

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره یاضی

سر دبیر: دکتر منصور امیدی

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

هیات تحریریه

دکتر علی اکبر 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 معالی امیری (دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر منصور امیدی (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر علی اکبر حبشی (دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)
دکتر مسعود توحیدفر (دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)
دکتر فضل الله افراز (استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)
دکتر بهزاد قره یاضی (استاد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی)
دکتر مقصود پژوهنده (دانشیار، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان)
دکتر سید ضیاءالدین میرحسینی (دانشیار، دانشگاه گیلان)
دکتر پیمان نوروزی (دانشیار موسسه تحقیقات چغندر قند)

صفحه آرای: 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 آن ها به عهده مکاتبه کننده مقاله است.

دو فصل نامه در ویرایش و تخریص مطالب آزاد است. درج مطالب به منزله تأیید کامل محتوای آن ها نیست.

مقالات وارده مسترد نمی شود. نقل مطالب با ذکر ماخذ مجاز است.

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

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

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

پایگاه اینترنتی: www.gebsj.ir

امور چاپ: مرکز نشر دانشگاهی

تیراژ: ۵۰۰



مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصل نامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره ۲، شماره پیاپی ۸، پاییز و زمستان ۱۳۹۴

فهرست مطالب

مقاله های پژوهشی

صفحات

- ۱- دخالت متالوپروتئین MSD1 در مکانیسم مقاومت به شوری بوسیله میانکنش با SOS3
مینا خواجه دهی، مقصود پژوهنده، فاطمه محمودی کردی
۷۹-۸۹
- ۲- بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن GUS به موسیر با استفاده از آگروباکتریوم
ابوالفضل حاجی حیدر، مسعود توحیدفر، سید مهدی میری
۹۱-۱۰۱
- ۳- بهینه سازی القاء ریشه های موئین به کمک آگروباکتریوم در گیاه دارویی شاه اسپرم
اسعد معروفی و محمد مجدی
۱۰۳-۱۱۱
- ۴- تجزیه و تحلیل پروتئوم عصاره پروتئینی باکتری *Xanthomonas citri subsp. citri* با خاصیت
محركی بر روی گیاه آرابیدوپسیس وحید فلاح زاده ممقانی
۱۱۳-۱۲۳
- ۵- جداسازی، همسانه سازی و بررسی بیوانفوماتیکی ژن مقاومت به سویه آسیایی باکتری عامل بیماری
میوه سبز مرکبات در گیاه گریپ فروت مسعود توحید فر و مریم غایب زمهریر
۱۲۵-۱۳۳
- ۶- روش ارزیابی فعالیت مهارکننده های خاموشی ژن در گیاه با استفاده از دو پروتئین از ویروس برگ
بادبزی مو (GFLV) سمیرا پاکباز، مقصود پژوهنده و امید عینی گندمانی
۱۳۵-۱۴۴
- ۷- بررسی وضعیت زیست فناوری در استان آذربایجان شرقی
جعفر رازقی و امین سهندی خلیفه کندی
۱۴۵-۱۵۵
- ۸- بررسی القای ریشه زایی در چند گونه گیاهی دارویی با تاثیر ژنهای *rol* آگروباکتریوم رایزوترن
آوین شجاعی، هانیه محجل شجاع و ناصر مهنا
۱۵۷-۱۶۳

English Abstracts

دخالت متالوپروتئین MSD1 در مکانیسم مقاومت به شوری بوسیله میانکنش با SOS3

The involvement of MSD1 metalloprotein in the mechanism of resistance to salinity by interaction with SOS3

مینا خواجه دهی^۱، مقصود پژوهنده^{۲*}، فاطمه محمودی کردی^۳

Mina Khajehdehi¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*}, Fatemeh Mahmoudi Kurdi¹

۱- دانش آموخته ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳- دانشیار گروه بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid
Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

² Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani
University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۷)

چکیده

در بین تنش‌های مختلف، تنش شوری تهدید بزرگی برای گیاه محسوب می‌شود و مطالعه مکانیسم تحمل شوری در گیاه حائز اهمیت است. در یکی از مسیرهای تحمل شوری در گیاه مدل آراییدوپسیس، پروتئین Salt Overly Sensitive3 (SOS3) که یک حسگر یونهای کلسیم و آغازگر مسیر تحمل شوری است با تشکیل کمپلکس SOS3-SOS2 موجب فعال سازی فرایندهای مختلف به منظور تحمل شوری می‌شود. از سوی دیگر، رادیکال‌های سوپراکسید که در تنش‌های مختلف از جمله تنش شوری تولید می‌شود برای سلول مضر بوده و بایستی از بین بروند. چگونگی حذف این رادیکال‌های سوپراکسید و حفظ سلول از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان مقاوم به شوری مشخص نیست. در این تحقیق، با کارگیری روش Yeast Two Hybrid System (Y2HS) و دوپل ترانزیشن مخمر *Saccharomyces cerevisiae* سویه AH109 با ناقل‌های pGBT9-SOS3 و pGADT10-AtcDNA میانکنش‌های پروتئینی SOS3 در میان کتابخانه cDNA آراییدوپسیس جستجو گردید. از چهار کلنی بدست آمده در روی محیط کشت انتخابی SD-AHWL استخراج DNA انجام و پس از تکثیر ناقل pGADT10-AtcDNA آنها در *E. coli* توالی‌یابی صورت گرفت و در بانک اطلاعات آراییدوپسیس BLAST شد. یکی از مهمترین میانکنش‌های یافت شده مربوط به پروتئین Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1) میانکنش‌های واکنش خنثی سازی رادیکال‌های سوپراکسید برای حفاظت گیاه از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از استرس‌ها را به عهده دارد. میانکنش و بکارگیری MSD1 توسط SOS3 در مسیر مقاومت به شوری موجب نجات گیاه از آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. در ادامه، میانکنش SOS3-MSD1 با جداسازی و همسانه سازی cDNA کامل MSD1 در ناقل‌های دوپل هیبرید مخمر تایید شد. همچنین به کمک تکنیک GST-Pull Down نشان داده شد که پروتئین SOS3 تولید شده در باکتری از روی pGEX2TK-SOS3 و پروتئین نشاندار MSD1 تولید شده از روی pGBKT7-MSD1 بصورت مستقیم باهم میانکنش دارند. این اولین گزارش از برهمکنش مسیر تحمل به شوری (SOS3) با مسیر حذف یونهای مضر سوپراکسید (MSD1) می‌باشد که مکانیسم مولکولی این دو مسیر را بهم مرتبط می‌سازد.

واژه‌های کلیدی

سیستم دوپل هیبرید مخمر

SOS3

شوری

منگنز سوپراکسیددسموتاز

GST-Pull Down

مقدمه

برای این که یک سلول به طور کاملاً هماهنگ رفتار کند، باید کلیه عملکردهای آن به نوعی به هم مرتبط شوند. از این رو، تنوع عملکرد و پیچیدگی در سیستم‌های بیولوژیکی نتیجه میانکنش‌های موجود مابین اجزاء بیولوژیکی است. پروتئین‌ها به عنوان فراوان‌ترین اجزاء سیستم‌های زیستی، اساس بیشتر فرایندهای بیولوژیکی مهم را تشکیل می‌دهند و مطالعه میانکنش بین آنها می‌تواند کمک قابل توجهی در توضیح بخشی از یک مسیر عملکردی ارائه کند. این امر بر این فرض استوار است که عملکرد یک پروتئین، مرتبط با عملکرد شریک میانکنش‌گر آن است (Pawson, 2003). روش‌های مختلفی همانند GST Pull-down، Co-Tandem Affinity Purification (TAP-tag)، Bimolecular Fluorescence Immunoprecipitation (Co-IP) و Fluorescence Lifetime Complementation (BiFC) Imaging Microscopy (FLIM) برای مطالعه میانکنش‌های پروتئینی وجود دارد. یکی از روش‌های کلاسیک جهت مطالعه این میانکنش‌ها، سیستم دوپل هیبرید مخمر یا Yeast two hybrid system (Y2HS) است که بر پایه ویژگی‌های پروتئین GAL4 مخمر که شامل دو بخش اتصال به DNA (DNA Binding Domain: BD) و فعال‌سازی رونویسی (Transcription Activating Domain: AD) می‌باشد، پایه‌ریزی شده است (Chien et al. 1991) (شکل ۱). این سیستم که در اوایل دهه ۹۰ توسط Song و Fildes در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ارائه شد، انقلابی را در آنالیز میانکنش پروتئینی ایجاد کرد و به تدریج به علت سادگی نسبی، تنوع و کارایی بالا، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار شد (Bruckner et al. 2009). لازم به یادآوری است که یافته‌های این روش لازم است به کمک سایر روشها مورد تایید قرار گیرد.

موجودات زنده برای بقا و رشدونمو، باید به طور ثابت، تغییرات محیط خود را درک کنند و به طور صحیح از طریق تنوعی از مکانیسم‌های مولکولی به آن پاسخ دهند (Silva, 2009). تنش‌های مختلف محیطی منجر به تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بسیاری می‌شوند که به طرز نامطلوبی رشد و باردهی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند و مانع بروز پتانسیل

ژنتیکی کامل گیاه می‌شوند (Rodriguez et al. 2005). از جمله تنش‌های مهم می‌توان به تنش شوری اشاره کرد که به واسطه تجمع نمک، رشد گیاه را مهار می‌کند (Zhu, 2007). در یکی از فرایندهای تحمل شوری در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* به نام مسیر Salt Overly Sensitive (SOS)، پروتئین SOS3، یک پروتئین با موتیف EF-hand است که قادر به درک سیگنال Ca^{2+} سیتوزولی ناشی از تنش شوری می‌باشد. SOS3 به محض درک سیگنال Ca^{2+} ، باعث تجمع SOS2 در غشای سیتوپلاسمی و تشکیل کمپلکس SOS3-SOS2 شده و در ادامه موجب فعال سازی فرایندهای مختلف به منظور تحمل شوری می‌شود (Sanchez-Barrena et al. 2004). تاکنون مطالعات زیادی در مورد SOS3 صورت گرفته است، از جمله: بررسی تاثیر بیان همزمان ژن‌های مسیر SOS (*SOS1-3*) در افزایش تحمل گیاه نسبت به شوری (Yanga et al. 2009)، بیان، خالص سازی و کریستالیزاسیون SOS3 (Sanchez-Barrena et al. 2004)، تعیین ساختار SOS3 در حالت اتصال به Ca^{2+} و همچنین حالت اتصال به Ca^{2+} و یون منگنز (Sanchez-Barrena et al. 2005). در ادامه این تحقیقات، در پژوهش حاضر، به منظور درک بهتر مسیر مذکور و با توجه به نبود اطلاعات در زمینه میانکنش‌های مولکولی این پروتئین، با بکارگیری روش Y2HS و دوپل ترانزیشن مخمر *S. cerevisiae* با ناقل حاوی بانک AtcDNA و ناقل حاوی ژن SOS3 میانکنش پروتئین SOS3 با دیگر پروتئینها بررسی شد و یافته‌ها با روش GST Pull-Dwon تایید گردید.

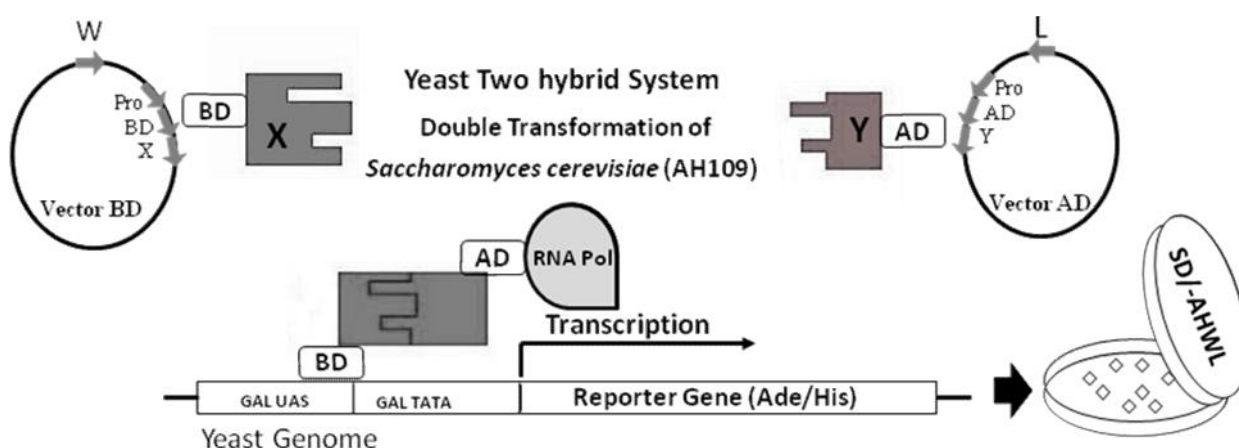


Figure 1. The schematic mechanism of Yeast two hybrid test.

شکل ۱- سازوکار مولکولی تست دوپل هیبرید مخمر. مخمر با دو ناقل بصورت همزمان تراریزش می شود. پروتئین های شیمیر BD-X و AD-Y در مخمر تولید می شود. اگر بین دو پروتئین X و Y میانکشی وجود داشته باشد موجب کنار هم قرار گرفتن AD و BD برای اتصال BD-X به ناحیه اختصاصی روی پروموتور و همچنین فعال سازی آنزیم RNA pol II توسط AD-Y می شود تا رونویسی ژن گزارشگر صورت گیرد و پروتئین های مربوطه تولید شود که در نتیجه موجب رشد مخمر در محیط کشت فاقد A و H خواهد شد. AD: ناحیه فعال سازی آنزیم RNA پلیمراز (Activation Domain), BD: ناحیه اتصال شونده به پروموتور (DNA Binding Domain), X و Y نام فرضی دو ژن، GAL TATA: پروموتور ژن GAL4، UAS: توالی بالادست پروموتور ژن GAL4، L: لوسین که از روی ناقل حاوی AD تولید می شود، W: تریپتوفان که از روی ناقل حاوی BD تولید می شود، A: ژن گزارشگر آدنین، H: ژن گزارشگر هیستیدین.

مقطر استریل و یک بار با بافر (X1) LiAcTE، 10mM Tris pH 7.5، 1mM EDTA، 0.1M LiAc) آنگاه در همین بافر معلق شده و برای تراریزش با ناقلها مورد استفاده قرار گرفتند. ۳۰ میکرولیتر بافر (X1) LiAcTE، ۵ میکرولیتر ssDNA با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۲ میکرولیتر ناقل با غلظت یک میکروگرم بر میکرولیتر، ۲۵۰ میکرولیتر بافر PEG 50% استریل شده با فیلتر و ۵۰ میکرولیتر سلول مخمر در مخلوط هر تراریزش استفاده شد. نیم ساعت در ۳۰ درجه و سپس ۲۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از شستشوی سلولها با آب روی محیط انتخابی پخش شدند. گزینش کلنی های تراژن بر روی محیط استاندارد پایه فاقد تریپتوفان (مارکر انتخابی ناقل pGBT9 (SD-W) یا در صورت دوپل تراریزش کردن بر روی محیط SD-WL (L: لوسین، مارکر انتخابی ناقل pGADT10) انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

تراریزش مخمر: به این منظور پس از تکثیر مخمر *Saccharomyces cerevisiae* سویه AH109 در محیط غنی Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)، تراریزش اول مخمر با ناقل pGBT9 حاوی ژن SOS3 متصل به ناحیه GAL4-BD با روش شوک حرارتی شرکت Clontech انجام شد (Pazhouhandeh et al. 2006). برای این کار پس از تهیه سلولهای شایسته مخمر با کشت مایع در YPD و حصول OD₆₀₀=0.5 سانتریفیوژ ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انجام و سلولهای مخمر در میکروتیوب دو میلی لیتر استریل، دو بار با آب

تست اتواکتیواسیون: این تست به منظور اطمینان از عدم توانایی پروتئین SOS3 در فعالسازی رونویسی بدون حضور شریک میانکنشگر آن و پس از انجام تراریزش اول مخمر، تنها بازکشت کلنی های تراژن بر روی محیط انتخابی SD-HW و SD-AHW (AH: ژنهای گزارشگر هیستیدین و آدنین در مخمر) صورت گرفت. سه کلنی مستقل به عنوان تکرار بازکشت شد.

استخراج DNA مخمر: یک کلنی مخمر تراریخته (حاصل از غربالگری) در ۱۰ میلی لیتر محیط SD-WL مایع تلقیح و کشت داده شد و به مدت سه روز روی شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس برای استخراج DNA از مخمر ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه انجام و محیط کشت دور ریخته شد. سلولها در ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج DNA (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM NaCl, 1% SDS و ۰.۲٪ Triton×100) معلق شده و به تیوب های ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافتند. ۲۵۰ میکرولیتر ذرات بسیار ریز شیشه و ۲۵۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه و به مدت ۳ دقیقه ورتکس کامل انجام شد. سپس ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام و محلول رویی به تیوب های جدید انتقال یافت. رسوب دهی DNA با استفاده از ۳ حجم اتانل ۱۰۰٪ و ۰/۱ حجم استات آمونیوم ۴ مولار صورت گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و شستشوی رسوب حاصل با اتانل ۷۰٪ و خشک کردن رسوب، DNA در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد (Pazhouhandeh et al. 2006).

تراریزش باکتری: DNA استخراجی از کلنی های مخمر دوبل تراریزش شده با استفاده از روش الکتروپوراسیون با ۲/۵ کیلوولت به مدت ۵ میلی ثانیه در دستگاه مولتی پوراتور (Eppendorf) به باکتری *E. coli* سویه Top10، جهت تکثیر ناقل pGADT10 انتقال داده شد و روی محیط جامد Luria-Bertani (LB) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین (مارکر انتخابی ناقل pGADT10) گزینش شد.

بررسی و تعیین هویت ناقلهای بدست آمده pGADT10-AtcDNA: PCR برای بررسی پلاسمیدهای استخراجی از کلنی-

های باکتریایی تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pGADT10 (آغازگر رو به جلو F: TACCACTACAATGGATG و آغازگر برگشتی R: GTTGAAGTGAACCTGCGGGGT) صورت گرفت. این دو آغازگر به روی ناقل به دو طرف محل ورود اینزیم متصل می-شوند و در ناقل خالی باندی به طول حدود ۲۵۰ جفت باز تولید می کنند. تنوع قطعات cDNA بدست آمده از کلونها روی ژل آغاز الکتروفورز بررسی و تعدادی از آنها به مرکز توالی یابی انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی (IBMP) شهر استراسبورگ فرانسه ارسال شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار APE و پایگاه اطلاعاتی TAIR (<http://www.arabidopsis.org/blast>) مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی و همسانه سازی cDNA کامل ژن MSD1 از آراییدوپسیس: برای بررسی بیشتر و تایید برهمکنش بین SOS3 با MSD1 از روی RNA گیاه آراییدوپسیس، cDNA سنتز و به کمک آغازگرهای اختصاصی F: ACCCGGGAATGGCGATTCGTTGTGTAGC حاوی سایت برشی SmaI و R: AAGAATTCTCAGTTGTTTCCTTCTCATAAAC حاوی سایت برشی EcoRI واکنش PCR برای همسانه سازی در ناقل pGEX-2TK و به کمک آغازگرهای اختصاصی F: AAGAATTCATGGCGATTCGTTGTGTAGC حاوی سایت برشی EcoRI و R: AACCCGGGTCAGTTGTTTCCTTCTCATAAAC حاوی سایت برشی SmaI واکنش PCR برای همسانه سازی در ناقل pGBKT7 انجام شد و با استفاده از آنزیم های برشی مربوطه همسانه سازی ها صورت گرفت و صحت توالی ناحیه کد کننده ژن MSD1 (At3G10920) به طول ۶۹۶ جفت باز در ناقلهای نوترکیب حاصل با توالی یابی تایید گردید.

بررسی تعامل پروتئین های SOS3-MSD1 با GST-Pull Down: برای تایید میانکنش های یافت شده از تکنیک Y2HS، از روش Pull-Down استفاده شد. ناقل نوترکیب pGEX2TK-MSD1 که از آن پروتئین MSD1 بصورت فیوژن با پروتئین S-Glutathione Transferases تولید می شود به باکتری *E. coli* سویه Roseta

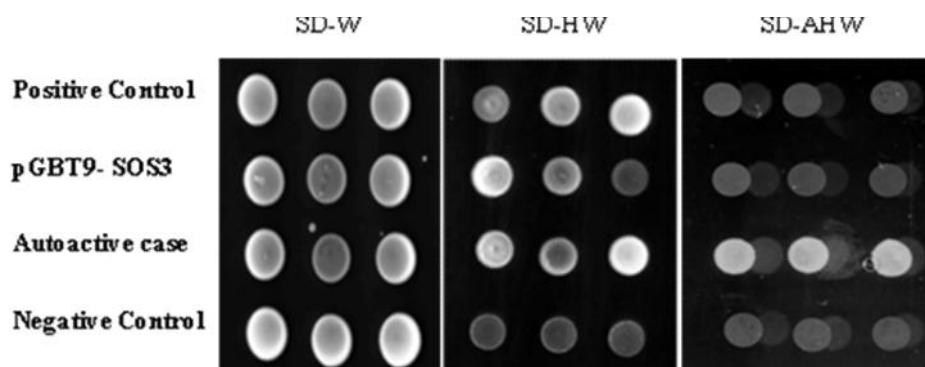
آمینو لوسین، تریپتوفان و هیستیدین و همچنین آدنین است وجود دارد.

نتایج

غربالگری شریک مولکولی پروتئین SOS3 در بانک cDNA
آرابیدوپسیس: یک کلنی مخمر حاوی pGBT9-SOS3 با ناقل pGADT10 حاوی قطعات مختلف بانک cDNA گیاه مدل آرابیدوپسیس تراریزش شد و کلنی‌ها بر روی محیط SD-AHWL گزینش شدند. تنها کلنی‌های مخمری می‌توانند در این محیط کشت رشد کنند که هم حاوی دو پلاسمید باشند و هم بین پروتئین‌های بیان شونده از این پلاسمیدها تعامل برقرار شود. تعامل باعث بیان ژنهای گزارشگر و تولید هیستیدین و آدنین در مخمر شده و بنابراین کلنی توانست در عدم حضور این دو ماده در محیط کشت رشد نماید. چهار کلنی در روی این محیط کشت بدست آمد و DNA این کلنی‌ها استخراج شده و در باکتری *E. coli*، ناقلهای pGADT10 تکثیر و جداسازی شدند. برای بررسی ژنهای موجود در این ناقلها واکنش PCR به کمک دو آغازگر که به دو طرف محل ورود ژن در ناقل pGADT10 می‌چسبند انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز مشاهده شد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که چهار ژن متفاوت در این چهار کلون غربال شده اند (شکل ۳). هر چهار ناقل pGADT10 حاصل از غربالگری پس از تیمار RNase جهت تعیین هویت در دو جهت با آغازگرهای اختصاصی ناقل توالی‌یابی شدند. توالی‌های حاصل پس از بررسی و اطمینان از فاز ترجمه‌ای صحیح آنها، در سایت <http://www.arabidopsis.org/blast> بلاست شده و توالی یکی از کلونها (شماره ۴ شکل ۳) با توالی مربوط به ژن *MSD1* (Manganese SuperOxide Dismutase 1: At3g10920) مطابقت کرد (شکل ۴). این ژن به نامهای *MnSOD1* و *SOD1* نیز نامیده می‌شود و ناحیه کد شونده آن دارای ۹۶۹ جفت باز بوده و شش اگزون و پنج انترون دارد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود کلون بدست آمده از غربالگری ناقص بوده و ۱۲۹ نوکلوتید از ابتدای ژن را ندارد ولی از نوکلوتید ۱۳۰ تا انتها (نوکلوتید ۶۹۶) بجز در نوکلوتید ۶۵۹ کاملاً منطبق به توالی ثبت

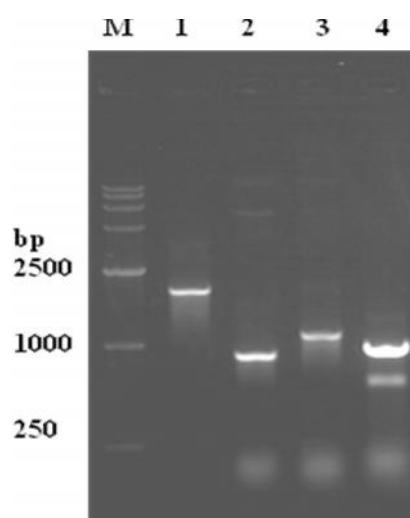
منتقل و باکتری پس از ۸ ساعت کشت مایع در LB به مدت ۱۰ ساعت با IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القاء شد و پروتئین آن با سونیفیکاسیون و سانتریفیوژ در بافر حاوی 50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.2% Triton X100 (طبق پروتکل ذکر شده در Pazhouhandeh et al., 2006) استخراج و بر روی ذرات سفارز تثبیت گردید. پروتئین SOS3 نیز از روی ناقل pGBKT7-SOS3 که تحت کنترل پروموتور T7 می‌باشد با کیت رونویسی و ترجمه همزمان (Promega, USA) و با کاربرد متیونین رادیواکتیو ³⁵S مطابق پروتکل کیت تولید شد. پروتئین SOS3 به تیوبهای حاوی سفارز که GST خالی یا GST-MSD1 روی آنها به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد تثبیت شده بود اضافه گردید و یک شب دیگر در همان شرایط روی چرخ غلطان گذاشته شد. روز بعد شستشو سه بار با بافر PBS حاوی 100mM NaCl انجام و سفارزها پس از گرم شدن در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به چاهک‌های ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲٪ ریخته شد. ژل پس از رنگ آمیزی با کماسی بلو اسکن و تصویر برداری شد و به منظور اتورادیوگرافی به روی آن فیلم خام گذاشته شد و پس از ده روز فیلم ظاهر گردید.

آزمایش اتواکتیواسیون پروتئین SOS3: چون هدف از این تحقیق پیدا کردن یک شریک مولکولی برای SOS3 در تست دابل هیبرید مخمر بود بنابراین ابتدا بایستی مطمئن شویم که خود SOS3 خاصیت فعال کردن رونویسی ژن گزارشگر را ندارد. برای اینکار پس از تهیه کلون‌های مخمر حاوی ناقل pGBT9-SOS3 و کشت آنها روی محیط انتخابی SD-AHW (شکل ۲)، اطمینان از عدم اتواکتیو بودن پروتئین SOS3 بدست آمد (W نشانگر تریپتوفان مارکر انتخابی pGBT9، H نشانگر هیستیدین و A نشانگر آدنین). این شکل نشان می‌دهد که سه کلنی مخمر حاوی pGBT9-SOS3 در محیط کشت کنترل SD-W رشد کرده ولی حتی پس از دو هفته در محیط کشت انتخابی SD-AHW قادر به رشد نبودند و برای رشد در این محیط کشت نیازمند یک شریک مولکولی هستند. بنابراین امکان غربالگری میانکنش این پروتئین در بانک cDNA آرابیدوپسیس بر روی محیط SD-AHWL (L نشانگر ژن لوسین، مارکر انتخابی pGADT10) که فاقد سه اسید



شکل ۲- تست اتواکتیواسیون. عدم رشد سلول های مخمری تراریخته با ناقل حاوی BD-SOS3 بر روی محیط SD-AHW نشانگر عدم توانایی پروتئین SOS3 در فعال سازی رونویسی ژنهای گزارشگر بدون حضور ناحیه فعال سازی پلیمراز است. کلنی های مخمر پس از دو روز از بین رفته و خشک شدند در حالیکه کلنی های کنترل (ردیف سوم) که خاصیت اتواکتیواسیون دارد توانستند در این محیط رشد نمایند. محیط SD-W پس از سه روز، محیط SD-HW پس از پنج روز و محیط SD-AHW پس از دوهفته تصویر برداری شده است. سه قطره قابل مشاهده هر کدام نتیجه کشت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یک کلنی مستقل تلقیح شده از محیط جامد پتری به داخل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر می باشد. سه قطره یعنی سه کلنی مستقل به عنوان تکرار.

Figure 2. The Autoactivation test.

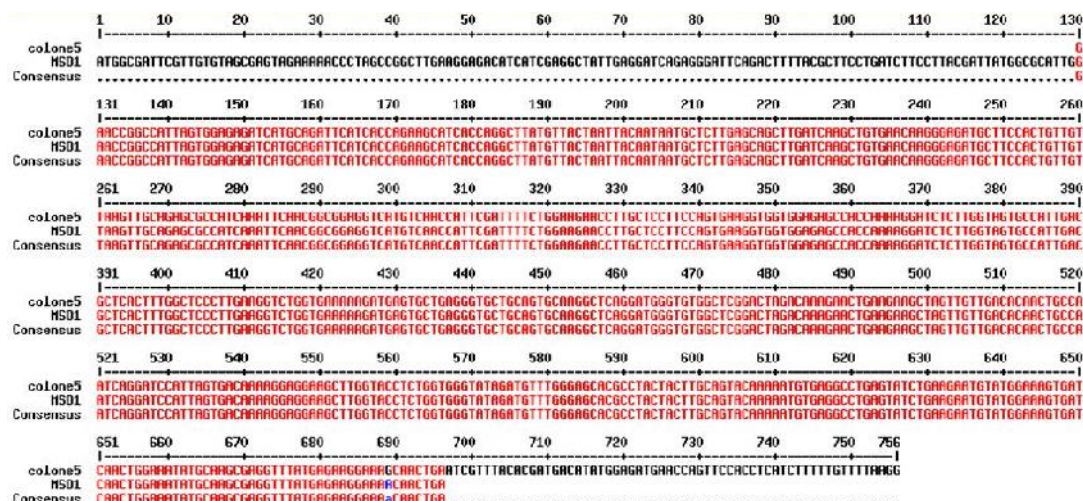


شکل ۳- بررسی حضور و اندازه ژنها در ناقلهای pGADT10 حاصل از غربالگری. الکتروفورز نتیجه PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل روی ژل آگارز ۱٪. لاین های ۱ تا ۴ مربوط به نتایج PCR روی ناقلهای استخراجی از چهار کلنی مخمر حاصل از تست میانکنش AtcDNA-SOS3 می باشد.

Figure 3. The Size of obtained genes in pGADT10.

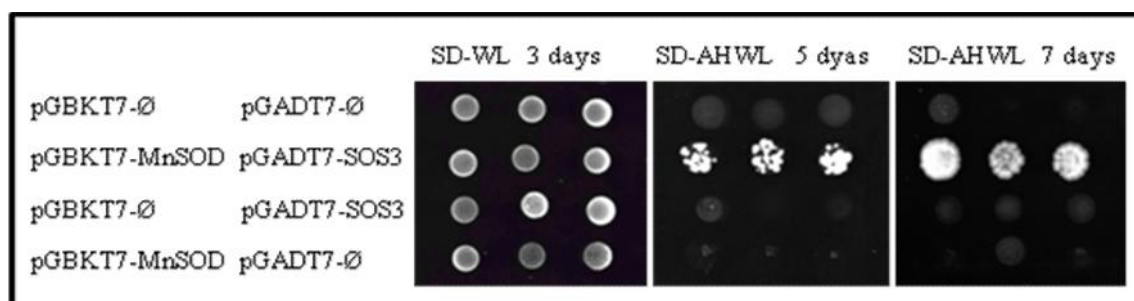
شده این ژن در NCBI می باشد. نوکلوتید ۶۵۹ در کلون توالی یابی شده G و در NCBI نوکلوتید A می باشد.

تایید میانکنش میان SOS3 با MSD1 بوسیله Y2HS: برای تایید نتیجه بدست آمده، cDNA کامل ژن MSD1 (۶۹۶ باز) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن از روی cDNA سنتز شده از RNA کلی گیاه آرابیدوپسیس تکثیر و این بار در ناقل pGBKT7 همسانه سازی گردید. توالی یابی نشان داد که توالی ثبت شده بدون هیچ گونه جهش همسانه سازی شده است. از طرف دیگر، SOS3 نیز از روی ناقل موجود با روش PCR تکثیر و در ناقل pGADT7 همسانه سازی و توالی یابی شد. پس از اطمینان از درستی توالی ها، میانکنش پروتئین های کامل MSD1 با پروتئین SOS3 از ناقل pGADT7 بررسی شد. عوض نمودن جهت ناقلها یعنی این بار ناحیه چسبنده (DNA Binding Domain) به همراه MSD1 و ناحیه فعال کننده (Activating Domain) به همراه SOS3، برای اطمینان از وجود میانکنش قوی بین آنها انجام گرفت. نتایج نشان داد که در این جهت نیز میانکنش بین پروتئین های کامل وجود دارد (شکل ۵).



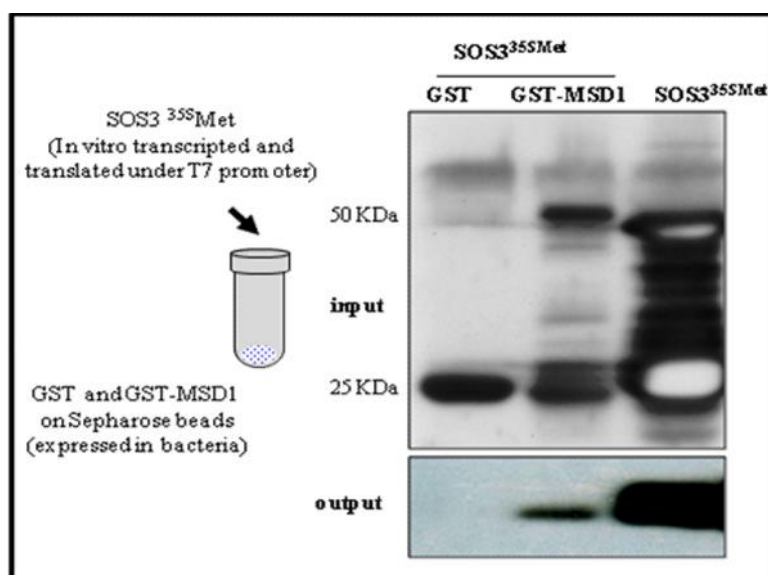
شکل ۴- زیرهمچینی نتیجه توالی یابی و CDS ژن منگنز سوپراکسیددسموتاز (At3g10920). ردیف بالا: توالی حاصل از توالی یابی ناقل
pGADT10-cDNA مربوط به کلون مورد آزمایش. ردیف دوم: CDS منگنز سوپراکسیددسموتاز. ردیف سوم نمایشگر توالی های یکسان (قرمز) یا
متفاوت (آبی) در دو توالی مورد بررسی است.

Figure 4. The Alignment of the CDS of MSD1 sequence (At3g10920) with obtained sequence.



شکل ۵- تایید برهمکنش بین SOS3 با MSD1 با تست دوبل هیبرید مخمر: سه کلنی مخمر تراریخته حاوی ناقلهای مذکور که پس از گزینش در دو
محیط کشت SD-WL به عنوان کنترل و SD-AHWL به عنوان انتخابگر تعامل بین دو پروتئین کشت شده‌اند و پس از ۳، ۵ و ۷ روز اسکن محیط
کشت صورت گرفته است. تنها کلنی‌های حاوی ناقل‌های دارای ژن SOS3 و MSD1 توانستند در محیط انتخابی رشد نمایند. سه قطره قابل مشاهده هر
کدام نتیجه کشت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یک کلنی مستقل تلقیح شده از محیط جامد پتری به داخل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر می باشد. سه قطره
یعنی سه کلنی مستقل به عنوان تکرار.

Figure 5. The confirmation of MSD1-SOS3 interaction by Y2HT.



شکل ۶- تایید میانکنش بین SOS3 با MSD1 با تکنیک GST-Pull Down: سمت چپ نشان دهنده شمای آزمایش است که پروتئین MSD1 ترکیب شده با GST از روی ناقل pGEX2TK-MSD1 در باکتری تولید و روی ذرات سفارز تثبیت شد. پروتئین SOS3 بصورت رادیواکتیو با متیونین S^{35} از روی ناقل pGBKT7 تولید و بر روی سفارز اضافه گردید. input نشان می‌دهد که GST خالی (به عنوان کنترل منفی) به اندازه تقریبی 25 KDa و GST-MSD1 با 50 KDa تولید شده اند اما SOS3 فقط توانسته روی MSD1 چسبیده و باقی بماند (output). پایین تصویر اسکن فیلم اتورادیوگرافی پس از گذاشته شدن روی ژل می‌باشد. SOS3 سمت راست ژل، ۵ میکرولیتر از محصول ترجمه است که مستقیماً در ژل به عنوان کنترل مثبت ریخته شده است.

Figure 6. The confirmation of MSD1-SOS3 interaction by GST-Pull Down.

با GST دارد. از طرف دیگر پروتئین SOS3 از روی ناقل pGBKT7 که تحت پروموتور T7 می‌باشد به کمک کیت رونویسی و ترجمه (Promega) به صورت رادیواکتیو با متیونین- S^{35} های تولید شد و بر روی ذرات سفارز حاوی GST-MSD1 اضافه گردید و پس از یک شب، شستشو انجام و نتیجه روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۶). GST تنها به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی ژل، مشاهده شد که GST تنها (25 KDa) و GST-MSD1 (25+25=50 KDa) به خوبی بیان شده اند (Input). نگهداری فیلم خام روی ژل و ظهور آن (output) نشان داد که پروتئین SOS3 رادیواکتیو فقط روی GST-MSD1 باقی مانده است و با GST تنها میل ترکیبی ندارد. بنابراین به کمک این تکنیک نتیجه حاصل از دوبل هیبرید مخمر تایید نهایی شد و نشان داده شد که تعامل این دو پروتئین مستقیم و بی‌واسطه است.

بنابراین، پروتئین MSD1 بصورت قوی با پروتئین SOS3 در هر دو جهت ناقل یعنی BD-SOS3...MSD1-AD و BD-MSD1...SOS3-AD در تست دوبل هیبرید مخمر میانکنش دارد.

تایید نهایی میانکنش میان SOS3 با MSD1 بوسیله GST-Pull Down

برای تایید نهایی تعامل SOS3 با MSD1، cDNA کامل ژن MSD1 (۶۹۶ باز) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این بار در ناقل pGEX2TK همسانه سازی و توالی یابی گردید. بیان MSD1 از این ناقل تحت پروموتور قابل القاء با IPTG و بصورت پروتئین ترکیبی در N-terminus با Glutathione S-Transferase (GST) می‌باشد. پروتئین GST-MSD1 در باکتری تولید، استخراج و بر روی میکروذرات سفارز تثبیت شد. سفارز میل ترکیبی اختصاصی

بحث

با اینکه اکسیژن جزء ضروری حیات برای موجودات هوازی است، اما گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species: ROS) که شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^\bullet$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است و در همه سلول‌های هوازی در طول فرایندهای متابولیکی ایجاد می‌شود، یکی از فاکتورهای مضر برای گیاهان در معرض استرس محیطی است. این پدیده که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود در نتیجه استرس‌های محیطی مختلف به ویژه شوری رخ می‌دهد و می‌تواند متابولیسم معمول سلول را از طریق آسیب اکسیداتیو به لپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک‌ها تغییر دهد (Joseph et al. 2011). سوپراکسید دسموتازها با دسموتاسیون و حذف رادیکال‌های سوپراکسید ایجاد شده در طی استرس اکسیداتیو و تبدیل آنها به اکسیژن و پراکسید هیدروژن، نقش مهمی را در حفاظت گیاهان علیه این استرس بازی می‌کند (Bowler et al. 1989). متالوپروتئین Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1) یک سوپراکسید دسموتاز است که اولین بار به عنوان یک آنزیم الکتریکی در آرآیدوپسیس شناسایی شد (Kliebenstein et al. 1998). این پروتئین به صورت هوموترامر در میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی و پراکسی‌زوم‌ها یافت می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). هومولوگ این ژن نیز از کبد انسان شناسایی شد و تشابه توالی زیادی در انسان، گیاه، مخمر و باکتری دارد. این آنزیم مهم آنتی اکسیدان در سیتوپلاسم به عنوان یک پروتئین اولیه سنتز می‌شود و بعداً در اثر حذف توالی رهبر انتهای NH_2 به ماتریکس میتوکندری منتقل می‌گردد (Bowler et al. 1989). سوپراکسید دسموتازها (Superoxide dismutases: SOD) در خط مقدم دفاع علیه استرس اکسیداتیو واقع‌اند و جزء سیستم دفاعی آنتی اکسیدان آنزیمی گیاهان محسوب می‌شوند که در همه موجودات هوازی و در همه اندامک‌های مستعد استرس اکسیداتیو از جمله کلروپلاست‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها حضور دارند (Gill and Tuteja, 2010).

استرس شوری در گیاهان به علت تولید ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت SOD تحت استرس شوری در گیاهان مختلف *Cicer arietinum*, *Viz mulberry* و *Anabaena doiolum* تحت استرس‌های شوری و مس گزارش شده است (Joseph et al. 2011). چندین تحقیق دیگر ارتباط بین استرس شوری و اکسیداتیو را به اثبات رسانده‌اند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: افزایش تحمل شوری در نتیجه افزایش بیان ژن MSD1 در گیاهان تراریخته آرآیدوپسیس (Martin et al. 2013)، افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و محتوای آنتی اکسیدان گیاهان مقاوم به شوری در پاسخ به تیمار شوری، اثبات رابطه بین تحمل شوری و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان مختلف، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در ریشه و جوانه تحت استرس شوری و افزایش فعالیت SOD و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در ارقام برنج مقاوم به شوری نسبت به وارته‌های حساس (Joseph et al. 2011). در گیاهان گوجه فرنگی نشان داده شده است که بیان ژن *MnSOD* در شرایط خشکی، ایجاد زخم در گیاه و دریافت اتانول افزایش یافته است (Perl-Treves and Galun, 1991). در گیاه آرآیدوپسیس نیز نشان داده شده است که با بیان بیشینه MSD1 (دو برابر بیان نسبت به گیاه غیر تراژن) تحمل گیاه به شوری افزایش یافت و گیاهان تراژن توانستند ۱۵۰ میلی مولار نمک را بخوبی تحمل کنند درحالی‌که گیاهان غیر تراژن زرد شده و از بین رفتند (Wang et al. 2004). در گیاه یونجه هم بیان *MnSOD* باعث افزایش پایداری گیاه و میزان بیوماس آن شده است (Samis et al. 2002). در گیاهان آرآیدوپسیس که بیان ژن MSD1 توسط وارد کردن یک آنتی‌سنس به گیاه خاموش شده بود میزان رشد ریشه کاهش یافته و همچنین با تاخیر مواجه بود (Morgan et al. 2008). در این تحقیق به تبع غربالگری با روش دابل هیبرید مخمر در بانک cDNA آرآیدوپسیس شریک مولکولی SOS3 بنام MSD1 شناسایی شد و سپس cDNA کامل آن از آرآیدوپسیس همسانه سازی و میانکنش آن با SOS3 دوباره در تست دابل هیبرید مخمر تایید شد. آنگاه به کمک روش بیوشیمیایی GST-Pull Down این میانکنش مستقیم تایید نهایی گردید. به این ترتیب

استرسهای اکسیداتیو با منشا مختلف خواهد شد. از سوی دیگر چنین گیاهی خاصیت دارویی ضد سرطانی نیز خواهد داشت چراکه همچون تمامی آنتی اکسیدانها، مطالعات قبلی نشانگر این است که بیان بیشینه MSD1 در موش باعث درمان سلولهای سرطانی شده است (Oberley, 2001).

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت مالی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و همکاری موسسه انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی استراسبورگ فرانسه در تامین برخی مواد، توالی یابی و فراهم سازی امکانات آزمایش GST-Pull Down.

منابع

Bowler C, Alliotte T, Van den bulcke M, Bauw G, Vandekerckhove J, Vanmontagu M, Inze D. 1989.

A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3237-3241.

Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. 2009. Yeast Two-Hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2763-2788.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R. Fields S. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 9578-9582.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Joseph B, Jini D. 2011. Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian Journal of Agricultural Research*. 1: 17-27.

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. 1998. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118:637-50.

Martin MV, Distefano AM, Zabaleta EJ, Pagnussat GC. 2013. New insights into the functional roles of reactive oxygen species during embryo sac

نتایج چندین مطالعه حاکی از ارتباط نزدیک MSD1 با مکانیسم شوری بود و شناسایی میانکنش بین پروتئین SOS3 (پروتئین درگیر در تحمل شوری) و MSD1 (پروتئین درگیر در تحمل استرس اکسیداتیو) در این تحقیق رابطه مولکولی را بین این دو استرس آشکار ساخت. شناسایی رابطه مولکولی SOS3 با MSD1 نشان می‌دهد که در سلول این دو پروتئین باهم در یک کمپلکس بکار می‌روند تا گیاه در معرض شوری، ضمن مقاومت یا تحمل به شوری محیط باعث حذف یونهای پراکسید مضر شود که در اثر شوری در گیاه ایجاد شده است. این ارتباط ممکن است ما را در تولید گیاهان متحمل به تنش شوری و اکسیداتیو کمک و یاری کند. به عنوان مثال تلاش برای ایجاد گیاهی با بیان بیشینه SOS3 و MSD1 حائز اهمیت است زیرا بیان بیشینه SOS3 باعث مقاومت به شوری و بیان بیشینه MSD1 باعث مقاومت به

development and fertilization in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav.* 8(10): e25714.

Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Finkemeier I. 2008. Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol.* 147:101-14.

Oberley LW. 2001. Anticancer therapy by over-expression of superoxide dismutase. *Antioxidants and Redox Signaling* 3:461-72.

Pawson T. 2003. Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 361: 1251-1262.

Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B. 2006. F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1994-1999.

Perl-Treves R, Galun E. 1991. The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol Biol.* 17:745-60.

Rodriguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnologia Aplicada* 22: 1-10.

Samis K, Bowley S, McKersie B. 2002. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve

- persistence and biomass production in alfalfa. J Exp Bot. 53:1343-50.
- Sanchez-Barrena MJ, Martinez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A. 2005.** The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for Salt Stress response. Journal of Molecular Biology 345: 1253-1264.
- Sanchez-Barrena MJ, Martinez-Ripoll M, Zhu JK, Alberta A. 2004.** SOS3 (salt overly sensitive 3) from *Arabidopsis thaliana*: expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. Acta Crystallographica 60: 1272-1274.
- Silva P, Hernani G. 2009.** Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyro-phosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. Plant Signaling and Behavior 4: 718-726.
- Wang Y, Ying Y, Chen J, Wang X. 2004.** Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. Plant Sci. 167:671-7.
- Yanga Q, Chena ZZ, Zhoua XF, Yina HB, Lia X, Xina XF, Honga XH, Zhuc JK, Gong Zh. 2009.** Overexpression of SOS (*Salt Overly Sensitive*) genes increases salt tolerance in transgenic *arabidopsis*. Molecular Plant 2: 22-31.
- Zhu JK. 2007.** Plant salt stress. In: Encyclopedia of Life Sciences, ed. A. O'Daly,. Chichester, UK, John Wiley and Sons Ltd. pp. 1-3.

The involvement of MSD1 metalloprotein in the mechanism of resistance to salinity by interaction with SOS3

Mina Khajehdehi¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*}, Fatemeh Mahmoudi Kurdi¹

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

2. Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Among the various stresses, salinity is a great threat to plants and the study of the mechanism of salt tolerance in plants is important. In one of the salt tolerance pathways in the model plant *Arabidopsis*, Salt Overly Sensitive 3 (SOS3) protein, which is a sensor of calcium ions and the initiator of a salt tolerance pathway, activates various processes in order to tolerate salinity by the formation of an SOS3-SOS2 complex. On the other hand, superoxide radicals that are produced in response to various stresses such as salinity are harmful to the cell and must be eliminated. How to remove superoxide radicals and protect cells from oxidative damage in salt-tolerant plants is not clear. In this study, the SOS3 protein interactions in *Arabidopsis* cDNA library were investigated using the Yeast Two Hybrid System (Y2HS), and double transformation of *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain with pGBT9-SOS3 and pGADT10-AtcDNA. DNA extraction was performed on four selected yeast colonies on SD-AHWL and pGADT10-AtcDNA vectors were amplified in *E. coli*, sequenced and compared to the *Arabidopsis* data bank. One of the most important interactions was found on Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1). MSD1 neutralizes superoxide radicals to protect plants from oxidative damage caused by stresses. The interaction and the recruitment of MSD1 by SOS3 in the salinity resistance pathway should save the plant from oxidative trauma. Afterward, the interaction of SOS3-MSD1 was confirmed by isolation of complete MSD1 cDNA and cloning in yeast two hybrid vectors. In parallel, using a GST-Pull Down assay, it was shown that the SOS3 protein produced in bacterium from pGEX2TK-SOS3 vector directly interacted with the radio-labeled MSD1 produced from pGBKT7-MSD1. This is the first report of the interaction of salinity tolerance pathway (SOS3) with the elimination pathway of harmful superoxide ions (MSD1) that shows interaction between these molecular mechanisms.

Key Words

Yeast two hybrid system, SOS3, salinity, Manganese superoxide dismutase, GST-Pull Down

بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن GUS به موسیر با استفاده از آگروباکتریوم

Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*

ابوالفضل حاجی حیدر^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، سید مهدی میری^۱
Abolfazl Hajiheidar¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Seied Mehdi Miri¹

- ۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران.
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی،
تهران، ایران.

1.M.Sc, Assistant Professor, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad
University, Karaj, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering,
Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۹)

چکیده

موسیر (*Allium stipitatum*) یک سبزی خوراکی بوده و از خصوصیات دارویی بسیار مهمی برخوردار است. بنابراین بهینه سازی یک سیستم باززایی و تراریزش کارآمد در این گیاه جهت بهبود و اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک ضروری است. در این مطالعه، ریزنمونه های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه ای موسیر در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلفی از تنظیم کننده های رشد NAA، 2,4-D و BA به منظور القاء کالوس و باززایی کشت شدند. ریزنمونه ها با سوبه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* دارای ناقل pBI121 حاوی ژن گزارشگر *gus* تراریزش شدند. نتایج نشان داد که ریزنمونه طبق پیاز نسبت به جنین و ریشه کالوس زایی و باززایی بالاتری داشت و بیشترین باززایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه طبق پیاز و در محیط کشت MS حاوی پنج میلی گرم در لیتر BA به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA، صورت گرفت. به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد و وجود این ژن را در هر دو ریزنمونه جنین و طبق پیاز، که به آزمون هیستوشیمیایی *gus* پاسخ مثبت داده بودند، اثبات کرد. همچنین عدم آلودگی ناشی از آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز تأیید شد. در این تحقیق کارایی تراریزش در ریزنمونه جنین ۱۰ درصد و در ریزنمونه طبق پیاز ۶/۶ درصد محاسبه شد.

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
ژن *gus*
کشت بافت
موسیر

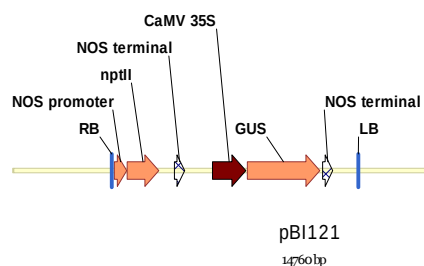
مقدمه

موسیر با نام انگلیسی shallot و نام علمی *Allium stipitatum* از تیره نرگس‌ها (Amaryllidaceae) است. برگ‌هایش باریک و دراز و به رنگ سبز تیره، گل‌ها کوچک و به رنگ صورتی یا مایل به سبز به صورت یک چتر در انتهای ساقه استوانه‌ای گل دهنده ظاهر می‌شود و دانه‌های آن سیاه است. از نظر ترکیبات شیمیایی دارای حدود ۰/۰۶-۱ درصد اسانس است که شامل آلپسین-آلیساتین یک و دو، آلپل پروپیل-دی سولفیدو دو ترکیب گوگردی است. از موسیر در صنایع غذایی (ماست موسیر، ترشی) و صنایع دارویی استفاده می‌شود و از این رو اهمیت اقتصادی قابل ملاحظه‌ای دارد (Kheikhah and Dadkhah, 2013). از اسانس موسیر در صنایع بهداشتی (شامپو) نیز استفاده می‌شود، به طوری که رضایی خوزانی و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند عصاره تام موسیر دارای اثرهای ضد باکتریایی بوده و می‌توان در آینده آن را جایگزین داروهای ضد باکتریایی شیمیایی کرد. موسیر ایرانی ضد دیابت بوده و اثرش را از طریق افزایش ترشح انسولین و کاهش خروج گلوکز کبدی با سرکوب فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز اعمال می‌کند (Arsalandeh et al., 2012). در ایران یکی از استان‌های مهم تولید کننده این محصول استان کرمانشاه با سطح زیر کشت حدود ۱۲ هکتار و عملکرد حدود ۱-۱/۵ تن در هکتار است (www.3s.irna.ir/faNews/80772912).

ارزش دارویی، تقاضای بازار و سطح فرآوری از مهمترین شاخص‌های سنجش اقتصادی یک گیاه است. طبق گزارش سازمان خواربار جهانی، ارزش تجارت گیاهان دارویی که در حال حاضر حدود صد میلیارد دلار در سال است، در سال ۲۰۵۰ میلادی به رقم پنج تریلیون دلار خواهد رسید. کشور ایران با داشتن شرایط اقلیمی و تنوع گیاهی به مراتب بهتر از اروپا، در حال حاضر تنها ۶۰ تا ۹۰ میلیون دلار از تجارت جهانی گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است. از مهمترین گیاهان دارویی صادراتی ایران در سال‌های گذشته موسیر، زیره سبز، آویشن و ... بوده که به طور کلی به کشورهای اروپای غربی و اروپای شرقی و آمریکا، هندوستان و کشورهای حوزه خلیج فارس صادر می‌شود (Kashfi Bonab, 2010).

یکی از جنبه‌های مهم فرآیندهای بیوتکنولوژی گیاهی، کشت بافت‌ها و اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای است که کاربردهای مختلف آن در زمینه گیاهان دارویی، از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی است. بهینه سازی کشت بافت موسیر که سریع‌ترین راه برای تکثیر این گیاه دارویی در حال انقراض است، می‌تواند راهگشایی برای تجاری سازی این گیاه با ارزش اقتصادی باشد. همچنین در موسیر از ریزنمونه طبق پیاز به منظور ریزازدیادی و تولید کالوس استفاده شده است (Ghahremani Majd et al., 2009). یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی گیاهی، مهندسی ژنتیک یا تکنولوژی DNA نوترکیب است که هدف از آن ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب گیاهان برتر از نظر ژن‌های کنترل کننده صفات مطلوب و همچنین حفظ تنوع واریته‌های گیاهی است (Farsi and Zolala, 2000). Zheng و همکاران در سال (۲۰۰۱) برای توسعه انتقال ژن به پیاز و موسیر دستورالعمل معتبری را تنظیم کردند و با ریزنمونه جنین‌های بالغ جنسی، ۱/۹۵ درصد فراوانی تراریزش به دست آوردند. همچنین کارایی تراریزش در سیر و تره فرنگی ۰/۰۶ درصد گزارش شده است (Eady et al. 2005).

با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*، می‌توان فرآیند انتقال ژن به موسیر را جهت فراهم آوردن زمینه‌های بعدی انتقال ژن به این گیاه بهینه کرد تا با افزایش میزان اسانس از آن در آینده راهگشایی جهت تولید داروهای گیاهی است. استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک و انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم نیازمند تهیه دستور کار روش موثر باززایی از بافت تراریخته است و تولید موفق موسیر تراریخته و هر گیاه دیگر به نوع ریزنمونه مورد استفاده، روش تراریزش، باززایی تعداد زیادی گیاه تراریخته مستقل از هم و نیز روش غربال‌گری و ارزیابی آن‌ها بستگی دارد (Tohidfar and Mohsenpour, 2010). در این پژوهش سعی شده است با استفاده از تیمارهای مناسب، بهترین فاکتورها به منظور حداکثر تراریزش برای گیاه موسیر بومی ایران (*A. stipitatum*) به دست آید. بدین منظور ابتدا باید یک روش باززایی مناسب برای انتقال ژن در موسیر بهینه شود و همچنین توسط ژن‌های گزارشگر مناسب نظیر ژن *gus* انتقال ژن به موسیر بهینه شود،



شکل ۱- نقشه وکتور دوگانه pBI121

Figure 1- Binary vector pBI121

برای کشت باکتری اگروباکتریوم، از محیط کشت باکتریایی LB (Bertani, 1951)، در دو نوع مایع (LB Broth) و جامد (LB Agar) حاوی ۱۰ گرم در لیتر آگار استفاده شد که هر دو از شرکت Duchefa تهیه شده بودند. پس از اتوکلاو و رسیدن به دمای مناسب (۵۰ درجه سانتی گراد)، آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین (۲۵ میلی گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) که توسط فیلتر استریل شده بودند به آن‌ها اضافه شد و در پتری دیش (برای محیط کشت جامد) و یا فالكون و ارلن (برای محیط کشت مایع) توزیع و در یخچال نگهداری شدند.

آماده سازی اگروباکتریوم جهت انتقال ژن

سویه اگروباکتریوم LBA4404 جهت انتقال ژن، در محیط کشت LB مایع حاوی ۲۵ میلی گرم بر لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در دستگاه شیکر-انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm کشت شدند. پس از طی مدت زمان ۴۸ ساعت، به منظور افزایش کارایی تراریزش، ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت شده به پنج میلی لیتر محیط کشت LB مایع جدید حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین اضافه شده و به مدت شش ساعت، برای رشد باکتری‌های تازه، در دستگاه شیکر-انکوباتور قرار گرفت.

تلقیح ریزنمونه‌ها

در این پژوهش ریزنمونه‌های جنین به مدت ده و پانزده دقیقه و طبق پیاز و ریشه به مدت پنج و ده دقیقه در سوسپانسیون باکتری $OD_{600}=0.6$ غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن بر روی

سپس این روش‌ها برای تراریختی موسیر با ژن‌های مفید مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای موسیر (*A. stipitatum*) و گیاهچه درون شیشه‌ای موسیر عاری از ویروس جهت تهیه ریزنمونه طبق پیاز، از بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و ادامه مراحل آزمایش در گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج انجام شد.

سترون سازی بذرها و آماده سازی ریزنمونه

بذرهای ابتدا در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم یک درصد حجمی/حجمی حاوی دو قطره Tween 20 به مدت ۱۲ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس با آب مقطر استریل ۳ مرتبه شستشو داده شدند. بذرهای به مدت یک هفته در آب مقطر استریل خیسانده شدند تا پوسته‌ی بذر نرم شده و بتوان جنین را از داخل بذر جدا کرد. جدا سازی جنین در زیر هود لامینار و توسط میکروسکوپ لوپ و در شرایط به طور کامل استریل انجام شد. همچنین از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای طبق پیاز و قطعات یک سانتی متری ریشه تهیه شد.

تراریزش باکتریایی

در این پژوهش از سویه باکتری LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* دارای پلاسمید دوگانه pBI121 حاوی ژن *gus* تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم CaMV35S و پایانبر NOS به عنوان حامل پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). همچنین در پژوهش حاضر از روش ذوب-انجماد (Sambrook and Russel, 2001) جهت تراریزش اگروباکتریوم استفاده شد و تأیید صحت تراریزش اگروباکتریوم از طریق آزمون هیستوشیمیایی *gus* (Jefferson et al. 1987) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت.

کاغذ صافی استریل به صورت افقی به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MS (Murashige and Skooge, 1962) حاوی سی گرم در لیتر ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار و pH معادل ۵/۷-۵/۸ کشت شدند. سپس به محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی گرم و سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی گرم در لیتر منتقل شدند.

کالزایی و باززایی

ریزنمونه‌های تلقیح یافته جهت کالزایی به محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۱) انتقال یافته و در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت. دو ماه پس از کشت صفات درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس بر روی تیمارهای هورمونی مختلف اندازه گیری شد.

برای باززایی نیز از محیط کشت‌های باززایی انتخابی MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۲) استفاده شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت باززایی در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و طول روز شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک بار

در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت. پس از دو ماه، درصد باززایی و سایر صفات بررسی شدند. تمامی محیط کشت‌ها حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر تهیه شدند.

استخراج DNA ژنومی گیاه موسیر و تأیید ترانزیشن ریزنمونه‌ها

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Dellaporta et al., 1983) انجام شد و برای اثبات ترانزیشن از آزمون هیستوشیمیایی *gus* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* استفاده شد. واکنش فوق در 94°C درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و 35°C (هر چرخه شامل 94°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، 57°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکمیل بسط در 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه) انجام شد. گیاهان تراریخته‌ای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* قطع مورد انتظار را تکثیر کردند، جهت اثبات عدم حضور آگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آگروباکتریوم *virG* بررسی شدند (جدول ۳).

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به منظور القای کالوس ریزنمونه‌ها

Table 1- Hormonal treatments for inducing callus in explants

ردیف	ریزنمونه	تنظیم کننده‌های رشد (میلی‌گرم بر لیتر)
Row	Explant	Hormones (mg/l)
		2,4-D
		NAA
		BA
1	جنین Embryo	1 -
2	طبق‌پایز موسیر Bulb	1 2
2	ریشه Root	1 2

جدول ۲- محیط‌های کشت باززایی پیازچه

Table 2- Regeneration culture media of bulblet

تنظیم کننده‌های رشد (میلی گرم بر لیتر) Hormones (mg/l)			ردیف Row
2,4-D	NAA	BA	
-	-	-	1
-	-	1	2
-	-	5	3
-	1	-	4
-	1	1	5
-	1	5	6
-	2	-	7
-	2	1	8
-	2	5	9
1	-	-	10
1	-	1	11
1	-	5	12
2	-	-	13
2	-	1	14
2	-	5	15

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 4- Primers and PCR products

آغازگرها Primers	توالی Sequence 5'→3'	قطعه تکثیری (bp) Amplified fragment (bp)	دمای بهینه اتصال (°C) Annealing (°C)
<i>gus</i>	Forward:CCCGCTTCGAAACCAATGCC Reverse:ACGTCCTGAAGAAACCCCA	1092	57
<i>virG</i>	Forward:ATGATTGTACATCCTTCACG Reverse:TGCTGTTTTTATGAGTTGAG	850	58

واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه) انجام شد.

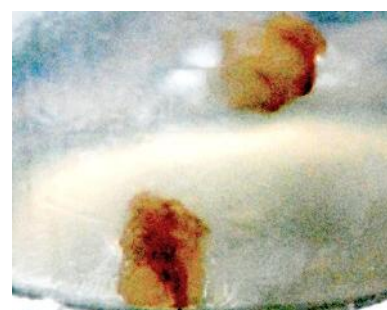
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات کالوس‌زایی و باززایی در قالب طرح به طور کامل تصادفی با سه تکرار (هر تکرار سه ریزنمونه) انجام شد. تجزیه آماری داده‌های حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم افزار MSTATC و نتایج تجزیه واریانس توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها

در این مطالعه، ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه درون شیشه‌ای موسیر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد NAA، BA و 2,4-D به منظور القاء کالوس کشت شدند و درصد کال‌زایی، وزن تر و خشک کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. یک ماه پس از کشت، در تمام تیمارهای هورمونی تشکیل کالوس بر روی ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز مشاهده شد اما در ریزنمونه ریشه هیچگونه کالوسی مشاهده نشد. در ریزنمونه جنین کالوس تشکیل شده در تیمار یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم در لیتر BA تفاوت معنی داری با تیمار حاوی 2,4-D و BA نداشت. در ریزنمونه طبق پیاز نیز کالوس‌ها مترکم و فشرده، گرانوله، آبنباتی شکل، چسبنده یا پفکی بودند (شکل ۲).

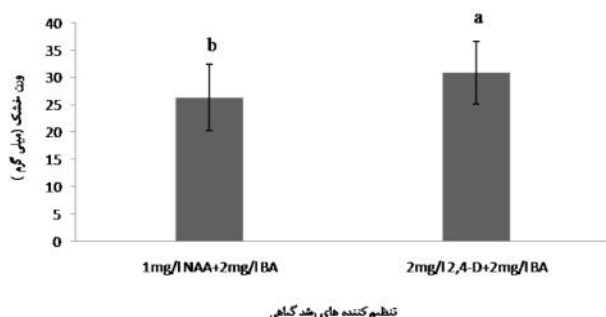


شکل ۲- کال‌زایی یک ماه پس از کشت

Figure 2- Callus induction one month after the culture

بررسی درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه جنین نشان داد که وزن تر کالوس در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی دار نداشت ولی در وزن خشک کالوس تفاوت معنی داری مشاهده شد. همچنین در ریزنمونه طبق پیاز نیز وزن تر و خشک کالوس‌ها در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی داری نداشتند. تشکیل کالوس در گیاه موسیر به نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه به طور کامل وابسته بود. در بین سه ریزنمونه به کار برده شده، جنین و طبق پیاز نسبت به ریشه تاثیر بیشتری را بر تشکیل کالوس ایجاد نمود. به طوریکه بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) با این دو ریزنمونه (در همه ترکیبات هورمونی) به دست آمد.

نتایج نشان داد در غلظت‌های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی داری بر وزن تر کالوس در ریزنمونه جنین مشاهده نشد. به طوریکه وزن تر کالوس در غلظت یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم لیتر BA و در غلظت دو میلی گرم در لیتر BA به همراه دو میلی گرم در لیتر 2,4-D با هم تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین نمودار نشان داد (شکل ۳) که در غلظت‌های مختلف BA، NAA و 2,4-D تاثیر معنی داری بر وزن خشک کالوس داشت. به طوریکه در غلظت دو میلی گرم در لیتر 2,4-D و BA بیشترین وزن خشک کالوس و در غلظت یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم در لیتر BA کمترین وزن خشک کالوس مشاهده شد. این مسئله بیانگر این است که افزایش غلظت اکسین‌ها در وزن خشک کالوس اثر مستقیم دارد و باعث افزایش وزن خشک کالوس می‌شود.



تنظیم کننده های رشد گیاهی

شکل ۳- مقایسه میانگین اثر هورمون بر وزن خشک کالوس حاصل از جنین

Figure 3- Mean comparison effect of the hormone on embryo for callus dry weight

تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی *gus* در گیاهان تراریخته احتمالی

در این مطالعه از ریزنمونه‌های جنین، طبق پیاز و ریشه به منظور انتقال ژن *gus* به گیاه موسیر بومی ایران استفاده شد. سنجش آزمون هیستوشیمیایی *gus* وجود نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نمونه را نشان داد که بیانگر بیان ژن *gus* است (شکل ۵).



شکل ۵- آزمون هیستوشیمیایی GUS در گیاهان تراریخته در محلول رنگ آمیزی GUS، نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نشان دهنده بیان ژن *gus* هستند

Figure 5- Histochemical GUS expression in transgenic plant

نتایج مقایسه میانگین فراوانی درصد تراریختی گیاهان احتمالی نشان داد (شکل ۶) در ریزنمونه جنین از ۳۰ نمونه بررسی شده توسط آزمون هیستوشیمیایی *gus*، سه نمونه که یکی به مدت ۱۵ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه دو میلی گرم در لیتر BA قرار گرفته بود و دو نمونه دیگر به مدت ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی دو میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه دو میلی گرم در لیتر BA قرار گرفته بودند، بیان ژن *gus* را نشان دادند. همچنین در ریزنمونه‌های طبق پیاز از ۳۰ نمونه بررسی شده یک نمونه به مدت پنج دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی یک میلی گرم در لیتر BA به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفته بود و نمونه دیگری که به مدت ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در تیمار هورمونی دو میلی گرم در لیتر BA به همراه دو میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفته بود، بیان ژن *gus* را نشان دادند. صفت زمان تلقیح با آگروباکتریوم (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) تاثیر

نتایج نشان داد در غلظت‌های مختلف BA و NAA تاثیر معنی-داری بر وزن تر و خشک کالوس در ریزنمونه طبق پیاز مشاهده نشد. به طوریکه در غلظت یک میلی گرم در لیتر BA و NAA و در غلظت دو میلی گرم در لیتر BA و NAA وزن تر کالوس تفاوت معنی دار با هم نداشتند.

کالوس‌های به دست آمده از ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز که در ترکیبات متفاوت هورمونی در بخش کالزایی به دست آمده بودند به منظور بررسی میزان تشکیل نوساقه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BA، NAA و 2,4-D طبق (جدول ۲) کشت شدند و نتایج آن بعد از ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در تیمار پنج میلی گرم در لیتر BA به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA در ریزنمونه طبق پیاز باززایی مشاهده شد (شکل ۴). در حالی که در ریزنمونه جنین هیچ گونه باززایی از کالوس صورت نگرفت. که این امر نشانگر این است که افزایش مقدار سایتوکینین‌ها در کنار اکسین‌ها برای باززایی بسیار موثر است. BA به عنوان یک سایتوکینین با غلظت بالا (پنج میلی گرم در لیتر) به همراه NAA به عنوان یک اکسین با غلظت متعادل (یک میلی گرم در لیتر) بیشترین تاثیر را در باززایی (۱۰۰ درصد) و افزایش طول نوساقه‌ها داشتند.

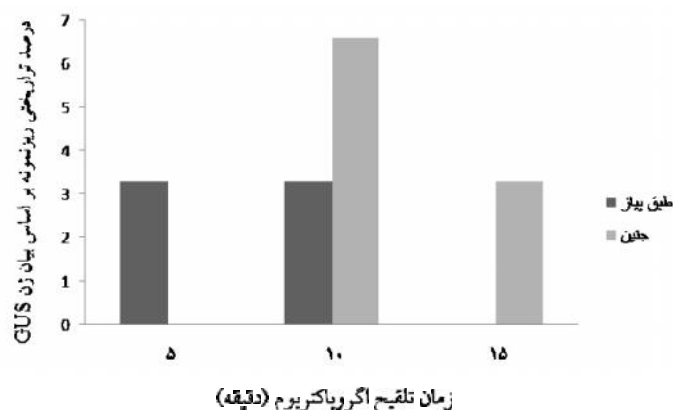


شکل ۴- باززایی از ریزنمونه طبق پیاز تراریخته

Figure 4- Regeneration of transgenic bulb

نتایج و بحث

در این پژوهش، دستورالعمل بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن به گیاه موسیر ایرانی تهیه شد. قهرمانی مجد و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند در نسبت‌های برابر بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید در ریزنمونه طبق پیاز اثر بهتری در تولید کالوس دارد که با نتایج ما نیز مشابه بود. همچنین تنها کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه طبق پیاز، باززا شدند. این امر نشان دهنده این است که ریزنمونه طبق پیاز بهترین ریزنمونه است. عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای بستگی به فاکتورهای متعددی دارد. مقادیر سطوح مختلف هورمون‌های داخلی، غلظت تنظیم کننده‌های رشد خارجی و برهمکنش اثر این تنظیم کننده‌ها همگی بر پاسخ ریزنمونه موثر است (Ghahremani Majd et al. 2009). به‌طور کلی چندین فاکتور می‌توانند اثر مهمی بر تراریزش با استفاده از آگروباکتریوم در گونه‌های گیاهی مختلف داشته باشند. با بهینه سازی فاکتورهای موثر می‌توان کارایی انتقال ژن به گیاهان را بالا برد. تراریختی به کمک آگروباکتریوم با وجود محدودیت‌هایی که دارد، در حال حاضر هنوز هم کاراترین روش برای تولید گیاهان تراریخته است. کوشش‌هایی در جریان است تا این روش را ساده‌تر و موثرتر کند تا تعداد ژنوتیپ‌های بیشتر، به‌خصوص واریته‌های برتر تراریخته شوند. برای ایجاد یک روش تراریختی مستقل از ژنوتیپ در گیاه پژوهش‌های بیشتری لازم است تا به افزایش تقاضا برای دستیابی سریع به ارقامی بهبود یافته برای تولید تجاری پاسخ داده شود (Tohidfar and Mohsenpour, 2010). در این پژوهش ریزنمونه‌های طبق پیاز و جنین نسبت به ریزنمونه‌های ریشه جهت کال‌زایی، باززایی و تراریزش در موسیر کاراتر بودند. بین سه محیط کشت باززایی، محیط کشت MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به همراه یک میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید بهترین محیط برای باززایی تشخیص داده شد. تنظیم کننده‌های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم سلولی دارند. همچنین سائتوکینین‌ها نیز در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی نقش دارند (Piriki, 2007).



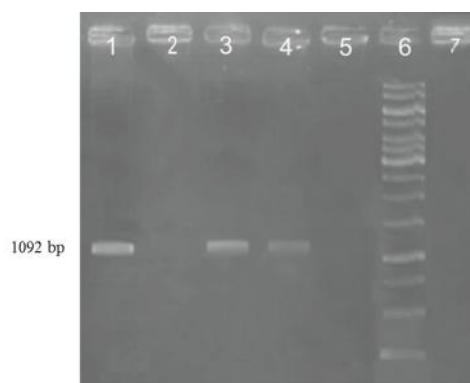
شکل ۶- فراوانی درصد تراریختی ریزنمونه‌های جنین و طبق پیاز بر اساس آزمون هیستوشیمیایی GUS

Figure 6- Transformation frequency percentage of embryo and bulb according to GUS assay

بسیار کمی بر درصد تراریختگی داشت و می‌توان نتیجه‌گیری نمود که زمان ۱۰ دقیقه مناسب‌ترین زمان برای تلقیح به روش غوطه‌وری است.

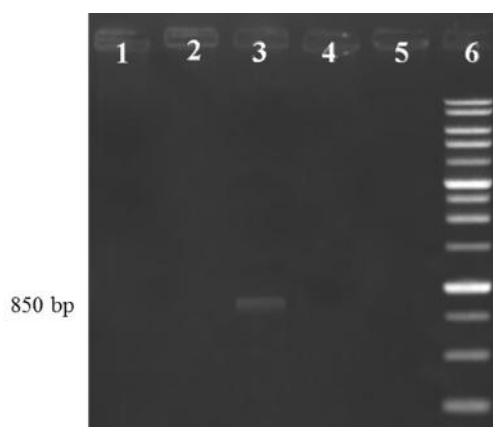
اثبات وجود ژن *gus* در گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب این ژن انجام شد. مشاهده باند ۱۰۹۲ جفت بازی وجود این ژن را در گیاه، که به آزمون هیستوشیمیایی *gus* پاسخ مثبت داده بودند، اثبات کرد (شکل ۷). در گیاهان حاصل از ریزنمونه طبق پیاز و جنین باند ۱۰۹۲ جفت بازی مشاهده شد. به‌طوری که وجود باند ۱۰۹۲ جفت بازی مربوط به ژن *gus* نشان دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *gus* را دارا هستند. همچنین جهت اثبات عدم حضور آگروباکتریوم در گیاهان تراریخته احتمالی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* انجام شد. باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه آگروباکتریوم مشاهده شد و عدم ظهور این باند در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود آگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آن‌ها است (شکل ۸).



شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *gus*، چاهک ۱- پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۲- نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۳- گیاه تراریخته (ریزنمونه طبق پیاز)، چاهک ۴- گیاه تراریخته (ریزنمونه جنین)، چاهک ۵- گیاه شاهد (ریزنمونه طبق پیاز) چاهک ۶- نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb plus)، چاهک ۷- گیاه شاهد (ریزنمونه جنین).

Figure 7- PCR analysis of transgenic plants with *gus* specific primers, 1. Positive PCR control, 2. Negative PCR control without DNA (H₂O), 3. Transgenic plant (bulb), 4. Transgenic plant (embryo), 5. Untransformed plant (bulb), 6. DNA marker, 7. Untransformed plant (embryo).



شکل ۸- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *virG*، چاهک ۱- گیاه تراریخته (ریزنمونه پیاز)، چاهک ۲- گیاه تراریخته (ریزنمونه جنین)، چاهک ۳- پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۴- گیاه شاهد، چاهک ۵- نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۶- نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb plus).

Figure 8- PCR analysis of transgenic plants with *virG* specific primers, 1. Transgenic plant (bulb), 2. Transgenic plant (embryo), 3. Positive PCR control, 4. Untransformed plant, 5. Negative PCR control without DNA (H₂O), 6. DNA marker.

کردند (Eady et al. 2005). در این پژوهش درصد تراریزش در ریزنمونه جنین ۱۰ درصد و در ریزنمونه طبق پیاز ۶/۶ درصد محاسبه شد. از نتایج این پژوهش می توان جهت مطالعات کشت بافت و همچنین مهندسی ژنتیک در گیاه موسیر استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری کارکنان بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران جهت تهیه ریزنمونه و همچنین جناب آقای دکتر اردشیر قادری مدیر گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و به-خصوص جناب آقای مهندس امیررضا زارع کاریزی کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و از همکاران محترمی که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می شود.

نفتالن استیک اسید به عنوان یکی از تنظیم کننده های رشد اکسینی نقش موثری در تقسیم سلولی دارد، بنابراین حضور آن برای باززایی لازم است. در نتیجه تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره ای پلیمر از نمونه های تراریخته احتمالی با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، نیز مثبت بودند که همگی در محیط حاوی آنتی بیوتیک رشد کرده بودند. گیاهان حاصل جهت ارزیابی حضور آگروباکتریوم توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* نیز مورد سنجش قرار گرفتند و عدم آلودگی در ریزنمونه طبق پیاز و جنین، نشان دهنده عدم وجود آگروباکتریوم و اثبات صحت تراریختگی آنها است. موسیر از گونه های سرسخت جهت تراریزش به وسیله آگروباکتریوم محسوب می شود (Purwito and Zheng, 2009). پژوهشگران در سال ۲۰۰۱ درصد تراریزش برای انتقال ژن به پیاز و موسیر را ۱/۹۵ درصد اعلام کردند (Zheng et al. 2001). در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۵، پژوهشگران کارایی تراریزش در سیر و تره فرنگی را ۰/۰۶ درصد گزارش

منابع

- Arsalandeh F, Hoseini Zijevar M, Hoseini J, Mahmoodi M. 2012. The effects of extracts shallots (*Allium hirtifolium* Boiss.) on the gene expression of the enzyme glycogen phosphorylase and phosphoenol pyruvate carboxykinase in the rat liver diabetic for PCR-RT. 1st Student's National Conference of Biotechnology, Gorgan. (In Farsi with English abstract).
- Bertani G, 1951. Studies on lysogeny. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62:293-300.
- Dellaporta S, Hicks J W, Hicks JB, 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- Eady C, Davis S, Catanach A, Kenel F, Hunger S, 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). Plant Cell Rep. 24: 209-215.

- Farsi M, Zolala J, 2000. Introduction to plant biotechnology. Publishing Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi).

- Ghahremani Majd H, Dashti F, Piri Kh, Yari MB, 2010. *In vitro* bulblet formation of Mooseer (*Allium hirtifolium*). Plant Production Technology 9(2): 65-73. (In Farsi with English abstract).

- IRNA. 2013. Islamic Republic News Agency Available at <http://www3.as.irna.ir/fa/News/80772912/>. IRNA, Tehran, Iran.

- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and

- Kashfi Bonab A, 2011. The relative economic advantage the cultivation and trade of medicinal plants in Iran and its value in world markets. Commercial Surveys 44 (8): 78-67. (In Farsi with English abstract).

- Kheirkhah M, Dadkhah A, 2013. Study of *Allium altissimum* Regel. phenology and consider how to domesticating it. Horticulture

- Researches in Pajouhesh and Sazandegi, 82: 19-24. (In Farsi with English abstract).
- Murashige T, Skoog F**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473- 497.
- Pirik RLM**, 2007. *In vitro* culture of Higher plants. Translate Bagheri, A., Saffari, M., Publishing Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi with English abstract).
- Purwito A, Zheng SJ**, 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation in Shallot (*Allium cepa* L.), IPBRepository 159-171.
- Rezaee Khozani N, Doodi M, Ghanbari F, Nasiri Z**, 2013. Reviews of anti-microbial extracts shallots against *Staphylococcus aureus* resistant to Meticillin, *Journal of Veterinary Laboratory Research* 4(1): 91-92. (In Farsi with English abstract).
- Sambrook J, Russel D**, 2001. *Molecular Cloning*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Tohidfar M, Mohsenpour M**, 2011. Effective factors in Cotton (*Gossipium spp*) Transformation Using *Agrobacterium*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2(1): 1-24. (In Farsi with English abstract).
- versatile gene marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Zheng SJ, Khrustaleva L, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, Kik C**, 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* 7(2): 101-115.

Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*

Abolfazl Hajiheidar¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Seied Mehdi Miri¹

1.M.Sc, Assistant Professor, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* Corresponding Author, Email M_Tohidfar@sbu.ac.ir

ABSTRACT

Shallot (*Allium stipitatum*) is an edible vegetable that has important pharmacological properties. Therefore, optimization of an efficient *in vitro* regeneration and transformation system for shallot breeding through genetic engineering would be useful. Embryo, root and bulb explants of shallot were cultured *in vitro* on MS basal medium supplemented with different concentrations of growth regulators (NAA, 2,4-D and BA) for callus induction and plantlet regeneration. Explants were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 and pBI121 plasmid carrying the *gus* reporter gene. The results indicated that bulb had a higher efficiency of callus induction and plantlet regeneration (100%) compared to embryo and root explants. The highest percentage of regeneration (100 %) was observed on MS medium supplemented with 5 mg.l⁻¹ BA and 1 mg.l⁻¹ NAA for bulb explants. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of *gus*-positive transformants confirmed genetic transformation of the cultures. Furthermore, the lack of *Agrobacterium*-related infection was confirmed using *virG*-specific markers. In this study, the efficiency of transformation was 10 and 6.6% in embryo and bulb, respectively.

Key Words

Agrobacterium, GUS gene, Gene transformation, Shallot, Tissue culture

بهینه سازی القاء ریشه های موین به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه دارویی شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita*)

Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant *Alecost* (*Tanacetum balsamita* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*

اسعد معروفی^{۱*} و محمد مجدی^۲

Asad Maroufi*, Mohammad Majdi

۱- استادیار ۲- دانشیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

1-Assistant Professor and 2- Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.maroufi@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

چکیده

گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita*) از خانواده کاسنی (Asteraceae) یک گیاه دارویی مهم می باشد که غنی از متابولیت های ثانویه مانند فلاونها، سس کوی ترین لاکتونها، مشتقات فیل پروپان ها، تانن ها و همچنین اسانس ها می باشد. گیاه شاه اسپرم به عنوان طعم دهنده و افزودنی چه به صورت تازه و چه خشک شده استفاده شده است، همچنین دارای فواید دارویی بوده و در فراورده های معطر نیز به کار می رود. با توجه به اهمیت و کاربرد متابولیت های ثانویه، کشت ریشه های موین یک راهکار مناسب برای تولید بیشتر این مواد علاوه بر روش های کاشت کلاسیک به شمار می رود. بدین منظور در این تحقیق بررسی القاء ریشه موین در گیاه شاه اسپرم به کمک آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) مورد ارزیابی قرار گرفت. ریز نمونه های مختلف عکس العمل های متفاوتی را نسبت به القاء ریشه توسط آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 نشان دادند. همچنین فراوانی تولید ریشه های القاء شده نیز برای هر نوع ریز نمونه به صورت معنی داری متفاوت بود. صحت ریشه های القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز به کمک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* نیز تایید شد. نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان می دهد که تراریختی و القاء ریشه های موین در گیاه شاه اسپرم توسط آگروباکتریوم رایزوژنز امکان پذیر بوده و می تواند در تحقیقات انتقال ژن و کشت ریشه های موین به منظور تولید متابولیت های ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز

ریشه موین

شاه اسپرم

گیاه دارویی

متابولیت ثانویه

مقدمه

شاه اسپرم یا شاه اسپرغم با نام علمی *Tanacetum balsamita* L. و نام های انگلیسی *Alecost* یا *Costmary* گیاهی است چند ساله که متعلق به خانواده کاسنی (*Asteraceae*) و تبار *Anthemideae* می باشد. این گیاه توسط ریزوم و بذر تکثیر یافته و دارای گل های لوله ای شکل زرد رنگ است که در تابستان مشاهده می شود. منشأ آن مدیترانه بوده (Culpepers 1950) و در اروپا و آسیا می روید (Pérez-Alonso et al. 1992). شاه اسپرم در ایران به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است و در شمال غربی کشور کشت می شود (Hassanpouraghdam et al. 2008). شاه اسپرم یک گیاه غنی از متابولیت های ثانویه مانند فلاونها، سس-کوی ترپن لاکتونها، مشتقات فنیل پروپان ها، تانن ها و اسانس می باشد (Marculescu et al. 2001). اسانس های استخراج شده از قسمت های هوایی گیاه دارای استفاده های دارویی بوده و به عنوان طعم دهنده نیز در فراورده های غذایی به کار می رود (et al. 2009). همچنین گزارش هایی دال بر خاصیت حشره کشی اسانس و نیز اثرات آللوپاتی ترکیبات سس کوی ترپن-های این گیاه وجود دارد (Teixeira da Silva 2004; Bylaite et al. 2000). تاکنون تحقیقات بسیار محدودی در ایران و در دنیا بر روی افزایش و بهره گیری از متابولیت های ثانویه با استفاده از روش های ژنتیکی و بیوتکنولوژی بر روی گیاه شاه اسپرم انجام شده است. در بررسی تاثیر غلظت های مختلف محلول غذایی هوگلند تغییر یافته بر روی ویژگی های رویشی، محتوا و عملکرد اسانس شاه اسپرم نتیجه گیری شد که شاه اسپرم یک گیاه کم توقع از لحاظ عناصر غذایی بوده و می تواند با حداقل عناصر غذایی بیشترین عملکرد اسانس را داشته باشد (et al. 2008). در بررسی ترکیبات اسانس این گیاه در مناطق شمال غرب ایران ۲۳ ترکیب شناسایی شده اند که عمده ترین آنها مونوترپن های اکسیژنه شده (۹۳/۸۷٪) و سس کوی ترپن (۶۶/۶٪) می باشد، به طوری که مونوترپن های کارون (carvone)، آلفاتوجون (α -thujone)، بتاتوجون (β -thujone) و سینئول (1,8-cineole) ترکیبات اصلی اسانس می باشند (et al. 2009). همچنین یک سیستم تولید کالوس از

قسمت های مختلف گیاه شامل قطعات برگ، بین گره ها و دم برگ در شرایط درون شیشه ای (*in vitro*) و نیز ارزیابی تنوع سوماکلون در کشت های کالوس گزارش شده است (Mohajjel shoja et al. 2010). با توجه به اهمیت و نیاز به افزایش متابولیت های ثانویه به دلایل کاربرد های دارویی و غذایی، به نظر می رسد که روش های بیوتکنولوژی در کنار روش های کلاسیک، که در بسیاری از موارد جوابگوی نیازهای مصرف نیستند، می توانند در به ثمر رسیدن این اهداف مفید باشند (Verpoorte et al. 2002). کشت سلولی و کشت ریشه موئین القا شده به کمک آگروباکتریوم رایزوزن (*Agrobacterium rhizogenes*) از مهمترین روش های بیوتکنولوژی گیاهی هستند که در تولید متابولیت های ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار می گیرند (Berlin 1986; Alfermann 1995 and Petersen). هر چند کشت سلولی دارای مزایای زیادی است، اما در برخی از موارد سلول های تمایز نیافته توان بیوستزی فراورده های ثانویه را از دست می دهند (Hasanloo et al. 2008). بعلاوه آنها دارای ثبات ژنتیکی نبوده که منجر به کاهش تولید متابولیت ها می شود (Giri and Narasu 2000). امروزه تولید متابولیت های ثانویه گیاهی که اکثرا دارای ارزش دارویی و صنعتی هستند از طریق کشت ریشه های موئین بسیار گسترده است (Giri 2000 and Narasu) و به عنوان یک روش موثر به کار گرفته می شود. تاکنون تعدادی از گونه های مهم گیاهی از جمله گیاهان دارویی به وسیله آگروباکتریوم رایزوزن تراریخت شده و متابولیت های با ارزشی توسط ریشه های موئین تولید شده اند. به عنوان مثال از ریشه های موئین القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوزن در گیاه شاه بیزک (*Atropa belladonna*) آلکالوئید تروپاتی تولید شده است (Bonhomme et al. 2000). همچنین ریشه های موئین تراریخت نسبت به گیاه کامل در درمنه (*annua* *Artemisia*) مقدار سزکوی ترپن بیشتری را تولید کردند (Souret et al. 2003). در ریشه های حاصل از القاء آگروباکتریوم رایزوزن در گیاه *Rhamnus fallax*، آنتراکینون (Anthraquinone) بیشتری تولید می شود (Rosić et al. 2006). در گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) تولید ریشه های موئین به عنوان منبعی برای تولید سیلی مارین گزارش شده است (Rahnama 2007). در گونه

مواد و روش ها

مواد گیاهی: بذور شاه اسپرم ازپاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور تهیه ریز نمونه ها (جداکشت) بذور به شرح زیر استریل شدند. ابتدا بذرها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه غوطه ور شده و بلافاصله با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، سپس به مدت ۳۰ دقیقه درهپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) قرار گرفتند و نهایتاً سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور استریل در محیط MS (موراشیک و اسکوگ) استریل حاوی ۲ درصد شکر و ۰/۷ درصد آگار کشت شدند. کشتها در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور 3000 LUX) در شبانه روز قرار گرفتند. از قسمتهای مختلف (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) گیاهچه های بدست آمده بعد از بیست روز تا یک ماه از کشت بذور، ریز نمونه تهیه شد.

تهیه آگروباکتریوم رایزوزنز: جهت القای ریشه موین گیاه شاه اسپرم از سویه A4 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* حاوی پلاسمید (pRiA4) استفاده شد. باکتری ها در محیط کشت LB مایع حاوی 50 mg/l آنتی بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی شیکر چرخشی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی و به مدت ۲۴ ساعت تکثیر شدند. باکتریها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به کمک سانتریفیوژ رسوب داده شدند. پلت بدست آمده در محیط کشت MS مایع $1/2$ حاوی $100 \mu\text{M}$ استوسیرینگون به صورت سوسپانسیون در آمد. غلظت سوسپانسیون بین ۱-۰/۸ در $\text{OD}_{600\text{nm}}$ تعیین شد. نهایتاً این محلول جهت تلقیح ریز نمونه ها به کار گرفته شد.

هم کشتی و القای ریشه های موین: ابتدا ریز نمونه ها از گیاهچه جدا شده و به مدت دو ساعت در محیط MS مایع نگهداری شدند. زخمهایی در سطوح ریز نمونه ها ایجاد شد و در سوسپانسیون باکتری آماده شده جهت تلقیح به مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور شدند. سپس بر روی کاغذ صافی استریل سوسپانسیون باکتری اضافی خشک شد. نهایتاً ریز نمونه های تلقیح شده برای

Plumbago indica از تیره بهمنیان ریشه های حاصل از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت مقادیر بیشتری از پلامباگین (Plumbagin) تولید کردند (Gangopadhyay et al. 2010). همچنین در گونه *Bacopa monnieri* متعلق به تیره بارهنگیان، ریشه های تراریخته به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز تا پنج برابر مقادیر ساپونین بیشتری نسبت به گیاهان غیرتراریخت تولید کردند (Majumdar et al. 2011). پیریان و همکاران نیز نشان دادند که غلظت نورآدرنالین (Noradrenalin) در ریشه های گونه خرفه پرپهن (*Portulaca oleracea*) القاء شده به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در مقایسه با ریشه های نرمال تا حدود دوازده برابر افزایش داشت (Pirian et al. 2012). کرانول، یک نوع دی ترپن که در گونه گیاهی *Siegesbeckia orientalis* تنها در برگهای آن تجمع می یابد، در ریشه های موین نیز تولید شد (Wang et al. 2012). همچنین در ریشه های تراریخته گیاه برنجاسف (*Artemisia vulgaris*) از جنس درمنه ها مقادیر زیادی اسانس روغنی در مقایسه با ریشه های غیر تراریخت تجمع پیدا کردند (Sujatha et al. 2013). ریشه های موین حاصل از آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه *Portulaca oleracea* نیز قادر بودند دوپامین تولید کنند (Ahmadi Moghadam et al. 2014). سطح تولید caffeoylquinic در ریشه های تراریخته در گیاه راپتیکام کارتامویدس (*Rhaponticum carthamoides*) از تیره کاسنیان، خصوصاً در معرض نور به مقدار بالایی افزایش نشان داد (Skala et al. 2015). با توجه به اهمیت گیاه شاه اسپرم به دلیل داشتن متابولیت های ثانویه با ارزش، یافتن راهی برای تولید ارزان و سریع آنها از طریق ریشه های موین ضروری به نظر می رسد. بدین منظور در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های موین از طریق انتخاب ریز نمونه های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه شاه اسپرم به عنوان اولین گام موثر در کشت ریشه های موین مورد بررسی قرار گرفت.

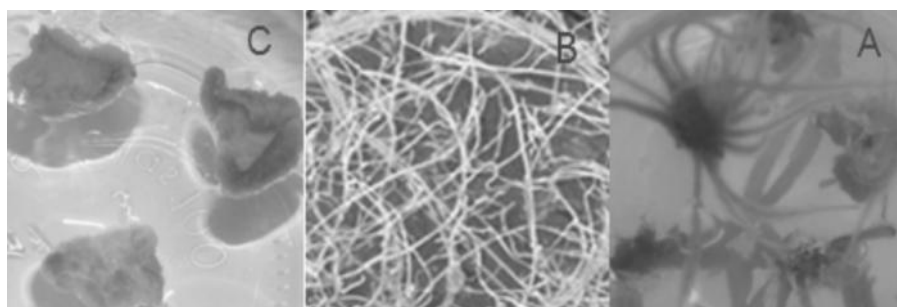
نتایج و بحث

در این تحقیق بهینه سازی شرایط القاء ریشه های موئین از طریق انتخاب ریز نمونه های مختلف، به کمک آگروباکتریوم رایزوترنز در گیاه شاه اسپرم بررسی شد. همه انواع ریز نمونه های به کار گرفته شده (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) توانستند پس از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوترنز بعد از ۳ تا ۴ هفته ریشه تولید کنند (شکل ۱ A). محل ظهور ریشه ها، محل های زخم ایجاد شده بر روی ریزنمونه ها بود، اینجا محلی است که باکتری می تواند با سلول گیاهی ارتباط ایجاد کرده و DNA خود را به درون ژنوم میزبان ملحق کند. ریشه ها به صورت متراکم با رشد پلاژیوتروپیک سریع و دارای انشعابات زیاد بوده و از نظر مورفولوژی با ریشه های معمولی در کشت بافت متمایزند (شکل ۱ B). در ریزنمونه های شاهد تلقیح نشده با باکتری هیچ ریشه ای مشاهده نشد و یا در آنها کالوس مشاهده شد (شکل ۱ C). اختلاف بسیار معنی داری بین چهار نوع ریز نمونه از نظر القاء ریشه های موئین بدست آمد (جدول ۱). فراوانی القاء ریشه در کوتیلدونها از بقیه ریز نمونه ها بیشتر بود و تجزیه آماری داده های بدست آمده نیز آن را تایید کرد (شکل ۲). وزن خشک ریشه های تولید شده توسط ریزنمونه های متفاوت نیز اندازه گیری و تجزیه واریانس انجام شد (جدول ۲). نتایج حاصل نشان داد که وزن ریشه های القاء شده در کوتیلدونها بیشتر از ریشه های حاصل از بقیه ریزنمونه ها بود و اختلاف معنی داری را نشان می-دهند (شکل ۳). اگر چه از نظر خصوصیات ظاهری ریشه های بدست آمده مانند ریشه های موئین بودند، اما جهت اطمینان و تایید آنها از تکنیک PCR برای بررسی ماهیت آنها استفاده شد.

هم کشتی بر روی محیط کشت MS جامد (7 gr/l آگار) قرار گرفتند. برای تهیه نمونه های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. کشتها در اتاق رشد با دمای 25 ± 2 سانتی گراد و در تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. پس از دو روز هم کشتی ریز نمونه ها ابتدا در محیط کشت MS مایع حاوی 400 mg/l سفوتاکسیم شستشو داده شدند تا از باکتری عاری شوند، سپس ریز نمونه ها به محیط کشت MS جامد حاوی 400 mg/l سفوتاکسیم منتقل شدند و در اتاق رشد در تاریکی و دمای 25 ± 2 سانتی گراد نگهداری شدند. تا حذف کامل باکتری و پدیدار شدن ریشه، ریز نمونه ها هر ۷ روز به محیط کشت مشابه واکشت می شدند. بررسی القاء ریشه زایی برای چهار نوع ریز نمونه (ریشه، کوتیلدون، برگهای جوان و ساقه) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تعداد ریشه های القا شده و وزن تر ریشه های تولید شده توسط ریزنمونه های متفاوت اندازه-گیری و با هم مقایسه شدند. بررسی داده ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شدند. میانگین ها نیز به روش دانکن با هم مقایسه شدند.

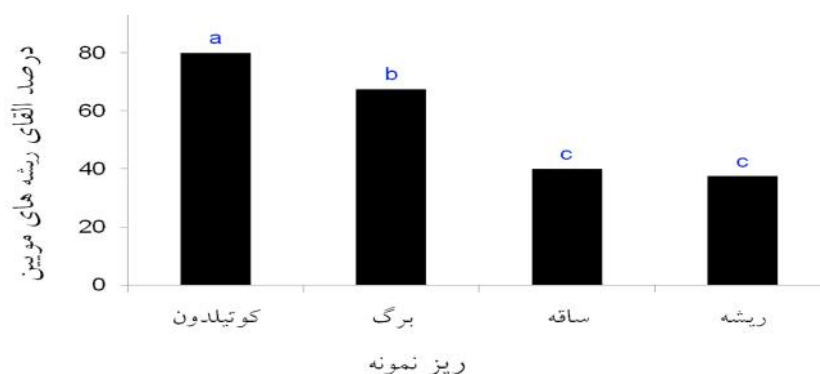
تایید مولکولی ریشه های موئین القا شده توسط آگروباکتریوم رایزوترنز

جهت تایید ریشه زایی ژنتیکی ریز نمونه ها، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* (Forward:) Reverse: /ATCCAACCTCACATCACAATGG) واکنش PCR بر روی DNA نمونه های ریشه انجام گرفت. DNA با روش CTAB از ریشه های القاء شده استخراج شد (Doyle 1991). شرایط دمایی PCR شامل واسرشتگی اولیه در 94°C درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و ۳۵ چرخه به صورت واسرشتگی در 94°C درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در 53°C درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و بسط در 72°C درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه بود. محصولات تکثیر شده برای بررسی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ بارگزاری شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید زیر نور UV مشاهده شدند.



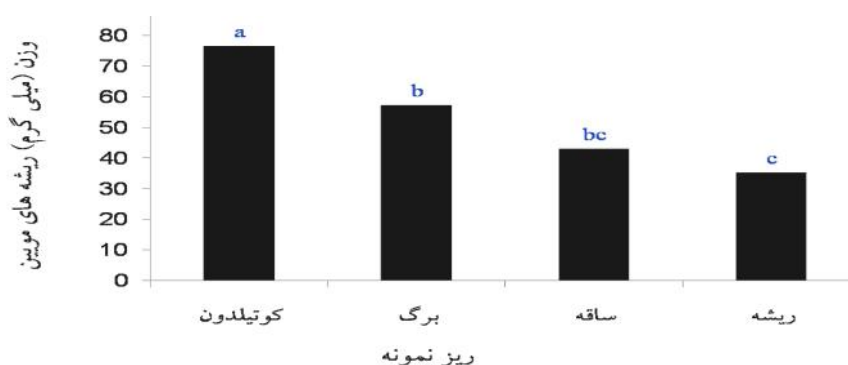
شکل ۱- مراحل مختلف القاء ریشه موئین به کمک آگروباکتریوم ریزوژنز. (A) ظهور ریشه های موئین بر روی ریزنمونه ها در نتیجه هم کشتی با آگروباکتریوم ریزوژنز سویه A4، (B) رشد ریشه های موئین القاء شده در محیط کشت، (C) عدم ظهور ریشه های موئین بر روی ریزنمونه های آلوده نشده به آگروباکتریوم ریزوژنز سویه A4.

Figure 1- Different steps of root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. (A) Hairy roots appeared on explants co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain, (B) Hairy root growth on medium, (C) Absence of hairy root on explants not infected with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain.



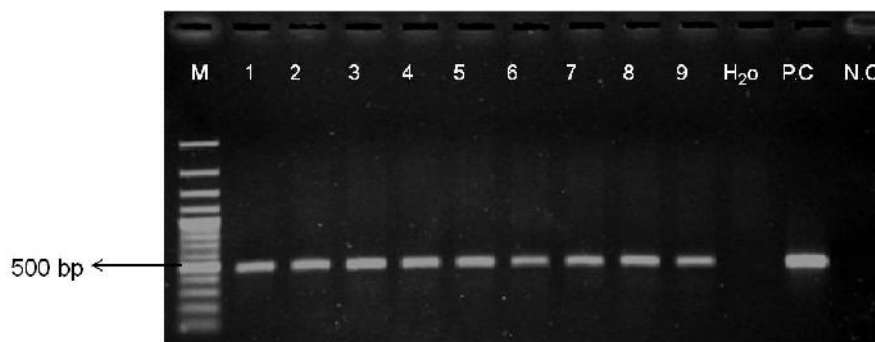
شکل ۲- مقایسه میانگین القاء ریشه های موئین در ریز نمونه های مختلف، تیمارهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Figure 2- Mean comparison of hairy root induced on different explants, treatments that have at least one common letter are not significantly different from each other.



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن ریشه های القاء شده توسط ریزنمونه های مختلف، تیمارهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Figure 3- Comparison of mean of induced roots weight on different explants, treatments that have at least one common letter are not significantly different from each other.



شکل ۴- تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* بر روی DNA حاصل از ریشه های موئین القا شده از ریز نمونه های گیاه شاه اسپرم. M نشان دهنده ساینز مارکر DNA. ردیف های ۱-۹ ریشه های حاصل از ریزنمونه های متفاوت، P.C کنترل مثبت (پلاسمید آگروباکتریوم رایزوترنز سویه A4)، H₂O کنترل منفی آب (مخلوط واکنش PCR آب به جای DNA الگو)، N.C کنترل منفی (محصول واکنش PCR با DNA ریز نمونه آلوده نشده به آگروباکتریوم رایزوترنز).

Figure 4- 500 bp fragment amplified using PCR with *rolB* primers on DNA of induced hairy roots of alecost plant. M indicating DNA size marker, lines 1-9 are root samples from different explants, P.C positive control (Plasmid from *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain), H₂O water negative control, N.C negative control (PCR product of DNA from uninfected explants with *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain).

جدول ۱- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه بر القاء ریشه های موئین.

Table 1- Analysis of variance of explants type on root induction.

منابع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تیمار (Treatment)	3	0.2**
خطا (Error)	12	0.01
کل (Total)	15	

** معنی دار در سطح یک درصد

جدول ۲- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه بر وزن ریشه های القا شده.

Table 2- Analysis of variance of explants type on induced root weight.

منابع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تیمار (Treatment)	3	1313.8**
خطا (Error)	12	25.2
کل (Total)	15	

** معنی دار در سطح یک درصد

Facchini, 2000) و (Jeong et al. 2002) را نام برد.

در این تحقیق نتایج بدست آمده نشان می دهد که القاء ریشه های موین و تراریختی به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4 در گیاه شاه اسپرم امکان پذیر است. دلیل انتخاب سویه A4 این است که یک سویه دارای طیف میزبانی وسیع است و در بیشتر گزارشات در گیاهان مختلف این سویه توانسته است ریشه های موین را القاء کند. همچنین نتایج نشان داد که ریز نمونه های مختلف عکس العمل های یکسانی در تولید ریشه موین نسبت به آگروباکتریوم رایزوزنز نشان ندادند، به نظر می رسد که کوتیلدون در مقایسه با بقیه ریز نمونه ها قابلیت بیشتری نسبت به انتقال ژن از خود نشان می دهد. این موضوع بیان می دارد که حساسیت ریز نمونه ها نسبت به آگروباکتریوم رایزوزنز ممکن است مرتبط با مرحله فیزیولوژیکی بافت در گیاه باشد (Shahabzadeh et al. 2013). همه کلونهای ریشه تولید شده خصوصیات ریشه های تراریختی را نشان دادند و بررسی مولکولی به کمک PCR نیز آن را تایید کرد. همچنین وزن ریشه های تولید شده حاصل از کوتیلدون ها بیشتر از ریشه های بدست آمده از بقیه ریز نمونه ها بود که به نظر می رسد این امر نیز مرتبط با مرحله فیزیولوژیکی بافت در گیاه باشد (Shahabzadeh et al. 2013).

در خاتمه نتایج بدست آمده اولین گزارش القاء ریشه های موین در گیاه دارویی شاه اسپرم است که با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A4، به عنوان یک ناقل طبیعی و نیز القاء کننده ریشه در گیاهان، به طور موفقیت آمیز به انجام رسیده است. نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات پایه مناسبی را جهت انتقال ژن و القاء ریشه موین به کمک آگروباکتریوم رایزوزنز در ریزنمونه های حاصل از گیاهچه های جوان فراهم می کند. این نتایج می تواند بویژه در تولید متابولیت های ثانویه با ارزش مانند کارون (carvone)، آلفاتوجون (α -thujone)، بتاتوجون (β -thujone) و سینول (1,8-cineole) در گیاه شاه اسپرم از طریق کشت ریشه های موین مفید واقع شود.

به کمک آغازگرهای طراحی شده PCR بر روی DNA ریشه های حاصل از القاء توسط آگروباکتریوم رایزوزنز انجام گرفت و قطعه مورد نظر تکثیر شد (شکل ۴). این می تواند دلیل خوبی از الحاق موفق ژن های القا کننده ریشه از پلاسמיד Ri توسط آگروباکتریوم باشد.

القاء ریشه های موین و کشت آنها علاوه بر کاربردهای آن در بیولوژی مولکولی (آنالیز ژنها، بیان پروتئینهای خارجی، باززائی گیاه کامل و ...) یکی از ابزارهای مناسب فن آوری زیستی برای تولید سریع و انبوه متابولیت های ثانویه در گیاهان می باشد (Rao 2002; Mulabagal and Tsay 2004; and Ravishankar 2002). اگرچه تولید تجاری متابولیت های ثانویه با ارزش در گیاهان از طریق روش ریشه های موین زیاد موفق نبوده و با مشکلاتی همراه است (Bensaddek et al. 2008; Stiles and Liu 2013)، اما با توجه به اهمیت آن روز به روز در حال بهبود و توسعه می باشد. به عنوان مثال تولید تجاری ساپونین از طریق کشت ریشه موین در جین سینگ امکان پذیر شده است (Jeong et al. 2002). به علاوه در بسیاری از گیاهان که متابولیت های ثانویه در حالت طبیعی فقط در اندامهای هوایی تولید می شوند، ممکن است در ریشه های القاء شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز نیز تولید شوند، از جمله ماده لائسون (lawson) در گیاه *Lawsonia inermis* که در حالت طبیعی فقط در اندامهای هوایی تولید می شود (Argolo et al. 2000). ثبات ژنتیکی ریشه های موین یکی دیگر از ویژگی های مناسب آنهاست (Hasanloo 2007). بنابراین القا و کشت ریشه موین ابزار مناسب و با ارزشی جهت استفاده در مطالعات بیولوژی مولکولی و همچنین افزایش تولید متابولیت های ثانویه می باشد. تاکنون القاء و کشت ریشه های موین برای برخی از گونه های مهم دارویی بهینه و توسعه یافته است که به عنوان مثال می توان *Artemisia annua* (Maldonado-Mendoza et al. 1993); *Datura stramonium* Cai et al. 1997); *Digitalis lanata* (Pradel et al. 1997); *Solanum aviculare* (Argolo et al. 2000); *Opium poppy* و *Papaver somnifera* (Park and

منابع

- Ahmadi Moghadam Y, Piri K, Bahramnejad B, Ghiasvand T. 2014. Dopamine Production in Hairy Root Cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) Using *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Agricultural Science and Technology 16:409-420.
- Alfermann AW, Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology -Results and perspectives. Plant Cell Tissue Organ 43:199-205.
- Argolo AC, Charlwood BV, Pletsch M. 2000. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*. Planta Medica 66:448-451.
- Bensaddek L, Villarreal ML, Fliniaux MA. 2008. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Bioscience 3(1):2-9.
- Berlin J. 1986. Secondary products from plant cell cultures. In: Rehm H.J. Reed G. (Eds.). Biotechnology a comprehensive treatise. Verlag Chemie, Weinheim 630-658.
- Bonhomme V, Laurain-Matter D, Lacoux J, Fliniaux MA, Jacquin-Dubreuil A. 2000. Tropan alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rolA, B, C genes only. Journal of Biotechnology 81:151-158.
- Bylaite E, Venscutonis R, Roozen JP, Posthumus MA. 2000. Composition of essential oil of costmary [*Balsamita major* (L.) desf.] at different growth phases. Journal of Agriculture Food Chemistry 48(6):2409-2414.
- Cai G, Li G, Ye H, Li G. 1995. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. Chinese Journal of Biotechnology 11:227-235.
- Culpepers N. 1950. Culpeper's Complete Herbal. W. Foulsham, London, 454.
- Doyle JJ. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM. Johnston A. (Eds.). Molecular techniques in taxonomy. Springer, Berlin, 283-293.
- Gangopadhyay M, Chakraborty D, Bhattacharyya S, Bhattacharya S. 2010. Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. Plant Cell Tissue Organ Culture 102:109-114.
- Giri A, Lakshmi Narasu M. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances 18:1-22.
- Hasanloo T, Rezazadeh Sh, Rahnama H. 2008. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. Journal of Medicinal Plants 29:1-17. (In Farsi).
- Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemyieh H, Aflatuni A. 2008. Effects of Different Concentrations of Nutrient Solution on Vegetative Growth and Essential Oil of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.). Danesh Keshavarzi 18(1):27-38. (In Farsi).
- Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemyieh H, Vojodi L. 2009. Volatile oil constituents of alecost [*Tanacetum balsamita* L. ssp. *balsamitoides* (Schultz-Bip.)] growing wild in North-West of Iran. Herba Polonica 55(1):53-59.
- Jeong G, Park D, Hwang B, Park K, Kim S, Woo JC. 2002. Studies on mass production of transformed *Panax ginseng* hairy roots in bioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology 98:1115-1127.
- Majumdar S, Garai S, Jha S. 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. Plant Cell Reports 30(5):941-954.
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, LoyolaVargas VM. 1993. Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:321-329.
- Marculescu A, Sand C, Barbu CH, Bobit D, Hanganu D. 2001. Possibilities of influencing the biosynthesis and accumulation of the active principles in *Chrysanthemum balsamita* L. species. Romanian Biotechnological Letters 7(1):577-584.
- Mohajjel shoji A, Hassanpouraghdam MB, Khosrowshahli M, Movafeghi A. 2010. Callogenesis Capability and Calli Somaclonal Variation of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.). Romanian Biotechnological Letters 15(2):5120-5124.
- Mulabagal V, Tsay HS. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2:29-48.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Park SU, Facchini PJ. 2000. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* cham. root cultures. Journal of Experimental Botany 51:1005-1016.
- Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Burzaco A. 1992. *Tanacetum balsamita* L. A medicinal plant from Guadalajara (Spain). Acta Horticulturae 306:188-193.

- Pirian K, Piri K, Ghiyasvand T. 2012.** Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(3): 642-649.
- Pradel H, Dumkelehmman U, Diettrich B, Luckner M. 1997.** Hairy root cultures of *Digitalis lanata*, Secondary metabolism and plant regeneration. Journal Plant Physiology 151: 209-215.
- Rahnama H. 2007.** Silimarín production using hairy root culture of *Silybum marianum*. In: Proceedings of Symposium of Medicinal Plants. Iran, Shahed University, 554-573. (In Farsi).
- Rao SR, Ravishankar GA. 2002.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101-153
- Rosić N, Momcilovic I, Kovacevic N, Grubisic D. 2006.** Genetic transformation of *Rhamnus fallax* and hairy roots as a source of anthraquinones. Biologia Plantarum 50 (4):514-518.
- Shahabzadeh Z, Heidari B, Faramarzi Hafez R. 2013.** Induction of Transgenic Hairy Roots in *Trigonella foenumgraceum* Co-cultivated with *Agrobacterium rhizogenes* Harboring a GFP Gene. Journal of Crop Science Biotechnology 16(4):263-268.
- Skala E, Kicel A, Olszewska MA, Kiss AK, Wysokinska H. 2015.** Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. BioMedical Research International ID article:181098. doi:10.1155/2015/181098.
- Souret FF, Yoojeong K, Barbara EW, Kristin KW, Pamela JW. 2003.** Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. Biotechnology and Bioengineering 83:653- .
- Stiles AR, Liu CZ. 2013.** Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology 134:91-114.
- Sujathaa G, Zdravkovic-Kora S, Cali D, Flamini G, Ranjitha Kumari B.D. 2013.** High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis. Industrial Crops and Products 44: 643-652.
- Teixeira da Silva JA. 2004.** Mining the essential oils of the Anthemideae. Afric Journal of Biotechnology 3(12):706-720.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002.** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1:13-25.
- Wang JP, Zhou YM, Zhang YH. 2012.** Kireneol production in hairy root culture of *Siegesbeckia orientalis* and its antimicrobial activity. Pharmacognosy Magazine 30:149-155.

Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant Alecost (*Tanacetum balsamita* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*

Asad Maroufi*, Mohammad Majdi

Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

* Corresponding Author, Email: a.maroufi@uok.ac.ir

ABSTRACT

Alecost (*Tanacetum balsamita* L.), belongs to the Asteraceae family, is a pharmacologically important species rich in important secondary metabolites including flavones, sesquiterpene lactones, phenylpropane compounds and derivatives, tannins and essential oils. Alecost has been used both fresh or dried as flavouring or food additive. Additionally, it has medicinal properties and is applied in aromatic products. In addition to traditional farming, in vitro hairy root culture has been found to be suitable for the production of secondary metabolites. Therefore, in order to establish a protocol for hairy root culture of alecost, root induction by co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* (strain A4) was assessed in this study. Different explants (cotyledon, young leaf, stem and root) showed different responses to hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. Moreover, the frequencies of hairy root induction for different types of explants were considerably different. The induced roots were shown to be transformed by PCR using primers specific for *rolB*. This is the first report of hairy root induction in alecost and the results may be useful in genetic manipulation of *Tanacetum balsamita* and use of hairy root culture to produce high-value secondary metabolites.

Key Words

Agrobacterium rhizogenes, Hairy root, Medicinal plant, Secondary metabolites, *Tanacetum balsamita*

تجزیه و تحلیل پروتئوم عصاره پروتئینی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* با خاصیت محرکی بر روی گیاه آراییدوپسیس

Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*

وحید فلاح زاده ممقانی

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Assistant Professor of Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fallahzadeh@azaruniv.edu

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

چکیده

در حال حاضر پژوهش های وسیعی در موسسات پژوهشی در دنیا در حال انجام است که هدف آنها یافتن محرک هایی (الیستورهای) جدید از میکروارگانیسم ها و گیرنده های آنها از گیاهان می باشد. شناخت کامل این محرک ها و گیرنده های مربوط به آنها، امکان استفاده از آنها جهت ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به بیمارگرهای گیاهی را امکان پذیر می سازد. با توجه به اینکه تولید اتیلن گیاه مدل آراییدوپسیس *Thaliana* در واکنش به تیمار محرک های میکروبی به شدت افزایش می یابد، در این مطالعه از آزمون سنجش اتیلن برای خالص سازی و بررسی پروتئین هایی با خاصیت محرک از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) استفاده شد. برای این منظور عصاره پروتئینی این باکتری تهیه و خالص سازی شد و سپس نمونه خالص شده که در آزمون سنجش اتیلن خاصیت محرکی داشت، با استفاده از طیف سنجی جرمی متوالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حدود ۶۰ پروتئین مختلف در نمونه مورد بررسی شناسایی شد که از بین موارد شناسایی شده تنها سه مورد از نظر جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک مشابه محرک مشاهده شده در عصاره پروتئینی باکتری *Xcc* بودند. این پروتئین ها عبارتند از *cspA* (پروتئین شوک سرمای *A*)، *csrA* (پروتئین تنظیم گر ذخیره کربن) و یک پروتئین ناشناخته فرضی محافظت شده که از خانواده پروتئینی DUF1456 می باشد. با بررسی هایی که در نرم افزارهای *SOSUI* و *PSORTB* صورت گرفت مشخص شد که این پروتئین ناشناخته فرضی قابل حل در آب بوده و هیچگونه توالی مرتبط با غشاء های باکتری را ندارد و بنابراین به احتمال زیاد جزء پروتئین های سیتوپلاسمی محسوب می شود.

واژه های کلیدی

آراییدوپسیس
محرک
اتیلن
پروتئین
زانتوموناس سیتتری

مقدمه

در سالهای اخیر تشخیص الگو (Pattern recognition) به عنوان فرآیندی اساسی در پاسخ ایمنی گیاهان و جانوران شناخته شده است. گیاهان و جانوران دارای گیرنده‌های تشخیص الگویی (Pattern recognition receptors- PRRs) هستند که آنها را قادر می‌سازد که الگوهای مولکولی (یا محرکها) از تمام رده‌های میکروبی را ادراک کنند (مثل کیتین در مورد قارچ‌ها و یا پپتیدوگلیکان در مورد باکتریها). از آنجایی که این ترکیبات در خود میزبان وجود ندارند، به شناسایی غیر خودی آنها کمک می‌کند. اگرچه الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (Pathogen-associated molecular patterns-PAMPs)، به صورت قراردادی به این نام خوانده می‌شوند، اما الگوهای مختلفی از میکروارگانیسم‌های مختلف اعم از بیمارگر یا غیر بیمارگر توسط گیرنده‌های شناساگر پروتئینی (Pattern recognition receptors- PRRs) ادراک می‌شوند. بنابراین، در منابع گذشته (Mackey and Ludwig *et al.* 2005; McFall, 2006) ترجیح داده شده است که به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (Microbe-associated molecular patterns-MAMP) توصیف شوند. محرکهای مشابهی ممکن است از خود گیاه نیز ایجاد شود که در اثر آسیب ایجاد شده توسط میکروبها حاصل می‌شود. این محرکها نیز به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (Damage-associated molecular patterns-DAMPs) توصیف شده‌اند (Lotze *et al.* 2007). ادراک محرکها چه از نوع MAMP و یا از نوع DAMP توسط PRRها پاسخ‌های دفاعی فعالی را شروع می‌کنند که در گیاهان، ایمنی پایه (basal immunity) و در جانوران، ایمنی ذاتی (innate immunity) نامیده می‌شوند، که بیمارگرهای ناسازگار را بازداري می‌کنند (Boller and Felix, 2009). از جمله مهمترین محرکها و گیرنده‌های آنها که تا به حال شناخته شده‌اند عبارتند از: ناحیه flg22 از تاژک باکتریها که گیرنده آن در گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس FLS2 شناخته شد است، فاکتور ترجمه EF-Tu از باکتریها که گیرنده آن در اعضای تیره کلم، EFR شناسایی شد، گیرنده گلوکان بیمارگر *Phytophthora megasperma* در سویا، زایلاناز قارچ *viride* *Trichoderma* که گیرنده آن در آرابیدوپسیس EIX شناخته شد و

گیرنده کیتین در برنج که CERK1 نامیده شده است. علاوه بر این تعداد زیادی از MAMPها از بیمارگرهای مختلف شناسایی شده‌اند که عملکرد آنها، گیرنده‌ها و برهمکنش مولکولی آنها به طور دقیق مطالعه نشده است (Boller and Felix, 2009).

شناسایی محرکها چندین فرآیند پاسخ سلولی از قبیل تغییر جریان یونی بین غشای سلولی (که باعث قلیایی شدن فضای بین سلولی می‌شود)، افزایش غلظت یون کلسیم سیتوپلاسمی (Boller and Felix, 2009)، القا کینازهای پروتئینی فعال شونده از طریق میتوزن (Mitogen-activated protein kinase-MAPK) که باعث فعال شدن فاکتورهای نسخه‌برداری می‌شوند (Asai *et al.*, 2002) و بیوسنتز هورمون استرس اتیلن (که از طریق فعال شدن ACC-synthase صورت می‌گیرد) را القا می‌کنند (Felix *et al.*, 1999). وقوع هر کدام از این پدیده‌ها به عنوان مارکر شناسایی محرکها می‌باشد که با تکنیکها مختلف اندازه گیری می‌شوند.

شانکر باکتریایی مرکبات، یکی از خطرناکترین بیماریهای مرکبات بوده و همه انواع مرکبات را آلوده می‌کند. باکتریهای ایجاد کننده این بیماری سه گونه متمایز از جنس *Xanthomonas* می‌باشند. مخربترین و شایعترین فرم عامل بیماری، فرم A (شانکر آسیایی) ناشی از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشد. خسارت بیماری شامل کاهش کمیت و کیفیت محصول و ریزش میوه‌های نارس است (Agrios, 2005). به رغم اعمال اقدامات بهداشتی و رعایت مقررات قرنطینه‌ای و ریشه کنی درختان بیمار در بعضی از کشورها، گستره شیوع این بیماری در جهان رو به افزایش است. در ایران نیز برای اولین بار این بیماری در سال ۱۳۶۸ در منطقه کهنوج استان کرمان گزارش شد و در حال حاضر در بسیاری از باغات مرکبات استانهای جنوبی کشور گسترش پیدا کرده است (Ashkan, 2009).

با توجه به دشواریهای موجود جهت کنترل موفق این بیماری، یافتن شیوه‌های نوین کنترل این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از موثرترین و سالم‌ترین روش‌ها جهت کنترل بیماری‌های گیاهی افزایش دادن مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی است و یکی از روش‌های نوین برای مقاوم

مواد و روش‌ها

سویه باکتریایی و نحوه نگهداری آن: باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 از کلکسیون میکروارگانیسم‌ها و کشتهای سلولی آلمان (DSMZ) دریافت گردید. برای نگهداری کوتاه مدت، باکتری بر روی محیط کشت LB آگار و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نگهداری بلند مدت، باکتری تا اواخر فاز لگاریتمی در داخل محیط LB کشت شد و سپس سوسپانسیون حاصل با گلیسرول مخلوط گردید، به طوری که درصد نهایی گلیسرول آن ۵۰ درصد شد. سوسپانسیون‌های حاصل بعد از نگهداری به مدت حداقل یک ساعت در دمای اتاق به دمای ۸۰- منتقل شدند.

گیاه وحشی و جهش یافته‌های مورد استفاده: در تمامی آزمایشات، جفت موتانت‌های *efr x bak1* و *efr x fls2* از گیاه آراییدوپسیس تالیانا مورد استفاده قرار گرفت. جفت موتانت *efr x fls2* هیبریدی از لاین الحاقی T-DNA در SALK_044334 (که دارای یک الحاق در ژن کد کننده گیرنده EF-Tu است)، و لاین الحاقی T-DNA در SALK_691_C4 (که دارای یک الحاق در ژن کد کننده گیرنده FLS2 است)، می‌باشد. این موتانت توسط دکتر Cyril Zipfel (آزمایشگاه ساینوری، نورویچ، بریتانیا) تهیه شده است (Zipfel, 2005).

کشت در خاک: بذر گیاه طبیعی آراییدوپسیس و جهش یافته‌های آن در گلدانهای کوچک به مدت یک هفته کشت شدند و بعد از به وجود آمدن گیاهچه‌های کوچک به گلدانهای دیگر (۷×۵ سانتی‌متر) نشاء شدند. برای هر گلدان یک گیاهچه در نظر گرفته شد. هم برای جوانه‌دار کردن و هم برای رشد، گلدانها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۷۰ $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ با رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد در اتاقکهای کنترل شده محیطی نگهداری شدند. سینی‌های حاوی گلدانها در ۳ هفته اول با پوشش مخصوص شفاف پوشانده شدند. خاک مورد استفاده از نوع GS90 با نسبت ورمیکولیت ۲۱:۵ بود که با کونفیدور ۰/۰۳۵ درصد آبیاری شده بود.

سازی گیاهان ایجاد گیاهان تراریخته با گیرنده‌های مختلف است که قادر به شناسایی مولکولی بیمارگرهای گیاهی و فعال‌سازی واکنش دفاعی می‌باشند (Brutus and Yang He, 2010). در حال حاضر پژوهش‌ها وسیعی در موسسات پژوهش‌های مختلفی در دنیا در حال انجام است که هدف آنها یافتن محرکهایی جدید از میکروارگانیسم‌ها و گیرنده‌های آنها از گیاهان مختلف می‌باشد تا بعد از شناخت کامل این محرکه‌ها و گیرنده‌های مربوطه آنها امکان استفاده از آنها جهت ایجاد گیاهان ترنسژنیک مقاوم علیه بیمارگرهای گیاهی مورد ارزیابی قرار گیرد.

ایده وجود محرکی جدید در *Xanthomonas citri* subsp. *citri* از فعالیت قابل توجه سوسپانسیون سلولی آن در تست‌های مختلفی همچون تست قلیایی شدن خارج سلولی، تولید فرم‌های فعال اکسیژن و تولید اتیلن به وجود آمد که بر روی گیاه کامل آراییدوپسیس تالیانا و کشت سلولی آن انجام گرفت (Jehle, 2013). هم سوسپانسیون سلولی و هم عصاره خام بدست آمده از این باکتری فعالیت شدیدی بر روی کشت سلولی آراییدوپسیس نشان دادند (Jehle, 2013). علاوه بر این در تست تولید اتیلن نیز آموده‌های مزبور بر روی چنین آراییدوپسیسی بسیار فعال بودند. خاصیت محرکی سوسپانسیون باکتریایی و عصاره خام بدست آمده از آن بعد از حرارت دادن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و تیمار با پروتئازها به شدت کاهش پیدا می‌کرد که نشان دهنده ماهیت پروتئینی آن است (Jehle, 2013). تمامی محرکهایی که تا به حال از گونه‌های مختلف *Xanthomonas* گزارش شده‌اند نسبت به حرارت مقاوم بودند. در تحقیق حاضر در ابتدا عصاره پروتئینی حاصل از باکتری *Xcc* با روش‌های مختلف و بر اساس خاصیت محرکی آن در آزمون تولید اتیلن خالص سازی گردید و سپس نمونه‌های خالص شده با دستگاه تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی (LC-MS/MS) مورد بررسی قرار گرفت. دانسته‌ها بدست آمده از LC-MS/MS با روشهای بیوانفورماتیک تجزیه و تحلیل شد و پروتئینهایی با بیشترین تشابه با ویژگی‌های پروتئین مورد بررسی معرفی شدند.

اندازه‌گیری تولید اتیلن: این آزمون بر اساس روش فلیکس و همکاران (۱۹۹۹) به انجام رسید. برای این کار، برگهایی از گیاه-های آراییدوپسیس ۴ تا ۶ هفته‌ای جمع‌آوری شده، به قطعات ۱ میلی‌متر در ۲ میلی‌متر (هر تکه حدود ۴ میلی‌گرم بود) تکه تکه شدند و به مدت حداقل ۶ تا ۱۰ ساعت در ddH₂O و در داخل پتری دیش نگهداری شدند. سپس به هر لوله آزمایش کوتاه (۶ میلی‌لیتری) که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر ddH₂O بود ۳ عدد از این تکه‌های برگ منتقل شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت MAMP نمونه‌های مورد نظر، مقادیر مختلف (بسته به نمونه ۱ تا ۳۰ میکرولیتر) از آن به لوله‌های آزمایش منتقل شد و دهانه لوله‌ها با دربهای لاستیکی مخصوص پوشانده شد و لوله‌ها بر روی شیکر و در دمای آزمایشگاه با چرخش ۱۲۸ دور در دقیقه به مدت ۲ تا ۴ ساعت قرار داده شدند. سپس یک میلی‌لیتر از هوای داخل لوله‌ها با استفاده از سرنگ به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند.

تکنیکهای پروتئومیکس مورد استفاده

تعیین کمیت پروتئینی: غلظت پروتئین در مراحل مختلف با استفاده از روش بردفورد و بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های معین پروتئینی اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد به وسیله غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم) و با نرم افزار اکسل تهیه شد. محلول تغلیظ شده 5x Roti®-Quant Bradford (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) به نسبت ۱ به ۴ رقیق شد و ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه مورد نظر (به عنوان کنترل)، نمونه و محلولهای استاندارد در چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی پخش شدند و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده بردفورد اضافه گردید و با دستگاه الیزا قرائت گردید.

دیالیز: در تمام مراحل که محلول‌های پروتئینی نیاز به تنظیم pH و یا جداسازی مولکول‌های کوچک داشت مورد دیالیز قرار گرفتند. برای این منظور از تیوپ دیالیز با قابلیت عبور حداکثر ۶ کیلودالتون استفاده شد. بعد از پر کردن تیوپ دیالیز با محلول پروتئینی مورد نظر تیوپ با گیره‌های مخصوص بسته شد و در داخل ۳-۵ لیتر محلول تریس با pH ۸ دیالیز شد.

کروماتوگرافی تبادل آنیونی (Anion exchange chromatography): برای پیش خالص‌سازی عصاره خام بدست آمده، ابتدا

تهیه عصاره خام کل باکتری Xcc در مقیاس بالا: بعد از انجام کشت خطی و تک کلون نمودن باکتری Xcc از استوک گلیسرول آن از دمای ۸۰-، کلنی‌های حاصل برای تلقیح در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت تلقیح شده در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت گردش ۲۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد و سوسپانسیون باکتریایی حاصل برای تلقیح ۲۰۰ عدد تشتک پتری حاوی محیط کشت کینگ بی (King's medium B) مورد استفاده قرار گرفت. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و باکتری‌های رشد یافته بر روی این محیط کشت‌ها جمع‌آوری شده و در داخل ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تعلیق گردیدند. باکتری‌های موجود در سوسپانسیون حاصل با استفاده از سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ g رسوب داده شدند و یکبار دیگر با آب مقطر استریل شست و شو شدند. محصول نهایی بدست آمده که حدود ۱۵۰ گرم سلول باکتری بود (وزن تر) به نسبت ۱ به ۱ در آب مقطر دیونیزه و استریل شده تعلیق گردید و در ظرف‌های تیوپ‌های ۵۰ میلی‌لیتری (۳۰ میلی‌لیتر به ازای هر ظرف) ریخته شد. برای تهیه عصاره خام پروتئینی، سوسپانسیون‌های حاصل در معرض سونیکاسیون (با شدت ۶۰ تا ۷۰ درصد) قرار گرفت تا

مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی از ابزارهای موجود در سرور ProtParam ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam>) استفاده شد. برای تعیین عملکرد پروتئین‌ها از ابزارهای بیوانفورماتیک CDD- BLAST, TIGRFAM و PFAM استفاده شد تا دمن‌ها (Domains) و موتیف‌های (Motifs) محافظت شده در توالی‌های مزبور تعیین گردد. برای پیش بینی جایگاه قرار گیری پروتئین از سرور PSORTB (<http://www.psort.org/psortb/>) و SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) استفاده شد. تعیین ساختار سه بعدی پروتئین به وسیله سرور Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) صورت گرفت.

نتایج و بحث

تهیه عصاره پروتئینی فعال و پیش خالص سازی آن

برای تهیه عصاره پروتئینی فعال باکتری از ۲۰۰ عدد تشتک پتری حاوی محیط کشت کینگ بی استفاده شده که در نهایت حدود ۱۵۰ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی فعال بدست آمد. غلظت پروتئینی این عصاره بسیار بالا بوده و با روش برد فورد در حدود ۲-۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین این عصاره در آزمون تولید اتیلن بسیار فعال بود و تنها ۰/۱ میکرولیتر از آن منجر به تحریک تولید ۱/۴۴ پیکو مول اتیلن گیاه به ازای هر میلی‌لیتر هوا شد (شکل ۱). در صورتی که هر ۰/۳ میکرولیتر از این محلول را یک واحد فعال در نظر بگیریم محلول مزبور حاوی ۵۰۰۰۰۰ واحد فعال MAMP خواهد بود. برای خالص سازی نسبی، عصاره به دست آمده بعد از انجام دیالیز بر علیه محلول ۲۰ میلی مولار تریس با pH ۸، بر روی ستون تبادل آنیونی (anion exchange column) اعمال شد و با غلظت‌های مختلف محلول کلرید سدیم از ستون شست و شو شده و در حجم‌های ۱۴ میلی-لیتری جمع آوری شد. کروماتوگرافی تبادل یونی در حال حاضر یکی از مهمترین تکنیکهایی است که به صورت وسیعی برای

کروماتوگرافی تبادل آنیونی به صورت دستی و مرحله‌ای و با استفاده از رزینهای Q-sepharose و یا DEAE sephacel در ستون شیشه‌ای Econo-Column (BioRad, Hercules, USA) در اتاق سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. حجم این ستون ۵۵ میلی-لیتر با قطر ۸ سانتی‌متر بود. با توجه به قطر زیادی که این ستون داشت امکان انجام کروماتوگرافی با سرعت و کارایی بسیار زیاد را امکان‌پذیر ساخت. سرعت جریان بافرها در مرحله متعادل سازی ستون ۲ میلی لیتر بر دقیقه و در زمان اعمال عصاره پروتئینی و شست و شو ۱ میلی لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد. بافر مورد استفاده برای کروماتوگرافی تبادل آنیونی تریس ۲۰ میلی‌مولار با pH ۸ بود. برای انجام کروماتوگرافی ابتدا ستون با محلول B (۱ مولار کلرید سدیم در ۲۰ میلی‌مولار بافر تریس ۸ pH) شست و شو شد و سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول A (۲۰ pH) میلی‌مولار تریس ۸ pH) از آن عبور داده شد تا متعادل (Equilibrate) گردد. سپس نمونه پروتئینی مورد نظر از ستون عبور داده شد و دوباره با محلول A شست و شو شد و پروتئین-های متصل شده به ستون با غلظت‌های مختلف محلول B (با ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) از ستون شست و شو شد و در حجم‌های ۱۴ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و میزان پروتئین کل و فعالیت محرکی موجود در آنها به ترتیب با آزمون بردفورد و آزمون تولید اتیلن تخمین زده شد. علاوه بر این برای بدست آوردن تفکیک و وضوح بیشتر برای خالص سازی از ستون ۵ میلی‌لیتری Hitrap Q FF متصل به سیستم ÄKTA microFPLC با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نیز استفاده شد.

تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی کروماتوگرافی مایع

(LC-MS-MS): تجزیه و تحلیل‌های جرم سنجی که به منظور تعیین توالی پپتیدها در مراحل مختلف انجام شد در مرکز پروتئومیکس دانشگاه توینینگن انجام شد. قبل از انجام کروماتوگرافی پروتئین‌ها در معرض تریپسین قرار گرفته و سپس تجزیه و تحلیل شدند.

تجزیه و تحلیل پروتئومیکس نتایج حاصل از LC-MS/MS

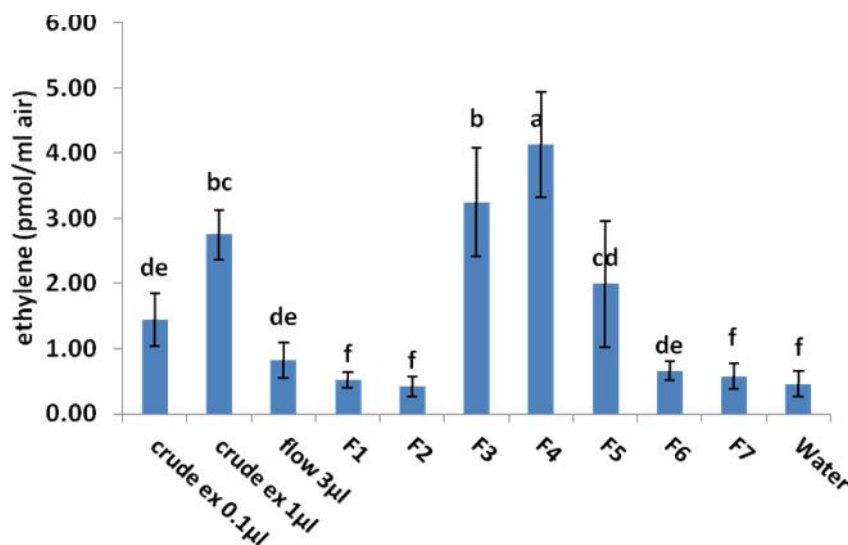
توالی‌های حاصل از LC-MS/MS برای یافتن توالی‌های هومولوگ در بانک ژن NCBI (GenBank) توسط ابزار بلاست

اتیلن گیاه مورد استفاده قرار گرفت. این تکنیک به عنوان یک مرحله غیر قابل اجتناب و به صورت موفقیت آمیزی در خالص سازی MAMP های مختلف به کار گرفته شده است (Thuerig *et al.*, 2006; Felix *et al.*, 1991; Basse *et al.*, 1992; Kunze *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010; Silva and Heath, 1997). همکاران (۱۹۹۱) از این روش برای توصیف فعالیتی شبیه به هارپین (Harpin like activity) از *Pseudomonas syringae* استفاده کردند و در طول پژوهش ها خود به صورت تصادفی فعالیت دیگری را شناسایی کردند که مربوط به تاژک باکتریایی بود.

خالص سازی پروتئین ها به کار می رود. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، از بین فراکسیونهای جمع آوری شده تنها سه فراکسیون فعالیت MAMP ی دارد و بیشترین قدرت فعالیت مربوط به فراکسیون های F3 و F4 می باشد. غلظت پروتئینی این فراکسیون ها به ترتیب ۵۱۶ و ۶۵۱ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد و هر کدام حاوی ۴۶۰۰ واحد MAMP ی بودند. فراکسیون های F3 و F4 برای انجام خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین (FPLC)

کروماتوگرافی تبادل یونی مهمترین تکنیکی بود که به صورت موفقیت آمیزی در پیش خالص سازی محرک فعال کننده

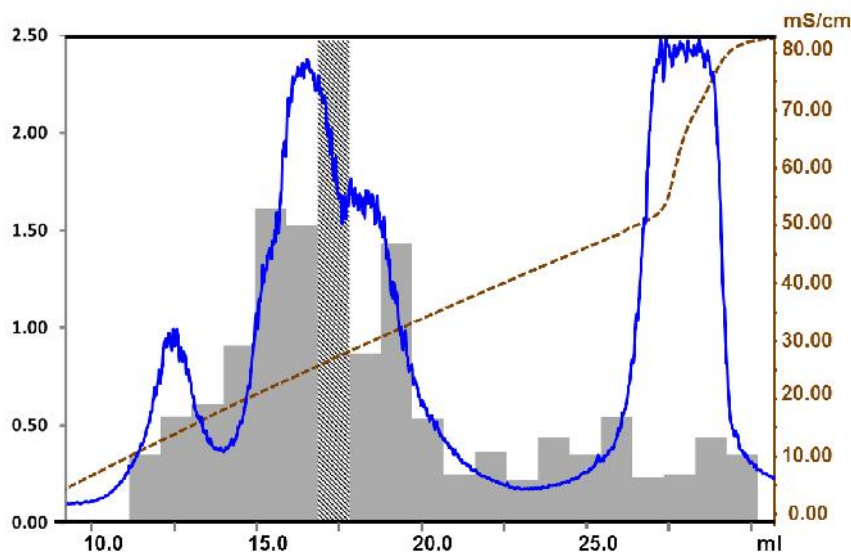


شکل ۱- کروماتوگرافی تبادل آنیونی دستی عصاره خام دیالیز شده Xcc با استفاده از رزینهای DEAE sephacel (۵۰ میلی لیتری) در ستون Econo-Column. بعد از متعادل کردن ستون مزبور با ۲۰ میلی مولار بافر تریس pH ۸، عصاره پروتئینی (۵۰ میلی لیتری به غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، pH ۸) بر روی ستون اعمال شد و پروتئین های متصل شده با غلظت های ۳۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی مولاری کلرید سدیم در بافر تریس شست و شو شد و در فرکسیون های ۱۴ میلی لیتری جمع آوری شده و میزان فعالیت محرکی آنها با آزمون تولید اتیلن بررسی شد. flow: فراکسیون های جمع آوری شده از ستون قبل از اعمال محلول کلرید سدیم، crude ex: عصاره خام پروتئینی

Figure 1. Manual anion exchange chromatography of Xcc crude protein extract with DEAE sephacel resin (50 ml) in Econo-Column. After equilibration of mentioned column with 20 mM tris buffer pH8, protein extract (50 ml with 2 mg/ml concentration, pH8) was applied on column, bonded proteins eluted with 350, 500, and 1000mMNaCl concentrations in tris buffer, gathered in 14 ml fractions and elicitor activity of them was estimated with ethylene production bioassay. flow: gathered fractions from column before sodium chloride solution application, crude ex: crude protein extract.

آزمون تولید اتیلن مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به شکل ۲ فراکسیون‌هایی که بعد از اعمال غلظت ۱۹ تا ۲۹ میلی زیمنس بر سانتی متر از ستون خارج شدند فعال بودند و حداکثر میزان فعالیت در فراکسیون مشاهده شد که با اعمال غلظت ۲۵ تا ۲۸ میلی زیمنس خارج شده بود (ستون حاشور خورده). این فراکسیون که دارای ۱۰۰۰۰ واحد MAMP بود با تکنیک MS/MS مورد ارزیابی قرار گرفت.

نمونه‌های پیش خالص شده توسط کروماتوگرافی مرحله‌ای برای خالص‌سازی بیشتر توسط دستگاه FPLC مجهز شده به ستون تبادل آنیونی Hitrap Q FF تجزیه و تحلیل شدند. پروتئین‌های متصل شده به ستون با اعمال شیب غلظت نمک کلرید سدیم شسته (elute) و توسط دستگاه جمع کننده (Fraction collector) در فراکسیون‌های (fractions) یک میلی‌لیتری جمع‌آوری و ۰/۱ میکرولیتر از این فراکسیون‌ها برای بررسی فعالیت MAMP با



شکل ۲- کروماتوگرافی تبادل آنیونی نمونه‌های نیمه خالص با دستگاه FPLC. بعد از تنظیم pH فراکسیون‌های بدست آمده از کروماتوگرافی دستی، بر روی ستون HitrapQ FF به حجم ۵ میلی‌لیتر اعمال شد و با اعمال شیب غلظت کلرید سدیم در مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، پروتئین‌های متصل شده در بخش‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و میزان فعالیت محرکی موجود در آنها با استفاده از آزمون تولید اتیلن اندازه‌گیری شد.

Figure 2. Anion exchange chromatography of semi purified sample by FPLC. Semi-purified protein solution was dialyzed against Tris buffer with pH8 and applied on Hitrap Q FF 5 ml column and bounded proteins were eluted by applying gradient concentration of NaCl in 15 min with 1 ml per minute. Eluted proteins were gathered in 1 ml fractions and their elicitor activity estimated by ethylene production bioassay.

شد که این توالی‌ها مربوط به پروتئین‌های با عملکرد نامشخص می‌باشند. علاوه بر این جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک هر کدام از موارد با ابزارهای مورد اشاره در روش‌ها محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، پروتئین‌های شناسایی شده دارای عملکردهای متنوعی می‌باشند که در باکتری‌های جنس *Xanthomonas* معمول هستند. در غالب موارد، نقطه ایزوالکتریک بین ۵/۵ تا ۶ و جرم مولکولی بین ۲۰ تا ۵۰ کیلو دالتون محاسبه شد. هر چند برای بعضی از پروتئین‌ها نقطه ایزوالکتریک بالای ۹ و جرم مولکولی بالای ۶۰ کیلو دالتون نیز

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از جرم سنجی متوالی

فراکسیون فعال حاصل از FPLC با تکنیک تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی مورد ارزیابی قرار گرفت و توالی‌های پپتیدی داخل آن تعیین، و شباهت این توالی‌ها در پایگاه‌های دانسته‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از بلاست پپتیدها در پایگاه‌های دانسته‌های، برای بیشتر پپتیدهای مورد بررسی عملکرد کاملاً مشخصی قابل شناسایی بود و تنها در ۹ مورد عملکرد مشخصی شناسایی نشد و تنها مشخص

محرك گزارش نشده است (Boller and Felix, 2009; Henry et al., 2012).

از بین سه کاندید اشاره شده در بالا، مورد شماره ۲ شناخته شده نبوده و تنها به عنوان یک پروتئین حفاظت شده از خانواده پروتئینی DUF1456 شناسایی گردید. این خانواده شامل چندین پروتئین باکتریایی است که هر کدام از حدود ۱۵۰ اسید آمینه تشکیل شده است و عملکرد هیچکدام از آنها شناخته نشده است (<http://pfam.xfam.org/family/PF07308.10>). با بررسی‌هایی که در ابزارهای SOSUI و PSORTB صورت گرفت مشخص شد که این پروتئین قابل حل در آب بوده و هیچگونه توالی مرتبط با غشاء های باکتری را ندارد و بنابراین به احتمال زیاد جزء پروتئین‌های سیتوپلاسمی محسوب می‌شود. برای تعیین ساختار سه بعدی این پروتئین از سرور Phyre2 استفاده شد (شکل ۳). ابزار مورد استفاده در این سرور چندین مدل بر اساس الگوهای مختلف ارائه کرد که یکی از مدل‌های ارائه شده که بیشترین شباهت را به پروتئین مورد بررسی ما داشت مربوط به مدل ارائه شده بر اساس یک پروتئین متصل شونده به DNA به نام ure3-bp بود. سطح اطمینان این مدل پایین بوده و در حد ۶۹ درصد می‌باشد (شکل ۳).

هر سه پروتئینی که در این بررسی به عنوان کاندید معرفی شدند اندازه کوچکی دارند و حفاظت شدگی بالایی در بین پروکاریوت‌ها دارند. این خصوصیات تا حد زیادی جزء خصوصیات عمومی MAMPها محسوب می‌شود (Boller and Felix, 2009). از سویی دیگر همانطور که اشاره شد، این پروتئین‌ها از لحاظ جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک نیز مشابه بخش فعال پروتئوم *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشند. بنابراین با احتمال بسیار بالایی می‌توان نتیجه گیری کرد که یک، دو و یا هر سه این پروتئین‌ها مسئول خاصیت محرکی پروتئوم این باکتری می‌باشند. با این وجود برای اثبات این پروتئین‌ها به عنوان MAMP جدید باید ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها کلون شوند و بعد از بیان آنها در ای. کولای، خاصیت محرکی آنها بر روی آراییدوپسیس بررسی شود. با شناخت کامل این محرکها و گیرنده‌های آنها می‌توان این سیستم شناسایی را از گیاه

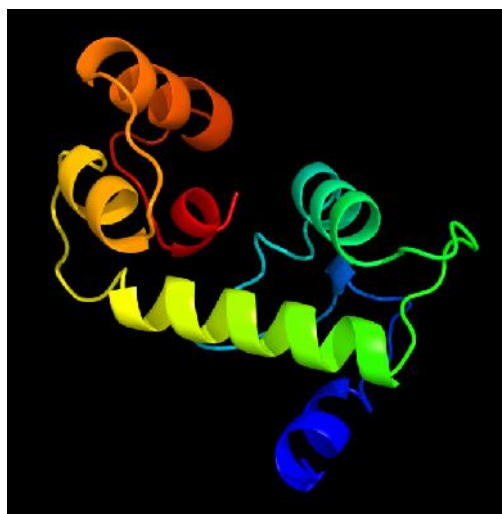
محاسبه شد. در بررسی‌های پیشین جرم مولکولی اصلی‌ترین عامل القاء کننده تولید اتیلن در پروتئوم باکتریهای جنس *Xanthomonas* در حدود ۱۰ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک آن در حدود ۸ تعیین شده بود (فلاحزاده، ۱۳۹۲). با نگاهی به جدول ۱ می‌توان به راحتی بسیاری از موارد شناسایی شده را غربال کرد چرا که از بین این لیست تنها سه مورد از پروتئین‌ها دارای جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک ذکر شده هستند (موارد ۲، ۱۲ و ۲۱) و به عبارتی می‌توان آنها را به عنوان کاندید القاء کننده اتیلن معرفی کرد.

توصیف خصوصیات کاندیدهای معرفی شده

یکی از کاندیدهای معرفی شده در این بررسی پروتئین CspA می‌باشد که وزن مولکولی آن در حدود ۸ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۱۲ است. این پروتئین کوچک یکی از مهمترین پروتئین‌هایی است که در هنگام اعمال شوک سرمایی در باکتریها تولید می‌شود به طوری که ۱۰ درصد کل پروتئین‌های سنتز شده در باکتری‌ها بعد از اعمال شوک را تشکیل می‌دهد (Goldstein et al., 1990). پروتئین CspA از ۷۱ اسید آمینه تشکیل شده است که توالی آن با دمین شوک سرمایی خانواده پروتئینی جعبه Y در یوکاریوتها ۴۳ درصد تشابه نشان می‌دهد (Wolffe, 1994). در بررسی‌های اولیه پروتئین شوک سرمایی cspA به عنوان یک محرک غالب در القای تولید اتیلن معرفی شد (فلاحزاده، ۱۳۹۲) اما در بررسی‌های تکمیلی مشخص شد که این پروتئین بر روی توتون به شدت فعال است و در صورتی که بر روی آراییدوپسیس هیچگونه فعالیتی ندارد (Martin Lipschis, unpublished data).

پروتئین کاندید دیگر CsrA می‌باشد که در واقع جزء مرکزی سیستم تنظیمی عمومی (Global regulatory system) Csr در باکتری‌هاست که مسئول کاهش بیان ژنهای مختلف فاز سکون می‌باشد (Gutierrez et al., 2005). با انجام بلاست در سایت NCBI شباهت توالی این پروتئین با پروتئین CsrA در باکتری *Escherichia coli* به میزان ۹۰ درصد و در جنس *Bacillus* در حدود ۴۵ درصد تعیین شد و می‌توان گفت این پروتئین جزء پروتئین‌های حفاظت شده است. این پروتئین تا به حال به عنوان

آراییدوپسیس به مرکبات منتقل کرد و ارقامی با مقاومت کامل نسبت به بیماری شانکر مرکبات ایجاد کرد.



شکل ۳- ساختار سه بعدی ارائه شده توسط سرور Phyre2 برای پروتئین فرضی شماره دو.

Figure 3. Three dimensional structure of hypothetical protein number 2 by Phyre2 server.

جدول ۱. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل طیف سنجی جرمی متوالی و خصوصیات پروتئین‌های شناسایی شده.

Table 1. Results from tandem mass spectrometry analysis and identified proteins

	Protein Descriptions	Intensity	Sequence Coverage	pI	Mol. Weight [kDa]
1	ssb single-stranded DNA binding protein	185300000	54.4	5.48	19.096
2	conserved hypothetical protein	20404000	33.8	7.82	17.855
3	conserved hypothetical protein	21690000	31.9	7.91	27.393
4	conserved hypothetical protein	16636000	31.8	9.51	17.113
5	mdh malate dehydrogenase	1081500000	31.7	5.52	34.935
6	groEL 60kDa chaperonin	135710000	28.2	5.01	57.184
7	groEL 60 kDa chaperonin	32560000	26.2	5.05	57.166
8	pdxHpyridoxamine 5-phosphate oxidase	55075000	21.6	6.44	22.2
9	osm Cosmotically inducible protein	7476200	19.4	5.6	15.371
10	purEphosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	2048100	14.4	6.39	17.097
11	sodMsuperoxidase dismutase	2555000	14.3	5.46	22.717
12	cspA major cold shock protein	2875600	14.1	8.12	7.9449
13	kdsA 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	2216200	13.8	5.87	29.755
14	PqqC protein	16708000	13.6	6.67	28.234
15	conserved hypothetical protein	14219000	12.7	5.34	43.848
16	conserved hypothetical protein	7481800	12.6	9.15	21.417
17	pcnB polynucleotide adenylyltransferase	19147000	12.3	8.89	51.034
18	eda KDPG and KHG aldolase	6572900	11	6.32	22.774
19	pnp polynucleotide phosphorylase	43356000	10.8	5.46	75.434
20	atoBacetoacetyl-CoA thiolase	22552000	10	6.08	39.847

21	csrA carbon storage regulator	7686100	10	6.25	7.5655
22	gvpU gas vesicle protein	3833900	10	4.85	14.139
23	conserved hypothetical protein	2669100	9.9	5.44	17.434
24	gltA citrate synthase	7706800	9.8	5.98	47.832
25	tolBTolB protein	2754500	9.8	9.2	47.034
26	pykA pyruvate kinase	26389000	9.6	5.45	52.21
27	gumLGumL protein	1595800	9.5	6.38	29.376
28	conserved hypothetical protein	1305400	9.4	7.79	23.73
29	acdA acyl-CoA dehydrogenase	1091300	9	5.89	41.503
30	phdBdihydrolipoamideacetyltransferase	27981000	8.9	5.07	59.791
31	dnaKDnaK protein	12167000	8.9	4.99	68.836
32	hydrolase	4487200	8.9	5.17	24.258
33	crt 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	2429200	8.8	6.44	27.648
34	rpoB RNA polymerase beta subunit	30576000	8.7	5.46	154.2
35	tufA elongation factor Tu	5226600	8.1	5.45	43.185
36	fadE9 acyl-CoA dehydrogenase	2609000	8.1	5.96	42.356
37	rpoB RNA polymerase beta subunit	1102300	8.1	5.35	154.9
38	tolBTolB protein	3303900	7.7	9.3	47.056
39	rplT 50S ribosomal protein L20	1289700	7.6	11.74	13.373
40	crt 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	17537000	7.3	5.99	27.588
41	nerA GTN reductase	16462000	6.8	5.35	39.407
42	rpfNRpfn protein	1742100	6.3	6.07	41.13
43	ggt gamma-glutamyltranspeptidase	16491000	6.1	6.48	62.711
44	alcohol dehydrogenase	9970800	6	6.3	34.912
45	DNA-binding related protein	1499800	6	5.72	20.37
46	purAadenylosuccinatesynthetas	4962500	5.8	5.56	46.163
47	odhAoxoglutarate dehydrogenase	12898000	5.7	5.97	104.42
48	zwf glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	36378000	5.5	9.91	70.995
49	CoA transferase	1689800	5	5.59	55.008
50	pepAaminopeptidase A/I	4634000	4.7	5.18	51.181
51	bioA adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	3183200	4.4	6.01	51.508
52	accC biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase	1119500	4.4	6.95	49.435
53	lig1 DNA ligase	4924800	4.2	5.57	90.483
54	conserved hypothetical protein	2950800	4.1	5.88	24.068
55	pgi glucose-6-phosphate isomerase	2789200	4	5.75	54.176
56	folPdihydropteroate synthase	1319600	4	5.86	31.861
57	aceE pyruvate dehydrogenase	2808400	3.5	5.77	99.758
58	bioA adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	6634100	3.4	6.11	51.303
59	prc tail-specific protease	1268300	3.4	5.64	79.988
60	conserved hypothetical protein	6544800	3.3	6.92	29.45
61	deoD purine nucleoside phosphorylase	2781500	3.2	5.79	26.216
62	rneribonuclease E	1069300	3.2	5.59	128.31

منابع

- Agrios GN. 2005.** Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. USA.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. 2002.** MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983.
- Ashkan SM. 2009.** Handbook of froot trees disease in Iran. Ayizj press. Iran. (In persian).
- Basse CW, Bock K, Boller T. 1992.** Purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan suppressors generated by enzymatic cleavage of yeast invertase. *The Journal of biological chemistry*. 267: 10258-10265.
- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Reveiws of Plant Biology* 60:379-406.
- Brutus A, Yang HS. 2010.** Broad-spectrum defense against plant pathogens. *Nature Biotechnology* 28: 330-331
- D'Silva I, Heath MC. 1997.** Purification and characterization of two novel hypersensitive response-inducing specific elicitors produced by the cowpea rust fungus. *The journal of biological chemistry* 272 (7): 3924-3927.
- Fallahzadeh-Mamaghani V. 2012.** Iteraction of *Xanthomonas axonopodis* elicitor with the receptor like protein from *Arabidopsis thaliana* and its role in the induction of plant resistance. Doctorial thesis, University of Tehran. (In persian)
- Felix G, Duran JD, Volko S., Boller T. 1999.** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18: 265-276
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW, Boller T. 1991.** Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiology* 97:19-25.
- Goldstein J, Pollotte NS, Inouye M. 1990.** Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7322-7326.
- Gutierrez P, Li Y, Osborne MJ, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K. 2005.** Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 10(189): 3496-3501.
- Henry G, Thonart P, Ongena M. 2012.** PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the Diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16(2): 257-268
- Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G. 2013.** The receptor-like protein ReMAX of *Arabidopsis thaliana* detects the novel MAMP emax from *Xanthomonas*. 25: 2330-2340.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. 2004.** The N terminus of bacterial Elongation Factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16, 3496-3507.
- Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, DeVera ME, Liang X, Tör, M, Billiar T. 2007.** The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews* 220:60-81.
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G., Freymark G, Miersch O. 2005.** Ethylene-mediated cross-talkbetween calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10736-41.
- Mackey D, McFall AJ. 2006.** MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innateimmunity. *Molcular Microbiology* 61: 1365-71.
- Thuerig B, Felix G, Binder A, Boller T, Tamm L. 2006.** An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 180-193.
- Wolffe AP. 1994.** Structural and functional properties of the evolutionary ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 16:245±251.
- Yunhua Zhang, Xiufen Yang, Quan Liu, DewenQiu, YuliangZhang, Hongmei Zeng, Jingjing Yuan, Jianjun Mao 2010.** Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiological Research* 165: 142-151
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X. 2010.** Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* 7: 290-301.
- Zipfel C. 2006.** Receptor-like kinases and pathogen-associated molecular patterns perception in *Arabidopsis*. Doctorial thesis, University of Basel.

Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

Assistant Professor of Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email: fallahzadeh@azaruniv.edu

ABSTRACT

Extensive research is currently going on in different research centers of the world to find new elicitors from microorganisms and their related receptors from different plants. Comprehensive knowledge about these elicitors and their cognate receptors could be used for development of transgenic plants displaying resistant against plant pathogens. As a crude protein extract of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) has strong elicitor activity on *Arabidopsis*, in this study protein extracts of this bacterium were prepared and fractionated and a semi-purified sample displaying elicitor activity was analyzed by LC-MS/MS. About 60 different proteins were detected in the analyzed sample. Among the detected proteins, only three were similar to the elicitor activity observed in a protein extract of Xcc bacterium: cspA (cold shock protein A), csrA (carbon storage regulator protein A) and an unknown conserved hypothetical protein from the DUF1456 protein family. This protein is soluble in water and it has no bacterium membrane-targeting sequence as determined by PSORTB and SOSUI analysis, suggesting with high probability that it is a cytoplasmic protein.

Key Words

Arabidopsis, Elicitor, Ethylene, Proteome, *Xanthomonas*

بررسی بیوانفورماتیکی ژن مقاومت به سویه آسیایی باکتری عامل بیماری میوه سبز مرکبات در گیاه گریپ فروت

مسعود توحید فر^۱ و مریم غایب زمهریر^{۲*}

Isolation, cloning and bioinformatic study of a resistance gene against an Asian strain of citrus greening librobacter in grapefruit plant

Masoud Tohidfar¹ and Maryam Ghayeb Zamharir²

- ۱- گروه بیوتکنولوژی دانشکده فن آوری های نوین و مهندسی انرژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی - تهران، ایران

1. Biotechnology group, Department of New Technology and Energy Engeneer, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.
2. Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Tehran, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zamharir2005@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۴)

چکیده

بیماری میوه سبز مرکبات از جمله مهم ترین بیماری های باکتریایی مرکبات در مناطق جنوبی کشور است. با توجه به ماهیت بیماری، استفاده از ارقام مقاوم مناسب ترین راه کار در جهت مبارزه با این بیماری است. اخیراً، مطالعه جامع برهمکنش میزبان-پاتوژن و شناسایی ژن های دخیل در این برهمکنش، نشان داد که در گریپ فروت متحمل به این بیماری، بیان یک ژن آنالوگ مقاومت متعلق به خانواده Nucleotide Binding Site- Leucien-Rich Repeats (NBS-LRR) با آغازگرهای اختصاصی از گریپ-افزایش می یابد. در این تحقیق جداسازی ژن (NBS552) با آغازگرهای اختصاصی از گریپ-فروت به روش PCR صورت گرفت و در پلاسمید pGEM-T همسانه سازی شد. آنالیز توالی یابی نشان داد که چارچوب بازخوانی این ژن ۱۷۱ جفت باز است و پروتئین با طول ۵۷ اسید آمینه را کد می کند. نتایج بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن در بین گونه های گیاهی دارای توالی های حفاظتی بالایی است و احتمالاً ترشح پروتئین NBS552 در غشاء پلاسمایی و ترشح خارج سلولی آن ناچیز است. هدف این مطالعه جداسازی و همسانه سازی ژن NBS552 از ژنوم گیاه گریپ فروت و تعیین مشخصات آن به منظور استفاده کاربردی در گیاهان است.

واژه های کلیدی

گریپ فروت
NBS552
میوه سبز مرکبات
مقاومت

مقدمه

به دلیل ماهیت این عامل بیماریزا، کنترل بیماری مشکل بوده و در حال حاضر استراتژی کارآمد برای کنترل بیماری‌های ناشی از فایتوپلاسماها و لیبروباکترها استفاده از گیاهان مقاوم است. به منظور دستیابی به ارقام مقاوم و منابع ژنتیکی مقاومت، درک مکانیسم مولکولی فعل و انفعالات مربوط به برهمکنش میزبان-پاتوژن آنالیزهای cDNA-AFLP در گریپ فروت مایه‌زنی شده با باکتری عامل میوه سبز مرکبات انجام شد. نتایج بررسی نشان می‌دهد که بیان یک ژن متعلق به خانواده NBS LRR با نام اختصاری NBS552 در گیاهان گریپ فروت مایه‌زنی شده با عامل بیماری میوه‌سبز مرکبات افزایش می‌یابد (Gholampour et al. 2014). NBS552، هومولوژی بالایی با ژن مقاومت در برابر Citrus Tristeza Virus (Ctv) که ژنی منفرد و غالب در *Poncirus trifoliata* است، دارد (Mariângela et al. 2007). بیماری تریتستیزای مرکبات از چند جهت مشابه با میوه‌سبز مرکبات است. با توجه به اینکه عامل تریتستیزا نیز محدود به آوند آبکشی است و نیز انتقال آن توسط حشره ناقل صورت می‌گیرد، همچنین در علائم ایجاد شده توسط عامل بیماری نیز تشابهاتی مشاهده می‌شود (Sagheer et al. 2012)، مطالعه بیشتر این ژن ضروری است. پیشرفت عمده در جهت درک وقایع مولکولی که منجر به مقاومت گیاهان به بیماری‌ها می‌شود، اتفاق افتاده است. جالب توجه است که، با توجه به اختصاصی بودن این ژن‌ها، تقریباً تمام ژن‌های R که تا این تاریخ شناسایی شده‌اند، کد کننده پلی‌پپتیدهایی است که قسمتی از آن‌ها مشابه است و باعث تقسم بندی ژن‌های R داخل پنج گروه عمده می‌شود (Lawrence et al. 2000).

Ctv به عنوان ژنی غالب در گروه ژنی NBS-LRR مقاومت گسترده‌ای به عامل CTV در *Poncirus trifoliata* ایجاد می‌کند (Mariângela et al. 2007). همچنین نتایج بررسی در پایگاه داده مرکبات (CitEST database) نشان می‌دهد که حضور ژن Ctv در گونه‌های مختلف مرکبات آلوده به پاتوژن *Xylella fastidiosa* عامل ایجاد مقاومت در برابر آن پاتوژن بوده است (Simone and Helaine 2007).

مطالعات بر روی ژن‌های آنالوگ مقاومت در خانواده NBS-LRR در ارقام مختلف مرکبات، نشان داد که بیان ژن NBS552 در

مرکبات در ایران از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است و ایران از نظر تولید مرکبات در جهان در رتبه هشتم قرار دارد (FAO 2013). در سال‌های اخیر بیماری میوه سبز مرکبات یا (HLB) huanglongbing از جنوب ایران گزارش شد (Salehi et al. 2010). ولی خسارت آن در ایران هنوز تعیین نشده است. عامل بیماری یک باکتری گرم منفی سخت کشت و محدود به آوند آبکشی (PLB) است (Ute and Kim 2008). این باکتری بیرون از سلول‌های میزبان زنده نمی‌ماند، به همین دلیل مطالعه آن مشکل است. از نظر تاکسونومی این باکتری در خانواده Phyllobacteriaceae قرار دارد. نام علمی جنس آن *Candidatus Liberibacter* است که بر اساس پراکنش جغرافیایی سه گونه *Ca. L. americanus*، *Ca. L. africanus* و *Ca. L. asiaticus* از آن گزارش شده است (Bove 2006). دو گونه از پسپل مرکبات *Diaphorina citri* Kuwayama (پسپل آسیایی) و *erytrae* Del Guerico (پسپل آفریقایی) توانایی انتقال پاتوژن میوه سبز را دارند (Bove 2006).

براساس مطالعات انجام شده عامل بیماری میوه سبز مرکبات در ایران از فرم آسیایی است. بر اساس وجود پسپل آسیایی مرکبات و با استفاده از روش‌های تشخیص علائم بیماری در مرکبات، انتقال بیماری با پیوند، ردیابی عامل بیماری در بدن پسپل مرکبات و همچنین درختان پرتقال و نارنگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فرم آسیایی، در سال ۱۳۸۸ این بیماری در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (Salehi et al. 2012). نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد گونه *Citrus grandis* (سلطان مرکبات) دارای تحمل نسبی و گونه‌های *C. reticulate* (نارنگی) و *C. sinensis* (پرتقال) دارای حساسیت فراوان در برابر این بیماری می‌باشند (Hajivand et al. 2009). همچنین مشخص شده است که گریپ فروت و لیموترش (*C. aurantifolia*) جزو ارقام متحمل محسوب می‌شوند (Ute and Kim 2008).



شکل ۱- مایه زنی گریپ فروت با پیوندک‌ها آلوده به عامل میوه سبز مرکبات در شرایط گلخانه

Fig 1- Grapfruit inoculation by grafting with citrus greening agent in greenhouse

پس از ورتکس کردن ویال‌ها، نمونه‌ها در دمای 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. به این محلول $500\text{ }\mu\text{l}$ آب مقطر استریل و $170\text{ }\mu\text{l}$ نمک لیتیم کلراید 8 M اضافه شد. تیوب‌ها چند بار با دست معکوس کرده تا محلول‌ها با هم مخلوط شوند. میکروتیوب‌ها ۳-۵ ساعت در دمای 4°C در یخچال نگهداری شدند و پس از آن در دمای 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در $500\text{ }\mu\text{l}$ آب فوق خالص حل شده و $170\text{ }\mu\text{l}$ نمک لیتیم کلراید 8 M به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها مجدد ۳-۵ ساعت در دمای 4°C در یخچال نگهداری و سپس در دمای 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در $300\text{ }\mu\text{l}$ آب فوق خالص حل شد و $30\text{ }\mu\text{l}$ نمک استات سدیم 10 M و $600\text{ }\mu\text{l}$ الکل اتانول خالص که در فریزر خنک شده بود به آن اضافه و یک ساعت در دمای -50°C نگهداری شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن میکروتیوب‌ها در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. پلیت تشکیل شده را با اتانول $(\text{v/v}) 80\%$ شسته و در دمای 4°C با سرعت 13000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. بعد از دور ریختن مایع رویی، رسوب تشکیل شده در دمای 37°C خشک شد. به هر نمونه $25\text{ }\mu\text{l}$ آب مقطر استریل اضافه نموده و پس از حل شدن رسوب در آب نمونه‌ها برای انجام

مرکبات متحمل مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات افزایش می‌یابد و در ارقام مرکبات حساس این ژن بیان نمی‌شود (Ghayeb Zamharir *et al.* 2014). از آنجایی که اطلاعات کمی در مورد این خانواده ژنی و ساختار و عملکرد آن در دست است، هدف این تحقیق جداسازی، تعیین ویژگی‌های توالی کاندید (NBS552) در مقاومت به باکتری عامل میوه سبز مرکبات، ترسیم ساختارهای پروتئینی و پیش‌بینی عملکرد و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است.

مواد و روشها

تهیه نهال گیاهان گریپ فروت: نهال‌های گریپ‌فروت از نهالستان‌های جیرفت تهیه شد. نهال‌ها دارای گواهی سلامت از سازمان حفظ نباتات و فاقد علائم بیماری‌های قارچی و باکتریایی بودند. نهال‌ها پس از انتقال به گلخانه قرنطینه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، در خاک سبک کشت شده و در دمای 20°C -۱۸ و در نسبت روشنایی ۸:۱۶ ساعت با مقدار نور طبیعی قرار داده شدند. پس از استقرار نهال‌ها، نهال‌های با قطر مناسب با پیوندک آلوده (که از درختان علائم‌دار در جیرفت تهیه و با روش‌های مولکولی آلودگی آنها به عامل میوه سبز مرکبات تایید شده بود)، مایه‌زنی شدند (شکل ۱) پس از گذشت ۴ ماه، استخراج RNA ژنومی روی چهار نهال سالم و چهار نهال پیوندی با پیوندک آلوده انجام شد. آلودگی در نهال‌های پیوندی با روش‌های مولکولی تایید شد.

جداسازی RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Song *et al.* 2011). در این روش $800\text{ }\mu\text{l}$ بافر CTAB دو درصد به نمونه‌های پودر شده برگ که از گیاهان گریپ‌فروت سالم و مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات تهیه شده بود اضافه و ویال‌ها ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C نگه داشته و سپس به آن‌ها $600\text{ }\mu\text{l}$ کلروفرم-ایزواکیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد

آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند. پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷°C، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب و در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سه نمونه برای توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال شد.

آنالیزهای تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی: با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و BLAST، توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن NBS552 در گریپ‌فروت و چندین گونه دیگر به همراه سایر ویژه‌گی‌ها (ویژگی‌های توالی‌های مورد بررسی از جمله طول mRNA، cDNA، تعداد اگزون و اینترون طول پروتئین و شماره دسترسی توالی‌ها) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌ردیفی مقایسه‌ای ژن کلون شده در وکتور pGEM-T با سایر گیاهان موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW انجام شد. بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از NBS552 و انواع ژن‌های NBS با استفاده از نرم افزار MEGA4 به روش UPGMA انجام شد. به منظور تایید صحت و اعتبار درخت‌های حاصل تست BootStrap با ۱۰۰ تکرار صورت گرفت.

تعیین مشخصات و شناسایی دومین‌های پروتئین: توالی پروتئینی با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئینی و UniProtKB تعیین شد. برای شناسایی دومین‌های پروتئینی از بانک اطلاعاتی ثانویه Blouks و CDD استفاده شد. تعیین قسمت‌های درون، خارج سلولی و غشائی پروتئین با استفاده از برنامه TMHMM صورت گرفت.

تعیین ساختار و محل عملکرد پروتئین: برای تعیین ساختارهای اول و دوم پروتئین از برنامه‌های Uniprot B، PSIPred و برای تعیین محل عملکرد آن از بانک PSORT PROTEIN استفاده شد. به منظور مشخص کردن توالی‌های کد کننده و سایر توالی‌های جانبی آن، آنالیز توالی و مستند سازی (Annotation) آن‌ها با استفاده از نرم افزار Vector NTi انجام شد.

آزمایشات بعدی در ۸۰°C - نگهداری شدند. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت first strand synthesis system (promega, USA) انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR: بر اساس مطالعات cDNA-AFLP بر روی گریپ‌فروت مایه‌زنی شده با عامل میوه‌سبز مرکبات مشخص شد که رونوشت شماره ۵۵۲ در مطالعات ترانسکریپتومیکس که در این مطالعه NBS552 نامیده می‌شود، همولوژی بالایی با ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در خانواده NBS-LRR دارد (Gholampour et al., 2014). آغازگرهای مختلف به منظور جداسازی ژن NBS552 از روی توالی رونوشت ۵۵۲ حاصل از مطالعات cDNA-AFLP طراحی شد. از جمله مناسب-ترین آنها، آغازگر 3'-CGGGGCGTCTAACTCATAGA-5' به عنوان آغازگر روبه‌جلو و توالی 5'-GGGGAAAGACAACCTTGGA-3' به عنوان آغازگر برگشتی در نظر گرفته شدند. از cDNA سنتز شده در مرحله قبل به عنوان الگوی تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. برنامه‌ی انجام PCR شامل واسرشتگی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴°C و انجام ۳۵ چرخه متوالی (۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۵۸°C به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه) انجام شد. این آغازگر قطعه‌ای به طول ۲۲۰ bp را در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر می‌کند.

همسانه سازی در وکتور pGEM-T: بعد از تکثیر ژن توسط PCR و خالص‌سازی آن به روش لئونارد و همکاران (Leonard et al., 1998)، عمل اتصال بین ژن و پلاسمید pGEM-T easy vector system I، محصول شرکت پرومگا (آمریکا) صورت گرفت. پلاسمید pGEM-T شامل پروموتورهای T7 و SP6 در طرفین ناحیه‌ی سایت برشی (MCS) است و ژن انتخاب-گر آن برای گزینش *E. coli* ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. همچنین کاست ژنی حاوی β -گلوکورونیداز تحت پروموتورهای SP6 و T7 در طرفین سایت برشی اختصاصی (MCS) جهت گزینش به روش کلونی سفید و آبی وجود دارد. پس از الحاق قطعه به پلاسمید و ایجاد پلاسمید نوترکیب، ترانسفورماسیون به وسیله‌ی شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد Top10 انجام شد. در مرحله‌ی بعد باکتری‌ها روی محیط LB جامد حاوی

نتایج

پس از استخراج RNA از گیاه گریپ فروت سالم و مایه زنی شده با پیوندک آلوده به عامل میوه سبز مرکبات و سنتز cDNA، PCR به منظور تکثیر ژن NBS552 با استفاده از آغازگرها انجام شد. محصول PCR یک باند ۲۲۰ جفت بازی روی ژل آگارز نشان داد (شکل ۲). پس از خالص سازی، باند مورد نظر برای تعیین توالی با دو آغازگر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال شد و نمونه‌ها با دستگاه Automatic Sequencer 3730 XL تعیین ترادف شدند. آنالیز بلاست با استفاده از برنامه NCBI نشان داد که توالی مورد نظر ۹۴٪ شباهت را با ژن مقاومت به ویروس *Poncirus trifoliata citrus tristeza* دارد. در واقع این ژن قطعه‌ای از منطقه ژنوم *Citrus trifoliata* است که در مقاومت به ویروس نقش دارد. آنالیزهای بیشتر با استفاده از برنامه Vector NTi نشان داد که ۲۲۰ جفت باز از توالی ما بطور کامل با این منطقه از ژنوم شباهت صددرصدی دارد که از این میان ۱۷۱ جفت باز آن دارای ORF است که تاکنون گزارش نشده است (شکل ۳A).

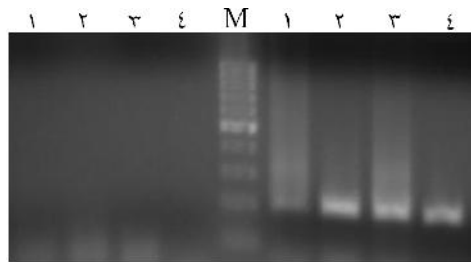
به منظور بررسی بیشتر وضعیت ژنوم، در حدود ۱۰۰۰ جفت باز از دو طرف ژن بررسی شد که نتایج نشان داد در این منطقه از ژنوم تاکنون فقط برای سه ناحیه (Misc Feature1, Misc Feature2, Misc Feature3) مستند سازی انجام شده است (شکل ۳B). لازم است آنالیزهای بیشتر برای نقش عملکردی این مناطق انجام شود. آنالیزهای مستندسازی نشان داد که این ژن بدون ایترون بوده و فقط بصورت یک اگزون عمل می‌کند. آنالیز عملکردی با استفاده از ترجمه پروتئین نشان داد که این ژن احتمالا بصورت یک گیرنده عمل می‌کند.

نتایج هم‌ردیفی با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW نشان داد که این ژن حفاظت شدگی بالایی به طول حدود ۵۰ جفت باز را در گیاهان مختلف نشان می‌دهد. دلیل اصلی تفاوت را می‌توان به تفاوت بین گونه‌ای و جهش‌های احتمالی در طول تکامل نسبت داد (Matsuba et al. 2013) (شکل ۳C).

به منظور بررسی روابط تکاملی بین گیاهان از نظر توالی مورد نظر درخت فیلوژنی رسم شد، تا میزان شباهت آنها با سایر گیاهان موجود در پایگاه بررسی شود. با توجه به اینکه ژنوم جانداران حجم گسترده‌ای از اطلاعات را در خود دارد و بررسی تمام این توالی‌ها بسیار دشوار است، معمولا از توالی‌های استفاده می‌شود که در موجودات هومولوگ باشد. ترسیم درخت فیلوژنی چهار گروه را ایجاد کرد (شکل ۵ بالا) گروه اول شامل *Poncirus trifoliata*, *Daucus carota*, *Vaccinium macrocarpon* است، که بیشترین شباهت با ژن مذکور مربوط به گیاه *Vaccinium* است. اگر چه این سه گیاه از خانواده‌های مختلفی هستند، این ژن در گونه‌های مختلف وجود دارد. گروه دوم فقط شامل گیاه *Geranium maderence* است که بصورت جداگانه از بقیه گروه‌ها قرار گرفته است. گروه سوم شامل *Gossypium*, *Rhazya stric* و *Helianthus annuus* است که متعلق به خانواده‌های مختلف است. در نهایت گروه چهارم که دورترین گروه نسبت به ژن مورد نظر است شامل *Oenothera bertian* است که کمترین شباهت را با ژن مورد نظر دارد. نکته حائز اهمیت در این درخت وجود ژن مورد نظر در خانواده‌های مختلف با عملکرد یکسان است که نشان می‌دهد این ژن می‌تواند نقش کلیدی در گیاه داشته باشد و همین باعث شد تا بصورت حفاظت شده در گونه‌های مختلف در طول تکامل حفظ شود.

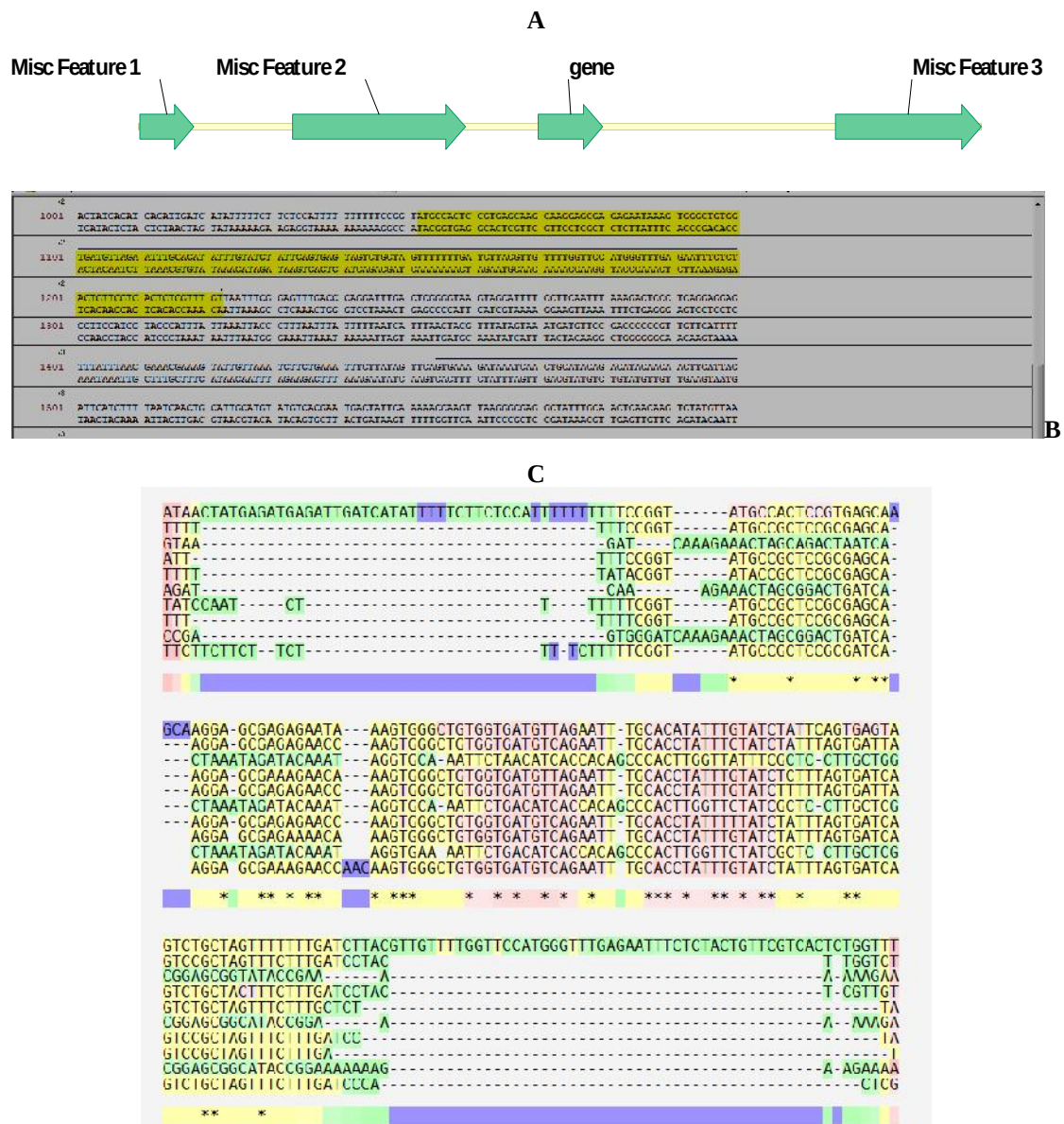
بررسی ساختار دوم پروتئین ژن کلون شده با استفاده از PSIPred نشان داد که این پروتئین فقط از مارپیچ α تشکیل شده است (شکل ۵ پایین).

خصوصیات پروتئین و دومین‌های آن: خصوصیات فیزیکی شیمیایی پروتئین ژن توالی‌یابی شده نشان داد که پروتئین مورد نظر دارای ۵۷ اسید آمینه با وزن ملکولی ۶۵۶۱ دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۹/۱ است. این پروتئین با فرمول شیمیایی C3132H4808N796O925S18 و شاخص ناپایداری (بیانگر میزان پایداری در لوله آزمایش) برابر با ۴۹/۵ است. نیمه عمر این پروتئین به صورت بیوانفورماتیکی در شرایط درون شیشه‌ای حدود ۳۰ ساعت در یوکاریوت‌ها تخمین زده می‌شود که این نیز دلیل دیگری بر پایداری پروتئین است.



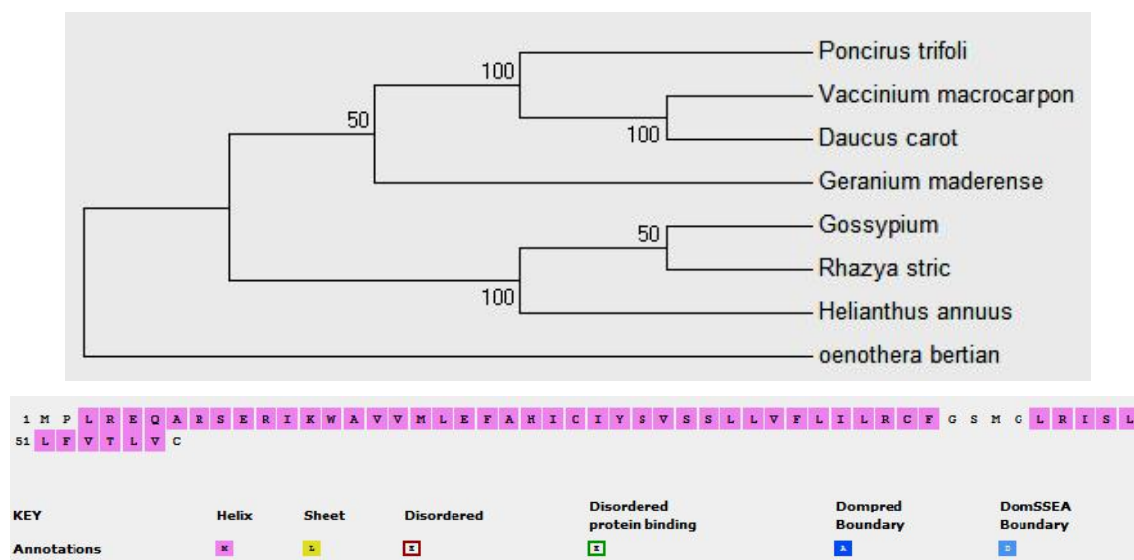
شکل ۲- تکثیر ژن NBS552 از روی cDNA حاصل از گیاهان آلوده گریپ فروت (چاهک انا ۴ در سمت راست مارکر)، گیاهان سالم (چاهک انا ۴ در سمت چپ مارکر) و M سایز مارکر 100 bp (فرمتاز).

Fig 2- NBS552 amplification from infected grapefruit plant cDNA (wells 1-4 at left of marker), healthy one (wells 1-4 at right of marker) and M: DNA 100 bp size marker (Fermentase).



شکل ۳- **A:** توالی ORF به طول ۱۷۱ جفت باز، **B:** نقشه فیزیکی ژن NBS552 با سایر مناطق ژنوم بعد از مستند سازی شده و **C:** همردیفی مقایسه‌ای ژن کلون شده در وکتور pGEM-T با *Poncirus trifoliata* (AF5a06028.1), *Gossypium raimondii* (KU317325.1), *Vaccinium macrocarpon* (KF386162.1), *Daucus carota* (AJ300556.1), *Geranium maderense* (KP940515.1), *Rhazya stricta* (KJ485850.1), *Helianthus annuus* and *Oenothera* T-Coffe.

Fig 3- A: ORF sequence include of 171 bp, **B:** Physical map of NBS552 Gene with other genome regions after annotation and **C:** Comparative alignment of cloned gene into the vector pGEM-T with *Poncirus trifoliata* (AF5a06028.1), *Gossypium raimondii* (KU317325.1), *Vaccinium macrocarpon* (KF386162.1), *Daucus carota* (AJ300556.1), *Geranium maderense* (KP940515.1), *Rhazya stricta* (KJ485850.1), *Helianthus annuus* and *Oenothera* sequence in the NCBI using T-Coffe.



شکل ۵- بالا: درخت فیلوژنتیکی توالی همسانه شده با سایر ژن‌های همتای خود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.

پایین: ساختار دوم پروتئین ژن NBS552 جدا شده از گریفروت ایرانی با استفاده از PSIPred

Fig 5- Up: Phylogenetic tree of cloning sequence with different similar genes in NCBI database using MEGA4 software,

Down: Structure of second protein structure of NBS552 gene isolated from Iranian grapefruit using PSIPred

بحث و نتیجه گیری

با در نظر گرفتن خسارت بیماری‌های باکتریایی، اهمیت شناسایی و آنالیز ژن‌های مقاوم به پاتوژن‌های باکتریایی در کشاورزی حائز اهمیت است. با توجه به خسارت بالای بیماری‌های باکتریایی در باغبانی تولید گیاهان تراریخته متحمل از طریق انتقال ژن می‌تواند منجر به افزایش تولیدات، کاهش مصرف سم و رسیدن به راندمان مطلوب تولید آن در واحد سطح شود.

بیماری میوه سبز مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در ایران است (Salehi et al. 2010). ولی با توجه به آن- که ناقل این بیماری یعنی پسیل مرکبات می‌تواند همه گونه مرکبات را آلوده نماید، در صورت عدم کنترل به موقع این بیماری به نظر می‌رسد خطرناک‌تر از جاروک لیموترش باشد. مهم‌ترین علائم در درختان آلوده شامل کم پشت بودن، کوتاهی، مرگ ترکه‌ها، زردی شاخساره یا ریزش شدید میوه، ایجاد رنگ سبز در قسمت گل‌گاه میوه است (Akhtar and Ahmad 1999). باکتری عامل میوه سبز می‌تواند بیشتر رقم‌ها، گونه‌ها، هیبریدها و نیز خویشاوندان مرکبات را آلوده کند (Sindhuja and Ehsani 2010).

همچنین این پروتئین دارای سه دومین است. دومین اولی که از اسید آمینه ۱ الی ۱۴ را شامل می‌شود در خارج سلول قرار دارد. دومین دوم که داخل غشایی است از اسید آمینه ۱۵ الی ۳۷ را شامل می‌شود. در نهایت دومین آخری داخل سلولی است از اسید آمینه ۳۸ الی ۵۷ را در برمی‌گیرد. دومین اولی به عنوان یک گیرنده عمل می‌کند. در این پروتئین تعداد کل اسیدآمینه‌های باردار ۱۶/۴ درصد که از این تعداد ۳ اسیدآمینه دارای بار منفی و ۶ اسید آمینه با بار مثبت هستند.

تعیین عملکرد پروتئین با استفاده از پایگاه BLOCKS نشان داد که پروتئین مد نظر با دارا بودن کمترین ارزش مورد انتظار، به خانواده پروتئینی bradykinin receptor مربوط بوده و این خانواده پروتئینی دارای ۸ بلوک حفاظت شده است. نتایج بیوانفورماتیکی مربوط به هدف‌گیری پروتئین، نشان داد که بیشترین میزان ترشح پروتئین در غشاء پلاسمایی بوده است.

شاخه باغی شامل *Poncirus trifolia* و بقیه شامل گیاهان غیر باغی است. قابل توجه این که ژن NBS552 گریپ فروت جدا از بقیه قرار گرفته، همچنین دیگر گونه گیاهی در درخت فیلوژنی در جایگاه مناسبی به لحاظ تاکسونومیکی قرار نگرفته اند به عنوان مثال گیاه پنبه که زراعی است با گیاه *Rhazya stric* که دارویی است کنار هم قرار گرفته اند که بیانگر شباهت بالای ژن NBS552 در سطح ملکولی بین گونه های گیاهی است و این که نقش مهمی در مقاومت در گونه های مختلف گیاهی دارد.

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی مشخص شد قطعه ی توالی یابی شده شباهت زیادی با توالی ژن های سایر گیاهان ثبت شده در NCBI دارد. بررسی شباهت ژن NBS552 با سایر ژن های موجود در NCBI نشان داد که این ژن در اکثر گیاهان حفظ شده است. از آنجایی که خانواده NBS-LRR ها در مقاومت عمودی نقش دارند، این مطالعه راهی برای تولید گیاهان تراریخته متحمل به بیماری میوه سبز مرکبات از طریق انتقال ژن برای مطالعه آینده است.

واکنش ارقام مختلف و هیبریدهای مرکبات به عامل میوه سبز مرکبات متفاوت است. در مالزی گزارش شده که علائم بیماری میوه سبز مرکبات روی پوملو مشاهده نمی شود، اما نارنگی رقم عسلی (*C. reticulata* cv. Honey Mandarin)، *C. madurensis*، *C. aurantium*، cv. Calamondin به ترتیب علائم را با شدت ۷۵٪، ۶۵٪، ۵۰٪ نشان دادند. بیماری میوه سبز مرکبات روی ۱۵ گونه از مرکبات، شش ماه پس از آلودگی از طریق پیوند دیده می شود. اما ظهور و شدت علائم بین گونه های مختلف متفاوت بود (Sindhuja and Ehsani 2010).

داده های بدست آمده در مطالعات اخیر نشان داده اند که تظاهر ژن NBS552 نقش مهمی در مقاومت به باکتری عامل میوه سبز مرکبات دارد (Gholampour et al. 2014). این ژن برای اولین بار از گیاه گریپ فروت ایرانی از طریق PCR جداسازی و در پلاسمید pGEM کلون شد. شماره دسترسی به این ژن در بانک جهانی ژن JZ775596 است. این اولین گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است.

درخت فیلوژنی براساس توالی NBS552 بین گونه های مختلف گیاهی به منظور بررسی روابط تکاملی نشان می دهد که دو شاخه اصلی شامل گیاهان زراعی و باغی را شکل می دهد که

منابع

- Akhtar M, Ahmad I. 1999. Incidence of citrus greening disease in Pakistan. Pakistan Journal of Phytopathology 11: 1-5.
- Bove JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7-37.
- Fao. 2013. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.
- Ghayeb Zamharir M, Alizadeh A and Kachoei S. 2014. Phylogenetic analysis of divergent structural organization of nucleotide binding domain encoded by resistance genes and gene homologues in Citrus. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 7:379-385.
- Gholampour H, Ghayeb Zamharir M, Karimi J, Farrokhi N, Alizadeh A and Taheri P. 2014. Identification of genes differentially expressed during interaction of Grapefruit infected with *Candidatus* Liberibacter asiaticus in disease late stage. Journal of phytopathology 162 (11-12): 811-819, doi: 10.1111/jph.12273.
- Hajivand S, Thohirah LA, Kamaruzaman S, Siti NAA, Nu APA. 2009. Differential Species Reacation to Huanglongbing (HLB) Disease by Grafting Method in Malaysia. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 4(1): 32-38.
- Lawrence L, Ram C, Ning H, Pamela C and Frederick M. 2000. Isolation and characterization of disease resistance gene homologues from rice cultivar IR64. Gene 255: 245-255.
- Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ and Barbagallo CB. 1998. Preparation of PCR Products for DNA Sequencing. BioTechniques 24: 314-317.
- Mariângela C, Irving J, Maria L, Marco A, Sílvia O, Juliana F, Alessandra A, Raquel L, Marcelo S and Marcos A. 2007. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico

- hybridization. *Genetics and Molecular Biology* 30(3): 972-979.
- Matsuba Y, Nguyen TT, Wiegert K, Falara V, Gonzales-Vigil E, Leong B, Schafer P, Kudrna D, Wing RA, Bolger AM. 2013.** Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum*. *Plant Cell* 25: 2022–2036.
- Sagheer A, Zhou C, Zhou Y, Cao M, Wang X. 2012.** Distribution and research advances of citrus tristeza virus. *Journal of Integrative Agriculture* 11(3): 346-358.
- Salehi M, Faghihi M, Bagheri A, Zakeri M and Izadpanah K. 2010.** Further studies on citrus huanglongbing disease in Southern Iran. In proceeding of 19th Iranian plant protection congress, 31 July- 3 August, IRIPP, Tehran. P: 473. (In Farsi with English abstract)
- Salehi M, Faghihi M, Khanchesh R, Bagheri A, Zakeri M and Izadpanah K. 2012.** Distribution of citrus huanglongbing disease and its vector in southern Iran. *Iranian journal of plant pathology* 48 (2): 195-208. (In Farsi with English abstract)
- Simone G, Helaine C. 2007.** Putative resistance genes in the CitEST database. *Genetics and Molecular Biology* 30(3): 931-942.
- Sindhuja S and Ehsani R. 2010.** Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. *Talanta* 83: 574–581.
- Song HW, Liu YX, Hu GB, Qin YH, Lin SQ. 2011.** An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) buds. *Pakistan Journal of Botany* 43(2):1-9.
- Ute A and Kim DB. 2008.** Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberobacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science* 175: 291–306.

Isolation, cloning and bioinformatic study of a resistance gene against an Asian strain of citrus greening librobacter in grapefruit plant

Masoud Tohidfar¹ and Maryam Ghayeb Zamharir^{2*}

1. Biotechnology group, Department of New Technology and Energy Engeenier, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.

2. Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Tehran, Iran.

*Corresponding Author, Email: zamharir2005@yahoo.com

ABSTRACT

Citrus greening disease is the most important bacterial diseases of citrus and is present in the southern region of Iran. Due to the nature of the pathogen, disease control is difficult. cDNA-AFLP analysis shows that the expression pattern of NBS-LRR (Nucleotide Binding Site- Leucine-Rich Repeats) genes was upregulated in grapefruit plant interacting with *Candidatus* Leiberibacter asiaticus. In this study we have isolated the NBS552 gene from grapefruit by PCR and clone it by ligation of this product to pGEM-T vector transformed *E. coli* bacteria. Sequencing analysis revealed an open reading frame for a gene of 171 bp that encodes a protein of 57 amino acids. Results of bioinformatic analysis showed that this gene contains regions that are conserved in different plant species. The NBS552 protein is associated with membranes and its extracellular secretion is low. The aim of this study was isolation and cloning of NBS552 genes from the grapefruit genome and characterization of the genes in view of their potential for practical use in plants.

Key Words

Grapefruit, C itrus Greening, Gene NBS552, Resistance

روش ارزیابی فعالیت مهارکننده‌های خاموشی ژن در گیاه با استفاده از دو پروتئین از ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV)

A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using two Proteins of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)

سمیرا پاکباز^۱، مقصود پژوهنده^{۲*} و امید عینی گندمانی^۳

Pakbaz S.¹, Pazhouhandeh M.*² and Eini Gandomani O.³

۱- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

1. PhD student of Plant Virology, Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Tabriz.

2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Fac., Azarbaijan Shahid Madani University.

3. Assistant Prof., Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Zanjan. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۵)

چکیده

مهارکننده‌های RNA Silencing در گیاهان، جانوران و بیشتر ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند و نیز شیوه شناسایی فعالیت مهارکنندگی خاموشی ژن یک پروتئین در سیستم گیاهی راه اندازی شده است. ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf* (GFLV) *virus* یکی از شایع‌ترین ویروس‌های شناخته شده مو در سراسر دنیا است که تا ۸۰ درصد خسارت می‌زند. این ویروس دویکراهی با ژنوم RNA تک رشته‌ای در جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* قرار دارد. ژن مهارکننده خاموشی در نپوویروس‌ها هنوز شناسایی نشده است و دانش ما از تعیین کننده‌های علایم و مهارکننده‌های خاموشی ویروس‌های این جنس خیلی محدود است. در این پژوهش ژن GFP در گیاهان *Nicotiana benthamiana* تراریخته با GFP خاموش شد و سپس توانایی پروتئین‌های پلیمراز (RdRp) و حرکتی GFLV در مهار سازوکار RNA Silencing ارزیابی شد. عملکرد این دو پروتئین با شاهدهای مثبت و منفی به کاربرده شده مقایسه شد و نتایج نشان داد که اگرچه این دو پروتئین در بروز علایم و سیستمیک شدن بیماری نقش دارند اما کارایی لازم را جهت مهارکنندگی خاموشی ندارند. این پژوهش مدل بررسی فعالیت ممانعت‌کنندگی از RNA Silencing را بیان می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

RNA Silencing

مهار خاموشی ژن

ویروس برگ بادبزنی مو

مقدمه

سیستم بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است و برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش برخلاف روش بیان دایم که زمان‌بر و مستلزم کار زیاد می‌باشد، روشی سریع، انعطاف پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت بافت و در بافت‌های گیاهی به طرز کامل تمایز یافته مانند برگ‌ها قابل اجرا می‌باشد. از بیان موقت بیشتر برای تأیید تراریختی و اثبات تولید پروتئین نو ترکیب و تجزیه و تحلیل پیش‌برهای گیاهی استفاده می‌شود. این روش مستقل از موقعیت استقرار ژن در کروموزوم است (Fischer et al., 1999) که در آن پروتئین مورد نظر در سطح بالایی بیان و در کوتاه‌ترین زمان ممکن تولید می‌شود (Yang et al., 2000; Goodin et al., 2002). روش بیان موقت بر پایه آگروباکتریوم جایگزین مناسبی برای روش‌های انتقال مستقیم DNA مانند بمباران ژنی و القاء پروتوپلاست‌ها برای مطالعات اولیه بوده و برخلاف آن‌ها که ژن مورد نظر را در تعداد کمی از سلول‌ها بیان می‌کنند، تلقیح (اینفیلتراسیون) آگروباکتریوم به داخل بافت‌های گیاهی، باعث بیان ژن در بیشتر سلول‌های گیاهی می‌شود (Kapila et al., 1997). به علاوه در اینفیلتراسیون مکانیکی تعداد نمونه‌هایی که به طور همزمان مطالعه می‌شوند، افزایش یافته و بافت مورد مطالعه می‌تواند بصورت فعال به گیاه متصل باقی بماند، در نتیجه در مواردی مانند تجزیه و تحلیل پیش‌برهای گیاهی، تیمارها بر روی بافت متصل به گیاه اعمال می‌شود (Cazonelli and Velten, 2006). بیان موقت در چندین گونه گیاهی به کار گرفته شده است ولی از بین آنها بیشترین گزارش‌ها در گیاه توتون *N. benthamiana* بوده است (Chakrabarty et al., 2007; Mokrzycki-Issartel et al., 2003). مزیت‌های استفاده از *N. benthamiana* برای بیان موقت پروتئین شامل موارد زیر است: اول اینکه یک گیاه مدل بوده و معمولاً در تمام آزمایشگاه‌های پژوهش‌های گیاهی به کار می‌رود و دوم اینکه پروتئین به راحتی در سطح بالا از طریق آگرواینفیلتراسیون در برگ‌های این گیاه بیان می‌شود (Voinnet et al., 2003; Ma et al., 2008). در بین ۶۴ گونه ویروسی آلوده کننده مو (Martelli, 2014)، ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) (*Grapevine fanleaf virus*)

یکی از شایع‌ترین ویروس‌های شناخته شده مو در سراسر دنیا است که تا ۸۰ درصد خسارت می‌زند و کیفیت و طول عمر مو را در تاکستان‌ها کاهش می‌دهد (Andret-Link et al., 2004). ویروس GFLV یک عضو دو پیکره‌ای با ژنوم دو قسمتی از زیر گروه A جنس *Nepovirus* و در خانواده *Secoviridae* است (Sanfacon et al., 2009). ویرونی‌های این ویروس ایزومتریکی بوده و حدود ۳۰ نانومتر قطر دارند. ژنوم ویروس از دو قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت تشکیل شده است (+ssRNA) که در انتهای ۵' دارای پروتئین متصل به ژنوم ویروسی (Viral Protein genome-linked, VPg) و در انتهای ۳' به صورت پلی آدنینی (Poly A) هستند. هر قطعه محتوی یک چارچوب خواندنی باز است که یک پلی‌پروتئین را رمز می‌کند (P1 و P2). هر پلی‌پروتئین توسط پروتئینازی که توسط RNA1 رمز می‌شود، به پروتئین‌های کوچکتری شکسته می‌شود (Pinck et al., 1988). پلی‌پروتئین رمزشونده توسط RNA1 (P1)، به پنج پروتئین شکسته می‌شود که اجزاء تکثیر ویروس هستند و از انتهای آمینی به کربوکسیلی شامل یک کوفاکتور پروتئیناز فرضی، هلیکاز فرضی، پروتئین متصل به ژنوم ویروس، پروتئیناز سیستمین و RNA پلیمرز وابسته به RNA (RNA dependent RNA Polymerase, RdRp) است (Naraghi-Arani et al., 2001; Andret-Link et al., 2004). قطعه RNA2 پلی‌پروتئین P2 را رمز می‌کند که از انتهای آمینی به کربوکسیلی با فعالیت پروتئولیتیکی به ترتیب به سه پروتئین شامل $(2A)^{HP}$ که برای تکثیر RNA2 مورد نیاز است و می‌تواند به عنوان پروتئین خانگی عمل کند (Gaire et al., 1999)، پروتئین حرکتی $(2B)^{MP}$ که پروتئین اصلی مشاهده شده در پلاسمودسماتاست (Ritzenthaler et al., 1995) و پروتئین پوششی $(2c)^{CP}$ (Serghini et al., 1990) شکسته می‌شود. هر دو RNA ژنومی برای آلودگی سیستمیک گیاه ضروری هستند (Viry et al., 1993).

اگرچه در چندین ویروس گیاهی پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در شناسایی سازوکارهای بیان علایم به دنبال اثر متقابل گیاه-ویروس به دست آمده است، اما این سازوکارها هنوز به طور ناچیزی شناخته شده‌اند (Culver and Padmanabhan, 2007). چندین پروتئین ویروسی مثل پروتئین حرکتی (Lewsey et al.,

N. benthamiana و *N. clevelandii* آلودگی سیستمیک ایجاد می‌کنند، به طوری که حضور ویروس در برگ‌های تلقیح نشده بالایی توسط آزمون الایزا-Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) ردیابی شده است. نژاد GHu شش روز بعد از مایه‌زنی روی *N. benthamiana* زردی خفیف رگبرگ و به دنبال آن زردی نسبی برگ و پیسه‌ای شدن را نشان داد، همچنین شش روز بعد از مایه-زنی در *N. clevelandii* لکه‌های کلروز مشاهده شد که حداقل بیش از بیست روز پایدار بودند. در مقایسه، نژاد F13 هیچ‌گونه علائمی روی *N. benthamiana* و *N. clevelandii* ایجاد نکرد. تجزیه و تحلیل‌های نیمه‌کمی، هیچ‌گونه تمایز قابل ملاحظه‌ای در غلظت ویروس بین گیاهان آلوده شده با نوترکیب‌های مختلف که علائم ایجاد کردند و گیاهانی که فاقد علائم بودند، نشان ندادند (Vigne et al. 2013). در این پژوهش ضمن معرفی و راه‌اندازی یک سیستم جهت بررسی فعالیت ممانعت‌کنندگی از RNA Silencing، به بررسی این فعالیت در دو پروتئین از GFLV پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتریایی و وکتورها

در پژوهش حاضر، از لاین 16c گیاهان تراریخته *N. benthamiana* که بیان‌کننده پروتئین فلورسنت سبز (Green) (GFP) هستند، استفاده شد. همچنین از ویروس جغجغه‌ای توتون (*Tobacco Rattle Virus*, TRV) که به RNA2 آن (Enhanced-GFP, EGFP) افزوده شده است، به عنوان القاء‌کننده خاموشی ژن GFP استفاده شد (Ratcliff et al. 2001). RNA1 و RNA2 این ویروس به طور جداگانه به ناقل همسانه‌سازی pEPT8 و سپس ناقل بیان pGA482G منتقل شده و سلول‌های مستعد سویه GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* با این ناقل نوترکیب تراریخت شدند (Larsen and Curtis, 2012). همچنین ژن‌های پروتئین حرکتی ^{MP} (2B) و پلیمرز ^{Pol} (1E) ویروس GFLV و نیز ژن 24p از *Grapevine* (*leafroll-associated Virus 2*, GLRaV-2) (Chiba et al. 2006) در ناقل نام‌برده همسانه‌سازی و سپس به سویه GV3101

(Shibolet et al. 2007)، پروتئین جزء کمکی پروتئیناز (Kagiwada et al. 2005)، پروتئین پوششی (Heaton et al. 1991) و پروتئین بیماری‌زایی (Jupin et al. 1992) به عنوان تعیین‌کننده‌های علائم شناسایی شده‌اند. تعدادی از پروتئین‌های ویروسی درگیر در بیان علائم شبیه HC-Pro در جنس *Potyvirus* ژن 2b در *Cucumovirus* P19، *Tombusvirus* P0، *Polerovirus* پروتئین ۱۳۰K در *Tobamovirus* و پروتئین پوششی جنس *Carmovirus* مهارکننده‌های ویروسی خاموشی RNA (Voinnet et al. 2005)، اما دانش ما از تعیین‌کننده‌های علائم و مهارکننده‌های خاموشی ویروس‌های جنس نیپوویروس از خانواده *Secoviridae* خیلی محدود است و با اینکه مهارکننده‌های خاموشی (VSRs) در بیشتر ویروس‌های گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند، اما در نیپوویروس‌ها هنوز ناشناخته مانده‌اند (Vigne et al. 2013). پدیده بهبود که به موجب آن تضعیف یا عدم بروز علائم در برگ‌های نوظهور به دنبال آلودگی و ظهور علائم بیماری اتفاق می‌افتد، ۸۷ سال پیش برای اولین بار در یک نیپوویروس توصیف شد (Wingard, 1928) و خاموشی ژن که یک واکنش دفاعی طبیعی گیاه است با این پدیده همراه است (Jovel et al. 2007). تعیین‌کننده‌هایی که تاکنون در مورد اعضاء *Secoviridae* شناسایی شده و سبب بروز علائم می‌شدند، پروتئین‌های درگیر در تکثیر و پلی‌پروتئین بالغ مثل هلیکاز نوع III و پروتئیناز سیستمین شبه 3C بودند (Fan et al. 2011; Gu and Ghabrial, 2005). پروتئین کامل ^{Pol}(1E) نژاد مجارستانی GHu ویروس GFLV بین ۳۹-۸۴ درصد با RdRp چندین ویروس در خانواده *Secoviridae* شباهت دارد. هفت موتیف حفاظت شده در RdRp به طور معمول برای ویروس‌های گیاهی توصیف شده است (Chisholm et al. 2007) که در بالادست ۱۳۶ اسیدآمینه انتهایی پروتئین ^{Pol}(1E) نژاد GHu ویروس GFLV قرار می‌گیرد (Letunic et al. 2012). وجود دومین‌های اختصاصی نژاد، روی ژن RNA پلیمرز وابسته به RNA (RdRp) ویروس GFLV تأیید و مشخص شده است که این دومین‌ها وظیفه تنظیم عوامل تعیین‌کننده علائم را دارند. هر دو نژاد GHu و F13 این ویروس روی

در زمانی انجام شد که این گیاهان در مرحله چهار برگی بودند و حداقل یک هفته از نشاء آن‌ها گذشته بود. گیاهان پس از تزریق در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و ۷۰٪ رطوبت نگهداری شدند.

بررسی تأثیر ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) در مهار خاموشی ژن

جهت مشاهده روند مهار بیان ژن GFP، گیاهان از روز سوم پس از تزریق به طور روزانه در زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. پس از مشاهده تغییر رنگ سیستمیک گیاهان تراریخته از رنگ سبز به قرمز و اطمینان از وقوع خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز، گیاهان تیمار شده در روز هفتم پس از تزریق، به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه با برگ‌های *Chenopodium quinoa* آلوده به نژاد GFLV-F13 و یک گروه با نژاد GFLV-GHu به طور مکانیکی مایه‌زنی شدند. در گروه سوم مایه‌زنی با GFLV انجام نشد و به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. از روز سوم پس از مایه‌زنی، همه گیاهان زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. جهت تأیید حضور GFLV، یک هفته پس از مایه‌زنی استخراج RNA از برگ‌های نوظهور نمونه‌های مورد آزمایش انجام و سپس آزمون RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر مربوط به RNA1 با توالی‌های Forward: 5' ARA GCC TCA AGA GTA AAG و Reverse: 3' CTA G (نوکلئوتیدهای ۱۷۴۴-۱۷۶۵) و 3' CTC CTG TTA TAA AAT GAC G (نوکلئوتیدهای ۲۹۴۴-۲۹۲۳) صورت گرفت.

بررسی تأثیر ژن پروتئین حرکتی و پلیمرز ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) در مهار خاموشی ژن

بر اساس نتایج آزمایش قبل، آزمایش دیگری جهت بررسی میزان عملکرد پروتئین دو ژن پلیمرز $(1E)^{Pol}$ و پروتئین حرکتی $(2B)^{MP}$ ویروس GFLV در مهار خاموشی ژن انجام شد. در این پژوهش لاین 16c گیاهان تراریخت یک هفته پس از نشاء و در مرحله ۴-۵ برگی مشابه آزمایش قبل توسط سلول‌های آگروباکتریوم حاوی سازه القاءکننده خاموشی TRV تیمار شدند. هشت روز پس از آگرواینفیلتراسیون با TRV، یک گروه از این گیاهان با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی $pGA482G-(1E)^{Pol}$ و

باکتری *A. tumefaciens* انتقال داده شدند. جدایه‌های مربوط به ویروس‌های GFLV و GLRaV-2 توسط آزمایشگاه ویروس-شناسی دانشگاه کرنل امریکا در اختیار این پژوهش قرار گرفت.

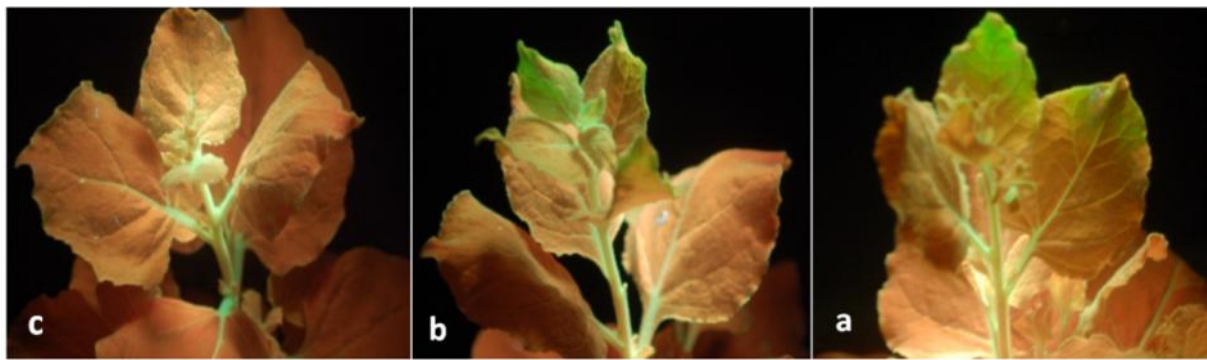
بیان موقت با استفاده از روش تزریق آگروباکتریوم

جهت انتقال سازه القاءکننده خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز به گیاهان تراریخت لاین 16c، از آزمایش بیان موقت به روش تزریق آگروباکتریوم استفاده شد (Vaghchhipawala et al., 2010). بدین منظور سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pGA482G-TRV_{RNA1} در ۵ میلی‌لیتر از محیط (LB) Luria Bertani حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) و ریفامپیسین (۱۲/۵ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) و سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pGA482G-TRV_{RNA2:EGFP} در ۵ میلی‌لیتر از محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شدند. جهت افزایش حجم سوسپانسیون باکتری، از محیط القاء حاوی یک میلی‌لیتر N-morpholino Ethane Sulfonic Acid (MES) نیم‌مولار (غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار) و ۴۴ میلی‌لیتر محیط LB تازه استفاده شد. همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها با غلظت‌های مناسب افزوده و سوسپانسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نیروی ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شد. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه در دمای اتاق رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، رسوب صورتی رنگ باکتری در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط اینفیلتراسیون حاوی MES ۱۰ میلی‌مولار و $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار معلق شد و به مدت ۲-۳ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با ۲۲۵ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شد. سوسپانسیون باکتری با استفاده از محیط اینفیلتراسیون تا غلظت $Optical\ Density_{600}: 0.8-1$ رقیق شد. سپس سلول‌های آگروباکتریوم حاوی TRV_{RNA1} و TRV_{RNA2:EGFP} با حجم یکسان با هم مخلوط شدند. سوسپانسیون باکتری با استفاده از سرنگ پلاستیکی سه میلی‌لیتری درون فضای میان سلولی برگ‌های سالم و متصل به گیاهان تراریخته *N. benthamiana* تزریق شد.

نتایج و بحث

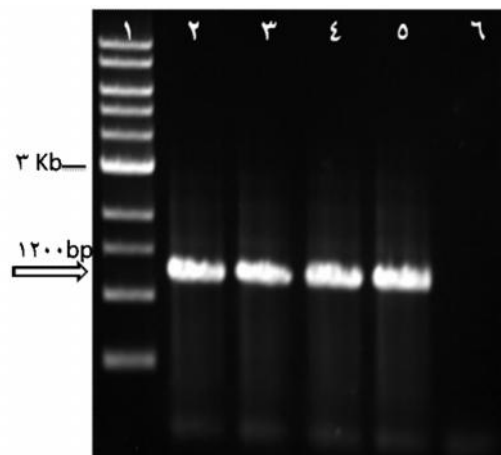
گروه دیگر با $pGA482G-(2B)^{MP}$ اگرواینفیلتراسیون شدند. همچنین یک گروه از گیاهان با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نو ترکیب $pGA482G-p24$ تیمار و به عنوان شاهد مثبت استفاده شدند. روی تعدادی از گیاهان تراریخت و تیمار شده با pTRV، تیمار دیگری انجام نشد و از این گیاهان به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از رقم وحشی گیاهان *N. benthamiana* بدون انجام هیچ‌گونه تیماری، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از روز سوم تا هشتم پس از اگرواینفیلتراسیون دوم، همه گیاهان زیر نور ماوراء بنفش بررسی شدند. علاوه بر این در روزهای سوم و چهارم جهت تعیین میزان سطح فلورسنت، نمونه‌های برگ یک سانتیمتر مربعی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نواحی اگرواینفیلتر شده و ترجیحاً از ناحیه سالم و خسارت ندیده در اثر انجام اگرواینفیلتراسیون انتخاب شدند. عصاره‌گیری نمونه‌ها با استفاده از بافر استخراج حاوی توئین ۲۰ انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه همراه با تکرار به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. سطح فلورسنت با استفاده از دستگاه Synergy2 Microplate Reader (BioTek) و نشر در ۵۰۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. میانگین داده‌های به دست آمده برای هر تیمار توسط روش آماری ANOVA در نرم افزار SPSS مقایسه شد ($P < 0.05$).

جهت انتقال سازه القاءکننده خاموشی ژن GFP به لاین 16c گیاهان تراریخت و همچنین بررسی فعالیت مهارکنندگی از خاموشی ژن، از آزمایش بیان موقت به روش تزریق آگروباکتریوم استفاده شد. پس از تیمار گیاهان تراریخت 16c با ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV) حاوی سازه القاءکننده خاموشی ژن GFP، تغییر رنگ این گیاهان زیر نور ماوراء بنفش هر روز مشهودتر می‌شد. به طوری که پس از یک هفته، برگ‌ها به طور کامل به رنگ قرمز دیده می‌شدند و رنگ سبز تنها محدود به ساقه‌ها بود (شکل c-۱). این تغییر رنگ نشان دهنده وقوع خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز است که در اثر مشابهت در توالی‌های ژن داخلی گیاه تراریخته (GFP) و ژن بیگانه که به طور موقت بیان شده، حاصل شده است و در نتیجه رنگ سبز فلورسنت پس از چند روز جای خود را به رنگ قرمز می‌دهد. در بررسی این گیاهان در روز سوم پس از مایه‌زنی با ویروس برگ بادبزی مو (GFLV) زیر نور ماوراء بنفش، تغییر رنگ به طور موضعی در برگ‌های مایه‌زنی شده دیده شد. از روز چهارم تا هشتم، تغییر رنگ از قرمز به سبز به طور سیستمیک در برگ‌های انتهایی گیاهان تراریخت نمایان شد و تا روز هشتم، هر روز به تعداد برگ‌های تغییر رنگ یافته در این گیاهان افزوده شد. این تغییر رنگ مجدد گیاه به سبز در برگ‌های نوظهور که نشان دهنده حضور سیستمیک GFLV در گیاه و نیز مهار خاموشی ژن بود، در گیاهان مایه‌زنی شده با هر دو نژاد F13 و GHu ویروس نمایان شد (شکل a, b-۱). این تغییر رنگ حاکی از عملکرد یک یا چند ژن از ویروس برگ بادبزی مو است که به عنوان مهارکننده خاموشی ژن در این ویروس عمل می‌کنند و توانسته‌اند خاموشی ژن پروتئین فلورسنت سبز را مهار کنند. همچنین نتایج آزمون RT-PCR، حضور GFLV را یک هفته پس از مایه‌زنی در این گیاهان تأیید کرد و آغازگرها توانستند قطعه‌ای به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز از RNA1 این ویروس تکثیر کنند (شکل ۲).



شکل ۱- مایه‌زنی GFLV روی گیاهان تراریخته *N. benthamiana* و تیمار شده با ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV). (a) مایه‌زنی با نژاد GFLV-F13. (b) مایه‌زنی با نژاد GFLV-GHu. (c) گیاه تراریخته *N. benthamiana* و تیمار شده با pTRV بدون مایه‌زنی با GFLV به عنوان کنترل.

Figure 1- GFLV inoculation on transgenic *N. benthamiana* and treated with pTRV. a) GFLV-F13 inoculation. b) GFLV-GHu inoculation. c) Transgenic *N. benthamiana* and treated with pTRV without GFLV inoculation as control.



شکل ۲- تجزیه و تحلیل RT-PCR گیاهان تراریخته تیمار شده با pTRV و مایه‌زنی شده با ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از آغازگرهای اختصاصی GFLV. ۱- نشانگر مولکولی یک کیلوبازی. ۲- ۳- قطعه تکثیر شده ۱۲۰۰ جفت بازی در گیاهان مایه‌زنی شده با نژاد F13. ۴- ۵- قطعه تکثیر شده ۱۲۰۰ جفت بازی در گیاهان مایه‌زنی شده با نژاد GHu. ۶- گیاه تیمار شده با TRV و بدون مایه‌زنی با GFLV به عنوان کنترل منفی.

Figure 2- RT-PCR analysis of treated transgenic plants with pTRV and inoculated by GFLV specific primers. 1-kb DNA ladder. 2- 3- GFLV-F13 Inoculation. 4- 5- GFLV-GHu Inoculation. 6- Treated plant with TRV and without GFLV inoculation as negative control.

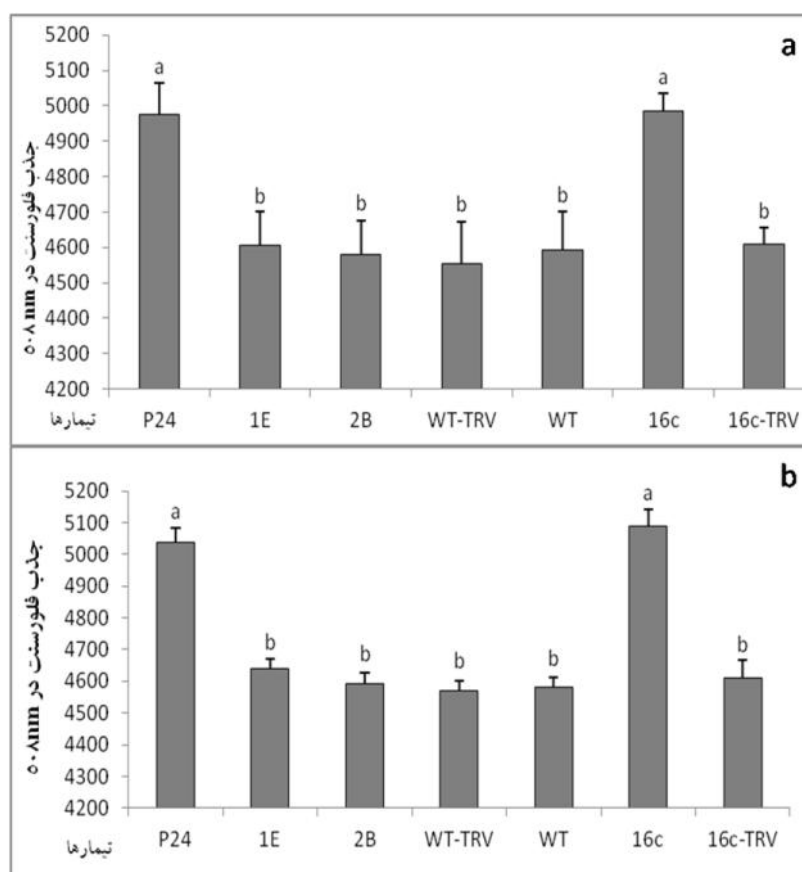
همچنین نتایج سنجش میزان فلورسنت با نتایج چشمی مطابقت داشت. این سنجش که در روزهای سوم و چهارم بعد از اگرواینفیلتراسیون با ژن‌های GFLV انجام شد، در هر دو روز متوالی نتایج یکسانی را در برداشت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح احتمال ۵٪ نشان داد که میزان جذب فلورسنت در نمونه‌های اگرواینفیلتر شده با ژن p24، مشابه نمونه‌های گیاهان تراریخت بیان کننده GFP (16c) بود و تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های این دو گروه وجود نداشت. در حالی که این دو گروه، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های $(1E)^{Pol}$ ، $(2B)^{MP}$ ، نمونه‌های تراریخت و تیمار شده با pTRV (16c-pTRV)، گیاهان وحشی (WT) و نیز گیاهان وحشی تیمار شده با pTRV (WT-) نشان دادند (شکل ۴- a, b).

در بررسی گیاهان 16c اگرواینفیلتر شده با سازه القاءکننده خاموشی و متعاقباً با سازه‌های حامل ژن‌های $(1E)^{Pol}$ و $(2B)^{MP}$ زیر نور ماوراءبنفش، هیچ‌گونه تغییر رنگی در ناحیه اگرواینفیلتراسیون شده در گیاهان مورد مطالعه مشاهده نشد (شکل ۳- c, d). در حالی که در گیاهان اگرواینفیلتراسیون شده با ژن p24، تغییر رنگ قابل ملاحظه‌ای نمایان شد و همه نواحی تیمار شده به طور واضح از رنگ قرمز به سبز تغییر رنگ دادند (شکل ۳- b). واضح است که هیچ‌گونه تغییر رنگی هم از رقم وحشی (شکل ۳- f) و نیز گیاه تراریخته *N. benthamiana* که با pTRV اگرواینفیلتر شده بودند (شکل ۳- a) انتظار نمی‌رفت. بررسی همه گیاهان از روز سوم تا هشتم پس از اگرواینفیلتراسیون زیر نور UV ادامه داشت ولی تغییر قابل ملاحظه‌ای ایجاد نشد.



شکل ۳- تیمار با سازه‌های حامل ژن‌های GFLV روی گیاهان تراریخته *N. benthamiana* (16c) و تیمار شده با pTRV. عکس‌ها در زیر نور ماوراء بنفش گرفته شده است. (a) گیاه 16c تیمار شده با pTRV بدون تیمار با ژن‌های GFLV. (b) تیمار با سازه حامل p24 به عنوان کنترل مثبت. (c) GFLV-(1E)^{Pol}. (d) GFLV-(2B)^{MP}. (e) گیاه 16c بدون تیمار به عنوان کنترل. (f) گیاه وحشی تیمار شده با pTRV (کاملاً مشابه با گیاه وحشی بدون تیمار).

Figure 3- Agroinfiltration with the constructs including GFLV genes on treated transgenic *N. benthamiana* with pTRV. Photographed under UV light. a) Treated 16c with pTRV and without treatment with GFLV genes. b) Treated with p24 as positive control. c) GFLV-(1E)^{Pol}. d) GFLV-(2B)^{MP}. e) The 16c plant without any treatment. e) The treated wild type plant with pTRV as control (The same with WT plant without treatment).



شکل ۴- سنجش سطح فلورسنت در گیاهان تراریخته 16c و تیمار شده با pTRV و سپس با ژنهای GFLV. حروف یکسان در نمودار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در میزان جذب فلورسنت وجود ندارد ($P < 0.05$). (a) روز سوم پس از آگرواینفیلتراسیون با p24-GLRaV-2 و سازهای GFLV. (b) روز چهارم پس از آگرواینفیلتراسیون با p24-GLRaV-2 و سازهای GFLV.

Figure 4- The evaluation of the fluorescence level in the treated 16c plants with pTRV and subsequently GFLV genes. The same letters within a graph represent no significant difference in fluorescence ($P < 0.05$). a) 3 days post Agroinfiltration with GLRaV-2 -p24 and GFIV constructs. b) 4 days post Agroinfiltration with GLRaV-2 -p24 and GFIV constructs.

از آنجا که ژنهای $(1E)^{Pol}$ و $(2B)^{MP}$ برخلاف p24 نتوانستند افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح فلورسنت در گیاهان تراریخته 16c که ژن GFP در آن‌ها خاموش شده بود، ایجاد کنند و عملکرد آن‌ها مشابه گیاهانی بود که به عنوان شاهد منفی در این تحقیق استفاده شدند، می‌توان گفت که ژن مهارکننده خاموشی در ویروس برگ بادبزنی مو هنوز ناشناخته بوده و مطالعات و آزمایشات بیشتری جهت تعیین ناحیه‌ای از ژنوم GFLV با این عملکرد نیاز است. این نتایج با نتایج Vigne و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت. Vigne برای شناسایی تعیین‌کننده‌های علایم، کلون‌های عفونی cDNA مربوط به RNA1 و RNA2 نژاد GHu و F13 ویروس GFLV را تهیه و با استفاده از رویکرد ژنتیک معکوس نشان داد که در نژاد GHu، تعیین‌کننده‌های علایم روی RNA1 خصوصاً در ۴۰۸ نوکلئوتید انتهایی ۳' ژن پلیمراز (RdRp) قرار دارند، اما به نظر نمی‌رسد این ژن به عنوان مهارکننده خاموشی عمل کند. آزمایش دیگری با استفاده از رقم وحشی *N. benthamiana* انجام شد، اما پروتئین $(1E)^{Pol}$ در هیچ-کدام از دو نژاد F13 و GHu برخلاف CMV-2b قادر به افزایش بیان GFP نبود. این در حالی بود که پروتئین $(1E)^{Pol}$ در قسمت-های آگرواینفیلتر شده به آسانی توسط آزمون وسترن بلاتینگ ردیابی شد. نتایج این آزمایشات، هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی

از آنجا که ژنهای $(1E)^{Pol}$ و $(2B)^{MP}$ برخلاف p24 نتوانستند افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح فلورسنت در گیاهان تراریخته 16c که ژن GFP در آن‌ها خاموش شده بود، ایجاد کنند و عملکرد آن‌ها مشابه گیاهانی بود که به عنوان شاهد منفی در این تحقیق استفاده شدند، می‌توان گفت که ژن مهارکننده خاموشی در ویروس برگ بادبزنی مو هنوز ناشناخته بوده و مطالعات و آزمایشات بیشتری جهت تعیین ناحیه‌ای از ژنوم GFLV با این عملکرد نیاز است. این نتایج با نتایج Vigne و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت. Vigne برای شناسایی تعیین‌کننده‌های علایم، کلون‌های عفونی cDNA مربوط به RNA1 و RNA2 نژاد

شده توسط سازه سنجاق سری مبتنی بر ژن پروتئین حرکتی غلبه کند که این به معنی مهار سازوکار خاموشی ژن می‌باشد. دلیل شکسته شدن مقاومت این است که سازه القاءکننده بر اساس ژن مهارکننده خاموشی این ویروس ساخته نشده است و در نتیجه پس از مایه‌زنی گیاه تراریخت شده با این سازه، ژن مهارکننده خاموشی ویروس، هدف اصلی RNA های دو رشته‌ای نخواهد بود و در نتیجه مقاومت نیز به طور کامل القاء نخواهد شد. روش به کاربرده شده در این پژوهش جهت تعیین و ارزیابی فعالیت مهارکنندگی خاموشی ژن ها، می‌تواند به عنوان روشی مناسب و قابل اعتماد برای یافتن ژن مهارکننده خاموشی در اعضاء جنس *Nepovirus* و سایر ویروس‌ها به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از آقای دکتر مارک فیوکس به خاطر در اختیار گذاشتن مواد و امکانات مورد نیاز جهت انجام این پژوهش در آزمایشگاه ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه کرنل آمریکا (ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی در ایالت نیویورک) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Andert-Link P, Laporte C, Valat L, Ritzenthaler C, Demangeat G, Ving E, Laval V, Pfeiffer P, Stussi-Garaud C, Fuchs M. 2004. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* 86: 183-195.
- Cazzonelli CI, Velten J. 2006. An in vivo, luciferase-based, Agrobacterium-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta*, 224: 582-597.
- Chakrabarty R, Banerjee R, Chung SM, Farman M, Citovsky V, Hogenhout SA, Tzfira T, Goodin M. 2007. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 740-750.
- Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, Carrington JC, Dolja VV. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346: 7-14.
- Chisholm J, Zhang G, Wang A, Sanfacon H. 2007. Peripheral association of a polyprotein precursor form of the RNA-dependent RNA polymerase of Tomato ringspot virus with the membrane-bound viral replication complex. *Virology* 368: 133-144.
- Culver JN, Padmanabhan MS. 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol* 45: 221-243.
- Fan Q, Niroula M, Feldstein PA, Bruening G. 2011. Participation of the Cowpea mosaic virus protease in eliciting extreme resistance. *Virology* 417: 71-78.
- Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U. 1999. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnology and applied biochemistry*, 30: 113-116.
- Gaire F, Schmitt C, Stussi-Garaud C, Pinck L, Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of Grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264: 25-36.
- Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO. 2002. pgd vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J.* 31: 375-383.
- Gu H, Ghabrial SA. 2005. The Bean pod mottle virus proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. *Virology* 333: 271-283.
- Heaton LA, Lee TC, Wei N, Morris TJ. 1991. Point mutations in the turnip crinkle virus capsid protein affect the symptoms

- expressed by *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 183: 143–150.
- Jardak-Jamoussi R, Winterhagen P, Bouamama B, Dubois C, Mliki A, Wetzel T, Ghorbel A, Reustle G. 2009.** Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 187–196.
- Jovel J, Walker M, Sanfacon H. 2007.** Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *Journal of Virology* 81: 12285–12297.
- Jupin I, Guilley H, Richards KE, Jonard G. 1992.** Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J* 11: 479–488.
- Kagiwada S, Yamaji Y, Komatsu K, Takahashi S, Mori T, Hirata H, Suzuki M, Ugaki M, Namba S. 2005.** A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the Potato virus X genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Res* 110: 177–182.
- Kapila J, derycke R, vanmontagu M, Angenon G. 1997.** An *Agrobacterium*- mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122: 101–108.
- Larsen JS, Curtis WR. 2012.** RNA viral vectors for improved *Agrobacterium*- mediated transient expression of heterologous proteins in *Nicotiana benthamiana* cell suspensions and hairy roots. *BMC Biotechnology* 12: 21–21.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012.** SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue): 302–305.
- Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell, H, Choi SH, Ryu KH, Canto T, Palukaitis P, Payne T. 2009.** The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 642–654.
- Ma P, Liu J, He H, Yang M, Li M, Zhu X, Wang X. 2008.** A viral suppressor P1/HC-Pro increases the GFP Gene expression in *Agrobacterium*- mediated transient assay. *Appl. Biochem. Biotechnology* 158: 243–252.
- Martelli GP. 2014.** Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 96 (1S): 1-4.
- Mokrzycki-Issartel N, Bouchon B, Farrer S, Berland P, Laparra H, Madelmont JC, Theisen M. 2003.** A transient tobacco expression system coupled to MALDITOF- MS allows validation of the impact of differential targeting on structure and activity of a recombinant therapeutic glycoprotein produced in plants. *FEBS Lett* 552: 170–176.
- Naraghi-Arani P, Duabert S, Rowhani A. 2001.** Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology* 82: 1791- 1795.
- Pinck L, Fuchs M, Pinck M, Ravelonandro M, Walter B. 1988.** A satellite RNA in Grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology* 69: 233–239.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001.** Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 25: 237–245.
- Ritzenthaler C, Pink M, Pink L. 1995.** Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo. *Journal of General Virology* 76: 907-15.
- Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, Vlugt van der R, Wetzel T. 2009.** Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology* 154: 899-907.
- Serghini MA, Fuchs M, Pinck M, Reinbolt J, Walter B, Pinck L. 1990.** RNA2 of Grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology* 71: 1433–1441.
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham S. A, Gaba V. Gal-On A. 2007.** The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of General Virology* 81: 13135–13148.
- Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS. 2010.** Agroinoculation and agroinfiltration: Simple tools for complex gene function analyses. *Methods in Molecular Biology*. A. Pereira, ed. Humana Press, Totowa, NJ. 65-76.
- Vigne E, Gottula J, Schmitt-Keichinger C, Komar V, Ackerer L, Belval L, Rakotomalala L, Lemaire O, Ritzenthaler C, Fuchs M. 2013.** A strain specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in *Nicotiana* species. *Journal of General Virology* 94: 2803–2813.
- Viry M, Serghini MA, Hans F, Ritzenthaler C, Pinck M, Pinck L. 1993.** Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine nepovirus RNAs. *Journal of General Virology* 74: 169-174.
- 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. *Plant Journal*. 33: 949-956.
- Voinnet O. 2005.** Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6: 206–220.
- Wingard SA. 1928.** Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J Agric Res* 37, 127–153.
- Yang Y. N, Li R. G, Qi M. 2000.** In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant Journal* 22: 543–551.

A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using two Proteins of *Grapevine Fanleaf Virus*

Pakbaz S.¹, Pazhouhandeh M.*² and Eini Gandomani O.³

1. PhD student of Plant Virology, Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Tabriz.

2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Fac., Azarbaijan Shahid Madani University.

3. Assistant Prof., Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Zanjan. Iran

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Suppressor proteins of RNA Silencing have been well described in most genera of plant viruses. The methodology for identifying gene silencing suppressor activity of a protein in a plant system has proven to be an important tool. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is one of the most common viral diseases in grapevines worldwide and can cause up to 80% crop losses. GFLV is a bipartite member of the *Nepovirus* subgroup A in the family *Secoviridae* and has a single-stranded positive-sense RNA genome. A viral suppressor of RNA silencing (VSR) in Nepoviruses has not yet been described and our knowledge of symptom determinant genes in nepoviruses is very limited. In this study, a transgenic GFP gene was silenced in transgenic *Nicotiana benthamiana* line 16c, and then the ability of GFLV polymerase and movement proteins to suppress gene silencing was evaluated. The efficiency of these two proteins was compared with positive and negative controls. The results showed that neither protein had the ability to suppress gene silencing. However, these proteins are involved in symptom production and systemic infection. This study demonstrates a model method for evaluation of suppressor activity of RNA Silencing.

Key Words

GFLV, RNA Silencing, Suppressor of Gene Silencing

بررسی وضعیت زیست فناوری در استان آذربایجان شرقی

The status study of Biotechnology in East Azarbaijan Province

جعفر رازقی^{۱*}، امین سهندی خلیفه کندی^۲

Jafar razeghi^{1*}, Amin Sahandi Khalifeh-Kandy²

۱- استادیار گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

¹Assistant Prof. Plant Biology Dept. Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, IRAN

²Master of Science, Biotechnology Dept. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, IRAN

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲)

چکیده

پیشرفت‌های چشم‌گیر زیست فناوری در دهه‌های اخیر به‌ویژه پس از دستیابی به روش‌های نوین مهندسی ژنتیک آن را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین فناوری‌های مولد معرفی کرده است. با توجه به اینکه مدیریت و برنامه‌ریزی در تمامی زمینه‌ها از جمله زیست فناوری نیازمند شناخت دقیق وضعیت موجود آن می‌باشد، در این مطالعه اقدام به شناسایی محققان، موسسه‌ها، دانشگاه‌ها و شرکت‌های فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری همراه با زمینه‌های پژوهشی آن‌ها گردید، تا با شناخت نقاط ضعف و قوت زیست فناوری استان آذربایجان شرقی زمینه اتخاذ تصمیم‌های هدفمند برای مسئولین فراهم گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیش از ۴۰٪ فعالیت‌های زیست فناوری استان در ارتباط با بخش کشاورزی، حدود ۲۵٪ در حوزه جانوری و ۳۵٪ نیز شامل سایر بخش‌ها می‌باشد. عمده فعالیت محققان در حوزه زیست فناوری کشاورزی در ارتباط با بررسی شرایط مختلف رشدی گیاه است. مطالعه بر روی گیاهان دارویی، کشت بافت گیاهی، تولید گیاهان تراریخته نیز از جمله فعالیت‌های بخش زیست فناوری گیاهی است. بررسی عوامل موثر در رشد دام‌ها، سلامت دام و محصولات دامی در بخش زیست فناوری جانوری و همسانه سازی ژن‌های مفید و کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا عمده پژوهش‌های زیست فناوری میکروبی می‌باشد. بررسی، درمان، مطالعه ژنتیکی و تشخیص بیماری‌ها در زیست فناوری پزشکی و در نهایت تولید فراورده‌های دارویی و استفاده از زیست فناوری در صنایع غذایی از فعالیت‌های انجام گرفته در سایر زمینه‌های زیست فناوری می‌باشد. برطبق نتایج، تحقیقات انجام شده در زمینه‌های زیست فناوری محیط زیست و بخصوص صنعت در این استان بسیار اندک است که نیازمند توجه جدی در این بخش می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

زیست فناوری
توسعه
استان آذربایجان شرقی

مقدمه

واژه بیوتکنولوژی (زیست فناوری) نخستین بار در سال ۱۹۱۹ توسط Karal Ereky به مفهوم کاربرد علوم زیستی و اثر متقابل آن‌ها در فناوری‌های ساخت به کار برده شد. به طور کلی هرگونه فعالیت هوشمندانه بشر در خلق، بهبود و عرضه محصولات گوناگون با استفاده از موجودات زنده مخصوصاً از طریق بهبود ژنتیکی آن‌ها در سطح مولکولی، در حوزه زیست فناوری قرار می‌گیرد (Fári and Kralovánszky, 2006). برخی کاربردهای سنتی زیست فناوری شامل اصلاح نباتات و دام، تهیه نان، ماست و پنیر و تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، انسولین انسانی و ایتروفرون می‌باشد. در حال حاضر با ظهور فناوری DNA نو ترکیب، مهندسی ژن‌ها و انتقال ژن از یک موجود زنده به دیگری، ظرفیت بهره‌گیری از این فناوری به نحو فزاینده‌ای افزایش یافته است (Verma et al., 2011).

کمیته ملی زیست فناوری کشور بیوتکنولوژی را این گونه تعریف کرده است: بیوتکنولوژی (زیست فناوری) عبارت است از کاربرد علوم مختلف در استفاده مستقیم یا غیرمستقیم از موجودات زنده، قسمتی از بدن و یا فرآورده‌های آن‌ها در اشکال طبیعی یا تغییر یافته به عبارت دیگر، زیست فناوری شامل عضوی از فناوری‌هاست که در آن از موجودات زنده و یا اجزای آن‌ها بهره گرفته می‌شود (Jamejam ۱۳۸۶). این تعریف، گستره وسیعی از رشته‌های مختلف علوم و فنون را در بر می‌گیرد. چنانکه می‌توان زمینه‌های فعالیت زیست فناوری را در بخش‌های کشاورزی، پزشکی، دام و آبزیان، فرآورده‌های غذایی و دارویی، صنعت، محیط زیست و بخش میکروبی فراهم نمود. پیشرفت‌های چشم‌گیر زیست فناوری در دهه‌های اخیر به ویژه پس از دستیابی به روش‌های نوین مهندسی ژنتیک در جداسازی ژن‌ها و انتقال آن‌ها از موجودی به موجود دیگر را به عنوان یکی از مهم‌ترین فناوری‌های مولد در حال و آینده معرفی کرده است. به طور کلی زیست فناوری یکی از محورهای اساسی توسعه در بسیاری از کشورها قلمداد شده و در تنظیم راهکارها و برنامه‌های ملی توجه جدی به آن معطوف گردیده است و ارتقا زیست فناوری به عنوان یکی از اساسی‌ترین شاخص‌های تعیین کننده توسعه محسوب می‌-

شود. کشور ایران با داشتن تنوع گسترده اقلیمی و جغرافیایی و منابع طبیعی اولیه در خشکی و دریا و الگوی منحصربه‌فرد ژنتیکی در همه زمینه‌های انسانی، گیاهی و حیوانی (به طوری که بنا به تصریح برخی دانشمندان علم ژنتیک، ارزش اقتصادی برخی از این ذخایر ژنتیکی از ذخایر معدنی و نفت به مراتب بیشتر است)، از غنی‌ترین و مناسب‌ترین کشورهای جهان برای دستیابی به فناوری‌های حاصل از منابع زیستی است (Tabandeh, 1386).

در حال حاضر زیست فناوری به لحاظ اهمیت و پیش‌بینی افق‌های روشن رشد و توسعه فراگیر، وضعیتی مشابه فناوری‌های هسته‌ای و کاربرد رایانه در قرن بیستم را داراست. از سال ۱۹۸۹ میلادی در بسیاری از کشورها، زیست فناوری به عنوان یک علم با ظرفیت سودآوری بالا شناخته شده است. بنابراین سرمایه‌گذاری در زمینه زیست فناوری در برخی از کشورهای در حال توسعه مانند برزیل، آرژانتین و هند که اهمیت این فناوری برتر قرن را دریافته بودند نیز همانند کشورهای توسعه یافته (مانند آمریکا، کانادا و آلمان) مورد توجه ویژه قرار گرفت. هر چند در ایران سابقه استفاده از زیست فناوری سنتی در انستیتو پاستور ایران و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی نزدیک به یک قرن می‌باشد، ولی توجه جدی به زیست فناوری نوین با تأسیس پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی و همچنین مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی به سال ۱۳۶۰ هجری شمسی برمی‌گردد. با این حال با گذشت نزدیک به یک قرن از حضور علم زیست فناوری در کشور آمار دقیق و ارائه شده‌ای از تعداد پژوهشگران و شرکت‌های فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری در استان‌های مختلف کشور وجود ندارد. در این مطالعه با توجه به اهمیت زیست فناوری در زمینه‌های مختلف و نقش هر یک از آن‌ها در توسعه و پیشرفت، ایجاد اشتغال و درآمدزایی برای استان آذربایجان شرقی لازم دیده شد که اهمیت هر کدام از بخش‌های زیست فناوری و تعداد فعالان در زمینه‌های مختلف زیست فناوری تعیین گردد و با توجه به نیاز استان در زمینه‌های مختلف زیست فناوری و نقش و تاثیر هر کدام از آن‌ها در توسعه استان، اولویت‌بندی لازم بر اساس نیاز استان به هر کدام از زمینه‌های زیست فناوری انجام گیرد تا با اعلام نتیجه

روش‌های دیگر امکان تولید آن وجود نداشته یا بسیار سخت و دشوار بوده، ممکن ساخته است (Erickson et al., 2012).

در این تحقیق که زیر نظر مرکز هدایت و حمایت زیست‌فناوری سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری استان آذربایجان شرقی انجام گرفته است، زیست‌فناوری در هفت زیرشاخه زیست‌فناوری گیاهی، زیست‌فناوری جانوری، زیست‌فناوری پزشکی، زیست‌فناوری صنعت و معدن، زیست‌فناوری دارویی و صنایع غذایی، زیست‌فناوری میکروبی و زیست‌فناوری محیط زیست در نظر گرفته شده است. (Belmi, 2015). مرکز هدایت و حمایت زیست‌فناوری سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری استان آذربایجان شرقی چالش‌ها و اولویت‌های خود را با توجه به نیاز کشور در زمینه زیست‌فناوری به صورت زیر بیان کرده است (Belmi, 2015).

- ۱- حذف آلودگی‌های زیست محیطی به روش‌های بیولوژیک از قبیل Bioremediation و میکروارگانیسم‌ها
- ۲- تولید فرآورده‌های آنزیمی، میکروبی با کاربردهای وسیع از قبیل لیپازها، پروتئازها
- ۳- تولید پروتئین‌های نوترکیب (از قبیل داروئی، واکسن)
- ۴- تولید مواد اولیه زیست‌فناوری (مانند آنزیم‌ها، مارکر DNA، مارکر پروتئین، آگار، آگاروز)
- ۵- ایجاد Platform برای زیست‌فناوری در منطقه (مرکز تولید پرایمر، مرکز توالی‌یابی DNA و پروتئین و ...)
- ۶- بومی‌سازی پروتکل‌های تولیدی و تشخیصی در حوزه زیست‌فناوری برای اولین بار در استان و یا کشور
- ۷- بررسی و تولید انرژی‌های نوین از قبیل سوخت زیستی، هیدروژن زیستی و ...
- ۸- تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات ارزشمند از ریز جلبک‌ها
- ۹- راهکارهای درمانی جدید در مقابل میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو از قبیل مواد ضد میکروبی جدید

این مطالعه به هریک از بخش‌های مربوطه، این بخش‌ها مطالعات خود را بر اساس اولویت‌های زیست‌فناوری مشخص شده و با توجه به نیاز کشور و استان برنامه‌ریزی و به اجرا برسانند. امید است مطالعات مشابه در سایر استانها نیز انجام و اطلاعات در سطح کشور به روز رسانی شود.

بخش‌های مختلف زیست‌فناوری

در قرن ۲۱ با توجه به افزایش بی‌رویه جمعیت و نیاز به تأمین مواد غذایی، زیست‌فناوری کشاورزی مورد توجه خاص قرار گرفته است. گیاهان زراعی تراریخته پر محصول و مقاوم گوناگونی مانند ذرت، برنج، سویا، گوجه‌فرنگی و گندم تولید شده و روش‌های نوین زیست‌فناوری در افزایش تولید شیر و گوشت دام موثر واقع شده‌اند (Samuel, 2008). تأمین سلامت و بهداشت جمعیت بیش از هفت میلیاردی ساکنان کره زمین از طریق تولید داروهای نوترکیب و واکسن‌ها، دستیابی به روش‌های درمان کم‌هزینه بیماری‌ها، یافتن درمان بیماری‌های صعب‌العلاج و تشخیص سریع‌تر و مؤثرتر بیماری‌های گوناگون از جمله بیماری‌های ژنتیکی از وظایف زیست‌فناوری پزشکی می‌باشد (Zand and Narasu, 2013).

رویکرد جدید به محیط زیست در قرن حاضر، در نظر گرفتن آن به عنوان یک جزء از سرمایه ملی کشورها و در نتیجه لزوم حفظ آن با استفاده از زیست‌فناوری از مهم‌ترین دغدغه‌های بشر در قرن حاضر است. حذف مؤثر آلاینده‌های محیطی خطرناک از محیط زیست با استفاده از میکروارگانیسم‌های پالایشگر آلودگی و استفاده از روش‌های حفظ، نگهداری و حراست از ذخایر ژنتیکی کشور از جمله کاربردهای زیست‌فناوری در زمینه محیط زیست می‌باشد (Fahmideh et al., 2014).

کاربردهای زیست‌فناوری در صنعت که منجر به تولید محصولات گوناگون با صرف هزینه و انرژی کمتر، ضایعات اندک و از همه مهم‌تر با کمترین اثر مخرب بر محیط زیست می‌شود، باعث شده که از این فناوری به عنوان یکی از پاک‌ترین و درعین حال سودآورترین بخش‌های صنعت یاد شود. زیست‌فناوری همچنین تولید محصولات نوینی را که قبلاً از

مواد و روشها

این تحقیق در سالهای ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ هجری شمسی زیر نظر مرکز هدایت و حمایت زیست فناوری سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری استان آذربایجان شرقی انجام گردید. اطلاعات مربوط به فعالان در زمینه‌های مختلف زیست فناوری، و شرکت‌های دانش‌بنیان مربوط به حوزه زیست فناوری با مراجعه حضوری به محل هریک از دانشگاه‌ها، پژوهشکده‌ها، موسسه‌ها و ایستگاه‌های تحقیقاتی و شرکت‌های مربوطه و انجام مصاحبه حضوری، مراجعه به سایت‌های اینترنتی و تهیه و ارسال فرمی مبنی بر وارد کردن اطلاعات فعالیت‌های انجام شده به محققان جمع‌آوری گردید. اطلاعات در فرم‌های طراحی شده در نرم‌افزار اکسس ۲۰۱۰ طبقه‌بندی شد. فرم‌های طبقه‌بندی شده به نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ انتقال یافت. جداول و نمودارهای مربوط به اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ طراحی و رسم گردید.

نتایج

پژوهشگران فعال در حوزه‌های مختلف زیست فناوری استان

به‌منظور شناسایی و ارزیابی دقیق تعداد افراد فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری از طریق سایت‌های مربوط به مراکز علمی دانشگاهی، موسسه‌های تحقیقاتی فعال در زمینه زیست فناوری و شرکت‌های دانش‌بنیان فعال در ارتباط با زیست فناوری و همچنین با مراجعه حضوری به مراکز مربوطه، اطلاعات موردنیاز در این رابطه جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تعداد کل افراد فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری استان ۲۴۰ نفر شناسایی شد. با توجه به اینکه تعدادی از محققین در چند زمینه مختلف فعالیت می‌کردند بنابراین درصد فعالیت پژوهشگران در زمینه‌های مختلف زیست فناوری به ترتیب ۴۸/۳٪ برای زیست فناوری گیاهی، ۳۰٪ زیست فناوری جانوری، ۱۳٪ زیست فناوری میکروبی، ۱۲/۵٪ زیست فناوری پزشکی، ۹/۱۶٪ زیست فناوری دارویی و صنایع غذایی، ۵/۴۱٪ زیست فناوری محیط‌زیست و ۰/۴۱٪ زیست فناوری صنعت و معدن برآورد شد (نمودار ۱). همچنین در این مطالعه تعداد شرکت‌های دانش‌بنیان فعال در حوزه‌های مختلف زیست فناوری ۱۴ عدد شناسایی

۱۰- تولید بذر و نهال عاری از بیماری برای تمامی محصولات کشاورزی (سالم، پر محصول و سازش یافته با منطقه) با استفاده از روش‌های پیشرفته ویروس‌زدایی و...

۱۱- استفاده از مباحث حوزه زیست فناوری در حوزه سلامت و امنیت غذایی

۱۲- شناسایی و معرفی بیومارکرها برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها به‌خصوص سرطان‌های شایع در استان

۱۳- شناسایی یا تولید ترکیبات دارویی جدید برای درمان بیماری‌ها (با تأکید بر ترکیبات گیاهی و نانو ذرات)

۱۴- شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری‌های مختلف به‌منظور درمان ایده آل و مناسب بیماری‌ها

۱۵- استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاح نباتات

۱۶- تکمیل، ساماندهی و شبکه‌سازی بانک‌های ژن یا ژرم‌پلاسما گیاهی، میکروارگانیسمی و... (منطقه‌ای) و فهرست کردن نمونه‌های هریک از بانک‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی

۱۷- استفاده از زیست فناوری برای حفظ تنوع زیستی و ذخایر ژنتیکی استان به‌ویژه منطقه ارسباران و پیام

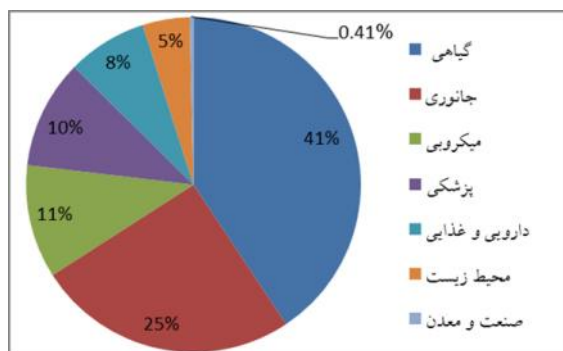
۱۸- مطالعه مکانیسم‌های مقاومت به شوری و معرفی گونه‌های گیاهی مقاوم به شوری و کشت و اهلی سازی آن‌ها

۱۹- شناسایی ژن‌های مقاومت به شوری و انتقال آن به گیاهان زراعی (به‌ویژه در مناطق اطراف دریاچه ارومیه)

۲۰- بررسی راهکارها و موانع افزایش تعداد بنگاه‌های خصوصی و تعاونی زیست فناوری در استان

۲۱- ایجاد و بومی‌سازی روش‌هایی برای ارزیابی و مدیریت خطرات زیست فناوری

با توجه به این اولویت‌بندی و با توجه به حضور تعداد زیادی از فعالان حوزه زیست فناوری در استان، بررسی و تعیین دقیق زمینه‌های فعالیتی محققین در راستای هدایت آن‌ها با توجه به اولویت‌های موردنیاز جامعه امروزی امری ضروری به نظر می‌رسد.



نمودار ۱- درصد فعالیت محققین در زمینه‌های مختلف زیست فناوری استان

Chart 1- Percent of researchers' activity in different area of biotechnology in the province

بررسی‌ها نشان داد که از نظر استقرار شرکت‌های دانش‌بنیان نیز شهر تبریز نسبت به شهرهای دیگر پیشگام بوده و از بین ۱۴ شرکت دانش‌بنیان شناسایی شده ۱۳ عدد از آن‌ها در شهر تبریز و تنها یک مورد از آن‌ها در شهر مرند مستقر گردیده است (جدول ۲). شکل ۱ پراکندگی جغرافیایی شرکت‌های دانش‌بنیان و محققان فعال در حوزه زیست فناوری استان را نشان می‌دهد.

گردید که در زمینه‌های کشاورزی، دارویی، پزشکی و صنایع غذایی به ترتیب با ۳۷/۵٪، ۳۷/۵٪، ۱۲/۵٪ و ۱۲/۵٪ فعالیت می‌کنند (نمودار ۷).

بررسی‌ها و مطالعات انجام‌گرفته نشان داد که در بین شهرهای استان آذربایجان شرقی چهار شهر تبریز، مراغه، شبستر و اهر شهرهای فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری می‌باشند. در بین این شهرها، شهر تبریز با فعالیت ۱۴۶ محقق در زمینه‌های مختلف زیست فناوری (پزشکی، دارویی و صنایع غذایی، جانوری، صنعت و معدن، گیاهی، محیط‌زیست، میکروبی) بیشترین فعالیت را به خود اختصاص داده و شهرهای مراغه با ۴۶ محقق و فعالیت در زمینه‌های زیست فناوری جانوری، پزشکی، گیاهی و میکروبی؛ شبستر با ۳۰ فعال و فعالیت در زمینه‌های زیست فناوری جانوری و صنایع غذایی و اهر با ۱۸ فعال و فعالیت در زمینه‌های زیست فناوری پزشکی، جانوری و گیاهی در رتبه‌های بعدی قرار دارند (جدول ۱).

جدول ۱- شهرهای فعال، زمینه‌های فعالیتی زیست فناوری و تعداد افراد فعال در این شهرها.

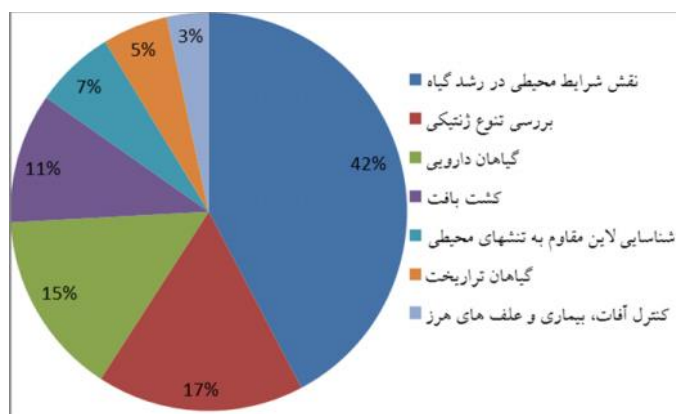
Table 1- Active cities, fields of biotechnology activity and the number of active researchers in the cities

نام شهر	زمینه‌های فعالیتی زیست فناوری	تعداد افراد فعال
تبریز	پزشکی، دارویی و صنایع غذایی، جانوری، صنعت و معدن، گیاهی، محیط‌زیست، میکروبی	۱۴۶
مراغه	جانوری، پزشکی، گیاهی، میکروبی	۴۶
شبستر	جانوری، صنایع غذایی	۳۰
اهر	پزشکی، جانوری، گیاهی	۱۸

جدول ۲- تعداد شرکت‌های دانش‌بنیان مستقر در شهرهای استان آذربایجان شرقی.

Table 2- The number of knowledge-based companies in the East Azarbaijan Province

نام شهر	زمینه‌های فعالیتی شرکت‌های دانش‌بنیان	تعداد شرکت‌ها
تبریز	پزشکی، دارویی و صنایع غذایی، جانوری، صنعت و معدن، گیاهی، محیط‌زیست، میکروبی	۱۳
مرند	کشاورزی	۱



نمودار ۲- فعالیت محققین در زمینه های مختلف زیست فناوری گیاهی استان

Chart 2. Research activities in various area of plant biotechnology in the province

مطالعه و بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی با هدف اصلاح نباتات نیز با ۱۶/۸٪ در رتبه دوم مطالعات محققین فعال در زمینه زیست فناوری گیاهی استان قرار دارد. مطالعه بر روی گیاهان دارویی با ۱۴/۹٪ توسط محققین زیست فناوری گیاهی در جایگاه بعدی قرار دارد که از این ۱۴/۹٪ در حدود ۵۰٪ در ارتباط با بررسی شرایط مختلف رشدی و نقش آنها در عملکرد این گیاهان بوده، ۵۰٪ نیز در ارتباط با تولید و استخراج متابولیت های ثانویه و عصاره گیاهان دارویی و همچنین بررسی نقش و عملکرد دارویی آنها می باشد. مطالعه بر روی کشت بافت گیاهی، شناسایی لاین های مقاوم گیاهی به تنش های مختلف محیطی، تولید گیاهان تراریخت و استفاده از روش های مختلف در زمینه کنترل آفات، بیماری ها و علف های هرز گیاهی به ترتیب با ۱۰/۶٪، ۶/۵٪، ۵/۳٪ و ۳/۴٪ در رتبه های بعدی قرار گرفتند (نمودار ۲).

در بین مطالعات مرتبط به زیست فناوری جانوری که ۳۰٪ مطالعات بخش زیست فناوری استان را شامل می شود، بخش اعظم مطالعات در ارتباط با بررسی تاثیر عوامل مختلف بر روی رشد و پرورش دام و طیور و نیز عملکرد محصولات آنها می باشد که ۵۱/۵٪ از مطالعات زیست فناوری جانوری را شامل می شود. ۲۷/۵٪ از مطالعات زیست فناوری جانوری مربوط به سلامت دام و طیور و مطالعه بر روی بیماری های مختلف آنها می باشد و همچنین بررسی سلامت و امنیت محصولات مورد استفاده این



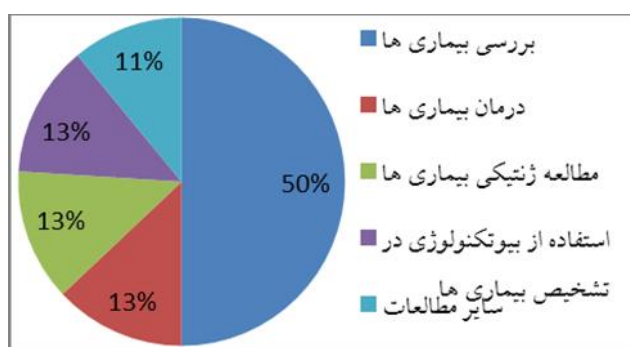
شکل ۱- پراکندگی شرکت های دانش بنیان فعال در حوزه زیست فناوری استان آذربایجان شرقی (نقاط زرد)، پراکندگی فعالان حوزه زیست فناوری در سطح شهرهای این استان (نقاط سبز).

Figure 1. Distribution of active knowledge-based companies in the field of biotechnology in East Azerbaijan Province (Yellow dots), Distribution of biotechnology researchers in the cities of the province (Green dots).

تعداد ۱۵ مرکز علمی دانشگاهی، موسسه و ایستگاه تحقیقاتی فعال در حوزه زیست فناوری در این مطالعه شناسایی شد که در زمینه های مختلف زیست فناوری فعالیت می کنند (جدول ۲). بنابراین بررسی فعالیت محققین و تعیین زمینه های فعالیتی آنها بر اساس اولویت های معرفی شده صورت گرفت. با توجه به آنچه اشاره شد در حدود نیمی (۴۸/۳٪) از فعالین در حوزه زیست فناوری در زمینه گیاهی فعالیت می کنند، بنابراین تنوع فعالیتی در زمینه گیاهی نیز بیشتر بوده و بررسی ها نشان داد که در حدود ۴۲٪ درصد از فعالان در زمینه گیاهی در ارتباط با بررسی تاثیر شرایط مختلف محیطی و تغذیه ای از جمله قرارگیری گیاه تحت تنش های مختلف (شوری، کم آبی و ...) روی رشد، خصوصیات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و در نهایت عملکرد گیاهان می باشد.



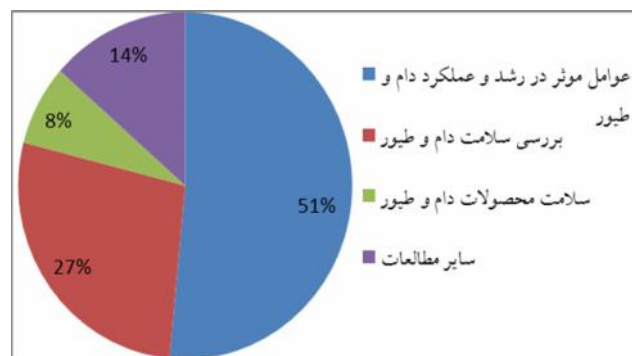
نمودار ۴- فعالیت محققین در زمینه های مختلف زیست فناوری میکروبی استان

Chart 4. Research activities in various area of microbial biotechnology in the province


نمودار ۵- فعالیت محققین در زمینه های مختلف زیست فناوری پزشکی استان

Chart 5. Research activities in various area of medical biotechnology in the province

فناورانه توسط زیست فناوری پزشکی نیز به طور مساوی و در حدود ۱۳٪ می باشد (نمودار ۵). در ارتباط با زیست فناوری دارویی و صنایع غذایی، بیشتر مطالعات در ارتباط با صنایع غذایی و بررسی سلامت و امنیت فراورده های غذایی، بررسی ترکیبات مختلف و میزان ترکیبات در فراورده ها و همچنین استفاده از باکتری های پروبیوتیک در فراورده های غذایی (شیر و ماست پروبیوتیک) می باشد که ۶۰٪ از مطالعات را به خود اختصاص داده است. عمده مطالعات در زمینه دارویی مربوط به ساخت داروهای جدید، بررسی عملکرد داروها و افزایش اثر داروها برعلیه بیماری های مربوطه می باشد که در حدود ۴۰٪ از مطالعات زمینه زیست فناوری دارویی و صنایع غذایی را شامل می شود (نمودار ۶).



نمودار ۳- فعالیت محققین در زمینه های مختلف زیست فناوری جانوری استان

Chart 3. Research activities in various area of animal biotechnology in the province

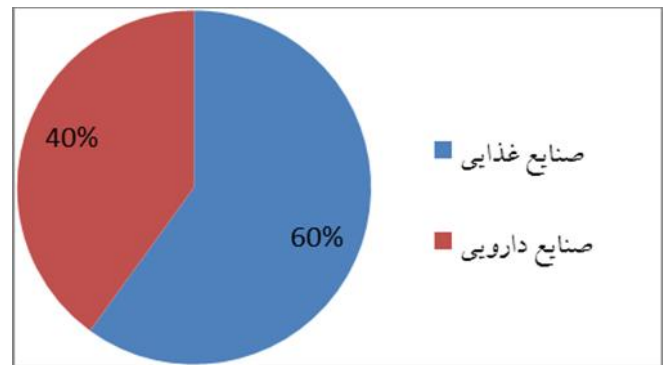
حوزه نیز با ۷/۵٪ از موضوعات مورد مطالعه محققین فعال در زمینه زیست فناوری جانوری می باشد. ۱۳/۵٪ نیز در ارتباط با سایر مطالعات از جمله مطالعات تنوع ژنتیکی دام و طیور با استفاده از نشانگرهای مولکولی، استفاده از برنامه های اصلاحی نژاد دام ها و همچنین حفظ گونه های جانوری می باشد (نمودار ۳).

بررسی مطالعات در زمینه زیست فناوری میکروبی بیانگر علاقه مندی محققین به استفاده از سیستم های باکتریایی در جهت همسان سازی ژن های مفید با هدف انتقال این ژن ها به موجودات هدف یا بیان ژن مورد نظر به منظور تولید پروتئین ها و آنزیم های دارویی و صنعتی می باشد که بیش از ۵۰٪ مطالعات در زمینه زیست فناوری میکروبی را به خود اختصاص داده است. در حدود ۲۵٪ مطالعات در این زمینه نیز مربوط به بررسی اثر ترکیبات مختلف جدا شده از گیاهان و میکروارگانیسم های مختلف برعلیه میکروب های مضر انسانی، جانوری و گیاهی می باشد. مطالعات انجام گرفته در زمینه برهمکنش پروتئینی در سیستم مخمری، تولید ترکیبات جدید ضد میکروبی، استفاده از باکتری های مفید (پروبیوتیک ها) در فراورده های غذایی و استفاده از باکتری ها در حذف مواد آلاینده از محیط زیست و زیست پالایی هم در ارتباط با زیست فناوری میکروبی می باشند (نمودار ۴).

در زمینه زیست فناوری پزشکی نیز حدود ۵۰٪ از مطالعات محققین فعال در رابطه با بررسی بیماری های مختلف (چگونگی ایجاد بیماری، مکانیسم بیماری، عوامل تاثیر گذار بر روی بیماری) می باشد، مطالعات مربوط به درمان بیماری ها، مطالعه ژنتیکی بیماری ها و تشخیص بیماری ها از طریق روش های زیست

تعدادی از مطالعات انجام گرفته نیز در زمینه زیست فناوری محیط زیست و زیست پالایی بود که بررسی ها انجام گرفته حاکی از استفاده محققین از باکتری ها و برخی گیاهان یا هر دو آنها به منظور حذف مواد مضر از محیط زیست و زیست پالایی می باشد.

اما سایر مطالعات محققین زیست فناوری استان آذربایجان شرقی که کمتر از سه درصد کل مطالعات را شامل می شود در ارتباط با مطالعات بیوانفورماتیکی، بررسی تولید و عملکرد بیوسنسورها و همچنین در ارتباط با صنعت می باشد.



نمودار ۶- فعالیت محققین در زمینه های مختلف زیست فناوری دارویی و صنایع غذایی استان

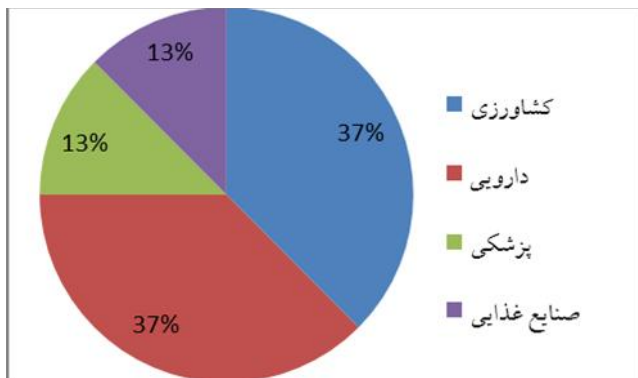
Chart 6. Research activities in various areas of pharmaceutical biotechnology and food industry in the province

جدول ۲- مراکز علمی فعال و زمینه فعالیت های آنها در حوزه زیست فناوری در استان آذربایجان شرقی

Table 2- Active scientific centers and their activities in the field of biotechnology in the province

ردیف	نام دانشگاه، موسسه، مرکز تحقیقات	زمینه فعالیت
۱	دانشگاه علوم پزشکی تبریز/ دانشکده علوم نوین پزشکی	زیست فناوری پزشکی، دارویی
۲	دانشگاه تبریز/ دانشکده دام پزشکی	زیست فناوری جانوری
۳	دانشگاه تبریز/ دانشکده علوم طبیعی	زیست فناوری گیاهی، جانوری، پزشکی
۴	دانشگاه تبریز/ دانشکده کشاورزی	زیست فناوری گیاهی، جانوری
۵	دانشگاه شهید مدنی آذربایجان/ دانشکده علوم پایه	زیست فناوری پزشکی، میکروبی، گیاهی
۶	دانشگاه شهید مدنی آذربایجان/ دانشکده کشاورزی	زیست فناوری گیاهی، میکروبی
۷	دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز/ دانشکده کشاورزی	زیست فناوری گیاهی
۸	مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب	زیست فناوری گیاهی، صنایع غذایی
۹	دانشگاه صنعتی سهند/ دانشکده شیمی	زیست فناوری دارویی، صنایع غذایی، محیط زیست
۱۰	دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر	زیست فناوری گیاهی، جانوری
۱۱	دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر	زیست فناوری پزشکی، جانوری
۱۲	دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر	زیست فناوری جانوری، صنایع غذایی
۱۳	مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آ.ش	زیست فناوری جانوری، گیاهی
۱۴	دانشگاه مراغه	زیست فناوری گیاهی، جانوری، پزشکی
۱۵	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور	زیست فناوری گیاهی

بحث و نتیجه‌گیری

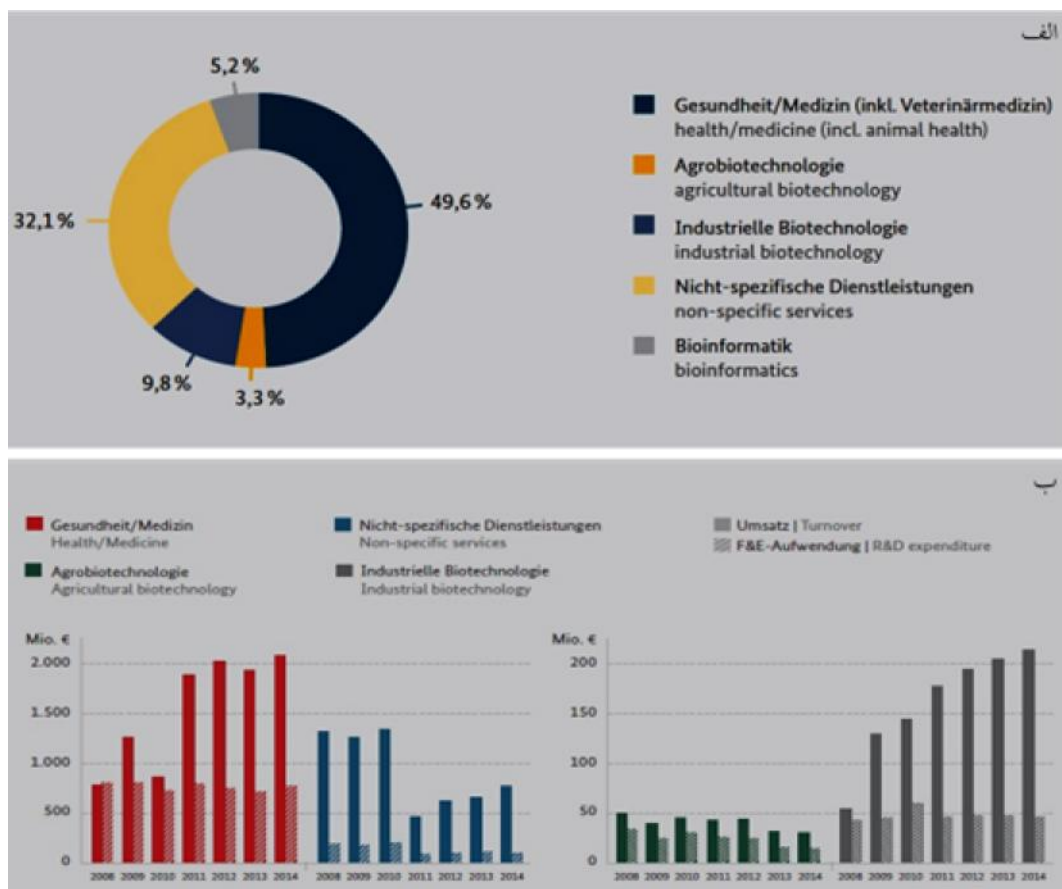


نمودار ۷- فعالیت شرکت‌های دانش‌بنیان استان آذربایجان شرقی در زمینه‌های مختلف زیست‌فناوری

Chart 7. Activity of Knowledge-based companies in various field of biotechnology in East Azerbaijan Province

مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه که نشان دهنده موضوعات مورد مطالعه محققان فعال زمینه زیست‌فناوری استان آذربایجان شرقی می‌باشد با اولویت‌های مطرح شده توسط مرکز هدایت و حمایت زیست‌فناوری سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری استان آذربایجان شرقی بیانگر وضعیت نه‌چندان مطلوب استان در این حوزه می‌باشد. با توجه به مشکلات موجود بر سر راه زیست‌فناوری استان آذربایجان شرقی از جمله فقدان راهبرد و اولویت‌بندی مشخص برای زیست‌فناوری استان، ضعف ارتباطات لازم بین سازمان‌ها، مراکز پژوهشی، دانشگاه‌ها و سایر نهادها، کمبود امکانات پژوهشی باوجود گستردگی و غنای ذخایر ژنتیکی، گونه‌های مختلف گیاهی و جانوری در نقاط مختلف استان امید است که با راه‌اندازی مراکزی همچون مرکز هدایت و حمایت زیست‌فناوری سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری و تعیین اولویت‌های دقیق با توجه به نیازهای استانی و کشوری و حمایت همه‌جانبه دولت و مسئولین از زیست‌فناوری و سرمایه‌گذاری مناسب و ویژه دولت در زیرساخت این علم به‌زودی شاهد شکوفایی زیست‌فناوری استان در تمام زمینه‌های آن با توجه به اولویت‌های تعیین شده باشیم. نتایج این بررسی در قالب یک وب سایت قابل جستجو در دسترس فعالان قرار گرفت و

نتایج این مطالعه نشان داد که بخش اعظم مطالعات زیست‌فناوری استان آذربایجان شرقی در ارتباط با زمینه‌های مختلف زیست‌فناوری گیاهی می‌باشد درحالی‌که در کشور پیشرفته‌ای از نظر علم زیست‌فناوری مثل آلمان طبق آمار سال ۲۰۱۵ (The German Biotechnology Sector 2015) عمده فعالیت محققان در زمینه زیست‌فناوری پزشکی و در ارتباط با سلامت انسان می‌باشد، به‌طوری‌که فعالیت ۴۹/۶٪ از شرکت‌های فعال در زمینه زیست‌فناوری در ارتباط با زیست‌فناوری پزشکی می‌باشد. مطالعات در زمینه صنعت و مطالعات بیوانفورماتیکی نیز با توجه به تعداد زیاد شرکت‌های فعال در این زمینه‌ها که به ترتیب ۹/۸٪ و ۵/۲٪ می‌باشد بیشتر از مطالعات گیاهی بوده، در این کشور تنها ۳/۳٪ از شرکت‌های فعال زیست‌فناوری در حوزه گیاهی فعالیت می‌کنند (نمودار ۸-الف). با توجه به آمار به‌دست آمده تعداد شرکت‌های فعال (دانش‌بنیان) در زمینه زیست‌فناوری در استان آذربایجان شرقی ۱۴ عدد شناسایی شد. بررسی‌ها نشان داد که بخش اعظم فعالیت‌های مربوط به این شرکت‌ها در زمینه‌های کشاورزی و دارویی بوده که هرکدام از این زمینه‌ها ۳۷/۵٪ سهم فعالیت‌های زیست‌فناورانه شرکت‌های فعال استان را در برمی‌گیرند. فعالیت این شرکت‌ها در زمینه‌های پزشکی و در ارتباط با صنایع غذایی نیز به‌طور مساوی و ۱۲/۵٪ برآورد شد (نمودار ۷) اما زیست‌فناوری صنعتی باوجود اهمیت بسیار بالایی که دارد هیچ سهمی در فعالیت‌های شرکت‌های دانش‌بنیان استان آذربایجان شرقی ندارد. این در حالی است که در کشور آلمان باوجوداینکه زیست‌فناوری صنعتی تنها ۹/۸٪ فعالیت‌های حوزه زیست‌فناوری را به خود اختصاص داده در سال ۲۰۱۴ بیش از ۲۰۰ میلیون یورو درآمد کسب کرده است که نشان از اهمیت زیست‌فناوری صنعتی در توسعه کشورها دارد (نمودار ۸-ب).



نمودار ۸- فعالیت شرکت‌های فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری کشور آلمان (الف)، میزان سرمایه‌گذاری و سود حاصل شرکت‌های فعال در زمینه‌های مختلف زیست فناوری در کشور آلمان (ب) (The German Biotechnology Sector, 2015).

Chart 8. (A) Different area of activity in biotechnology companies in Germany, (B) The investments and profits of active companies in different field of biotechnology in Germany. *The German Biotechnology Sector, 2015*

امید است بررسی‌های مشابه در سایر استانها باعث شناخت وضعیت موجود کشور از لحاظ زیست فناوری گردد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از سازمان بسیج علمی، پژوهشی و فناوری استان آذربایجان شرقی که حامی این مطالعه و بررسی بوده است را ابراز می‌داریم.

منابع

- Belmi. 2015.** [http:// www.bio.belmi.ir/](http://www.bio.belmi.ir/). Belmi. Tabriz. Iran.
- Erickson B, Nelson JE, Winters P. 2012.** Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol. J* 7: 176-185.
- Jamejam online. 1386.** <http://www1.jamejamonline.ir/printable.aspx?newsnum=100004069951>. Tehran. Iran.
- Fahmideh L, Khodadadi E, khodadadi E. 2014.** A review of applications of biotechnology in the environment. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 3: 1319-1325.
- Fári MG, Kralovánszky UP.** The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science* 12(1): 9-12.
- Samuel SM. 2008.** Application of agricultural biotechnology to improve food nutrition and healthcare products. *Asia Pac J Clin Nutr* 17: 87-90.
- The information portal Biotechnology. 2015.** The German Biotechnology Sector 2015. <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation>
- Tabndeh F. 1385.** National document biotechnology Islamic Republic of Iran. Tehran.
- Verma AS, Agrahair S, Rastogi S, Singh A. 2011.** Biotechnology in the Realm of History. *J pharma Bioallied Sci* 3(3): 321-323.
- Zand M, Narasu ML. 2013.** A review article Biotechnology Applications in Medicine. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 4: 2557-2563.

The status study of Biotechnology in East Azerbaijan Province

Jafar razeghi^{1*}, Amin Sahandi Khalifeh-Kandy²

¹Assistant Prof. Plant Biology Dept. Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, IRAN

²Master of Science, Biotechnology Dept. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, IRAN

* Corresponding Author, Email jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Biotechnology is one of the most important scientific strategies in today's world and involves application of various techniques in direct or indirect usage of living organisms or their byproducts in natural or modified forms for different fields. Significant advances of biotechnology in recent decades, especially after the acquisition of new methods of genetic engineering for gene isolation, their modification and transferring from one species to another have made biotechnology one of the most productive present and future technologies. Iran with a wide variety of climate and the variety of living organisms is the most suitable region for access to technologies derived from biological sources. It is evident that management and planning in biotechnology, as in all fields, requires a good understanding of the researchers in that field. In this study we attempted to identify researchers, institutes, universities and companies operating in various fields of biotechnology along with their research areas so as to identify strengths and weaknesses of biotechnology to help making targeted decision in the province and the country. The results of this study showed that more than 40% of the provincial biotechnological activities are related to agriculture, about 25% are related to animal science and 35% to other sectors. The main activities in the agricultural biotechnology are related to study of different growth conditions of plants. Study on medicinal plants, plant tissue culture and production of transformed plants are other activities in this section. Factors affecting the growth of livestock, animal health and livestock products are main activities related to animal biotechnology as well as cloning of useful genes and control of pathogenic microorganisms in microbial biotechnology. Review, treatment, and diagnosis of genetic diseases through biotechnology in the medical field and, finally, production of pharmaceutical products and the use of biotechnology in the food industry are also activities which are carried out by researchers in various fields of biotechnology in East Azerbaijan Province. Based on these results, activities related to environmental biotechnology and especially industrial biotechnology are under-represented in East Azerbaijan Province and serious attention should be paid to this section.

Key Words

Biotechnology, Development, East Azerbaijan Province

بررسی القای ریشه زایی در چند گونه گیاهی دارویی با تاثیر ژنهای *rol* آگروباکتریوم رایزوژنز

Study of root induction in several medicinal plant species using *A. rhizogenes rol* genes

آوین شجاعی^۱، هانیه محجل شجا^{۲*} و ناصر مهنا^۳

Shojaii A.¹, mohajjel shoja H.^{2*}, Mahna N.³

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد تکوین گیاهی،
۲- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

1. MSc. student, 2. Assistant professor, Plant Biology Dept. Faculty of Natural
Science, University of Tabriz
3. Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: H_mohajjel@tabrizu.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۴)

چکیده

آگروباکتریوم رایزوژنز از طریق انتقال ژنهای *rol* موجود در ناقل Ri خود به درون ژنوم سلولهای گیاهی موجب القاء علائم ریشه‌های موین در بسیاری از گیاهان دولپه‌ای می‌گردد. این ریشه‌ها بدلیل ویژگی‌هایی همچون رشد سریع، ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی، نگهداری آسان و قابلیت رشد در محیط کشت بدون هورمون دارای اهمیت زیادی در تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه در بیوراکتورهای صنعتی محسوب می‌شوند. در تحقیق پیش رو تاثیر ژن‌های *rol* خصوصاً ژن *rolB* در القاء ریشه‌زایی گیاهان دارویی سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه که بخش دارویی مورد مصرف آنها ریشه می‌باشد مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور ریزنمونه‌های برگ‌گی و قسمتهای زخمی گیاهان کامل برای تلقیح باکتری و القاء ریشه‌زایی استفاده شدند. اثبات تراژنی ریشه‌ها با استفاده از روش PCR بر روی DNA ژنومی و اثبات بیان تراژنها نیز توسط روش RT-PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام پذیرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین ریشه‌زایی در گیاه سنبل الطیب و در شرایط کشت ریز نمونه‌های برگ‌گی در محیط کشت جامد MS صورت می‌گیرد و تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های کامل تاثیری در القاء ریشه‌زایی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز
rol
ریشه موین
RT-PCR

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز به منظور درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با پیشرفت علم شیمی تجزیه امکان شناخت مواد موثره گیاهی فراهم شده و داروهای گیاهی طبیعی و سنتتیک تولید گشته‌اند. با توجه به وحشی و نادر بودن اکثر گیاهان دارویی و وجود مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی آن‌ها و نیز غلظت پایین ترکیبات موثره دارویی (متابولیت‌های ثانویه) در این گیاهان، توجه پژوهشگران به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف شده است. کشت بافت گیاهان دارویی از جمله روش‌های بیوتکنولوژی می‌باشد که به منظور تولید بهینه متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است (Matkowski, 2008; Davies and Murthy et al. 2014). اخیراً کشت ریشه‌های مویین به عنوان یک منبع پایدار برای بالا بردن سطح این متابولیت‌ها پیشنهاد شده است (Chandra and Chandra, 2011; 2007). (Srivastava and Srivastava, 2006). ریشه‌های مویین که در اثر آلودگی گیاه با آگروباکتریوم رایزوترنز ایجاد می‌شوند دارای رشد بسیار سریع‌تر از بافت‌های مجاور خود بوده و توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. دلیل اصلی سرعت بالای رشد این ریشه‌ها انتقال قطعه‌ای از ژنوم ناقل باکتری موسوم به قطعه T-DNA (Transferred-DNA) به درون ژنوم گیاه می‌باشد که با دارا بودن جایگاه‌های ژنی *rolA*, *rolB*, *rolC* و ژن‌های مربوط به سنتز هورمون‌هایی همچون اکسین باعث تراریزش ریشه‌ها و ایجاد علائم ریشه‌های مویین در محل آلودگی گیاه با آگروباکتریوم می‌گردند (Chabaud et al. 2006). از ویژگی این ریشه‌ها ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی، نگهداری آسان و قابلیت رشد در محیط کشت بدون هورمون می‌باشد که استفاده از آن‌ها را در بیوراکتورهای صنعتی به منظور دستیابی به تولید انبوه میسر ساخته است. تحقیقات متعددی تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را در کشت ریشه‌های مویین به اثبات رسانده‌اند. محققان نشان داده‌اند که تولید متابولیت‌های ثانویه خصوصاً فلاونوئیدها در ریشه‌های مویین گیاه وسمه (*Isatis tinctoria*)

آلوده به آگروباکتریوم رایزوترنز و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد بسیار چشم‌گیر می‌باشد (Gai et al. 2015). در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Dracocephalum kotschy* Boiss افزایش ۱۵ برابری تولید رزمارینیک اسید (Fattahi et al. 2013) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. افزایش تولید فورانوکومارین‌ها در گیاه آلوده به آگروباکتریوم *Glehnia littoralis* (Terato et al. 2011) و افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها نیز در ریشه‌های مویین گیاه بنگدانه *Hyoscyamus muticus* L. (Dehghan et al. 2012) پس از آلودگی با آگروباکتریوم مشاهده شد. این‌چنین به نظر می‌رسد که ژن‌های *rol* از طریق افزایش میزان حساسیت سلول‌های گیاه میزبان به فیتوهورمون‌ها از جمله هورمون اکسین عملکرد ریشه‌زایی خود را انجام می‌دهند و لذا در حضور مقادیر بسیار ناچیز این هورمون - چه در درون سلول‌های ریشه و چه در محیط کشت- بیشترین تاثیر در القای ریشه‌زایی اتفاق می‌افتد (Cardarelli et al. 1987). از میان ژن‌های *rol*, ژن *rolB* به عنوان مهمترین و قوی‌ترین ژن ریشه‌زا تلقی می‌گردد چرا که این ژن به تنهایی قادر به القاء ریشه‌زایی بر روی برگ و ساقه گیاهان توتون می‌باشد (Cardelli et al. 1987; Spena et al. 1987)، از طرف دیگر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوترنز که دارای ژن جهش یافته *rolB* می‌باشند قادر به القاء ریشه‌زایی به همان گونه‌ای که باکتری‌های تیپ وحشی ایجاد می‌کنند، نیستند (White et al. 1985). پژوهش حاضر قصد دارد اثر ژن‌های *rolABC* و نیز ژن *rolB* را در القای ریشه‌زایی چند گونه گیاهی که بخش دارویی مورد مصرف آن‌ها ریشه می‌باشد مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر گیاه توتون و نشاء گیاهان سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه از موسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی در شهر تبریز تهیه شدند. بذر گیاه توتون و نشاء گیاهان سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه در خاک گلدان کاشته شدند و پس از گذشت ۸ هفته برداشت ریزنمونه از آنها جهت

OD600 باکتری‌ها مساوی ۱ باشد. این سوسپانسیون برای تلقیح ریزنمونه‌های برگی مورد استفاده قرار گرفت.

تلقیح ریزنمونه‌ها:

ریزنمونه‌های برگی بدست آمده از گیاهان ۸ هفته‌ای توتون، سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه در سوسپانسیون باکتریایی به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس مایع اضافی توسط کاغذ صافی استریل زدوده شد. سپس ریزنمونه‌ها به پتری‌های حاوی محیط کشت MS با ۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز منتقل و در تاریکی با دمای 24°C قرار داده شدند. پس از سپری شدن ۴۸ ساعت، به منظور حذف باکتری‌ها، ریزنمونه‌ها در محیط $\frac{1}{2}\text{MS}$ مایع حاوی 350 mg/L سفوتاکسیم غوطه‌ور گردیدند و پس از زدودن مایع اضافی به محیط MS با ۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز و دارای همان غلظت سفوتاکسیم منتقل شدند. هر دو هفته یک‌بار تعویض محیط کشت صورت پذیرفت تا مواد غذایی همواره در دسترس ریزنمونه‌ها قرار داشته باشد.

آزمایش‌های مولکولی: به منظور اطمینان از ماهیت تراژنی بافت‌های آلوده، واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده (به روش CTAB, Reichardt and Rogers, 1994) از ریزنمونه‌های برگی دارای ریشه و به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام پذیرفت. همچنین به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در بافت‌های آلوده استخراج RNA (به روش Trizol، ساخت شرکت Invitrogen) و سنتز cDNA (توسط کیت Superscript III ساخت شرکت Invitrogen) و سپس واکنش RT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده، توسط همان آغازگرها صورت پذیرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

توالی آغازگرهای ژن *rolB*:

5'-ATGGATCCCAATTGCTATTCC-3'
5'-TCGCGAGAAAGATAGACAAATA-3'

توالی آغازگرهای ژن خانه دار rRNA16s:

5'-GGAGCGGTGAAATGCGTAGAG-3'
5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'

بررسی داده‌ها و محاسبات آماری: کلیه آزمایش‌ها براساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گردید. بررسی آماری داده‌ها،

آلودگی با باکتری‌ها انجام پذیرفت. به این ترتیب که برگ‌های جوان و شاداب از قسمت دم‌برگ چیده شدند و به مدت ۲ دقیقه در داخل الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه به آب ژاول ۲۰ درصد منتقل شده و سه مرحله و هر مرحله به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در نهایت در زیر هود استریل برگ‌های ضد عفونی شده، به صورت قطعاتی به قطر ۲ سانتی‌متر برش داده شدند. برش‌ها به گونه‌ای صورت گرفت که همه قطعات حاوی رگ‌برگ بودند. این قطعات به مدت ۱-۲ دقیقه با محلول باکتریایی آغشته شده و سپس ۵ ریزنمونه برگی به یک پتری حاوی محیط کشت MS (با ۴ تکرار) انتقال داده شدند. پتری‌های آماده سپس به اتاقک کشت با شرایط دمایی 24°C درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

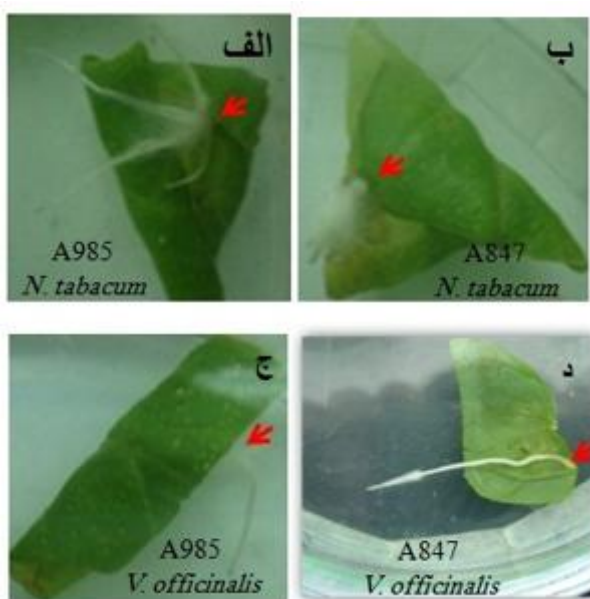
باکتری: از سویه آگروباکتریوم رایزوزنز LBA4404 حامل هر سه ژن *rolA*, *rolB* و *rolC* (A985) -به عنوان شاهد مثبت-، آگروباکتریوم حامل ژن *rolB* (A847) و آگروباکتریوم حامل وکتور خالی (A826) -به عنوان شاهد منفی- استفاده شد.

کشت باکتری: از کلونی‌های مجزای باکتری موجود در محیط کشت جامد LB یک کلونی برداشته شد و به ۳ ml محیط کشت مایع در فالكون‌های ۱۵ ml انتقال یافت. این محیط کشت اولیه (Preculture) در شیکر دورانی با دور ۱۶۰ rpm در تاریکی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28°C قرار داده شد. سپس باکتری‌ها به ۳۰ ml محیط کشت اصلی (culture) انتقال داده شده و ارلن‌ها در شیکر با دور ۲۲۰ rpm در تاریکی و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. محیط کشت عاری از باکتری نیز به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد تا از عدم آلودگی محیط کشت در طول مدت آزمایش اطمینان حاصل شود. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت اصلی در فالكون‌های ۵۰ ml با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شده و رسوب با ۲ میلی‌لیتر (۱۰ mM) MgSO_4 شستشو گردید و مجدداً سانتریفیوژ در همان شرایط قبلی انجام شد. پس از سانتریفیوژ، محلول (۱۰ mM) MgSO_4 تا حدی بر رسوب اضافه شد که

گیاهان رازیانه: در ریزنمونه‌های برگ گیاهان رازیانه، ۷ روز پس از آغشتگی ریزنمونه‌ها با باکتری‌های A985 و A847 ریزنمونه‌ها در محیط کشت زرد شده و از بین رفتند.

گیاهان سرخارگل: در ریزنمونه‌های برگ گیاهان سرخارگل نیز بعد از ۳ هفته تنها در یک مورد القاء ریشه‌زایی -آن‌هم در اثر آغشتگی با باکتری‌های A985- صورت گرفت که طول این ریشه در سن ۴ هفتگی ۴ سانتی‌متر بود.

گیاهان سنبل الطیب: گیاهان سنبل الطیب بهترین نتیجه را از نظر القاء ریشه‌زایی از خود نشان دادند. به این ترتیب که پس از گذشت دو هفته اولین ریشه‌ها در ریزنمونه‌های برگ گیاه در اثر آلودگی با A985 ظاهر شدند، که در انتهای چهارمین هفته تعداد ریشه‌های ایجاد شده ۷ عدد و مجموع طول ریشه‌ها معادل ۳۴ سانتی‌متر بود (شکل ۱-ج). آغشتگی ریزنمونه‌ها با باکتری‌های A847 باعث القاء ریشه‌هایی به تعداد ۴ عدد و در مجموع به طول ۲۰/۵ سانتی‌متر شد (شکل ۱-د).



شکل ۱- ریشه‌های القایی در گیاهان توتون (الف و ب) و سنبل الطیب (ج و د) پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ با آگروباکتریوم رایزوزنز A985 و A847. A985 حامل هر سه ژن *rolA*، *rolB* و *rolC* و A847 حامل ژن *rolB* می‌باشد.

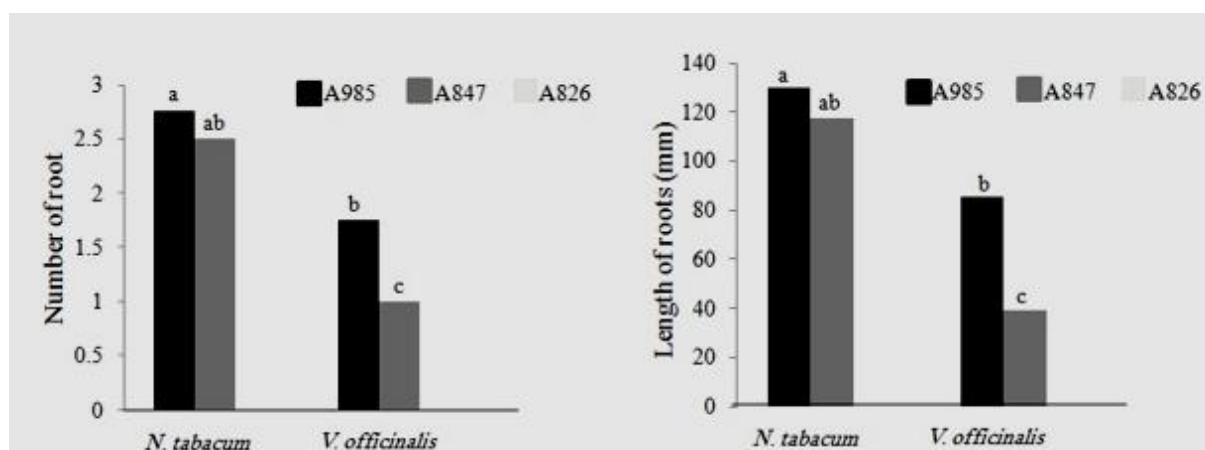
Figure1. Induced roots in *N. tabacum* (A, B) and *V. officinalis* (C, D) after inoculating with *A. rhizogenes* A985 and A847. A985 contains *rol A*, *B* and *C* genes and A847 contains *rolB* gene.

با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

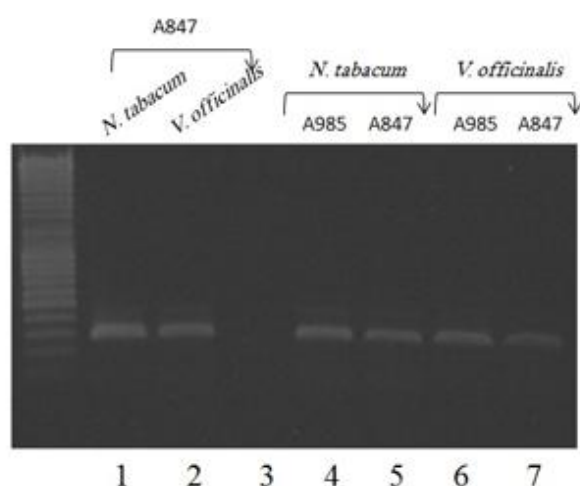
بررسی ریشه‌زایی در گونه‌های گیاهی مورد بررسی: بذر گیاهان سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.)، سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) در خاک کشت داده شدند. پس از گذشت ۴ ماه، زمانی که گیاهان در محله ۸-۱۲ برگی و با ارتفاع ۳۰-۴۰ سانتی‌متر بودند، ریزنمونه‌های برگی تهیه شدند و پس از استریلیزاسیون برای تلقیح با آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفتند. از گیاهان کامل نیز پس از ایجاد زخم بر روی ساقه جهت تلقیح استفاده شد. اولین ریشه‌ها بر روی ریزنمونه‌های برگی پس از گذشت دو هفته ظاهر شدند و در طول دو هفته بعد از آن به بیشترین تعداد خود رسیدند.

گیاهان توتون شاهد: در گیاهان توتون شاهد، آگروباکتریوم A985 (حاوی ژن‌های *rolABC*) که به عنوان کنترل مثبت بود، بیشترین میزان ریشه‌زایی را نشان داد. به طوری که از مجموع ۲۰ ریزنمونه برگی، در ۱۱ قطعه از آن ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۱-الف) که در مجموع طول ریشه‌های القایی در کل ریزنمونه‌های برگی ۵۲ سانتی‌متر بود. در ریزنمونه‌های برگی گیاهان توتون آغشته با آگروباکتریوم A826 که به عنوان کنترل منفی بود، القای ریشه‌زایی مشاهده نشد. آگروباکتریوم A847 (حامل ژن *rolB*) ریشه‌زایی قابل توجهی در ریزنمونه‌های برگی توتون نشان داد و از مجموع ۲۰ ریزنمونه برگی، در ۱۰ قطعه ریشه‌زایی اتفاق افتاد (شکل ۱-ب) که مجموع طول ریشه‌ها ۴۷ سانتی‌متر بود. زمانی که ساقه گیاهان کامل توتون خراش سطحی شدند و با سوسپانسیون باکتریایی آغشته گشتند در هیچ موردی حتی پس از گذشت چند ماه و با تکرار عمل آغشتگی القاء ریشه‌زایی مشاهده نشد.



شکل ۲- میانگین طول ریشه (راست) و تعداد ریشه (چپ) در گیاه توتون و سنبل الطیب در حضور باکتری‌های مختلف. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن ($p \leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 2. The average length and number of roots in *N. tabacum* and *V. officinalis* after inoculating with *A. rhizogenes* A985, A847 and A826. A985 contains *rolA*, *B* and *C* genes (served as positive control), A847 contains *rolB* gene and A826 contain no gene (served as negative control). Dissimilar letters indicate significantly ($0.05 \geq p$) based on Duncan test.



شکل ۳- نتیجه واکنش PCR و RT-PCR بر روی DNA و RNA استخراج شده از ریشه‌های القایی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rolB*. لاین‌های ۱ و ۲ تکتیر قطعه cDNA سنتز شده از روی mRNA استخراجی و لاین‌های ۳ تا ۷ تکتیر قسمتی از ژن *rolB* از روی DNA ژنومی را نمایش می‌دهند. نوع گیاه و باکتری مورد استفاده جهت تلقیح آن در قسمت فوقانی تصویر نوشته شده است.

Figure 3- PCR and RT-PCR analysis on DNA and RNA extracted from induced roots using *rolB* gene specific primers. Line 1 and 2 corresponds to the results of RT-PCR and Line 4-7 corresponds to the genomic DNA amplification.

بر روی ساقه‌های خراشیده و آغشته به باکتری گیاهان کامل هیچ یک از گیاهان مورد مطالعه، القاء ریشه‌زایی حتی پس از گذشت چندین ماه مشاهده نشد. شکل ۲ میانگین طول و تعداد ریشه‌های القایی را در گیاهان سنبل الطیب و توتون در حضور باکتریهای مختلف نشان می‌دهد. به خوبی آشکار است که گیاه سنبل الطیب نیز همچون گیاه شاهد توتون القای ریشه‌زایی را در حضور ژن-های *rolABC* و یا ژن *rolB* به تنهایی نشان می‌دهد.

اگرچه مورفولوژی خاص و رشد پلاژیوتروپیک ریشه‌های القایی توسط آگروباکتریوم رایزوترنز در محیط کشت فاقد هورمون، موید نفوذ T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی و تراریختگی این ریشه‌ها می‌باشد، با این وجود بررسی ماهیت تراریختگی آن‌ها توسط روش PCR الزامی است. به این منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن *rolB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های القایی گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم‌های A985 و A847 انجام پذیرفت.

نتایج حاصل از PCR حضور این ژن (تکثیر قطعه 320 bp مورد انتظار) را در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین تأیید نمود (شکل ۳- لاین‌های ۴-۷). روش PCR روشی ساده و سریع برای پی بردن به حضور توالی تراژن در ژنوم مواد گیاهی تراریخته است.

با این حال بررسی بیان یا عدم بیان تراژن در سلول‌های گیاهی نیز امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند کمک شایانی در تفسیر مکانیسم عمل و ایجاد فنوتیپ خاص توسط توالی تراژن باشد. برای بررسی بیان تراژن در ریشه‌های تراریخته تکنیک RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و آغازگرهای ژن خانه‌دار rRNA16s بر روی cDNA سنتز شده از mRNA ی استخراجی این ریشه‌ها در گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم A847 صورت گرفته و بیان این ژن در ریشه‌های فوق به اثبات رسید (شکل ۳- لاین ۱ و ۲).

نتایج حاصل از PCR حضور این ژن (تکثیر قطعه 320 bp مورد انتظار) را در ژنوم سلول‌های ریشه‌های موین تأیید نمود (شکل ۳- لاین‌های ۴-۷). روش PCR روشی ساده و سریع برای پی بردن به حضور توالی تراژن در ژنوم مواد گیاهی تراریخته است. با این حال بررسی بیان یا عدم بیان تراژن در سلول‌های گیاهی نیز امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند کمک شایانی در تفسیر مکانیسم عمل و ایجاد فنوتیپ خاص توسط توالی تراژن باشد. برای بررسی بیان تراژن در ریشه‌های تراریخته تکنیک RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و آغازگرهای ژن خانه‌دار rRNA16s بر روی cDNA سنتز شده از mRNA ی استخراجی این ریشه‌ها در گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم A847 صورت گرفته و بیان این ژن در ریشه‌های فوق به اثبات رسید (شکل ۳- لاین ۱ و ۲).

بحث

در پژوهش حاضر، امکان القای ریشه‌های موین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوترنز در چند گیاه دارویی همچون سرخرگل، رازیانه، سنبل الطیب که بخش دارویی مورد مصرف آنها اکثراً ریشه می‌باشد و در گیاه توتون -به عنوان کنترل مثبت آزمایش- بررسی شد و از ریزنمونه‌های برگ و یا ساقه زخمی گیاهان برای تلقیح باکتری استفاده شد. وجود تفاوت در نوع گیاه و نوع

ریزنمونه و در نتیجه امکان القای ریشه‌زایی و شدت آن توسط سویه خاصی از آگروباکتریوم و نیز تأثیر سویه‌های مختلف این باکتری بر القاء ریشه‌زایی گیاهان مختلف در مطالعات زیادی به خوبی اثبات شده است. Rugini و همکاران القاء ریشه‌زایی را در گیاه کیوی تحت تأثیر ژن‌های *rol* آ. رایزوترنز نشان دادند (Rugini *et al.* 1991). Bueno dos Reis و همکاران نیز در راس بریده گیاهچه‌های گل ساعتی که با محلول آگروباکتریوم رایزوترنز آغشته شده بود ظهور ریشه‌های موین را به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمودند (Bueno dos Reis *et al.* 2005). Felker و همکاران ریشه‌زایی بهینه گیاه چوبی الباکهور (چیل بلانکو) را تحت تأثیر باکتری‌های مختلف از جمله آ. رایزوترنز به اثبات رساندند (Felker *et al.* 2005) و Villalobos-Amador و همکاران میزان بالای ریشه زایی تا ۶۷ درصد را در ریزنمونه‌های مشتق از ساقه گیاه کاج در اثر آلودگی با آ. رایزوترنز نشان دادند (2002). با توجه به افزایش رغبت در مصرف گیاهان دارویی و تولید بیش از پیش داروهای گیاهی، تمرکز پژوهش‌های گیاهی نیز به سمت گیاهان دارویی و انجام راهکارهایی جهت دستیابی به میزان بالای متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات موثره گیاهی معطوف گشته است و در این میان استفاده از سویه‌های تومورزا و ریشه-زای آگروباکتریوم جهت رسیدن به توده‌های سلولی انبوه و در نتیجه دستیابی به مقدار قابل توجه متابولیت‌های ثانویه مورد توجه اکثر پژوهشگران قرار گرفته است. در پژوهش حاضر ساقه‌های زخمی گیاهان مورد استفاده، القاء ریشه‌زایی را در اثر آلودگی با آ. رایزوترنز از خود نشان ندادند، در حالی‌که ریزنمونه‌های برگی نمونه‌ها و خصوصاً ریزنمونه‌های گیاه سنبل الطیب، القای ریشه-های موین را در اطراف خود به خوبی نشان دادند و لذا یافته‌های این مطالعه می‌تواند مسیر بعدی تحقیقات را -که همان بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه در این ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان کنترل و نیز تعیین نوع متابولیت‌ها می‌باشد- فراهم سازد.

منابع

- Bueno dos Reis L, Lemes da Silva M, Barcelos Passos Lima A, Peixoto de Oliveira ML, Lopes Paim Pinto D, Ribeiro Garcia Lani E, Campos Otoni W. 2007.** *Agrobacterium rhizogenes*- mediated transformation of passion fruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* P. *flavicarpa*. International Society for Horticultural Science 425-431.
- Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P. 1987.** *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Molecular and General Genetics MGG 209(3):475-480.
- Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG. 2006.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. Medicago truncatula handbook 1-8.
- Chandra S, Chandra R. 2011.** Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews 10(3):371-395.
- Davies KM, Deroles SC. 2014.** Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 26:133-140.
- Dehghan E, Häkkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Ahmadi FS. 2012.** Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 110:35-44.
- Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Zamani Z, Palazon J. 2013.** A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss. Industrial Crops and Products 50:256-263.
- Felker P, Medina D, Soulier C, Velicce G, Velarde M, Gonzalez C. 2005.** A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. Journal of Arid Environments 61(2):227-247.
- Gai QY, Jiao J, Luo M, Wei ZF, Zu YG, Ma W, Fu YJ. 2015.** Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities. PLoS one 10 (3):e0119022.
- Hu ZB, Du M. 2006.** Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of integrative plant biology 48(2):121-127.
- Matkowski A. 2008.** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. Biotechnology Advances 26(6):548-560.
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY. 2014.** Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell Tissue Organ Culture 118:1-16.
- Richard E, Reichardt M, Rogers S. 1994.** Preparation of genomic DNA from plant tissue. Current protocols in molecular biology 2-3.
- Rugini E, Pellegrineschi A, Mencuccini M, Mariotti D. 1991.** Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes rol* genes. Plant Cell Reports 10(6-7):291-295.
- Spena A, Schmulling T, Koncz C, Shell J. 1987.** Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. The EMBO Journal 6(13):3891-3899.
- Srivastava S, Srivastava AK. 2007.** Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. Critical reviews in Biotechnology 27(1): 29-43.
- Terato M, Ishikawa A, Yamada K, Ozeki Y, Kitamura Y. 2011.** Increased furanocoumarin production by *Glehnia littoralis* roots induced via *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Biotechnology 28(3): 317-321.
- White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW. 1985.** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Bacteriology 164(1):33-44.

Study of Root Induction in Several Medicinal Plant Species using *A. rhizogenes* *rol* Genes

Shojaii A.¹, Mohajjel Shoja H.^{2*}, Mahna N.³

1. MSc. student, 2. Assistant professor, Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz

3. Associate professor, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: H_mohajjel@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Agrobacterium *rhizogenese* can induce hairy root phenotype in many dicotyledonous plants via the transfer of *rol* genes into the plant genome. The characteristics of induced roots such as a rapid growth, high stability of genetic material, ease of conservation and their ability to grow in a hormone-free medium have led to their use in the production of secondary metabolites. In the present study, we have investigated the effect of *rol* genes, particularly the *rolB* gene, on root induction of three medicinal plants *valeriana officinalis*, *Echinacea angustifolia* and *Foeniculum vulgare*. Leaf explants and wounded parts of stems were inoculated with bacterial suspension and the presence of bacterial DNA as well as its expression in induced roots was demonstrated using PCR and RT-PCR techniques with *rolB* specific primers. The results showed that maximum rooting occurred with *Valeriana officinalis* leaf explants cultured in MS medium and the wounded parts of stems did not show rooting at inoculated areas.

Key Words

Agrobacterium rhizogenese, hairy root, *rol* genes, RT-PCR

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol4, Number2

Fall 2015 and Winter 2016

Bi-seasonal

English Abstracts

8 Articles

The involvement of MSD1 metalloprotein in the mechanism of resistance to salinity by interaction with SOS3

Mina Khajehdehi¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*}, Fatemeh Mahmoudi Kurdi¹

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

2. Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Among the various stresses, salinity is a great threat to plants and the study of the mechanism of salt tolerance in plants is important. In one of the salt tolerance pathways in the model plant *Arabidopsis*, Salt Overly Sensitive 3 (SOS3) protein, which is a sensor of calcium ions and the initiator of a salt tolerance pathway, activates various processes in order to tolerate salinity by the formation of an SOS3-SOS2 complex. On the other hand, superoxide radicals that are produced in response to various stresses such as salinity are harmful to the cell and must be eliminated. How to remove superoxide radicals and protect cells from oxidative damage in salt-tolerant plants is not clear. In this study, the SOS3 protein interactions in *Arabidopsis* cDNA library were investigated using the Yeast Two Hybrid System (Y2HS), and double transformation of *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain with pGBT9-SOS3 and pGADT10-AtcDNA. DNA extraction was performed on four selected yeast colonies on SD-AHWL and pGADT10-AtcDNA vectors were amplified in *E. coli*, sequenced and compared to the *Arabidopsis* data bank. One of the most important interactions was found on Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1). MSD1 neutralizes superoxide radicals to protect plants from oxidative damage caused by stresses. The interaction and the recruitment of MSD1 by SOS3 in the salinity resistance pathway should save the plant from oxidative trauma. Afterward, the interaction of SOS3-MSD1 was confirmed by isolation of complete MSD1 cDNA and cloning in yeast two hybrid vectors. In parallel, using a GST-Pull Down assay, it was shown that the SOS3 protein produced in bacterium from pGEX2TK-SOS3 vector directly interacted with the radio-labeled MSD1 produced from pGBKT7-MSD1. This is the first report of the interaction of salinity tolerance pathway (SOS3) with the elimination pathway of harmful superoxide ions (MSD1) that shows interaction between these molecular mechanisms.

Key Words

Yeast two hybrid system, SOS3, salinity, Manganese superoxide dismutase, GST-Pull Down

Optimizing tissue culture and GUS gene transformation to shallots using *Agrobacterium*

Abolfazl Hajiheidar¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Seied Mehdi Miri¹

1.M.Sc, Assistant Professor, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* Corresponding Author, Email M_Tohidfar@sbu.ac.ir

ABSTRACT

Shallot (*Allium stipitatum*) is an edible vegetable that has important pharmacological properties. Therefore, optimization of an efficient *in vitro* regeneration and transformation system for shallot breeding through genetic engineering would be useful. Embryo, root and bulb explants of shallot were cultured *in vitro* on MS basal medium supplemented with different concentrations of growth regulators (NAA, 2,4-D and BA) for callus induction and plantlet regeneration. Explants were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 and pBI121 plasmid carrying the *gus* reporter gene. The results indicated that bulb had a higher efficiency of callus induction and plantlet regeneration (100%) compared to embryo and root explants. The highest percentage of regeneration (100 %) was observed on MS medium supplemented with 5 mg.l⁻¹ BA and 1 mg.l⁻¹ NAA for bulb explants. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of *gus*-positive transformants confirmed genetic transformation of the cultures. Furthermore, the lack of *Agrobacterium*-related infection was confirmed using *virG*-specific markers. In this study, the efficiency of transformation was 10 and 6.6% in embryo and bulb, respectively.

Key Words

Agrobacterium, GUS gene, Gene transformation, Shallot, Tissue culture

Assessment of hairy roots induction of the medicinal plant Alecost (*Tanacetum balsamita* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*

Asad Maroufi*, Mohammad Majdi

Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

* Corresponding Author, Email: a.maroufi@uok.ac.ir

ABSTRACT

Alecost (*Tanacetum balsamita* L.), belongs to the Asteraceae family, is a pharmacologically important species rich in important secondary metabolites including flavones, sesquiterpene lactones, phenylpropane compounds and derivatives, tannins and essential oils. Alecost has been used both fresh or dried as flavouring or food additive. Additionally, it has medicinal properties and is applied in aromatic products. In addition to traditional farming, in vitro hairy root culture has been found to be suitable for the production of secondary metabolites. Therefore, in order to establish a protocol for hairy root culture of alecost, root induction by co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* (strain A4) was assessed in this study. Different explants (cotyledon, young leaf, stem and root) showed different responses to hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. Moreover, the frequencies of hairy root induction for different types of explants were considerably different. The induced roots were shown to be transformed by PCR using primers specific for *rolB*. This is the first report of hairy root induction in alecost and the results may be useful in genetic manipulation of *Tanacetum balsamita* and use of hairy root culture to produce high-value secondary metabolites.

Key Words

Agrobacterium rhizogenes, Hairy root, Medicinal plant, Secondary metabolites, *Tanacetum balsamita*

Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

Assistant Professor of Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email: fallahzadeh@azaruniv.edu

ABSTRACT

Extensive research is currently going on in different research centers of the world to find new elicitors from microorganisms and their related receptors from different plants. Comprehensive knowledge about these elicitors and their cognate receptors could be used for development of transgenic plants displaying resistant against plant pathogens. As a crude protein extract of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) has strong elicitor activity on *Arabidopsis*, in this study protein extracts of this bacterium were prepared and fractionated and a semi-purified sample displaying elicitor activity was analyzed by LC-MS/MS. About 60 different proteins were detected in the analyzed sample. Among the detected proteins, only three were similar to the elicitor activity observed in a protein extract of Xcc bacterium: cspA (cold shock protein A), csrA (carbon storage regulator protein A) and an unknown conserved hypothetical protein from the DUF1456 protein family. This protein is soluble in water and it has no bacterium membrane-targeting sequence as determined by PSORTB and SOSUI analysis, suggesting with high probability that it is a cytoplasmic protein.

Key Words

Arabidopsis, Elicitor, Ethylene, Proteome, *Xanthomonas*

Isolation, cloning and bioinformatic study of a resistance gene against an Asian strain of citrus greening librobacter in grapefruit plant

Masoud Tohidfar¹ and Maryam Ghayeb Zamharir^{2*}

1. Biotechnology group, Department of New Technology and Energy Engeenier, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.

2. Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Tehran, Iran.

*Corresponding Author, Email: zamharir2005@yahoo.com

ABSTRACT

Citrus greening disease is the most important bacterial diseases of citrus and is present in the southern region of Iran. Due to the nature of the pathogen, disease control is difficult. cDNA-AFLP analysis shows that the expression pattern of NBS-LRR (Nucleotide Binding Site- Leucine-Rich Repeats) genes was upregulated in grapefruit plant interacting with *Candidatus* Leiberibacter asiaticus. In this study we have isolated the *NBS552* gene from grapefruit by PCR and clone it by ligation of this product to pGEM-T vector transformed *E. coli* bacteria. Sequencing analysis revealed an open reading frame for a gene of 171 bp that encodes a protein of 57 amino acids. Results of bioinformatic analysis showed that this gene contains regions that are conserved in different plant species. The *NBS552* protein is associated with membranes and its extracellular secretion is low. The aim of this study was isolation and cloning of *NBS552* genes from the grapefruit genome and characterization of the genes in view of their potential for practical use in plants.

Key Words

Grapefruit, Citrus Greening, Gene *NBS552*, Resistance

A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using two Proteins of *Grapevine Fanleaf Virus*

Pakbaz S.¹, Pazhouhandeh M.*² and Eini Gandomani O.³

1. PhD student of Plant Virology, Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Tabriz.

2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Fac., Azarbaijan Shahid Madani University.

3. Assistant Prof., Plant Protection Dept., Agriculture Fac., University of Zanjan. Iran

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Suppressor proteins of RNA Silencing have been well described in most genera of plant viruses. The methodology for identifying gene silencing suppressor activity of a protein in a plant system has proven to be an important tool. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is one of the most common viral diseases in grapevines worldwide and can cause up to 80% crop losses. GFLV is a bipartite member of the *Nepovirus* subgroup A in the family *Secoviridae* and has a single-stranded positive-sense RNA genome. A viral suppressor of RNA silencing (VSR) in Nepoviruses has not yet been described and our knowledge of symptom determinant genes in nepoviruses is very limited. In this study, a transgenic GFP gene was silenced in transgenic *Nicotiana benthamiana* line 16c, and then the ability of GFLV polymerase and movement proteins to suppress gene silencing was evaluated. The efficiency of these two proteins was compared with positive and negative controls. The results showed that neither protein had the ability to suppress gene silencing. However, these proteins are involved in symptom production and systemic infection. This study demonstrates a model method for evaluation of suppressor activity of RNA Silencing.

Key Words

GFLV, RNA Silencing, Suppressor of Gene Silencing

The status study of Biotechnology in East Azerbaijan Province

Jafar razeghi^{1*}, Amin Sahandi Khalifeh-Kandy²

¹Assistant Prof. Plant Biology Dept. Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, IRAN

²Master of Science, Biotechnology Dept. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, IRAN

* Corresponding Author, Email jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Biotechnology is one of the most important scientific strategies in today's world and involves application of various techniques in direct or indirect usage of living organisms or their byproducts in natural or modified forms for different fields. Significant advances of biotechnology in recent decades, especially after the acquisition of new methods of genetic engineering for gene isolation, their modification and transferring from one species to another have made biotechnology one of the most productive present and future technologies. Iran with a wide variety of climate and the variety of living organisms is the most suitable region for access to technologies derived from biological sources. It is evident that management and planning in biotechnology, as in all fields, requires a good understanding of the researchers in that field. In this study we attempted to identify researchers, institutes, universities and companies operating in various fields of biotechnology along with their research areas so as to identify strengths and weaknesses of biotechnology to help making targeted decision in the province and the country. The results of this study showed that more than 40% of the provincial biotechnological activities are related to agriculture, about 25% are related to animal science and 35% to other sectors. The main activities in the agricultural biotechnology are related to study of different growth conditions of plants. Study on medicinal plants, plant tissue culture and production of transformed plants are other activities in this section. Factors affecting the growth of livestock, animal health and livestock products are main activities related to animal biotechnology as well as cloning of useful genes and control of pathogenic microorganisms in microbial biotechnology. Review, treatment, and diagnosis of genetic diseases through biotechnology in the medical field and, finally, production of pharmaceutical products and the use of biotechnology in the food industry are also activities which are carried out by researchers in various fields of biotechnology in East Azerbaijan Province. Based on these results, activities related to environmental biotechnology and especially industrial biotechnology are under-represented in East Azerbaijan Province and serious attention should be paid to this section.

Key Words

Biotechnology, Development, East Azerbaijan Province

Study of Root Induction in Several Medicinal Plant Species using *A. rhizogenes rol* Genes

Shojaii A.¹, Mohajjel Shoja H.^{2*}, Mahna N.³

1. MSc. student, 2. Assistant professor, Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz

3. Associate professor, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: H_mohajjel@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Agrobacterium *rhizogenese* can induce hairy root phenotype in many dicotyledonous plants via the transfer of *rol* genes into the plant genome. The characteristics of induced roots such as a rapid growth, high stability of genetic material, ease of conservation and their ability to grow in a hormone-free medium have led to their use in the production of secondary metabolites. In the present study, we have investigated the effect of *rol* genes, particularly the *rolB* gene, on root induction of three medicinal plants *valeriana officinalis*, *Echinacea angustifolia* and *Foeniculum vulgare*. Leaf explants and wounded parts of stems were inoculated with bacterial suspension and the presence of bacterial DNA as well as its expression in induced roots was demonstrated using PCR and RT-PCR techniques with *rolB* specific primers. The results showed that maximum rooting occurred with *Valeriana officinalis* leaf explants cultured in MS medium and the wounded parts of stems did not show rooting at inoculated areas.

Key Words

Agrobacterium rhizogenese, hairy root, *rol* genes, RT-PCR