EM^{-2}S^{-1}$ با دوره تناوب ۸/۵ ساعت روشنایی و ۱۵/۵ تاریکی و در دمای ۲۰ °C نگهداری شدند.

سویه های باکتری

در این تحقیق باکتری های *E. coli* سویه DH5α، آگروباکتریوم تومفاشینز سویه GV3101 حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین، کانامایسین و هایگرومایسین (Koncz *et al.* 1986)، و سویهEHA101 دارای ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین (Koncz *et al.* 1986) مورد استفاده قرار گرفتند. وکتور باکتریایی مورد استفاده در آزمایش شامل: پلاسمید pGEM-B1 (دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ژن lac Z′) و ناقل دوگانه pJawohl3 (دارای ژن

گزینشگر باکتریایی مقاوم به آمپی‌سیلین و ژن گزینشگر مقاوم به کربنیسیلین در آگروباکتریوم و ژن گزینشگر مقاومت به علف کش BASTA بودند. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از طراحی با نرم افزار Fast PCR با توالی های زیر توسط شرکت تکاپو زیست فراهم شدند.

F: 5′-CTCGAGATGAAGTACGAAGA-3′

R: 5′-GAATCCTTAATGATGATGAT-3′

طراحی ژن انسولین مونومر آسپارت

در ابتدا با بررسی منابع علمی و پژوهش های انجام شده در زمینه ساخت انسولین مونومر با توجه به دامنه موجودات زنده متعدد (گیاه، باکتری و مخمر)، کدون‌هایی که بیشترین کارایی بیان را داشتند منظور شدند و صحت آن توسط برنامه‌های آنلاین in silico و J-cat تایید شد. با توجه به نوع میزبان، آغازگرهای مناسب، سایت‌های برشی و تغییرات لازم برای تبدیل انسولین مونومر انسانی به انسولین آنالوگ آسپارت با اندازه ۲۲۸ bp طراحی و بهسازی شد و با برنامه‌های NEBcutter و WatCut بررسی شدند. سپس ساختار فرضی سه بعدی پروتئین آنالوگ آسپارت طراحی شده توسط گروه بیوانفورماتیک بخش زیست شناسی دانشگاه شیراز مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از تایید ساختار ژن، آنالوگ مورد نظر توسط شرکت ژاپنی Bioneer سنتز و در پلاسمید pGEM-B1 قرار داده شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب pGEM-B1 به باکتری *E. coli*

سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α با استفاده از روش‌های ارائه شده توسط Chung (۱۹۸۹) و همچنین Chen و همکاران (۲۰۰۱) تهیه شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش Inoue و همکاران، (۱۹۹۰) به باکتری *E. coli* انتقال داده شدند. پرگنه های آبی رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب رشد یافته بر روی محیط کشت LB، حاوی دو ماده X-gal و IPTG (محرک تولید آنزیم ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید) + آمپی سیلین گزینش شدند. برای استخراج DNA پلاسمیدهای نوترکیب pGEM-B1 از سلول‌های باکتری DH5α از روش به کار برده شده در کیت استخراج پلاسمید AccuPrep® Plasmid Mini Kit (BiONEER) Extraction)) استفاده شد. جهت تایید حضور تراژن، DNA پلاسمید استخراج شده، با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Bam*HI توسط روش سامبروک و راسل برش داده شد و قطعات حاصل (باند ۲۲۸ bp ژن انسولین آسپارت و باند مربوط به پلاسمیدpGEM-B1) با انجام الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد تایید قرار گرفتند. خالص سازی قطعهbp ۲۲۸ ژن انسولین از ژل، طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از کیت استخراج از ژل ((Gel Extraction Kit (Fermentas) صورت پذیرفت. جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی، سه نمونه به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. پس از تایید توالی، تراژن بداخل پلاسمید دوگانه pJawohl3 جایگزین شد و سپس پلاسمید نوترکیب حاصل به سویه های باکتری آگروباکتریوم تومیفاشینز معرفی شد.

انتقال ژن به روش غوطه ورسازی گل آذین (Floral dip) به گیاه آرابیدوپسیس

وقتی که غنچه‌های گل دهنده ثانویه گیاه ظاهر شدند، قبل از باز شدن، غنچه‌های گیاهان با اگروباکتریوم تیمار شدند. تراریختی گل های آرابیدوپسیس بر طبق روش Clough و Bent، ۱۹۹۸ صورت پذیرفت.

انتخاب گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت

بعد از گذشت ۱۲ ساعت پوشش نایلونی گیاهان تیمار شده برداشته شد و گیاهان به گلخانه منتقل شدند. بعد از رشد کامل و رسیدن گیاهان، بذرهای آنها جمع آوری شد. برای انتخاب گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت، بذور در محیط کشت انتخابی (حاوی نصف نمکهای محیط کشت MS، 1x ویتامین های B5، $8grl^{-1}$ آگار و BASTA) در پتری دیش‌هایی به‌اندازه (۱۵×۱۵۰cm) کشت داده و به مدت یک هفته به منظور انجام بهاره سازی در داخل یخچال با دمای ۷ °C قرار داده شدند. سپس پتری دیش ها به اتاق رشد با دمای۲۵°C و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از انتقال پتری ها به اتاق رشد، گیاهچه های تراریخت که در محیط سبز

مانده، بخـوبی از جوانـه‌هـای غیـر تراریخـت کـه زرد شـده قابـل شناسایی بودند.

استخراج DNA ژنومی از گیاه آرابیدوپسیس

بـه منظـور اطمینـان از انتقـال ژن آنـالوگ انسـولین آسـپارت بـه گیاه آرابیدوپسـیس تالیانـا، اسـتخراج DNA از بـرگ نمونـه‌هـای گیاه آرابیدوپسـیس کـه بعـد از اسـپری بـا علـف کـش BASTA مقاومت کرده بودند، با استفاده از روشCTAB انجام شد.

استخراج RNA و واکنش نسخه برداری معکوس

RNA کل بافت برگ با استفاده از محلول استخراج (RNX- Plus, CinnaGen) RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج شد. جهت سنتز رشته cDNA از کیت (First Strand cDNA synthesis Kit, Fermentas) استفاده شد.

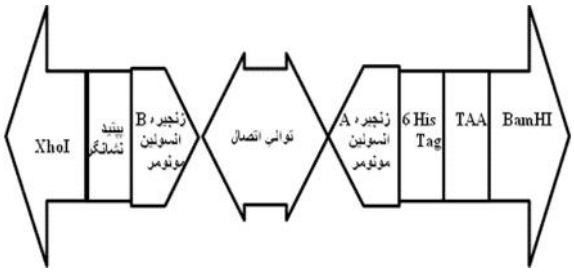
نتایج

ساختمان ژن انسولین آسپارت طراحی شده

همانطور که در شکل (۱) نشان داده شده است در ژن آسپارت طراحی شده از سر ′۵ به ترتیب، بعد از سایت برشی *Xho*I و کدون آغاز توالی پپتیدی نشانگر قرار گرفته است. در انتهای این توالی نشانگر، قبل از زنجیره B انسولین، اسیدآمینه لیزین قرار دارد که در واقع محل برش آنزیم اندوپرتئاز تریپسین می‌باشد. در زنخیره B انسولین آسپارت، اسیدآمینه گلوتامیک اسید جایگزین اسیدآمینه پرولین در ساختار طبیعی انسولین شده است. اتصال دو زنجیره B و A توسط اتصال با سه اسیدآمینه صورت گرفته است. اولین و سومین اسیدآمینه توالی ارتباطی در واقع سایت‌های برشی دیگر آنزیم تریپسین می‌باشند. پس از آن زنجیره A انسولین قرار دارد. در انتهای ساختار ژن انسولین طراحی شده یک توالی ۶ اسیدآمینه‌ای هیستیدین هدف به منظور خالص سازی پروتئین آسپارت در روش کروماتوگرافی قرار داده شد. پس از آن در انتهای ′۳، سایت بررشی *Bam*HI قرار دارد.

استخراج پروتئین کل از برگ و وسترن بلات

ابتدا ۱ گـرم بـرگ در هـاون و بـا اسـتفاده از ازت مـایع پـودر و هموژنیزه شد. سپس به مقدار مساوی به آن بـافر 2X SDS اضـافه شد و بعد از سانتریفیوژ (۳۰۰۰۰ g) به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد فاز بالایی جدا شد. پروتئین هـا بـر روی ژل SDS ٪۱۵ بارگذاری و با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی با ولتاژ ثابت ۲۵۰ از یکدیگر جدا شدند. آزمایش وسترن بـلات بـا اسـتفاده از آنتـی بـادی مونوکلونـال E2E3(ab9569; Abcam, Cambridge, MA, USA) بر طبق روش Nykiforuk و همکاران، 2005 انجـام شد.



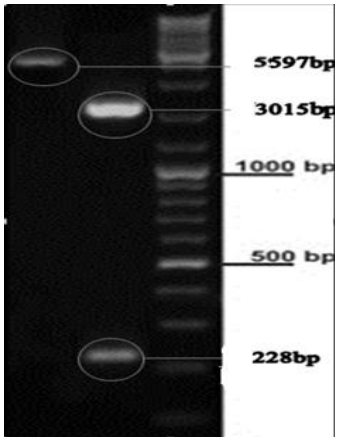
شکل ۱- ساختار کاست بیانی ژن آنالوگ مونومر آسپارت

Figure 1- Expression cassette of analog monomer Aspart gene

توالی ارتباطی طراحی شده بین زنجیره B و A آنالوگ انسولین در واقع یک توالی جایگزین برای زنجیره C انسولین طبیعی است. این توالی علاوه بر ایجاد پیوند بین دو زنجیره در واقع سایت برشی برای تیمار و برش انسولین توسط آنزیم تریپسین می‌باشد که در نهایت در شکل‌گیری نهایی انسولین و انعطاف‌پذیری مولکول برای ایجاد پیوند بین دو زنجیره موثر است. در این پژوهش ژن مونومر انسولین آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد.

شکل ۲- انتخاب کلونی های باکتریایی نوترکیب. کلونی های سفید، نوترکیب احتمالی هستند.

Figure 2- Selection of transformed bacterial colony. White colonies are probable recombinant.



شکل ۳- تصویر حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pGEM-B1 و pJawohl3. در چاهک اول (M) نشانگر، در ستون دوم (1)، پلاسمید برش خورده pGEM-B1 با آنزیم های *Xho*I و *Bam*HI همراه با ژن انسولین آسپارت و در ستون سوم ژل (2)، وکتور دوگانه pJawohl3 برش خورده با آنزیم های *Xho*I و *Bam*HI قرار گرفت.

Figure 3- Image of enzymatic digestion of pGEM-B1 and pJawohl3. The first well (M) marker, the second well (1) digestion of transformed plasmid pGEM-B1 which is associated with insulin gene Aspart with *Xho*I and *Bam*HI restriction enzymes and the third column (2), digestion of the pJawohl3 binary vector with *Xho*I and *Bam*HI restriction enzymes.

بررسی نتایج حاصل از همسانه سازی ژن آسپارت در وکتور pGEM-B1

پس از همسانه سازی پلاسمید نوترکیب pGEM-B1 در باکتری (شکل ۲)، پلاسمید کلون شده خالص سازی شد. پلاسمید نوترکیب به همراه وکتور دوگانه pJawohl3 بوسیله آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xho*I برش داده شدند. در ستون دوم ژل، پلاسمید نوترکیب دو باند مشاهده شد. یک باند مربوط به قطعه 3015 bp پلاسمید pGEM-B1 و یک قطعه 228 bp که باند مربوط به ژن انسولین آسپارت می‌باشد که این دو باند صحت عمل برش آنزیمی را نشان می‌دهد. در چاهک سوم باند مربوط به پلاسمید pJawohl3 برش خورده و خطی شده با اندازه bp 5597 مشاهده شد (شکل۳).

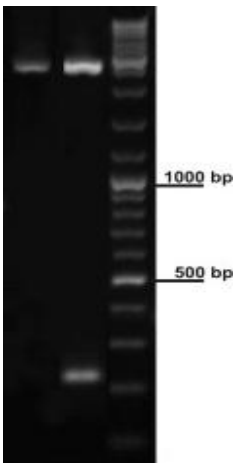
نتایج حاصل از قرار گرفتن قطعه ژن انسولین آسپارت در وکتور دوگانه pJawohl3:

در این مرحله پس از جداسازی ژن آسپارت از ژل، این قطعه 228 bp بوسیله آنزیم لیگاز به ناقل دوگانه بیانی pJawohl3 متصل شد و وکتور دوگانه حاوی ژن مذکور در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی شد. پس از استخراج پلاسمید حاوی ژن انسولین آسپارت، با استفاده از روش های هضم آنزیمی و توالی یابی، صحت توالی ژن انسولین مونومر آسپارت در ناقل pJawohl3 تایید شد. پس از روش هضم آنزیمی پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن انسولین آسپارت با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Bam*HI روی ژل الکتروفورز دو باند 5597bp مربوط به پلاسمید و یک باند 228bp مربوط به ژن آسپارت دیده می‌شود (شکل۴).

بررسی گیاه *Arabidopsis thaliana* تراریخت

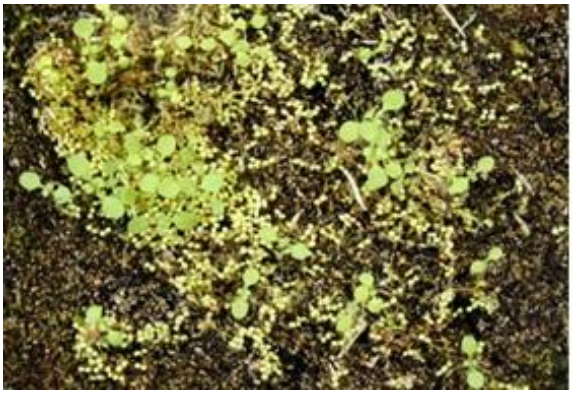
بذرهای گیاه آرابیدوپسیس تراریخت شده در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت انتخابی و هم در گلدان کشت شدند. ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از انتقال به اتاق رشد و اسپری با علفکش Basta، جوانه‌های تراریخت احتمالی در محیط سبز ماندند

و بخوبی از جوانه‌های غیر تراریخت که زرد شده بودند شناسایی شدند (شکل۵).



شکل ۴- برش آنزیمی پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن آسپارت. در ستون اول از سمت راست، نشانگر. در ستون دوم ژل، باند 5597bp پلاسمید و باند 228bp ژن آسپارت. در ستون سوم کنترل منفی pJawohl3 برش خورده فاقد ژن انسولین دیده می‌شود.

Figure 4- pJawohl3 enzymatic digestion containing the insulin gene for Aspart. Frst line from right, DNA marker. Second line, plasmid band 5597bp and 228bp band of Aspart gene. The third line, negative control and digested pJawohl3 without insert.



شکل ۵-انتخاب گیاهچه های تراریخت بوسیله علفکش بستا

Figure 5- Selection of transformed plants by BASTA herbicide.

تحقیقات Clough و Bent، ۱۹۹۸ نشان داده است که حتی بین ارقام مختلف گیاه آرابیدوپسیس نیز از نظر میزان تراریخت‌های بدست آمده تفاوت وجود دارد. همچنین نژادهای اگروباکتریوم نیز از نظر نفوذ به داخل گیاه و آلوده سازی متفاوت می‌باشند. زیرا بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش مشاهده می‌شود که فراوانی تراریخت‌های بدست آمده از گیاهان تیمار شده توسط آگروباکتری سویه EHA101 بیشتر از تراریخت‌های بدست آمده از گیاهان تیمار شده توسط سویه GV3101 می‌باشد (جدول ۱). بنابراین صرف نظر از نوع گیاه و روش انتقال ژن، بین نژادهای اگروباکتریوم نیز از نظر نفوذ به داخل بافت گیاه تفاوت وجود دارد. تحقیقات Clough و Bent، ۱۹۹۸ نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد.

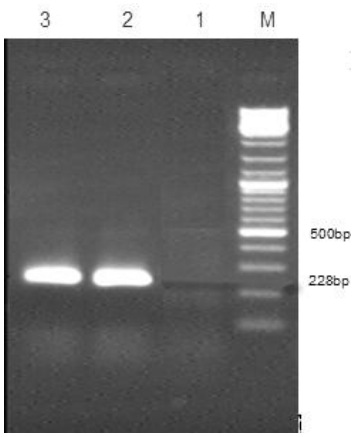
انتخاب گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس و بیان ژن مونومر انسولین آسپارت

با استفاده از روش های استخراج DNA، RNA و RT-PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن انسولین آسپارت بر روی گیاه آرابیدوپسیس تراریخت، حضور و بیان ژن انسولین مونومر آسپارت تایید شد (شکل ۶). همانطور که در شکل (۶) دیده می‌شود نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای ژن انسولین منومر با استفاده از DNA و cDNA از نمونه گیاهی تراریخته در ستون ۲ و ۳ دارای باند 228bp می‌باشد که این باند، صحت انتقال و بیان ژن انسولین آسپارت را به گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تایید می‌کند.

جدول ۱- مقایسه دو نژاد اگروباکتریوم از نظر درصد بذور تراریخت.

Table1- Comparison of two agrobacterium strains from percentage of transformed seed.

روش انتقال ژن	غوطه ورسازی گل آذین	
نوع گیاه	آرابیدوپسیس	
نژاد اگروباکتریوم	EHA101	GV3101
تعداد بذورآزمایش شده	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد جوانه‌های سبز	۴۰	۲۰
تعداد جوانه‌ها زنده مانده پس از ۱۰ روز	۱۳	۸
درصد گیاهان تراریخت	۰/۶۵	۰/۴

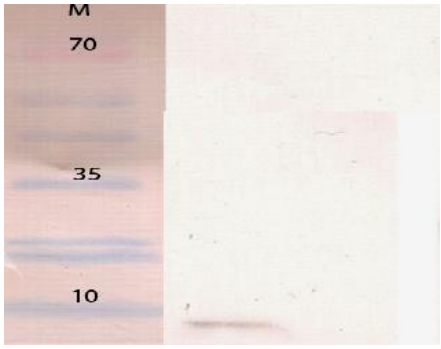


شکل ۶- شناسایی گیاهان تراریخت حاوی ژن انسولین آسپارت بوسیله PCR. راست: چاهک اول نشانگر ۱۰۰bp ، چاهک دوم (۱)، گیاه تراریخت فاقد ژن هدف. چاهک سوم (۲)، گیاه تراریخت حاوی ژن انسولین آسپارت ۲۲۸ bp. چاهک چهارم (۳)، بیان ژن انسولین آسپارت در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با استفاده از روش RT-PCR.

Figure 6- Identification of transformed plant with Aspart insulin gene by PCR. Right: first line, 100 bp DNA marker. Second line (1), transformed plant without target gene. Third line (2), transformed plant containing 228 bp Aspart insulin gene. Last line (3), Aspart insulin gene expression in *Arabidopsis thaliana* plant by RT-PCR.

نتایج حاصل از وسترن بلات پروتئین کل گیاهان تراریخت با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال E2E3 نشان داد که پروتئین انسولین آپارت نوترکیب در گیاه بیان و ترجمه شده است (شکل ۷).

با توجه به مطالعات صورت گرفته، در این پژوهش انسولین آنالوگ آسپارت با اندازه ۲۲۸ bp طراحی و بهسازی شد و ژن مونومر انسولین آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد. بیشتر تغییرات ایجاد شده در آنالوگ‌های انسولین در مقایسه با ساختار طبیعی آن در محل اسیدآمینه‌های ۲۵ تا ۳۰ زنجیره B می‌باشد. زیرا این اسیدآمینه‌ها بیشترین تاثیر را در عملکرد پروتئین انسولین و خواص درمانی آن دارند. اسیدآمینه ۲۵ زنجیره B در ایجاد پیوند با گیرنده‌های انسولین نقش موثری دارد بنابراین هر نوع تغییری در این اسیدآمینه می‌تواند قدرت درمانی انسولین را کاهش دهد (Gusarov *et al.* 2008). توانایی تشکیل فرم دایمر توسط فعل و انفعالات آبگریز بین اسیدآمینه‌های شماره ۸، ۹، ۱۱، ۱۳،



شکل ۷- وسترن بلات پروتئین کل گیاه آرابیدوپسیس تراریخت و شاهد با آنتی بادی مونوکلونال E2E3. (M)، نشانگر پروتئینی. (۱)، آرابیدوپسیس تراریخت با تراژن انسولین آسپارت. (۲)، شاهد

Figure 7- Western blot of transformed and control Arabidopsis leaf total protein using E2E3 monoclonal antibody. (M), protein marker. (1), Transformed Arabidopsis plant with Aspart insulin transgene. (2) Control

۱۶، ۲۴، ۲۶ و ۲۸ زنجیره B از یک انسولین مونومر در مقابل یک زنجیره B از انسولین مونومر دیگر می‌باشد. بنابراین در انسولین آسپارت به علت تغییر در اسیدآمینه شماره ۲۸ زنجیره B و همچنین pH در حدود ۷/۲ تا۷/۶ از تشکیل دایمر و هگزامر تا حد زیادی جلوگیری می‌شود. عامل موثر در ایجاد فرم مونومر انسولین، نیروی دافعه الکتروستاتیکی است که از واکنش بین اسید آمینه‌های سرین و آسپارتیک اسید ایجاد می‌شود. آسپارتیک اسید به علت انعطاف پذیری بیشتر قادر به دور شدن و عدم ایجاد تشکیل پیوند است که این امر منجر به تثبیت فرم مونومر و عدم ایجاد تشکیل دایمر در انسولین آسپارت می‌شود (Gusarov *et al.* 2008). مطالعات نشان می‌دهد هر چه طول توالی لینکر بیشتر شود اثرها منفی زیادی در میزان بیان پروتئین انسولین در میزبان خواهد داشت. اما طول کمتر از ۳ اسید آمینه توالی لینکر نیز باعث ایجاد اختلال در فعالیت زیستی پروتئین دارویی انسولین می‌شود (Hua *et al.* 2008).

در گذشته دو زنجیره A و B انسولین به صورت جداگانه ساخته می‌شد و هر کدام در یک وکتور مناسب قرار می‌گرفت.

این روش نیاز به برخی از آنزیم‌های خاص مانند اندوپروتئازها را از بین می‌برد اما در عوض امکان ایجاد پل‌های دی سولفیدی بین دو زنجیره جدا از هم بسیار دشوار بود. اما از سال ۱۹۸۶ ساخت انسولین به صورت مولکول پروانسولین انجام می‌شود. در این روش ژن انسولین به طور مستقیم به صورت پروانسولین (شامل زنجیره‌های A, B و C) سنتز شده و در یک وکتور بیانی قرار می‌گیرد (Wan *et al.* 2005).

در این تحقیق انتقال تراژن انسولین آنالوگ آسپارت به روش غوطه وری گل آذین و بدون نیاز به کشت بافت صورت پذیرفت. انتقال بدون کشت بافت توسط اگروباکتریوم روشی آسان و ارزان برای تراریخت کردن گیاهان می‌باشد. این روش به طور موفقیت آمیزی در گیاه آرابیدوپسیس به کار رفته است و در حال حاضر تلاشهای زیادی برای کاربرد آن در دیگر گونه‌های گیاهی انجام می‌گیرد. از مشکلات اصلی روشهای انتقال ژن مبتنی بر کشت بافت، باززایی گیاهان سالم از سلولهای تراریخت شده می‌باشد (Bechtold *et al.* 1993). اگرچه روشهای زیادی برای باززایی موفقیت آمیز گیاهان توسعه یافته است اما اغلب این روشها بر پایه یک دستورالعمل ضدعفونی و شستشو می‌باشند. آزمون وسترن بلات گیاهان آرابیدوپسیس تولید پروتئین نوترکیب انسولین آنالوگ آسپارت را تایید کرد. کاشانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ ژن پروانسولین انسانی را به سه رقم سیب‌زمینی انتقال دادند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الکتروفورز SDS-PAGE وجود باند پروتئینی مربوط به تراژن با سایز kDa ۱۸–۱۷ را تایید کرد. تجزیه و تحلیل ELISA نیز با استفاده از آنتی بادی انسولین انسانی تراریخته شدن و بیان در گیاهان سیب زمینی را تایید کرد.

در این تحقیق طراحی و بهسازی ژن انسولین مونومر برای اولین بار در ایران صورت گرفت که با استفاده از این روش می‌توان در آینده از گیاهان دیگر نیز برای تولید و بیان انسولین آسپارت، استفاده کرد.

تشکر و سپاس

از مسئولین دانشگاه کرمان به دلیل همکاری بسیار صمیمانه و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی سپاس‌گذاری می‌نمایم. همچنین، از جناب آقای دکتر نیکولاس شلایش دانشگاه فنی آخن آلمان بخاطر راهنمایی ها و همکاری ارزشمندشان کمال تشکر را داریم.

منابع

Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH. 1998. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nat Biotechnol 16(10):934-8.

Azhdari H. 2009. Cloning and transformation of human IFN gene to tobacco plants. Transgenic Research 5: 213–218.

Bechtold N, Ellis j, Plletier G. 1993. In Planta *Agrobacterium* Mediated gene transfer by Infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Science Paris 316: 1194-1199.

Chargelegue D, Vine N, Van Dolleweerd C. 2000. A murine monoclonal antibody produced in mice. Transgenic Research 9:187-194.

Clough, S.J., Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 16(6): 735-743.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science 6(5): 219-226.

Faber KN, Harder W, Veenhuis M. 1995. Review: Methylotropic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. Yeast 11: 1331-1344.

Fischer R, Schinkel H, Schillberg S. 2012. One-step protein purification: Use of a novel epitope tag for highly efficient detection and purification of recombinant proteins. The open biotechnology journal 5: 1-6.

Fisher R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. 2004. Plant-Based production of biopharmaceuticals. Plant Biology 7:152-158.

Giddings G. 2001. Transgenic plants az protein factories. Current Opinion in Biotechnology 12:450-454.

Goldberg M, Gomez-Orellana I. 2003. Challenges for the oral delivery of macromolecules. Nature Rev 2: 289–295.

Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. 2006. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. Plant Biology 8: 770-777.

Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, Swaminathan S, Khanna N, Tisminetzky S, Rinas U. 2010. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. Microbial Cell Factories 9:31.

Gusarov DA, Gusarova VD, Bairamishvili DI. 2008. Gene engineered insulin and its pharmaceutical analogs. Biomed Khim 54(6):624-42.

Hua QX, Chu YC, Jia W, Phillips NF, Wang RY, Katsoyannis PG, Weiss MA. 2002. Mechanism of Insulin Chain Combination Asymmetric Roles of A-Chain α-Helices IN Disulfide Pairing J. Biol. Chem 277: 43443–43453.

Julian KC, Drank PMW, Christou P. 2003. The prodaction of recombination pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics 4:794-805.

Kashani K, Jalali-Javaran M, Mohebodini M, Moieni A, Sheikhi-Dehabadi M. 2012. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of three potato cultivars (*Solanum tuberosum* cv. Desiree, Agria and Marfona) by human proinsulin gene. Australian Journal of Crop Science. 6(7): 1212-1220.

Koncz C, Németh K, Redei GP, Scell J. 1994. In: p. 167-189, J Paszkowski (ed.). Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Dordrecht the Netherlands 28: 130–141.

Liu M, Ramos-Castaneda J, Arvan P. 2003. Role of the Connecting Peptide in Insulin Biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry 278: 14798–14805.

Ma H, Yanofsky MF, Klee HJ, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1992. Vectors for plant transformation and cosmid libraries. Gene 117: 161-166.

Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G; Hayglass K, Lee JM. 1998. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. Protein Expression Purif 13: 45-52.

Mason HS, Arntzen CJ. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.

Mohebodini M, Jalali Javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H, Azhdari H. 2009. Human Proinsulin Gene Cloning in Plant Expression Vector pCAMBIA1304. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran. (In Farsi).

Murray I. 1971. Paulesco and the Isolation of Insulin. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences 26 (2): 150–157.

Nykiforuk Cl, Boothe JG, Murray WE, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM. 2005. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. Plant Biotechnology Journal 3:20-30

Pais JM, Varas L, Valdes J, Cabello C, Rodriguez L, Mansur M. 2003. Modeling of mini-proinsulin production in Pichia pastoris using the AOX promoter. Biotechnol Lett 25:251-255.

Platt A, Horton M, Huang Anastasio AE. 2010. "The Scale of Population Structure in *Arabidopsis thaliana*". PLoS Gen 6 (2): e1000843.

Rahimifar P. 2009. Human IFN Gene transfer to canola. Journal of Biochemistry 269, 6042–6051.

Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, Fiil NP 1986. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6766– 6770.

Wan ZL, Huang K, Xu B, Hu SQ, Wang S, Chu YC, Katsoyannis PG, Weiss MA. 2005. Diabetes-associated mutations in human insulin: crystal structure and photo-cross-linking studies of a-chain variant insulin Wakayama. Biochemistry 44: 5000-5016.

Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, Tang YH, Zhu SQ, Cui DF, Feng YM. 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris and a simple procedure for purifying the expression product. Biotechnol Bioeng 73: 74–79.

Winter J, Neubauer P, Glockshuber R, Rudolph R. 2001. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of Escherichia coli by fusion to DsbA. Journal of Biotechnology 84: 175–185.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۱۳-۱۰۶

شناسایی، همسانه‌سازی وتعیین توالی ژن MT ND2 در مرغ‌های بومی خراسان

Indentifying, Cloning, and Determining the Sequence of MT- ND2 Gene in Khorasan's Native Chickens

حمیدرضا ایزدنیا[۱] -مجتبی طهمورث پور[۲] *-محمدرضا نصیری[۳]

Hamid Reza Izadnia[1]- Mojtaba Tahmoorespur [2]- Mohammad Reza Nassiry [3]

۱-دانشجوی دکتری پردیس بین الملل دانشگاه فردوسی مشهد و محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول ۲و۳- استاد دانشگاه فردوسی مشهد

1. PhD student, Ferdowsi University of Mashhad, International Campus and Researcher of Agriculture and Natural Resources Research Center of SafiAbad (dezful)
2 and 3. Professor, Ferdowsi University of Mashhad

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲)

چکیده

میتوکندری مسئول تولید ۹۰ درصد از انرژی مورد نیاز سلول می باشد. مقداری از تفاوت‌ها در عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی و بیان فنوتیپی راندمان غذایی ممکن است مربوط به اختلاف در راندمان عملکرد میتوکندری باشد. این پژوهش بمنظور همسانه سازی و تحلیل مرغان بومی خراسان با تاکید بر ژن ND2 به منظور بررسی جهش‌های احتمالی است. بدین منظور از نمونه خون مرغ بومی خراسان، DNA ژنومی استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن انجام شد، محصول واکنش بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. باندهای حاصل با استفاده از ناقل خطی pTZ57R/T در باکتری *E. coli* همسانه-سازی و توالی‌یابی شد. مقایسه نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده با ژنوم مرجع چهار جهش را نشان داد و شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول خود با توالی کامل ژنوم میتوکندری *Gallus gallus* در توالی-های ثبت شده میتوکندری طیور با شماره دسترسی X52392.1 (ژنوم مرجع)، GU261709.1، GU261712.1، AP006746.1، KF826490.1، HQ857210.1 و AY235571.1 نشان داد. مقایسه پروتئینی نشان دهنده شباهت توالی حاصل با توالی‌های پروتئینی مربوط به ژن ND2 میتوکندری طیور در بانک اطلاعاتی بود به گونه ای که بیشترین شباهت، ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود متعلق به ژن ND2 در *Gallus gallus* با شماره دسترسی BAC57576.1 و کمترین شباهت متعلق به جنس ها و گونه های *Chrysolophus amherstiae* با شماره دسترسی AAF65702.1 و *Tetrastes sewerzowi* با شماره دسترسی ABH01111.1 با ۸۰٪ شباهت در ۱۰۰٪ طول خود بود. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای مرغ بومی خراسان با توالی مرجع و سایر توالی‌ها با شماره مرجع YP272073.1، BAD11115.1، NP_006916.1، ADB06584.1 و ADW41566.1 شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول نشان داد. پس از تبدیل توالی نوکلئوتیدی بدست آمده به توالی اسیدآمینه‌ای، با توالی پروتئینی مرجع مقایسه شد. نتیجه این مقایسه تفاوت در یک اسیدآمینه را نشان داد. در اسیدآمینه ۱۳۰ لوسین که اسیدآمینه ای غیرقطبی است به اسیدآمینه غیرقطبی متیونین تبدیل شد. جهش‌های مشاهده شده در این تحقیق از آنجایی که منجر به تغییر اسید آمینه شده است می‌توان به عنوان یک پایه در بررسی‌های اختلالات سوخت وساز و صفات تحت تاثیر ژن MT-DNA در مطالعات بعدی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

همسانه سازی
تعیین توالی
MT ND2
مرغان بومی خراسان

مقدمه

ژنوم میتوکندریایی در بسیاری از حیوانات از جمله پرندگان تقریبا حدود ۱۶ تا ۱۷ کیلو باز دارد و دارای ۲۲ tRNA، ۲ rRNA و ۱۳ پلی پپتید است (Chinnery and Schon, 2003). کشف توالی های موجود در میتوکندری، بررسی ژنهای کنترل کننده موجود در این اندامک را امکان پذیر ساخته است. بیان ژن‌های میتوکندری در مهره‌داران برای تولید انرژی، سوخت و ساز بدن، تعادل سلولی و مرگ سلولی ضروری است (DiMauro, 2004; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). فسفوریلاسیون اکسیداتیو اصلی ترین عملکرد مرتبط با میتوکندری می‌باشد. تولید انرژی از فسفوریلاسیون اکسیداتیو از طریق تشکیل آدنوزین تری فسفات (ATP) توسط زنجیره انتقال الکترون (ETC) است که از چند کمپلکس تشکیل شده است (Ahmad and Abdullah, 2012). همچنین امکان بررسی اشتقاق گونه های مختلف از یک جد مشترک و همچنین دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی از طریق مطالعه DNA میتوکندریایی وجود دارد (Fumihito, *et al*. 1994; Brown,1980; Szalanski *et al*. 2000) . یعقوب و فتحی(۲۰۱۳)، ژن سیتوکروم b را بعنوان شاخصی برای تمایز سویه‌های مرغ‌های بومی عربستان استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های مرغان عربستان با هم مشابه هستند اما با گونه‌های دیگر مرغان متفاوت هستند. همچنین مشخص شد که این ژن بعنوان شاخص مناسبی جهت بررسی تفاوت بین این گونه‌ها می‌باشد (Yacoub, and Fathi, 2013). جهش‌های DNA میتوکندریایی عموما بر بافت‌هایی که احتیاج به فسفوریلاسیون اکسیداتیو سالم جهت تامین انرژی متابولیسمی دارند تاثیر می‌گذارند (Taanman, 1999).

جهش بدمعنی در ناحیه کدگذاری ژن NADH Dehydrogenase 2 (MT-ND2) می‌تواند یک تغییر در ساختار دوم پروتئین تولید کند. وانگ و همکاران نشان دادند در حالت کمبود اکسیژن فعالیت کمپلکس I کمتر از استاندارد و تولید اکسیژن فعال میتوکندری به صورت معنی‌داری در مقایسه با حالت نرمال کاهش می‌یابد، همچنین جهش بدمعنی در ژن MT-ND2 به طور قابل توجهی با تولید انواع اکسیژن فعال در میتوکندری مربوط است (Wang *et al*. 2013).

ژنوم میتوکندریایی طیور از بخش‌های مختلفی تشکیل شده است. از جمله این ژنها، ژن Mt-ND2 است که ساختاری را برای تولید پروتئینی به نام NADH Dehydrogenase 2 فراهم می‌کند. این پروتئین بخشی از کمپلکس آنزیمی بزرگ است که در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو در مرحله ابتدایی انتقال الکترون ضروری است (Mitchell *et al*. 2006).

به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، ژنوم میتوکندری قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. هدف از این پژوهش شناسایی، همسانه سازی و تحلیل مرغان بومی خراسان با تاکید بر ژن ND2 بمنظور شناسایی جهش‌های احتمالی می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

از تعداد ۸ قطعه مرغ بومی خراسان خون گیری بعمل آمد و نمونه خون در لوله‌های حاوی EDTA (به عنوان ماده جلوگیری کننده از انعقاد خون) نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی از خون و با استفاده از کیت Roche ساخت کشور آلمان انجام شد. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA مورد مطالعه، از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و روش طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ استفاده شد.

طراحی آغازگر اختصاصی

ژنوم کامل میتوکندریایی *Gallus gallus* با شماره دسترسی X52392.1 به عنوان ژنوم مرجع، به منظور تکثیر ژن MT ND2 مورد بررسی قرار گرفت. به سبب طول ۱۵۸۳ جفت‌بازی ژن MT ND2 و ناحیه‌های مربوط به tRNA و نیز در نظر گرفتن توانایی توالی‌یابی در هر بار خوانش، این ژن به سه بخش تقسیم شد و

آغازگرها با در نظر گرفتن ناحیه‌ای هم‌پوشان به طول ۷۰ و ۸۳ جفت‌باز با استفاده از نرم‌افزار (Integrate DNA Technology IDT) به نشانی اینترنتی https://www.idtdna.com/ طراحی و ساخت آن‌ها به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد (جدول ۱).

غلظت مواد موجود در واکنش PCR و شرایط واکنش:

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) در حجم ۲۵ میکرولیتر و بر اساس شرایط مندرج در کیت *Taq* Polymerase شرکت Jena Bioscience و با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرها انجام شد. واکنش PCR در سه مرحله صورت پذیرفت. مرحله اول، واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. مرحله دوم حاوی ۳۵ چرخه دمایی بود که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. مرحله آخر، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

الکتروفورز محصول PCR، خالص‌سازی آن از ژل و درج در ناقل خطی pTZ57R/T: محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج از ژل آگارز شرکت Gene All خالص گردید. قطعه بازیابی شده از ژل به منظور درج در ناقل خطی pTZ57R/T طبق شرایط مندرج در کیت شرکت Thermo SCIENTIFIC کشور امریکا و نیز رعایت نسبت ۱ به ۳ بین ناقل و قطعه بازیابی شده با هم مخلوط شدند. همچنین به منظور برقراری پیوند فسفودی‌استری بین قطعه بازیابی شده و ناقل خطی از آنزیم T_4 DNA Ligase استفاده شد.

تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد، انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری و غربالگری کلونی‌های نوترکیب:

کشت شبانه (Over Night) باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α با هدف تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد صورت پذیرفت. آماده‌سازی سلول‌های باکتریایی کشت شبانه به روش شوک حرارتی و به منظور ترانسفورماسیون انجام شد. پس از ترانسفورماسیون و کشت باکتری در محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس شناسایی کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (ناقل pTZ57R/T و قطعه تکثیر و بازیابی شده) به روش PCR کلونی‌های مقاوم صورت گرفت (Sambrook et al., 2003) ، غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش مطابق با بخش‌های پیشین بود..

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن MT ND2

Table 1. The sequence of specific primers of MT ND2 gene

Primer	ناحیه دسترسی	توالی /sequence	طول قطعه تکثیر شده PCR Product
ND1 Part B. F	۴۶۲۷-۵۴۳۷	CATCTCTACCCTTGCTGAAACC	۸۱۰
ND1 Part B. R		GCAGTTGATTGGGTGAGGAA	
ND2 Part A. F	۵۳۶۷-۶۱۷۹	CTCATCTCCAAGTCACACCAC	۸۱۲
ND2 Part A. R		TTTATGTGGTTTGATGAGTTGGG	
ND2 Part B. F	۶۰۹۶-۶۸۹۴	CACTCCTAAGCCTATTCTTCTACC	۷۹۸
ND2 Part B. R		CTA GTC AGT TTC CGA AGC CA	

پس از ترانسفورماسیون و کشت باکتری در محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین ، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شد. سپس شناسایی کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (ناقل pTZ57R/T و قطعه تکثیر و بازیابی شده) به روش PCR کلونی‌های مقاوم صورت گرفت (Sambrook et al., 2003) ، غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش مطابق با بخش‌های پیشین بود..

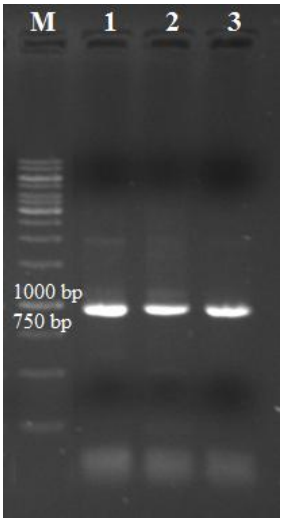
استخراج پلاسمید، PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده و توالی‌یابی

استخراج پلاسمید از کلونی مقاوم (مثبت)، پس از کشت شبانه با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Gene All انجام شد. به منظور تأیید حضور قطعه در پلاسمیدهای استخراجی، پس از تعیین غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با دستگاه نانودراپ به نسبت ۱:۲۰ رقیق شدند و به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش PCR مطابق با بخش‌های پیشین بود. پلاسمیدهای استخراج شده به منظور توالی‌یابی با آغازگرهای رفت و برگشت M13، به شرکت Macrogene ارسال شدند. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده به کمک نرم‌افزارهای Vector NTI، MEGA5، Bio Edit و CLC Workbench5 مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) به نشانی اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در طی طراحی آغازگرها بر اساس مکان قرارگیری هر جفت آغازگر، مشاهده باندی به طول ۸۱۰، ۸۱۲ و ۷۹۸ جفت‌باز در اثر تکثیر در هر کدام از واکنش‌های PCR انتظار می‌رفت. پس از انجام PCR و الکتروفورز محصول واکنش، مشاهده قطعه ۸۱۰ جفت‌بازی در واکنش اول، قطعه ۸۱۲ جفت‌بازی در واکنش دوم و قطعه ۷۹۸ جفت‌بازی در واکنش سوم نشان‌دهنده صحت واکنش ها بود. همچنین وجود تنها یک باند در هر کدام از واکنش‌ها مشخص کرد که جایگاه نشست دیگری برای آغازگرهای طراحی شده در سایر مکان‌های ژنوم وجود ندارد (شکل ۱).

پس از اطمینان از اختصاصی بودن تکثیر، توالی‌یابی صورت گرفت. خواندن توالی از دو انتها و با آغازگرهای عمومی M_{13}-F و M_{13}-R تعبیه شده در ناقل T/A صورت گرفت. نتیجه توالی‌یابی با نرم‌افزار Bio Edit خوانده شد و با حذف توالی‌های مربوط به ناقل قطعات ۸۱۰، ۸۱۲ و ۷۹۸ جفت‌بازی متعلق به ژن هدف بدست آمد. وجود توالی آغازگرهای طراحی شده در دو انتهای توالی، صحت توالی‌یابی را ثابت نمود. پس از مشخص شدن ناحیه‌های هم‌پوشان سه قطعه تکثیری با هم ادغام شدند و توالی ژن ND2 مرغ بومی خراسان حاصل آمد. سپس توالی حاصل با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از برنامه BLAST مقایسه شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR قطعه 1 (۸۱۰ bp)، 2 (۸۱۲ bp) و3 (۷۹۸bp) ، M) سایز مارکر ۸۱۰ bp

Figure 1: Electrophoresis of PCR products : 1 (810 bp), 2 (812 bp), 3 (798 bp).

در مقایسه نوکلئوتیدی توالی حاصل شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول خود با توالی کامل ژنوم میتوکندری *Gallus gallus* در توالی‌های ثبت شده میتوکندری طیور با شماره دسترسی X52392.1 (ژنوم مرجع)، GU261709.1، GU261712.1، AP006746.1، KF826490.1، HQ857210.1 و AY235571.1 نشان می‌دهد. کمترین شباهت نیز مربوط به FJ752429.1، JF921875.1، KF027439.1 و HQ221859.1 با ۸۷٪ در ۱۰۰٪ طول خود بود. همچنین توالی حاصل با توالی‌های مربوط به ژن NADH dehydrogenase subunit 2 gene (ND2) در میتوکندری طیور با شماره دسترسی‌های JQ970529.1 و EU845754.1 شباهت ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود را نشان داد (شکل۲).

طراحی درخت فیلوژنی توالی حاصل با توالی مرجع و سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی شباهت بالای ژن ND2 در مرغ بومی خراسان را با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی تأیید نمود. ژن ND2 در ژنوم مرجع از نوکلئوتید ۵۲۴۱ تا ۶۲۸۱ را شامل می‌شود، در مقایسه‌ای که بین توالی حاصل با ژنوم مرجع صورت گرفت تفاوت در نوکلئوتیدهای چهار جایگاه وجود داشت که فقط جهش اول در ناحیه مربوط به ژن ND2 واقع است. در جایگاه ۵۹۲۸ نوکلئوتید C (پیریمیدین) به نوکلئوتید A (پورین) تغییر یافت و جهش جابجایی (Transvertion) صورت گرفت، همچنین در هر سه جایگاه ۶۴۷۷، ۶۷۵۸ و ۶۸۰۰ نوکلئوتید T (پیریمیدین) به نوکلئوتید C (پیریمیدین) تبدیل شده است و جهش جابجایی (Transition) رخ داده است. مطالعات مختلفی بر روی ژنوم میتوکندریایی طیور صورت گرفته است که برخی از آنها بر روی تنوع در DNA میتوکندریایی طیور و دامهای اهلی است. کواب و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی لائوس از طریق آنالیز چندشکلی توالی DNA میتوکندریایی پرداختند. در کل ۲۹ هاپلوتیپ شناسایی شد و همچنین نتایج نشان داد که منشا مادری این مرغان از لائوس بوده، علاوه بر این دو منشا دیگر در چین و آسیای جنوب شرقی وجود دارد . در این تحقیق ناحیه ۵۰۰ باز تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج بدست آمده ۲۶ جهش جایگزینی در سویه بومی و ۱۲۰ جهش در سایر سویه‌ها را نشان داد. همچنین توالی تکراری ۱۴ جفت باز در هر دو نسخه در کل جمعیت شناسایی شد این در حالی است که در سویه بومی توالی تکراری ۴۲ جفت باز در دو نسخه موجود بود (Kawabe *et al.* 2014). مایو و همکاران مطالعه کاملی بر روی اهلیت مرغ بر پایه ژنوم میتوکندریایی داده و تاریخچه اهلی شدن مرغان آسیای جنوب شرقی و جنوب غرب چین را مشخص کردند (Miao *et al.* 2013).

در توالی نوکلئوتیدی حاصل، توالی مربوط به tRNA میتوکندریایی نیز وجود داشت به همین دلیل پس از حذف این نواحی، توالی حاصل به وسیله برنامه Translate tool موجود در پایگاه ExPASY به نشانی اینترنتی http://web.expasy.org/translate به ۳۴۶ اسیدآمینه برگردانده شد. در مقاسیه نوکلئوتیدی ارائه شده، جهش در چهار جایگاه رخ داده بود که سه جهش انتهایی آن در ناحیه خارج از ژن ND2 اتفاق افتاده بود و در ترجمه ژن ND2 وارد نشده‌اند. پس از تبدیل توالی نوکلئوتیدی بدست آمده به توالی اسیدآمینه‌ای، با توالی پروتئینی مرجع مقایسه گردید (شکل ۳). نتیجه این مقایسه تفاوت در قرارگیری یک اسیدآمینه را نشان داد. در اسیدآمینه ۱۳۰ لوسین که اسیدآمینه‌ای غیرقطبی است به اسیدآمینه غیرقطبی متیونین تبدیل شد. جهش بدمعنی در ناحیه کد گذاری ژن NADH دهیدروژناز ۲ (MT-ND2) می تواند یک تغییر در ساختار دوم پروتئین تولید کند. جهش بدمعنی در ژن MT-ND2 به طور قابل توجهی با تولید اکسیژن فعال درمیتوکندری مربوط بود (Wang *et al.* 2013). با توجه به غیر قطبی بودن هر دو اسید آمینه به نظر می رسد این تفاوت در قرارگیری اسید آمینه ها تغییر زیادی در کارکرد پروتئین ایجاد نخواهد کرد. با این حال با توجه به شباهت بیش از ۹۹ درصدی این دو توالی می‌توان گفت که این دو پروتئین احتمالاً از نظر پیکربندی و کارکرد مشابه می‌باشند.

مقایسه پروتئینی شباهت توالی حاصل با توالی‌های پروتئینی مربوط به ژن ND2 میتوکندری طیور در بانک اطلاعاتی را نشان داد و بیشترین شباهت، ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود متعلق به ژن ND2 در *Gallus gallus* با شماره دسترسی BAC57576.1 بود و کمترین شباهت ۸۸٪ در ۱۰۰٪ طول به متعلق به ژن ND2 در *Chrysolophus Amherstiae* با شماره دسترسی AAF65702.1 و

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Gallus gallus breed Huang Lang chicken mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	KF954727.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	KF825490.1
Gallus gallus isolate yin109 mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	HQ357210.1
Gallus gallus isolate YF20320 breed Yenwu mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	GU261712.1
Gallus gallus murghi isolate qgm1 breed Red jungle fowl mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	GU261709.1
Gallus gallus isolate YF20548 breed Autochthonic chicken mitochondrion, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	GU261694.1
Gallus sonnerati mitochondrial DNA, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	AP005746.1
Gallus sonnerati mitochondrial DNA, complete genome	2817	2817	100%	0.0	99%	AP003320.1

شکل۲- نتیجه هم‌ردیفی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده با سایر توالی‌های ثبت شده

Figure 2. The results of nucleotide comparison between our fragment and other registered sequences.

```
1    MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF  60
     MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF
1    MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF  60

61   LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ  120
     LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ
61   LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ  120

121  GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA  180
     GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA
121  GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA  180

181  FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLSTMLISWTKTPML  240
     FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLST+LISWTKTPML
181  FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLSTLLISWTKTPML  240

241  NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS  300
     NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS
241  NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS  300

301  TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML  346
     TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML
301  TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML  346
```

شکل۳- نتیجه هم‌ردیفی متنی قطعه پروتئینی توالی‌یابی شده با توالی مرجع

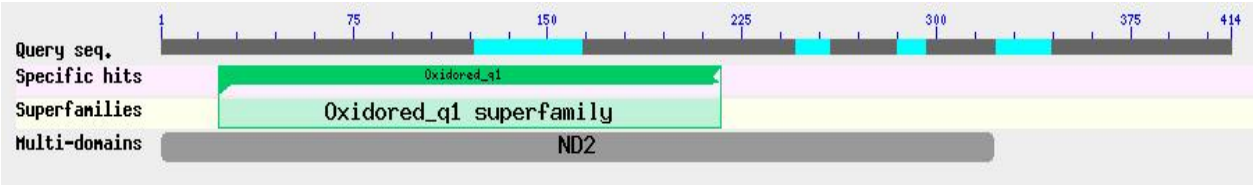
Figure 3. The results of a comparison between our protein sequence and reference sequence

Tetrastes Sewerzowi با شماره دسترسی ABH01111.1 تعلق داشت. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای مرغ بومی خراسان با توالی مرجع و سایر توالی‌ها با شماره مرجع YP272073.1، BAD11115.1، NP_006916.1، ADB06584.1 و ADW41566.1 شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول نشان داد (شکل۴). همچنین این نتایج نشان‌دهنده ناحیه‌های حفاظت شده NADH2 و Oxidored q1 بود که در زنجیره انتقال الکترون و انتقال پروتون‌ها به غشا شرکت دارند (شکل ۵). جهش‌های مشاهده شده در این تحقیق از آنجائیکه منجر به تغییر اسید آمینه شده است می‌توان به عنوان یک پایه در بررسی‌های اختلالات سوخت وساز و صفات تحت تاثیر ژن Mt –ND2 در مطالعات بعدی قرار گیرد. به منظور بدست آوردن اطلاعات بیشتر، مطالعات تکمیلی به ویژه بررسی ارتباط بین جهش‌ها و تاثیر آنها در فنوتیپ توصیه می‌شود.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus]	663	663	83%	0.0	100%	BAC57573.1
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus bankiva]	662	662	83%	0.0	99%	YP_272073.1
NADH dehydrogenase subunit II [Gallus gallus]	662	662	83%	0.0	99%	BAD11115.1
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus]	661	661	83%	0.0	99%	NP_006916.1
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus]	661	661	83%	0.0	99%	ADB07104.1
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus]	661	661	83%	0.0	99%	ADB06584.1
NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus spadiceus]	660	660	83%	0.0	99%	YP_272047.1

شکل ۴- نتیجه هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای قطعه تکثیر شده با سایر توالی‌های پروتئینی ثبت شده

Figure 4. The results of comparison between our sequence and the registered protein sequences



شکل۵- نواحی حفاظت شده در قطعه توالی‌یابی شده

Figure 5. The conserved region in our sequenced fragment

تشکر و قدردانی

از واحد بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

DiMauro S. 2004. Mitochondrial diseases. Biochemical et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1658:80-88.

Fumihito A, Miyake T, Sumi S, Takada M, Ohno S, Kondo N. 1994. One subspecies of the red junglefowl (Gallus gallus gallus) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, 91(26): 12505–12509.

Kawabe K, Worawut R, Taura S, Shimogiri T, Nishida T, Okamoto S. 2014. Genetic Diversity of mtDNA D-loop Polymorphisms in Laotian Native Fowl Populations. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27(1):19-23.

Ahmad IM, Abdallah MY.2012. Mitochondria-mediated oxidative stress and cancer therapy. In: Spitz, DR, Dornfeld, KJ, Krishnan, K, Gius, D, editors. Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Humana Press, p.3-19.

Brown WM.1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, 77(6): 3605–3609.

Chinnery PF, Schon EA. 2003. Mitochondria. Journal of neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 74, 1188-1199.

Mitchell AL. 2006. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: Mutation or polymorphism? , Journal of Medical Genetics, 43, 175-179.

Miao YW, Peng MS, Wu GS, Ouyang YN, Yang, ZY, Yu N , Liang JP, Pianchou G, Beja-Pereira A, Mitra B, Palanichamy MG, Baig M, Chaudhuri TK, Shen YY, Kong QP, Murphy RW, Yao YG, Zhang YP. 2013. Chicken domestication: an updated perspective based on Mitochondrial Genomes.The Journal of Heredity, 110: 277-282.

Newmeyer DD, Ferguson S. 2003. Mitochondria: Releasing Power for Life Review and Unleashing the Machineries of Death. Cell, 112: 481–490.

Sambrook JG, Campbell RD, Elgar G. 2003. Characterisation of a gene cluster in Fugu rubripes containing the complement component C4 gene. Gene, 312, 73-83.

Szalanski AL, Bischof R, Mestl G. 2000. Population Genetic Structure of Nebraska Based on Mitochondrial DNA Variation. Transactions of the American Fisheries Society, 129:1060–1065.

Taanman JW.1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1410(2): 103-123.

Wang XY, He Y, Li JY, Bao HG, Wu Ch. 2013. Association of a missense nucleotide polymorphism in the MT-ND2 gene with mitochondrial reactive oxygen species production in the Tibet chicken embryo incubated in normoxia or simulated hypoxia. Animal Genetics, 44(4):472-5.

Yacoub HA, Fathi MM. 2013. Phylogenetic analysis using d-loop marker of MtDNA of Saudi native chicken strains, Mitochondrial DNA, 24(5): 538-551.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۲۳-۱۱۴

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت (*Barbus grypus*) در رودخانه کرخه استان خوزستان و گونه پرورشی آن با استفاده از نشانگر ریزماهواره

Study on the genetic diversity of *Barbus grypus* in Karkheh river in Khuzestan province and a cultured species by microsatellite marker

[۱]محبوبه کرمی‌نسب, [۲]زینب حسین نیا *, [۳]حامد کلنگی میاندره, [۴]علی شعبانی

Mahbobe Karami nasab[1], Zeinab Hosseinnia*[۲], Hamed Kolangi Miandare[3],Ali Shabany[4]

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ۳- استادیار ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

1&2- MSc. Students 3- Assistant Professor 4- Associate Professor
Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment,
Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
Gorgan, Golestan, Iran.

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

(تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰)

چکیده

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) از خانواده *Cyprinidae* می‌باشد که در منابع آبی غرب و جنوب‌غرب ایران به‌ویژه آب‌های استان خوزستان حضور گسترده‌ای دارد. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت رودخانه کرخه با نمونه پرورشی آن با استفاده از ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره‌ای می‌باشد. در پاییز ۱۳۹۱، ۶۰ نمونه ماهی از دو منطقه جهت این بررسی، صید شد. طبق نتایج به‌دست آمده متوسط میزان F_{st}، ۰/۲۸ به دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد. دربررسی تعادل هاردی-واینبرگ، نمونه‌ها دراکثر لکوس‌ها انحراف از تعادل را نشان دادند. همچنین میزان نسبتاً بالایی ازجریان ژنی بین جمعیتها مشخص گردید. تنوع ژنتیکی دو منطقه، شامل کرخه تعداد الل در جایگاه: N_a= ۱۰/۲۸۶، تعدادالل مؤثر: N_e=۶/۷۸۹، هتروزیگوسیتی مشاهده شده: H_o= ۰/۶۹۱، هتروزیگوسیتی موردانتظار: H_e= ۰/۸۴۰ و پرورشی N_a= ۱۳/۲۸۶، N_e=۹/۱۴۱، H_o= ۰/۸۰۰، H_e= ۰/۸۸۳ نیز تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین آنالیز واریانس با استفاده از داده‌های ژنی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیت‌ها وجود داشته و بخش اصلی تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج بدست آمده در این پژوهش پیش از انجام آن، در گونه پرورشی با توجه به رعایت موارد اصلاح نژادی در مراکز تکثیر تقریباً قابل پیش بینی و مشخص بود.

واژه‌های کلیدی

تعادل هاردی- واینبرگ
تنوع ژنتیکی
ریزماهواره
ماهی شیربت
Barbus grypus

مقدمه

جهت بهره‌برداری پایدار از ذخایر ارزشمند ماهیان، نیاز به شناخت کافی از وضعیت ذخایر گونه‌ها، نژادها و جمعیت‌های متعدد آن‌ها می‌باشد تا اعمال مدیریت بهره‌برداری در جهت کمک به حفظ ذخایر، رهاسازی بچه ماهی‌ها و کاهش فشار صیادی بر اساس اصول علمی بنا گردد (رضوانی گیل کلائی و همکاران، ۱۳۸۸). درحال حاضر، بسیاری ازگونه های درمعرض خطر برای محفوظ ماندن از خطر انقراض، نیاز به تکثیر مصنوعی دارند، زیرا به علت تأثیرات مستقیم یا غیرمستقیم انسانی، همچون از دست رفتن زیستگاه‌ها، بهره‌برداری بیش از حد، آلودگی، معرفی گونه-های شکارچی و رقیب و یا ورود بیماری‌ها قادر به بقا در محیط-های طبیعی نامناسب نیستند. درآینده نیز، گونه‌های بسیار بیشتری به این وضعیت دچار خواهند شد (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; IUCN, 2006). بنابراین، جهت تحقق اهداف مدیریتی، مطالعات مولکولی جمعیت روی ماهی‌ها انجام می‌گیرد (Park and Moran, 1995; Allenford *et al*. 1987). آگاهی از میزان ذخایر ژنی و تنوع ژنتیکی در بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است؛ به‌طوری که بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آن‌ها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang *et al*. 2007). در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک صورت می‌گرفت اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و اثرهای منفی دست‌کاری در نشانه-گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده ازمارکرهای مولکولی همچون ریزماهواره ها و آلوزایم جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت. در این میان، نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده تری نسبت به سایر نشانگرها دارند. جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، توالی‌های کوتاه و تکراری DNA هستند که دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی هستند (Angers and Bernatchez, 1998). ریزماهواره‌ها به‌علت بالا بودن تعداد الل‌هایشان، در بین تمام نشانگرها، بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (Liu, 2007). این چند شکلی بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (Dunham, 2004). در واقع این نشانگرها ارزش بالایی داشته به طوری که علاوه بر فراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرار شونده در آن‌ها بالاست که دلیل آن را می‌توان به نرخ بالای جهش در این نشانگرها نسبت داد. ازطرفی به علت همبارزبودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر نشان داده، لذا میتوان اذعان نمود که این نشانگرها در بررسی‌های جمعیتی ماهیان بر برخی معایب روش‌های دیگر غلبه دارند (Verspoor and Jordan, 1989) مطالعات تنوع ژنتیکی زیادی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفته است. رضایی(۱۳۸۸) در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۸۱ گزارش نمود. همچنین، چکمه دوز و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بهاره و پاییزه ماهی سفید در دریای خزر با نشانگر ریزماهواره، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار را به‌ترتیب در محدوده ۰/۹۶-۰/۲۱ گزارش نمودند که بالا بودن دامنه هتروزیگوسیتی در ماهی سفید دریای خزر را بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این ماهی دانستند. پامپولی و همکاران (۲۰۰۶) به‌مقایسه تنوع ژنتیکی روغن ماهی اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) پرورشی با نوع وحشی آن پرداختند. نتایج حاکی از کاهش مقدار متوسط الل و تنوع اللی نمونه‌های پرورشی نسبت به نمونه‌های وحشی بود که دلیل آن را کاهش تعداد مولدین موثر دانستند. بائی و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره به‌بررسی تنوع ژنتیکی ۴ جمعیت پرورشی باس دهان‌بزرگ (*Micropterus salmoides*) و مقایسه آن با نمونه‌های وحشی پرداختند. با توجه به کاهش شدید تنوع آللی و کاهش هتروزیگوسیتی که همراه با علائمی از کاهش N_e نیز بود به این نتیجه رسیدند که تنگنای ژنتیکی رخ داده است.

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) از خانواده *Cyprinidae* بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین (Nelson, 1994) و یکی از گونه‌های بومی می‌باشد که در حوضه آبریز خلیج فارس، رودخانه‌های دشت خوزستان و حوزه‌ی رودخانه‌های دجله و

فرات پراکنش دارد (Dorostghoal *et al.* 2009). این ماهی بنتوپلازیک و ساکن آب‌های شیرین در مناطق تحت حاره ای می‌باشد و یک گونه همه‌چیزخوار بوده که در سنین بالا به رژیم گوشتخواری روی می‌آورد. این گونه دارای اهمیت اقتصادی در میان مردم محلی است و یک گونه مهم تجاری در آبزی پروری ایران به‌شمار می‌رود. برخی از گزارشات نشان می‌دهد که جمعیت این گونه در رودخانه‌های خوزستان کاهش یافته است (نیک‌پی، ۱۳۷۵). با وجود اهمیت این ماهی متاسفانه تاکنون آگاهی‌هایی درمورد تنوع ژنتیکی این گونه در میان مناطق مختلف منتشر نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی وضعیت ژنتیکی ماهی شیربت در رودخانه کرخه و مقایسه آن با نمونه‌های پرورشی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در پاییز ۱۳۹۱ تعداد ۳۰ عدد ماهی شیربت از رودخانه کرخه و ۳۰ عدد از مرکز تکثیر ماهیان گرمابی اهواز جمع‌آوری شد. حدود ۳ گرم از باله سینه‌ای هر ماهی جداسازی و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک مطلق نگهداری شد. سپس نمونه‌ها برای استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم انجام پذیرفت(Hillis *et al.* 1996) . DNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر تا زمان انجام مطالعات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگارز یک درصد و روش اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت از جایگاه‌های ژنی Bbar11، Bl1-153، GATA20، GGM024، MFW7، MFW26 و MFW2 استفاده شد (جدول ۱). تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل: ۱۵ نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۵۰ نانوگرم از نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی *Taq* پلیمراز(Fermentas)، بافر PCR ۱۰X(Fermentas)، ۱/۵ میلی-مولار کلریدمنیزیم و آب‌مقطر تا رسیدن به حجم، انجام گرفت. چرخه دمایی برای هرجایگاه ژنی عبارت بود از: یک مرحله ابتدایی ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته-سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به‌مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه (بسط) و یک مرحله انتهایی ۷۲ درجه‌ای به‌مدت ۳ دقیقه به‌عنوان مرحله بسط نهایی. محصولات واکنش PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. از نشانگر اندازه DNA (Ladder 50bp fermentas) به‌عنوان شاخص برای تعیین اندازه اللی استفاده شد. در ادامه، ژل‌ها به‌روش نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شدند (Bassam *et al.*, 1991) و پس از تهیه تصویر آن‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD)، از نرم‌افزار Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تعداد الل مشاهده شده ، الل موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) و تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Genealex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی براساس مدل اللی بی‌نهایت (F_{st}) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزاری Genealex استفاده شد. تعیین فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I)(Nei, 1978) و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA و نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh *et al.* 1999) صورت گرفت.

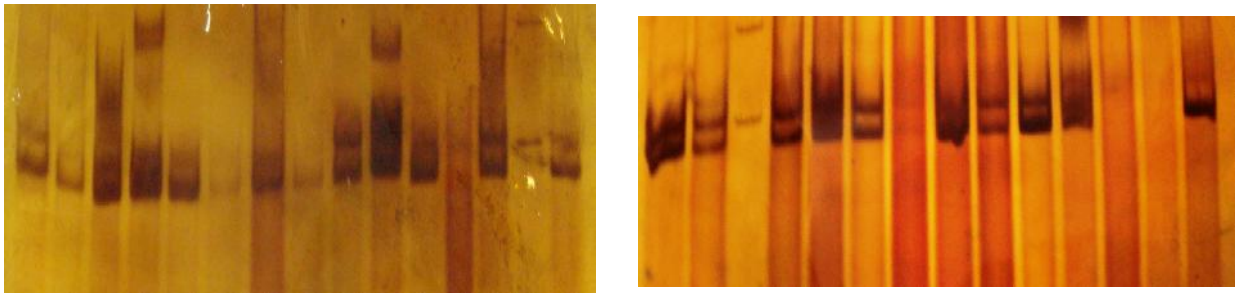
جدول۱- خصوصیات جایگاه های ژنی مورد استفاده در این مطالعه

Table 1: Specifications of genetic loci that are used in this study

جایگاه ژن Locus	توالی sequence	اندازه اللی (bp) Allele size	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temp. (°C)
Bbar11	F: GCGGAGGAAGAGAAACACAG R: CTATGCCATTGCCACACATC	116-216	49
Bl1-153	F: GCACAGCTCTAATCGGTCACT R:TATGGTCAAACACGGGTCAA	168-244	56
GATA20	F: AATCATGGCGATGGAAAGAC R: AATGACACTTCACATCTAGC	76-144	54
GGM024	F: TCCCTCTTTTTGCTCTCAGG R: TAGGTGAACAAATGGCATGG	116-184	55
MFW2	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	156-212	58
MFW7	F: TACTTTGCTCAGGACGGATGC R: ATCACCTGCACATGGCCACTC	116-172	59
MFW26	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGGATGCAAAAG	120-200	48

نتایج

هر ۷ جایگاه ژنی مورد استفاده در این بررسی پلی مورفیسم را نشان دادند (شکل ۱). تعداد الل‌های مربوط به تمامی جایگاه‌های چندشکل در جدول (۲) نشان داده شده است. تعداد کل الل در سطح جایگاه در دامنه ۱۸-۸ به‌دست آمد بطوری‌که جایگاهGGM024پایین‌ترین (۸ الل) و Bbar11(۱۸ الل) بالاترین تعداد الل را نشان دادند. تعداد متوسط الل‌های مشاهده شده و موثر در کرخه به‌ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۶/۷۸۹ و در جمعیت پرورشی ۱۳/۲۸۶ و ۹/۱۴۱ به‌دست آمد که از این نظر بین مناطق هدف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e)به‌ترتیب در دامنه ۰/۳۶۰-۱/۰۰۰ (متوسط: ۰/۷۴۶) و ۰/۷۵۰-۰/۹۲۱ (متوسط: ۰/۸۶۱) قرار داشت. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح مناطق نیز به ترتیب ۰/۶۹۱-۰/۰۷۸ برای کرخه و پرورشی به‌دست آمد. همچنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و موردانتظار، مشاهده نشد($P>0/05$). در بررسی نمونه‌ها از نظر تعادل هاردی-واینبرگ تمام نمونه‌های دو منطقه (۱۴ نمونه) انحراف از تعادل را نشان دادند. در این بررسی ضریب تصحیح بونفرونی اعمال شد. متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و جریان ژنی (N_m) به ترتیب ۰/۱۳۶ و ۱۰/۷۸۱ به‌دست آمد. از نظر تمایز بین مناطق میزان شاخص F_{st} و R_{st} بر اسا تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) به ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۱۸۸ به‌دست آمد. همچنین نتایج براساس AMOVA نشان داد که ۹۷ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها وتنها ۳ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها می‌باشد (شکل ۲). براساس معیار فاصله ژنتیکی Nei میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه ۰/۶۴۷ و مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۴۳۵ به‌دست آمد. دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه به‌طور کامل مجزا قرار دارند.



شکل ۱- تصویر نشانگرهای ریزماهواره ماهی شیربت در جایگاه‌های MFW2 و Bl1-153

Figure 1 . Microsatellite profiles of *Barbus grypus* at loci MFW2 and Bl1-153

جدول۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه درجمعیت‌های ماهی شیربت

Table 2: Genetic variability of microsatellite loci in two populations for *Barbus grypus*

MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	Bl1-153	Bbar11		
9	10	11	8	10	13	11	N_a	کرخه
4.980	6.614	7.962	3.994	7.310	10.504	6.158	N_e	
0.360	0.640	0.880	0.520	0.760	0.960	0.720	H_o	
0.799	0.849	0.874	0.750	0.863	0.905	0.838	H_e	
***	***	**	**	***	***	**	pHw	
13	13	13	9	12	15	18	N_a	پرورشی
8.929	9.124	10.246	5.274	7.622	10.163	12.626	N_e	
0.680	0.920	0.800	0.800	0.760	0.640	1.000	H_o	
0.888	0.890	0.902	0.810	0.869	0.902	0.921	H_e	
***	***	***	**	***	**	***	pHw	

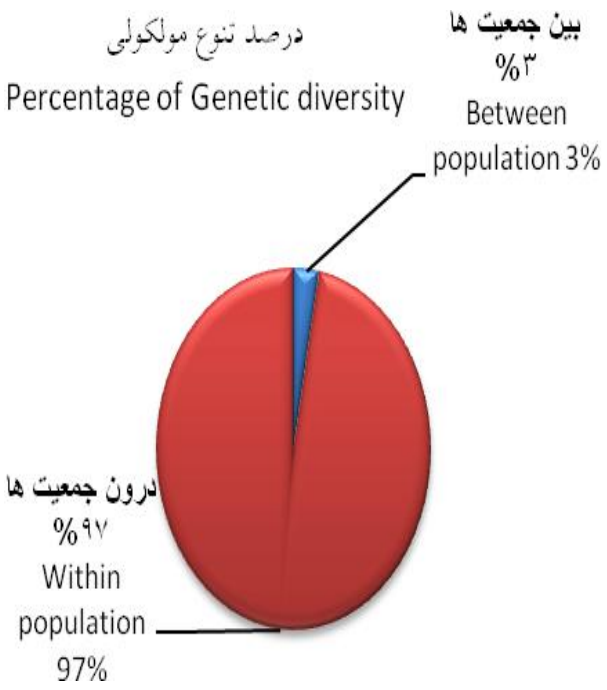
N_a: تعداد الل‌های مشاهده شده؛ N_e: تعداد الل‌های مؤثر؛ H_o: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ F_{is}: ضریب درون‌آمیزی؛ pHw: تست احتمال تعادل هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، *: P≤۰/۰۵، **: P≤۰/۰۱، ***: P≤۰/۰۰۱)

Na, number of observed alleles; Ne, number of effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; Fis, fixation indices; PHW, Hardy-Weinberg probability test
(*P < 0.05, **P <0.01, ***P < 0.001, n.s, non-significant).

جدول۳- میزان Fst (ضریب تمایز) ، Fis (ضریب درون آمیزی)، Nm (جریان ژنی) در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه

Table 3. Nm, F_{st} and F_{is} index of five microsatellite loci in two populations for *B. grypus*

میانگین Average	MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	Bl1-153	Bbar11	جایگاه ژنی Locus
0.028	0.034	0.021	0.018	0.046	0.036	0.010	0.035	F_{st}
0.136	0.384	0.103	0.054	0.154	0.122	0.114	0.022	F_{is}
10.781	7.077	11.945	13.543	5.242	6.724	24.021	6.912	N_m



شکل۲- تنوع ژنتیکی بدست آمده براساس معیار Fst

Figure 2. The distribution of genetic diversity on

F_{st} standard

بحث

تنوع ژنتیکی به‌عنوان پایه‌ای برای توانایی تکامل جمعیت‌هاست. دانسته‌های مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، نقشی اساسی درحفاظت و بهره‌برداری پایدار از آن‌ها دارد. عملیات آبزی‌پروری می‌تواند روی تنوع ژنتیکی یک گونه اثرگذار باشد (Norris *et al*. 1999). اندازه کوچک جمعیت و برنامه‌های کنترل نشده تکثیرمصنوعی، ازعوامل اصلی از کاهش تنوع ژنتیکی درگونه‌های پرورشی است (Hansen *et al*. 2000)، بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی باید به‌عنوان اولویت اصلی در برنامه‌های تکثیرحمایتی درنظرگرفته شود.

ریزماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که بصورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌گردند (Liu *et al*. 2009). درواقع، این نشانگرها ارزش بالایی دارند؛ به‌طوری که علاوه برفراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرارشونده درآنها بالاست که علت آن را میتوان به نرخ بالای جهش دراین نشانگر نسبت داد و از طرفی، به‌دلیل همبارز بودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر از سایر نشانگرها نشان می‌دهد(Liu and Cordes, 2004).

با وجود اهمیت بالای اقتصادی و تجاری ماهی شیربت، این گونه فاقد آغازگر طراحی شده اختصاصی می‌باشد. در این بررسی جهت مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیربت رودخانه کرخه وپرورشی از ۷ نشانگر ریزماهواره‌ای استفاده شد که همگی پلی-مورف بودند. کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگرکاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind *et al*. 2009). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. درواقع، بالا بودن غنای اللی، نشاندهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت بوده، استفاده از غنای اللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه-های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (Diz and Presa, 2009). دراین بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های کرخه و پرورشی به‌ترتیب ۰/۶۹ و۰/۸۰به‌دست آمد، که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین (۰/۴۶) (Dewoody and Avise, 2000) بالاتر می-باشند اما بین دو جمعیت از این نظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p< 0.05$).

در بررسی‌های تنوع ژنتیکی وخصوصا در مورد گونه‌هایی که تحت برنامه‌های تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر قرار دارند، هتروزیگوسیتی نمی‌تواند شاخص مناسبی برای نشان دادن وضعیت ژنتیکی باشد (Petit *et al*. 1998). تعداد متوسط الل واقعی در سطح جمعیت‌های کرخه و پرورشی به‌ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۱۳/۲۸۶محاسبه شد که تفاوت معنی داری از این نظر بین دو جمعیت مورد بررسی مشاهده نشد و این مقادیر بیشتر از مقدار محاسبه شده برای ماهیان آب شیرین (۷/۵) (Dewoody and Avise, 2000) بود. این مقدار به‌شدت تحت تاثیر تعداد نمونه‌ها می‌باشد، بر همین اساس، این امکان وجود دارد که در آزمایشات گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت تعداد الل‌های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین بدست آید. وجود حداقل تعداد ۳۰ نمونه می تواند تعداد الل‌های واقعی را در بررسی‌های ریزماهواره نشان دهد (Goldstien and Scholottor, 1999; Silva and Russo, 2000; Peakall and Smous, 2006). تعداد الل مؤثر در همه جایگاه‌ها کمتر از الل مشاهده شده می‌باشد که علت این امر محدود بودن تعداد مولدین مؤثر در عملیات تکثیر مصنوعی و امکان از دست رفتن الل‌ها در طی زمان می‌باشد. این نتایج نشان می دهد که به‌رغم مسائلی همچون تکثیر مصنوعی ماهی شیربت و فشار صید، تنوع ژنتیکی این ماهی در سطح قابل قبولی قرار دارد.متأسفانه علی‌رغم مزایای تکثیر مصنوعی، این روش در دراز مدت می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر ژنی بومی گردد (Blanchet *et al*. 2008). با اینکه انتظار می‌رود میزان الل واقعی و هتروزیگوسیتی در جمعیت پرورشی کمتر از جمعیت وحشی باشد اما از این نظر اختلاف معنی داری بین این جمعیت‌ها مشاهده نشد که این می‌تواند به علت وقوع درون آمیزی در جمعیت کرخه باشد که دلیل آن وجود تنگنای ژنتیکی می‌باشد که این امر در طولانی مدت باعث روند کاهشی در تنوع ژنتیکی جمعیت می‌شود. در صورت بزرگ بودن بیش از اندازه جمعیت، تصادفی بودن آمیزش‌ها و عدم وجود جهش، بهگزینی و مهاجرت (جابجایی ماهیان از یک جمعیت به جمعیت دیگر)، فراوانی آللی و ژنوتیپی می‌تواند از نسلی به نسل دیگر ثابت بماند که تحت عنوان تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌شود. در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini *et al*. 2006). در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، همه

موارد انحراف از تعادل را نشان دادند که ضریب تصحیح بونفرونی در این بررسی لحاظ شد. انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ می‌تواند علل متعددی داشته باشد. رضایی (۱۳۸۸) با بررسی جمعیت‌های ماهی سفید، علت انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ را عملیات تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر عنوان کرد. Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی *Acipenser sinensis* انحراف را به وجود آلل‌های صفر و تلاقی خویشاوندی نسبت دادند. در واقع وجود الل‌های صفر در ماهی پدیده‌ای کاملاً عادی می‌باشد و وجود این الل‌ها در توارث میکروستلایت در ماهیان مورد تأیید قرار گرفته است (Rodzen and May, 2002 Appleyard) و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ساختار ژنتیکی تن‌ماهی چشم‌درشت (*Thunnus obesus*) انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ را مربوط به خطای نمونه‌گیری دانست. در اینجا علاوه بر دلایل ذکر شده، انحراف از تعادل را می‌توان به غیراختصاصی بودن آغازگرها یا تعداد کم نمونه نیز نسبت داد.

در این بررسی متوسط میزان F_{is}، ۰/۱۳۶ به‌دست آمد و چون این مقدار بیشتر از صفر است می‌تواند دال بر آمیزش خویشاوندی و اختلاط بین جمعیت‌ها باشد (Wright, 1951). آمیزش خویشاوندی از جمله ملاحظات اصلی در جمعیت‌های ماهیان به‌شمار می‌رود که می‌تواند باعث کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش میزان بقاء و عدم مقاومت در برابر بیماری‌ها و در نهایت به خطر انداختن جمعیت‌ها می‌گردد (Fergusen, 1995). میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر اطلاق می‌شود که هرچه این میزان بین دو منطقه بیشتر باشد به این معنی است که مهاجرت بین دو منطقه بیشتر و اختلاف ژنتیکی کمتر و میزان تنوع ژنتیکی در دو منطقه بیشتر می‌شود (Rezvani Gilkolaei, 2009; Beacham *et al*. 2004). هرگاه $N_m > ۱$ باشد، جریان ژنی اصلی‌ترین عامل ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $N_m < ۱$ باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود (Li *et al*. 2007). از این‌رو نتایج به‌دست آمده نشان دهنده این است که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها جریان ژنی با میزان ۱۰/۷۸۱ بوده و دلیل مشاهده تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت-های این گونه را می‌توان وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها دانست. احتمالاً دلیل بالا بودن جریان ژنی را می‌توان انتخاب تصادفی و استفاده از تعداد زیاد مولدین جهت تکثیر اعلام کرد. در مراکز تکثیر ماهی شیربت عمدتاً سالانه تعداد زیادی مولد از رودخانه‌ها صید می‌شود که این امر موجب افزایش جریان ژنی خواهد شد.

در بررسی‌های جمعیتی میزان F_{st} به عنوان یک شاخص مهم جهت تفکیک و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها به کار می‌رود (Ballox and Moulin, 2002). یکی از مهمترین و هدفمندترین موضوعات در تحقیقات روی جمعیت‌های گونه‌های مختلف نیز دست‌یابی به اختلاف فراوانی اللی میان جمعیت‌ها یا به عبارتی همان F_{st} به عنوان مقیاسی از تنوع جمعیتی است. هرگاه میزان F_{st} کمتر از ۰/۰۵ باشد، نشان دهنده وجود تمایز کم، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ نشان دهنده تمایز متوسط، مقدار بین ۰/۱۵تا ۰/۲۵ نشان دهنده تمایز بالا و مقدار بالای۰/۲۵ نیز نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی خیلی بالا در بین جمعیت‌ها می‌باشد (Wright, 1978). در این بررسی میزان متوسط F_{st}، ۰/۰۲۸ می‌باشد که نشان دهنده تمایز پایین بین جمعیت‌ها می‌باشد و با توجه جریان ژنی بالای بین این دو منطقه، به سادگی قابل توجیه می‌باشد. درصورت عدم وجود جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها انتظار می‌رفت تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین آنها ایجاد گردد. آنالیز واریانس مولکولی به عنوان یک آنالیز آماری، ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Grassi *et al*. 2004). با توجه به اینکه R_{st} از دانسته‌های مربوط به اندازه اللی استفاده می‌کند و وابسته به جهش نیست، می‌تواند داده‌های بیولوژیک بهتری نسبت به معیار F_{st} فراهم کند (Balloux and Moulin, 2002). بنابراین نتایج آزمون AMOVA در این بررسی بر اساس R_{st} حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در داخل جمعیت‌ها (۸۳٪) و در عین حال تنوع ژنتیکی پایین بین جمعیت-ها (۱۷٪) می‌باشد. برای ریزماهواره‌ها میزان R_{st} می‌تواند بیشتر از F_{st} باشد (Slatkin, 1995) که در این بررسی میزان F_{st} و R_{st} به-عنوان شاخص‌های تمایز به‌ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۱۸۸ به‌دست آمد که نشان از وجود تمایز پایین بین مناطق مورد بررسی است. طبق پیراسنجه های عنوان شده توسط Throp(۱۹۸۲) که مقدار شباهت ژنتیکی را بر اساس سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره‌داران محاسبه کرد، برای جمعیت‌هایی که به گونه‌های مشابه تعلق دارند،

شباهت ژنتیکی بین ۰/۸۰–۰/۹۰ و در گونه‌های متعلق به جنس-های مشابه بین ۰/۳۵–۰/۸۵ قرار دارد. مقدار به‌دست آمده در این بررسی ۰/۶۴۷ می‌باشد که در محدوده گونه‌های مشابه قرار دارد و با مقادیر تمایز پایین به‌دست آمده مطابق است.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش، به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار دارد و تنوع بین گونه‌های پرورشی و کرخه اختلاف معنی داری نشان نمی‌دهد. همچنین تنوع ژنتیکی قابل قبول در جمعیت پرورشی، حاکی از رعایت مباحث مربوط به اصلاح نژاد در این جمعیت می‌باشد. با این وجود، احتمال کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی به-دلیل درون آمیزی در آینده، دور از انتظار نیست. همچنین نتایج نشان داد که نشانگر ریزماهواره از توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در این ماهی برخوردار است.

منابع

Allendorf F, Ryman N, Utter F. 1987. Genetics and fishery management. University of Washington. Wasgington.

Angers B, Bernatchez L. 1998. Combined use of SMM and non SMM methods to infer finestructure and evolutionary history of brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. Molecular Biology Evolution 15: 143-159.

Appleyard SA, Ward RD, Grewe PM. 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian ocean using mitochondrial DNA and microsatellite. Journal of Fish Biology 62: 987-999.

Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimate of population differentiation withmicrosatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.

Bai J, Lutz-Carrillo DJ, Quan Y, Liang S. 2008. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China Aquaculture 278: 27-30.

Gresshoff GM. 1991. Fast and sensitive silver stainingof DNA in polyacrylamide gels. Analytical biochemistry 84: 680-683.

Beacham Td, Mcintosh M, MacConnachie C. 2004. Population structure of lake-type and river-type sockeye salmon in Transboundary rivers of northern British Columbia. Journal of Fish. Biology 65: 389-402.

Blanchet S, Paez D, Bernatchez L, Dodson J. 2008. An integrated comparison ofcaptive-bredand wild Atlantic salmon (*salmosalar*): Implications for supportive breeding programs. Biological Conservation 141: 1989-1999.

Chakmedooz F, Pour kazemi M, Zamini DA, Yarmohammadi M, Rezvani S, Azizzade, L. 2009. Genetic diversity of (*Rutilus frisii kutum*) with microsatellite marker. Proceedings of the First National Congress of the fishery resources of the Caspian Sea. Page 2 (In Farsi).

Dewoody JA, Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish biology 56: 461-473.

Diz PA, Presa P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287: 278-285.

Dorostghoal M, Peyghan R, Papan F, Khalili L. 2009. Macroscopic and microscopic studies of annual ovarian maturation cycle of Shirbot *Barbus grypus* in Karon river of Iran. Shiraz University. Iranian Journal of Veterinary Research 27: 172–179.

Dunham RA. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology genetic approaches. Canadian Association of Business Incubation Publishing, London.

Fergusen M. 1995. The role of moleculargenetic markers in the management of culturedfish. G. R. arvalhoand, T. J. Pitcher (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries. London:Chapman and Hall 81-104.

Goldstein DB, Schlotterer C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press. New York. 368p.

Grassi F, Imazio S, Gomarasca S, Citterio S, Aina R, Sgorbati S, Sala F, Patrignani G, Labra M. 2004. Population structure and genetic variation within *Valerianawallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science 166: 1437-1441.

Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Mensberg KD. 2000. Microsatellite andmitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent

interbreeding between hatcheryand wild brown trout (*Salmo trutta* L.). Molecular Ecology 9: 583-594.

Hillis DM, Mortiz C. 1996. Molecular systematic. 2nd Ed, Sinauer Associates Inc, PublishersSunderland, Massachusetts.

IUCN.2006. IUCN Red List of Threatened species. Retrieved from http://www.redlist.org/. On 18May 2007.

Li D, Kang D, Yin Q, Sun Z, Liang L. 2007. Microsatellite DNA Marker Analysis of GeneticDiversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations. Genetics and Genomics 34: 984-993.

Lind CU, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR. 2009. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture 286: 12-19.

Liu Z. 2007. Aquaculture Genome Technologies. Blackwell Publishing, Oxford.

Liu F, Xia JH, Bai ZH, Fu JJ, Li JL, Yue GH. 2009. High genetic diversity andsubstantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed bymicrosatellite analysis. Aquaculture 297: 51-56.

Liu Z, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications inaquaculturegenetics. Aquaculture 238:1-37.

Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Gigliarelli L, Natali M, Panara F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike *Esox lucius*. Fisheries Research 80: 251–262.

Millennium Ecosystem Assessment. 2005. Ecosystems and human well-being: Current state andtrends: Findings of the conditions and trends working group of the millennium ecosystemassessment. Island Press, Washington D.C.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number ofindividuals. Genetics 89: 583-590.

Neik pei M. 1997. Report of Barbus biology project, Iranian Fisheries Research and Training Organization 28-36 (In Farsi).

Nelson J. 1994. Fishes of the World. 3rd ed., John Wiley and Sons, NewYork.

Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. 1999. Microsatellite genetic variationbetweenand within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture 180: 247-264.

Pampoulie Ch, Jorundsdottir TD, Steinarsson A, Petursdottir G, Stefansson MO, Danielsdottir AK. 2006. Genetic comparison of experimental farmed strains and wildIcelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture 261: 556-564.

Park LK, Moran P. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. MolecularGenetics in Fisheries. London.

Peakall R, Smouse PE. 2006. Gene Alex 6: genetic analysis in excel. Population geneticsoftware for teaching and research. Molecular Ecology 6: 288-295.

Peakall R, Smouse PE. 2006. Gene Alex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology and Systemic 28: 105-128.

Petit R J, Mousadik AE, Pons AO. 1998. Identifying populations for conservation on thebasis of genetic markers. Conservation Biology 12: 844-855.

Rezae M. 2010. Genetic diversity of (*Rutilus frisii kutum*) with microsatellite marker. MSc Thesis of Fisheries. The natural resources and Agriculture university of Gorgan 83pp(In Farsi).

Rezvani Gilkolaei K, Salari Aliabadi MA, Zolgharnain H, Nabavi SMB. 2009. Population genetic structure of Cobia, *Rachycentron canadum* revealed by microsatellite markers. Iranian journal of Fisheries science 3:61-69.

Silva EP, Russo CAM. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. Hydrobiologia, 420: 119-135.

Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462.

Thorp JP. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation andsystematic. Annual Review of Ecology and Systematics 13:139-168.Wright, B. S. 1951. The genetical structure of populations. Annual Eugenics 15: 323-354.

Verspoor E, Jordan WC. 1989. Genetic variation at the Me-2locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence forits selective maintenance. Fish Biology 35: 205-213.

Wright S. 1978. Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations. University of Chicago Press. 2nd Ed., University of Chicago Press, Chicago.

Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-basesFreeware for population Genetic Analysis. Retrieved from:www.uallberta.ca/fyeh/. University ofAlberta and the Centre for International Forestry Research.

Zhao N, Shao Z, Zhu B. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* genetic variability. J. Appl. Ichthyology 21:7-13.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Evaluation of total carbohydrate and soluble sugars in transgenic potato resistant to potato tuber moth

H. Mirrokni [1,2], H. Rahnama *[1], H. Zeinali [1]

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
* Corresponding Author, Email: hrahnama@abrii.ac.ir

ABSTRACT

Based on the regulatory frameworks in most countries, careful safety assessment based on comparison methods must be performed before the adoption and commercialization of GM crops and products. One of the safety assessments of GM plants is the comparison of key nutrients and metabolites between transgenic and non-transgenic lines. This study was designed to identify undesirable potential changes resulting from genetic manipulation (for example, as a result of the entry of foreign genes into the genome and new metabolite production) in transgenic potato resistant to potato tuber moth (*Phetorima operculella*). This process is known as substantial equivalence. This study attempted to examine total and soluble sugars such as sucrose, fructose and glucose in transgenic potato which were produced in Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. For this purpose, four transgenic lines (B2, B8, B11, B12) that have shown high levels of potato tuber moth resistance in bioassay tests were used. First, molecular analyses were performed on plant to be ensured of the presence of transgene, and the result of PCR showed that *cry*1Ab gene was present in all transgenic samples. The transgenic and control plants were transferred to greenhouse to produce the tubers. The harvested tubers were treated under light and dark conditions and then used for more analyses together with leaf samples. Evaluation of total sugar showed no significant differences between transgenic and control plants. Moreover, evaluation of soluble sugar showed that the contents of sucrose, fructose and glucose were not significantly different between transgenic and control plants. We conclude that according to evaluated components and regulatory rules of Codex, these transgenic potatoes are safe to use.

Key Words

*cry*1Ab gene, soluble sugar, substantial equivalence, total sugar, transgenic potato

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Evaluation of strain compatibility effects on Agrobacterium-mediated transient GUS expression in melon cultivars

Sahba Toosi[1], Farhad Shokouhifar[2*], Saeid Malekzadeh Shafaroudi[3], Abdolreza Bagheri[3]

1. M.Sc student, Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

2. Faculty Member of Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3. Faculty Members of Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

*Corresponding Author, Email: Shokouhifar@um.ac.ir

A B S T R A C T

Transient expression of a candidate effector gene in host plants following Agroinfiltration is a useful method to investigate the role of the gene in pathogenecity. In this study, the effects of two *Agrobacterium tumefaciens* strains on four standard melon lines and two Iranian melon cultivars were investigated to establish transient expression in melon. Compatibility of the LBA4404 and GV3101 strains was defined by injection of the bacterial suspensions into the leaves of cultivars. Viability of the injected *Agrobacterium* strain cells in leaf tissues was evaluated 24 hours after injection by prokaryotic GUS reporter gene assay. The LBA4404 strain harboring the pCAMBIA3301 vector containing an intron-GUS reporter gene was used to confirm eukaryotic GUS expression in the plant cells. The LBA4404 strain was transformed by the pBI121 and pCAMBIA3301 expression vectors and transient transformation was confirmed by colony PCR technique using the PSh3-F/R primers. The efficiency of transient transformation of the melon leaves was evaluated 48 hours after Agroinjection of the LBA4404 strain containing pCAMBIA3301 by the histochemical GUS assay. The leaves that were injected by LBA4404 harboring pBI121 showed GUS activity. All the melon cultivars transiently expressed the GUS reporter gene 24 hours after Agroinjection. These findings could be used in the future studies to evaluate function of candidate effector genes in interaction with standard melon lines.

Key Words

Agroinjection , GUS assay, Melon, Transient expression

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Study on Expression of some Transcription Factors Associated with Resistance to Black Stem Disease in Sunflower

Faramarz Hoshyardel[1], Hamid Hatami Maleki[2], Reza Darvishzadeh[1*], Morad Jafari[1]

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Professor and Associate Professor,

Department of Plant Breeding and Biotechnolgy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran.

* Corresponding Author, Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Black stem is one of the most important fungal diseases of sunflower caused by *Phoma macdonaldii*. In this study, expression level of some transcription factors (TF) including HD-Zip, AP2 domain, MYB- related, WRKY family and MYB family were studied using quantitative RT-PCR in sunflower genotypes, including ENSAT-B5 (susceptible to all 3 studied isolates; MA6, MP8, MP10), AS613 (resistant against MP8 and MP10 and susceptible to MA6), and M5-54-1 (a mutant genotype, resistant against MA6 and MP10 and susceptible to MP8) following infection by MA6, MP8 and MP10 isolates of *P. macdonaldii*. Among studied TFs, the expression level of two TFs, HD-Zip and MYB-related, were significantly different in genotype-isolate combinations but the expression level of three other TFs including AP2 domain, WRKY family and MYB family, were not significantly different in several genotype-isolate combinations. The expression of HD-Zip and MYB-related were suppressed in infected genotypes. Results revealed that increased repression of HD-Zip and decreased repression of MYB-related are affective in induction of resistance to MP8 and MP10 isolates in AS613 genotype. In this study, the induction of resistance in mutant genotype against MA6 and MP10 isolates was accompanied with decreased suppression of HD-Zip and MYB-related genes.

Key Words

Sunflower, black stem, transcription factors, gene expression

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Transformation and expression of recombinant insulin monomer in Arabidopsis plant

Behnaz Husseini[1], Gholam Reza Sharifi –Sirchi[2*]

1. Master of Science, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, University of Shahid Bahonar of Kerman.

2. Associate Professor in Biotechnology, Agriculture Department, Agriculture and Natural Science College, University of Hormozgan

* Corresponding Author, Email: sharifisirchi@yahoo.com

A B S T R A C T

The prevalence of diabetes is predicted to rise significantly in the coming decades. Also, the incidence of this disease is increasing in Iran every year. Aspart is an insulin analog. Aspart insulin has a more rapid peak than Lispro and can be used in insulin pumps, insulin pens and injection methods. In this research, Two *Agrobacterium tumefaciens* strains, EHA101 and GV 3101, containing pJawohl3 carrying the Aspart insulin gene were used to transform *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype plants by floral dip infiltration method. Seeds of floral dip infiltrated plants were sown on the pots. Then, seedlings were treated by BASTA herbicide. Expression of the Aspart insulin gene was detected in transgenic plants by RT-PCR and western blot. Evaluation of the infiltrated plants revealed that the EHA101 strain of Agrobacterium was more efficient than GV3101 strain in gene transformation.

Key Words

Agrobacterium, *Arabidopsis thaliana*, Aspart insulin, Transformation

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Indentifying, Cloning, and Determining the Sequence of MT-ND2 Gene in Khorasan's Native Chickens

Hamid Reza Izadnia[1]- Mojtaba Tahmoorespur [2]- Mohammad Reza Nassiry [3]

1. PhD student, Ferdowsi University of Mashhad, International Campus and Researcher of Agriculture and Natural Resources Research Center of SafiAbad (dezful)
2 and 3. Professor, Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding Author, Email: m_tahmoorespur@yahoo.com

A B S T R A C T

Discovering the sequences of mitochondrion has made it possible to study the presence of controlling genes in this organelle. Mitochondrion is responsible for producing 90 percent of the energy that the cell needs. Some differences in the broiler chicken growing function and the resulting phenotype and food efficiency may be related to differences in mitochondrion function. The aim of this study was to clone and to analyze the ND2 gene among Khorasan's native chickens in order to investigate possible mutations. To this end, genomic DNA was extracted from blood sample taken from this population. Then, using ND2 specific primers, PCR was conducted in order to multiply this gene. The PCR product was cloned into pTZ57R/T linear vector and sequenced. Comparison between the sequenced fragments and the registered gene revealed four mutations. A similarity of 99% was observed between them and the complete mitochondrial genome sequence of *Gallus gallus* with the accession numbers of X52392.1 (reference), GU261709.1, GU262712.1, AP006746.1, KF826490.1, HQ857210.1, and AY23557.1. Comparison between proteins showed that the resulting sequence was similar to protein sequences related to mitochondrial ND2 gene of the poultry in the data bank. The maximum similarity (100% similarity) was with the ND2 gene in *Gallus gallus* with the accession number of BAC57576.1. The minimum similarity (88% similarity) was with the ND2 gene in *Chrysolophus amherstiae* with the accession number of AAF65702.1 and *Tetra stessewerzowi* with the accession number of ABH01111.1. Also, the amino acid sequences of Khorasan's native chicken had 99% similarity with reference sequence and other sequences with the accession numbers of YP272073.1, BAD11115.1, NP_006916.1, ADB06584.1, and ADW41566.1. After translating the obtained nucleotide sequence to the amino acid sequence, it was compared with the reference proteins sequence. The result of this comparison showed a difference in one amino acid. The amino acid Leucine 130 was changed to Methionine.

Key Words

Chickens- Mitochondrial Genes- Cloning- MT-ND2

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Genetic diversity of *Barbus grypus* in the Karkheh River in Khuzestan Province and cultured fish studied using a microsatellite marker

Mahbobe Karami nasab[1], Zeinab Hosseinnia*[2], Hamed Kolangi Miandare[3],Ali Shabany[4]

1&2- MSc. Students 3- Assistant Professor 4- Associate Professor
Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

* Corresponding Author, Email: z.hosseinnia@yahoo.com

A B S T R A C T

Shirbot (*barbus grypus*) belongs to the *Cyprinidae* family and is widely present in the west and Southwest's water resources of Iran, especially the Karkhe River in Khuzestan Province. The aim of this study was to compare levels of genetic polymorphism between Karkhe River and cultured *Barbus grypus* populations using seven microsatellite loci. Genetic diversity was investigated by studying 60 samples collected from two regions. According to the results, the F_{st} value was 0.033, which indicates low genetic diversity between the populations. Most of the loci showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Also a relatively high level of gene flow was found among the population. Genetic variations in Karkheh: mean number of alleles per locus, N_a=10.286, mean effective number of alleles, N_e=6.789, observed heterozygosity, H_o=0.691 and expected heterozygosity, H_e=0.840 and cultured fish N_a=13.286, N_e=9.141, H_o=0.800 and H_e=0.883 were not statistically different. Also, analysis of molecular variance showed that there is low genetic variation among populations and most of the observed variation is within the populations.

Key Words

Genetic Diversity, Hardy-Weinberg Equilibrium, Microsatellite, Shirbot (*Barbus grypus*)