

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴

شماره پیاپی ۷

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سر دبیر: دکتر منصور امیدی

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

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 معالی‌امیری (دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)
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 فضل‌الله 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 چغندرقد)

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 آن‌ها به عهده مکاتبه کننده مقاله است.

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

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

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

دوفصلنامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
شماره پیاپی ۷

فهرست مطالب

صفحات

• مقاله مروری

- ۱- کاهش مصرف سموم کشاورزی و سرطان با کشت محصولات تراریخته
سولماز خسروی و مسعود توحیدفر

• مقاله‌های پژوهشی

- ۲- همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های ژن *RGT2* از سویه ایرانی مخمر نان
سولماز عزیزی، علیرضا تاری نژاد

- ۳- تاثیر نانو الیستورهای کبالت و کیتوزان بر میزان تولید آرتمیزنین و بیان دو ژن کلیدی
Artemisia annua در گیاه *DBR₂* و *SQS*
بی تا قاسمی، رامین حسینی، فاطمه دهقان نیری

- ۴- شناسایی و گروه بندی خانواده عوامل رونویسی *WRKY* در جو
بنیامین یزدانی، رسول اصغری زکریا، زهرا سادات شبر

- ۵- بررسی تاثیر سیانید هیدروژن در القای مقاومت به شوری در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis*
میلاد احمدی نجف آبادی، حسین عسکری، مسعود سلطانی نجف آبادی

- ۶- بررسی الگوی پروتئومی جو بهاره تحت تنش سرمای کوتاه مدت
رعنا ولی زاده کامران، محمود تورچی، محمد مقدم و حمید محمدی

English Abstracts

کاهش مصرف سموم کشاورزی و سرطان با کشت محصولات تراریخته

Reduction of applied pesticides and cancer with the cultivation of transgenic crops

سولماز خسروی^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}

Solmaz Khosravi¹ and Masoud Tohidfar^{2*}

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

۲- عضو هیئت علمی دانشکده مهندسی انرژی و فناوریهای نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

1. Agricultural research institute of Iran, Agricultural Research, Education and

Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۶)

چکیده

آفات یکی از اصلی ترین عواملی هستند که باعث کاهش محصولات کشاورزی می شوند. رایج ترین راه حل برای رفع این مشکل کاربرد سموم کشاورزی است. سموم کشاورزی علاوه بر هزینه های گزافی که بر قیمت تمام شده محصولات کشاورزی تحمیل می کنند خسارت های بیشماری را برای سلامت انسان (بیماری سرطان) و محیط زیست به همراه دارند. تاکنون ۵۰ نوع سرطان ریه مرتبط با مصرف سموم کشاورزی شناسایی شده است. از طرفی، بقایای این سموم در خاک نیز قادرند مدت ها به صورت فعال باقی مانده و علاوه بر تهدید جانداران خاکی از طریق جذب توسط گیاه وارد زنجیره غذایی انسان شوند. با وجود ترویج راهکارهایی مانند کشاورزی ارگانیک و یا مدیریت تلفیقی آفات، استفاده صحیح از سموم کشاورزی تحت کنترل قرار نگرفته است. یکی از فناوری هایی که با تکیه بر آن می توان ضمن رفع خسارات کاهش محصول ناشی از آفت، محصولات سالم عاری از بقایای سموم کشاورزی تولید کرد، فناوری مهندسی ژنتیک است که منجر به تولید محصولات تراریخته می شود. از اولین کشت محصولات تراریخته بیش از ۱۸ سال می گذرد و این محصولات از پذیرش عمومی نسبی خوبی بین کشاورزان و مصرف کنندگان برخوردار هستند. این مقاله با مروری بر صدمات ناشی از مصرف سموم کشاورزی بر سلامت انسان و محیط زیست به ارائه راه حل جایگزین یعنی فواید کشت محصولات تراریخته می پردازد.

واژه های کلیدی

سموم کشاورزی

سرطان

محصولات تراریخته

محیط زیست

مقدمه

با گسترش آگاهی در خصوص صدمات ناشی از مصرف سموم کشاورزی، راهکارهای مختلفی مانند تولید سموم کم ضررتر از طرف صنایع آگروشیمی و یا مدیریت تلفیقی آفات پیشنهاد شده - اند. راهکار دیگری که اخیراً به منظور تامین امنیت غذایی برای جمعیت رو به رشد و سلامت آن ارا - یی شده است تولید محصولات تراریخته مقاوم به آفات با هدف کاهش مصرف سموم با استفاده از فنا وری مهندسی ژنتیک است . با استفاده از این راهبرد ضمن کاهش مصرف سموم، محصولات تولید شده فاقد بقایای سموم کشاورزی بوده که می توانند سلامت مصرف کنندگان خود را تامین کنند (Salahi Ardekani et al. 2012). اکنون بیش از ۱۸ سال از ظهور این دسته از محصولات گذشته است و با مروری اجمالی بر میزان رشد سطح کشت محصولات تراریخته از ۱/۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به ۱۸۵/۵ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۵ می توان اظهار داشت که اینگونه گیاهان از سطح پذیرش عمومی مطلوبی از سوی مصرف کنندگان برخوردار هستند. با این وجود هنوز بسیاری از کشورها نسبت به بهره برداری از این راهبرد جهت تامین محصولات سالم برای مصرف کنندگان خود بی توجه هستند . این مقاله با مروری بر خسارات و مضرات حاصل از مصرف سموم شیمیایی، به نحوه تاثیر استفاده از محصولات تراریخ ته بر تامین سلامت مصرف کنندگان و محیط زیست می پردازد.

نتایج

اثرهای سوء سموم کشاورزی بر سلامت انسان

از آنجا که سیستم عصبی موجود در پستانداران و حشرات وجه تشابه زیادی دارد و حشره کش ها سیستم عصبی حشره را هدف قرار می دهند، بنابراین بسیاری از حشره کش ها تهدیدی بزرگ برای سلامت انسان به شمار می روند. هفده محقق از ۱۱ کشور در آژانس بین المللی پژوهش ها بر روی سرطان در سال ۲۰۱۵ گرد آمدند و احتمال سرطان زایی آفت کش های ارگانوفسفات تتراکلروئینفوس، پاراتیون، مالاتیون و دیازینون را ارزیابی کردند (Lancet Oncol 2015). بر اساس یافته های این گروه تحقیقاتی،

کاهش محصولات کشاورزی در جهان توسط آفات به طور میانگین ۱۴ تا ۲۵ درصد برآورد شده است (DeVilliers and Hoisington 2011) که متأسفانه استفاده از سموم کشاورزی به عنوان رایج ترین راه جلوگیری از این خسارات شناخته شده است. طبق آمار فائو، ۵۰۰۳۶۹/۷ تن علفکش و ۱۲۵۹۹۵/۸ تن انواع آفت کش ها در سال ۲۰۱۱ توسط کشورهای مختلف استفاده شده است.

باوجودی که سموم کشاورزی می توانند به عنوان یک راه حل سریع برای جلوگیری از این صدمات باشند اما اثرهای سوء ناشی از مصرف دراز مدت آنها بر سلامت انسان و یا محیط زیست نیز قابل تامل است (Adeli and Ghareyazie, 2013). ایران در مقایسه با کشورهای با تولید ناخالص ملی مشابه میزان بیشتری از انواع آفت کش ها را مصرف می کند (Anonymous 1995)، بطوری که میزان استفاده از آفت کش ها طی سالهای زراعی ۸۶-۸۵ در حدود ۲۶ هزار تن گزارش شده است (Heidari 2010).

استفاده از سموم کشاورزی با وجود کنترل موقت خسارت همواره زیان هایی را به دنبال دارد که از مهمترین آنها می توان به آلودگی محیط زیست و به خطر افتادن سلامت انسانها اشاره داشت . ایجاد مقاومت در آفات، نابودی حشرات مفید و موجودات غیر هدف، آلودگی منابع آبی و خاک، ایجاد مسمومیت و انواع بیماری ها از دیگر عیب های مرتبط با مصرف سموم کشاورزی هستند . سرطان هنوز به عنوان یکی از مشکلات مهم در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود. این بیماری به عنوان سومین عامل مهم مرگ و میر بعد از بیماریهای قلبی و تصادفات در ایران به شمار می رود (Mehrabani et al. 2008). مطالعات متعددی مبنی بر وجود رابطه مشخص بین مصرف سموم کشاورزی و ایجاد سرطان انجام شده است، بطوریکه مبتلایان به سرطان در ایران در سال ۷۰ هزار نفر برآورد شده است که یک سوم آنها مربوط به سموم شیمیایی است.

هم چنین در ایران مصرف این سم خطرناک که عوارض بسیار مخربی برای محیط زیست و سلامت مردم به همراه دارد، ممنوع شده است (Adeli and Ghareyazie 2013, Morowati and Azadvar 2012).

اشاری از جامعه مانند خلبانان سمپاش، کشاورزان و کارگران مشغول به کار در کارخانه های تولید سم بیشتر در معرض تهدید خطرات ناشی از حشره کش ها هستند (McConnell and Hruska 1993). طی یک مطالعه مشخص شده است که خطر وجود یکی از علائم تنفسی در ۲۷ درصد از کارگران شاغل در بخش تولید حشره کش های گیاهی (ارگانوفسفره) در قزوین حداقل ۳/۶ برابر نسبت به افراد شاهد افزایش داشته است (Yazdi et al. 2010).

استفاده از سموم شیمیایی نه تنها برای افرادی که بطور مستقیم با آن در تماس هستند بلکه برای مصرف کنندگان محصولاتی که بقایای سموم در آنها از بین نرفته است مخاطره آمیز است. مصرف سرانه هر فرد ایرانی از سم های مورد استفاده در کشاورزی کشور ۴۰۰ گرم گزارش شده است و آمار مبتلایان به سرطان در مناطقی که استفاده از سموم و کودهای شیمیایی بالا بوده افزایش نشان می دهد (Salahi Ardekani et al. 2012). سیب زمینی، پیاز، کاهو، خیار، گوجه فرنگی، سیب د رختی و برنج هفت محصول پر مصرف کشاورزی هستند که بر اساس نتایج پایش های سازمان غذا و دارو در ۱۰ نقطه کشور، میزان باقیمانده کودهای شیمیایی و سموم در آنها بیش از حد مجاز وزارت بهداشت اعلام شده است. میزان باقیمانده کودها و سموم این هفت محصول متفاوت بوده ولی اعداد در حدود ۸ تا ۱۰ درصد باقی مانده سموم، در بین محصولات و همچنین استان های مختلف، متفاوت است (Salahi Ardekani et al. 2012).

بقایای سم دیازینون در صورتیکه بیش از حد مجاز در محصول مورد مصرف قرار گیرد منجر به تخریب کبد، تشنج و مرگ سریع خواهد شد. طی مطالعه ای که بر بقایای دیازینون در محصولات خیار و خربزه انجام شد مشخص شد که بقایای این سم در خربزه شیروان و تربت جام ۴ برابر حد مجاز، در خیار دزفول ۶/۱ برابر، در خیار رفسنجان ۴/۴ برابر، در خیار جیرفت ۴/۲ برابر، در خیار کرمان ۲/۱ برابر و در خیار شیروان ۱/۸ برابر حد مجاز بود

تتراکلروئینفوس و پاراتیون در گروه 2B یعنی سرطانزای محتمل برای انسان طبقه بندی شدند. تتراکلروئینفوس منجر به تومور سلولهای کبدی در موش، تومور تبول کلیوی و ناهنجاری وریدی طحال در موش های نر شدند. بر اساس نتایج آزمایش های انجام شده در حیوان ها، تتراکلروئینفوس بطور سیستمیک در بدن توزیع، سوخت و ساز شده و در نهایت از طریق ادرار دفع می شود. استفاده از این سم در اروپا ممنوع شده است.

برخی مطالعات در مورد رابطه پاراتیون با سرطان، گزارش هایی را فراهم کرده اند اما مطالعات انسانی بسیار کم هستند. این سم باعث سرطان ریه در موش های نر و سرطان لنف در موش های ماده شد. همچنین در موش ها باعث ایجاد تومورهای بدخیم پانکراس و سرطان و یا تورم قشر آدرنال شد (National Toxicology Program 1979). پاراتیون به سرعت جذب و توزیع می شود. اگرچه آزمون های موتان زایی باکتری در این سم منفی بودند اما پاراتیون قادر به تخریب کروموزوم انسانی در شرایط این ویترو بود (Cabello et al. 2001). استفاده از این سم از اوایل دهه هشتاد میلادی به شدت محدود شده است.

حشره کش های مالاتیون و دیازینون در گروه 2A یعنی با احتمال قوی سرطانزا برای انسان قرار داده شده اند. حشره کش مالاتیون در کشاورزی علیه آفات غلات و درختان میوه سردسیری و برای کنترل حشرات در مناطق مسکونی استفاده می شود و تولید آن در مقیاس قابل توجه ادامه دارد. شواهد محدودی در خصوص سرطانزایی مالاتیون در انسان وجود دارد (Waddell et al. 2001; McDuffi et al. 2001 Eriksson et al. 2008).

حشره کش دیازینون هم در کشاورزی علیه انواع حشرات مصرف می شود. افزایش بروز سرطان خون با افزایش اثر تجمعی دیازینون پس از کاهش استفاده از سایر حشره کش ها توسط گروه مطالعات گسترده سلامت کشاورزی گزارش شد (Alavanja et al. 2014, Askari et al 2013). مصرف دیازینون در ایران بیش از سه میلیون لیتر در سال و از جمله خطرناک ترین سموم برای آبزیان و پرندگان است. بیشترین حجم استفاده شده از این سم در شالیزارهای استان های شمالی کشور است و این در حالی است که هم اکنون در تمام کشورهای اروپایی و آمریکایی

(Rezvani Moghadam et al. 2009, Morowati and Azadvar)
(2012).

تأثیر سموم شیمیایی بر محیط زیست

سموم مورد استفاده در کشاورزی یکی از منابع جدی آلاینده محیط زیست به شمار می روند. این سموم از طریق اثر بر منابع آبی، خاک، گیاهان و جانوران بر محیط زیست تأثیرات نامطلوب می گذارند. ورود آفت کش ها به منابع آبی از راههای متعددی امکانپذیر است از جمله بارش های جوی، آلودگی مستقیم آبهای سطحی، ورود بقایای سموم پس از عملیات سم پاشی، پسابهای کارخانجات تولید سموم و غیره. رفتار سموم در منابع آبی تحت عوامل مختلفی قرار گرفته و حساسیت جانداران آبی نسبت به آنها نیز متفاوت است (Hasani et al. 2011). از طرفی، برخی از سموم کشاورزی به علت پایداری زیاد، حلالیت در چربی و پایین بودن سرعت تجزیه در بدن جاندار باقی مانده و وارد چرخه غذایی انسانها می شوند. ورود سموم کشاورزی به آب های آزاد، می تواند سبب مرگ ماهی ها شود که برای گونه های بی مهره، سمی تر از ماهیان است (Ullah and Zorriehzahra 2015). بررسی حاصل از ردیابی بقایای سموم در آبهای سد امیرکبیر کرج نشان داده است که میزان باقیمانده سموم در ایستگاه هایی که در نزدیکی باغ ها قرار دارند خصوصاً در بازه زمانی ۱ تا ۲ ماه پس از سم پاشی، بیش از حد مجاز است (Shaieghi et al. 2008).

کاهش تخم پرندگان و جمعیت پروانه ها در طول چهل سال گذشته از دیگر تبعات استفاده سموم شیمیایی بر محیط زیست عنوان شده است (Greek 2003). با توجه به اینکه حشره کش ها اختصاصی عمل نمی کنند، بنابراین از طریق اثر بر موجودات غیر هدف باعث بر هم خوردن تعادل اکوسیستم ها می شود.

اثر محصولات تراریخته بر کاهش مصرف سموم کشاورزی

امروزه با آگاهی در مورد مضرات ناشی از استفاده سموم کشاورزی، راهکارهای متعددی نسبت به کاهش اثرهای نامطلوب استفاده از این سموم در پیش گرفته شده است که می توان به کشاورزی ارگانیک، مدیریت تلفیقی آفات و آموزش مصرف صحیح سموم اشاره کرد. با وجود اشاعه این راهکارها صدمات

سموم کشاورزی آنچنان که باید تحت کنترل قرار نگرفته اند، از طرفی تامین غذای کافی برای جمعیت رو به رشد دنیا و واردات ۵۰ درصدی مواد غذایی در کشور همچنان به عنوان یک معضل باقی مانده است. در این بین، فناوری مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی جهت کنترل این مضرات، مطرح شده است. با استفاده از این فناوری ژن های ضد آفت *Bt* از باکتری باسیلوس تورنجنسیس که یک باکتری گرم منفی است جدا و به گیاهان منتقل شده و پروتئین حاصل از ژن های *Bt* با اتصال به سیستم روده ای آفت باعث ایجاد لیز سلولی و در نهایت مرگ آفت می شود. انتقال ژن های *Bt* به گیاهانی مانند پنبه، سویا، یونجه و ذرت با هدف ایجاد مقاومت به آفات در این گیاهان انجام شده است (Tohidfar et al. 2008, 2013, 2015). در این گیاهان پروتئین *Bt* تولید می شود که به طور اختصاصی آفت مورد نظر را از بین می برد. بنابراین به طور کامل مشخص است که در مورد چنین گیاهانی استفاده از سموم آفت کش بسیار کم یا حتی به صفر رسیده است. سالیانه مقدار زیادی از محصولات تراریخته چون سویا، پنبه، کلزا، ذرت، خربزه درختی و کدوی حلوائی و فرآورده های حاصل از آن در بیش از ۱۷۰ کشور جهان مصرف می شوند. محصولات تراریخته و فرآورده های آن با برخورداری از ویژگی هایی مانند عدم باقی مانده سم، سلامتی و کیفیت و ارزش غذایی بالا برای مصرف کنندگان کشورهای صنعتی و در حال توسعه مزایایی را به ارمغان می آورد. اینگونه محصولات اولین بار در سال ۱۹۹۶ کشت شدند و اکنون با رشد بیش از ۱۰۶ برابر طی ۱۸ سال، در مقیاس ۱۸۵ میلیون هکتار توسط ۲۹ کشور تولید می شوند (James 2014).

تولید و واردات سم نه تنها هزینه های سنگینی را به همراه دارد (جدول ۱) بلکه افراد زیادی نیز به طور خواسته یا ناخواسته در اثر تماس با این سموم آسیب می بینند (Adeli and Ghareyazie 2013). این درحالی است که استفاده از محصولات تراریخته به دلیل عدم نیاز به سم توانسته این مشکل را حل کند به طوری بر اساس ارزیابی انجام شده بر تأثیر اقتصادی و زیست محیطی محصولات تراریخته از ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۴ مشخص شده است که این تکنولوژی توانسته باعث کاهش مصرف آفت کشها به میزان ۵۰۳ میلیون کیلوگرم شود. از طرفی، کشت محصولات تراریخته طی

این سالها باعث کاهش قابل توجه نشر گازهای گلخانه‌ای شده است (Brooks and Barfoot 2005). ارزیابی‌های انجام شده بر روی گیاهان تراریخته و غذاهای ناشی از آنها دال بر هیچ گونه اثر مخرب از سوی آنها است و سلامت این دسته از محصولات به دفعات توسط سازمان‌های بهداشت جهانی و خواروبار جهانی تأیید شده است (Brukanlu and Tohidfar 2015, Tohidfar and Khosravi 2015, Khosravi and Tohidfar 2012, Tohidfar 2012).

با این وجود برخی افراد دلایلی مانند احتمال ایجاد تغییرات ناخواسته در این گیاهان یا بروز حساسیت در مصرف کنندگان را بهانه‌ای برای مخالفت با استفاده از محصولات تراریخته قرار داده‌اند. ایجاد تغییر در برخی از صفات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و یا ژنتیک گیاه حتی در روش‌های سنتی اصلاح نباتات نیز غیر قابل اجتناب است. بارزترین مثال در این مورد ریشه گیاه کاساوا است که با وجود سمیت بالا، منبع اصلی کالری برای مردم فقیر آفریقا است. حتی سیب‌زمینی‌های اصلاح شده به روش سنتی در آمریکا بخاطر سولانین بالا برای سلامتی انسان مضر تشخیص داده شدند. کرفس‌هایی که باعث خارش زیاد در پوست می‌شوند نمونه دیگری از تغییرات ناخواسته اصلاح سنتی است، با وجود این، هنوز هیچ نظارت سازمان یافته‌ای بر این گونه محصولات وجود ندارد (Adeli and Ghareyazie 2013).

یکی دیگر از ملاحظات که در مورد محصولات تراریخته مطرح می‌شود، احتمال فرار ژن به طبیعت است. لازم به توضیح است که فرایند انتقال ژن بین موجودات یک روند کاملاً طبیعی است که سالها در طبیعت به طور مرتب در حال انجام است و ژنها از موجودی به موجود دیگر منتقل می‌شوند و حتی از باکتری‌ها به گیاهان نیز منتقل می‌شوند. نمونه بارز آن انتقال ژن از باکتری اگروباکتریوم به گیاه سیب‌زمینی شیرین است که در طبیعت اتفاق افتاده است. پس اصلاح ژنتیکی گیاهان و یا دستکاری ژنتیکی گیاهان از ابتدا وجود داشته است. امروزه نیز اصلاح ژنتیکی گیاهان با روش‌های سنتی به طور گسترده انجام می‌شود. با توجه به محدودیت‌های روش‌های سنتی و ناکارآمدی آنها در برخی موارد انتقال ژن، روش‌های نوین انتقال ژن با الهام از طبیعت ابداع شده‌اند که حاصل آن ایجاد گیاهان تراریخته است.

در روش‌های سنتی انتقال ژن، هزاران ژن به گیاه منتقل می‌شود که یکی از آنها ژن هدف است، در حالیکه در روش‌های نوین، تنها و تنها یک ژن هدف به گیاه منتقل می‌شود. پس چطور ممکن است محصولات تراریخته اثرهای سوء داشته باشند؟ محصولات تراریخته قبل از اینکه به مصرف برسند مورد آزمایش‌های زیادی قرار می‌گیرند تا سلامت آنها همچون محصولات غیرتراریخته به اثبات برسد. محصولات تراریخته طی ۳ سال تولید می‌شوند، سپس، ۵ سال آزمایش‌هایی در راستای ایمنی آنها صورت می‌گیرد، بطوری که بعد از آزادسازی نه تنها هیچ فرقی با بقیه محصولات ندارند، بلکه سلامتی آنها مورد تایید و بالاتر از محصولات سنتی است.

همان گونه که اشاره شد از نظر علم ژنتیک، انتقال ژن یک فرآیند کاملاً طبیعی است و تجربه تغذیه هزاران ساله انسان و سایر موجودات از گیاهان اصلاح شده ژنتیکی نیز مؤید این مطلب است. بنابراین ایجاد تغییرات ناخواسته در محصولات مهندسی شده ژنتیکی مسئله جدیدی نبوده و ابراز نگرانی در خصوص آن به منظور ممانعت از مصرف این دسته از محصولات بی اساس است. برای رفع این نگرانی می‌توان با انجام آزمایشات مربوط به اثبات این همانی (Modirosta et al. 2013) اقدام کرد و سلامت محصولات تراریخته را جهت استفاده مصرف کنندگان تایید نمود. محصولات تراریخته قبل از اینکه وارد بازار شوند از لحاظ ایمنی ارزیابی می‌شوند و این ارزیابی‌ها شامل بررسی تطابق توالی کامل پروتئین تولید شده توسط گیاه تراریخته با پروتئین‌های سمی موجود در بانک‌های اطلاعاتی، بررسی تشابه بین پروتئین جدید و پروتئین سمی موجود در بانک‌های اطلاعاتی (Tohidfar et al. 2008)، بررسی مقاومت پروتئین به آنزیم‌های پپسین - تریپسین و کیمو تریپسین است.

بر اساس مطالعات متا آنالیز در خصوص اثرهای گیاهان تراریخته مشخص شده است که این محصولات باعث کاهش مصرف آفتکش‌های شیمیایی به میزان ۳۷ درصد، افزایش عملکرد تا ۲۲ درصد و افزایش سود کشاورزان تا ۶۸ درصد (جدول ۲) شده‌اند (Klumper and Qaim 2014). علت افزایش ایجاد شده در عملکرد محصولات کشاورزی ناشی از کشت محصولات

جدول ۱- متوسط هزینه‌های سموم مصرفی در هر هکتار برای محصولات مختلف کشاورزی طی سال زراعی ۱۳۸۹-۹۰ در کل کشور (وزارت جهاد کشاورزی).

Table 1. The average cost of applied pesticides per hectare for different crops during 2010-11

نام محصول	علف کش		حشره کش		قارچ کش	
	مقدار	ارزش یک کیلو*	مقدار	ارزش یک کیلو*	مقدار	ارزش یک کیلو*
گندم آبی	۰/۹۲	۱۳۴۱۳	۰/۳۸	۱۱۶۶۰	۰/۰۶	۱۱۰۵۴
گندم دیم	۰/۳۶	۸۱۸۰	۰/۲۳	۸۷۹۴	۰/۱۳	۱۲۳۷۶
جو آبی	۰/۵۷	۱۲۱۴۲	۰/۴۷	۱۱۳۳۳	۰/۰۵	۹۳۷۹
جو دیم	۰/۲۴	۱۰۸۸۶	۰/۰۸	۸۴۸۵	۰/۰۴	۱۰۰۰۰
ذرت آبی	۱/۲۸	۱۳۸۹۸	۰/۰۸	۱۰۵۸۳	۰	۷۱۷۹
پنبه آبی	۰/۴۵	۱۳۹۸۱	۲/۴۳	۱۳۴۳۲	۰/۰۴	۹۴۰۷
چغندر قند	۲/۲۳	۱۳۰۸۹	۲/۳	۱۲۶۴۷	۱/۱	۶۵۵۳
خیار آبی	۰/۹۹	۱۳۰۰۳	۱/۹۵	۱۲۶۷۵	۱/۱۳	۱۵۸۳۴
سیب زمینی آبی	۱/۵۲	۱۲۱۳۸	۱/۳۱	۱۲۹۴۱	۱/۹۲	۹۸۶۳
پیاز آبی	۱/۳۴	۱۴۹۹۲	۲۷/۲	۱۶۶۴۱	۰/۴۶	۱۵۸۹۶
گوجه فرنگی آبی	۱/۵۷	۱۵۰۶۰	۳/۷۵	۱۹۷۸۵	۴/۹۸	۱۵۷۲۸
یونجه آبی	۰/۸۴	۹۳۵۰	۱/۴۸	۱۰۵۰۱	۰/۰۷	۱۸۴۵۴
یونجه دیم	۰	۱۲۲۵۸	۰/۱	۹۰۰۴	۰	۰
ذرت علوفه ای	۲/۷۵	۱۰۹۰۱	۰	۰	۰	۰
کلزا آبی	۲/۱	۱۷۸۵۳	۰/۸۲	۱۴۰۳۱	۰/۱۴	۳۲۱۳
کلزا دیم	۰/۹۴	۱۴۴۰۸	۳/۱۸	۱۴۳۳۹	۰/۸۳	۱۵۲۷۶
سویا بهاره آبی	۱/۲۱	۱۳۵۴۶	۲/۱	۲۵۷۶۴	۰	۰
سویا بهاره دیم	۱/۷	۱۵۹۹۲	۰/۷	۶۶۴۹	۰/۵۶	۱۶۵۰۱
سویا تابستانه آبی	۱/۰۲	۱۴۰۹۰	۲/۰۴	۱۷۳۹۱	۰/۰۱	۱۶۸۸۱
سویا تابستانه دیم	۱/۴۸	۱۰۰۷۸	۰/۱۴	۴۹۹۹۳	۰	۰
برنج دانه بلند مرغوب	۳/۲۹	۸۴۱۲	۱۸/۶۴	۲۷۶۸	۰/۸	۲۰۵۵۰
برنج دانه بلند پر محصول	۲/۳۶	۹۰۰۵	۱۲/۴	۲۷۶۹	۰/۴۹	۱۵۷۸۸
برنج دانه متوسط مرغوب	۴/۱۸	۸۱۴۰	۲/۸۹	۵۰۲۰	۰/۶۳	۱۶۶۴۰
برنج دانه متوسط پر محصول	۳/۸۶	۷۷۳۳	۷/۶۶	۳۱۵۲	۰/۱۹	۳۱۵۰۵
برنج دانه کوتاه	۲/۳۹	۸۰۴۲	۰/۲۸	۱۱۲۴۵	۰/۱	۱۳۲۹۶

*واحد ۱۰ ریال

جدول ۲- اثرهای محصولات تراریخته بر متغیرهای مختلف.

Table 2. The effects of transgenic crops on different variables

نوع متغیر (درصد)	تمام محصولات تراریخته	محصولات مقاوم به آفت	محصولات مقاوم به علفکش
عملکرد	۲۱/۵۷	۲۴/۸۵	۹/۲۹
مقدار سموم	-۳۶/۹۳	-۴۱/۶۷	۲/۴۳
هزینه سموم	-۳۹/۱۵	-۴۳/۴۳	-۲۵/۲۹
هزینه کل تولید	۳/۲۵	۵/۲۴	-۶/۸۳
سود کشاورز	۶۸/۲۱	۶۸/۷۸	۶۴/۲۹

هزینه‌های مربوطه خواهد شد که هزینه‌هایی نظیر خرید سموم، استخدام سمپاش و آموزش کشاورز برای نحوه استفاده از سموم از جمله آنها خواهد بود. حذف هزینه‌های فوق در نهایت کاهش چشمگیری در هزینه‌های تولید را به همراه دارد. بنابراین دستاوردهای زیست محیطی حاصل از عدم مصرف سموم مختلف در کنار چنین کاهش قابل توجهی از هزینه‌های تولید بسیار شایان توجه و ارزشمند است.

بطور کلی در دنیا، از غذا به عنوان یک سلاح جهت سلطه بر ملت‌ها استفاده می‌کنند، چرا که مردم به آن نیاز دارند. با توجه به ۵۰ درصد واردات غذایی سالیانه در ایران و کشت ۱۸۵ میلیون هکتار گیاهان تراریخته در دنیا، لازم است با اتکاء به زیست فناوری بومی، این فناوری را در کشور گسترش دهیم و با تولید گیاهان تراریخته وابستگی کشورمان را به بیگانگان کاهش دهیم.

بهره‌مندی از علوم و فناوری نوین به خصوص در زمینه مهندسی ژنتیک که در حال حاضر در انحصار تعداد محدودی از کشورهای صنعتی است، موجب توانمندی سیاسی و علمی نظام اسلامی در جهان خواهد شد. از طرفی با راه اندازی تکنیک‌های نوین مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی در کشور که از جدیدترین و پیشرفته ترین روش‌های علمی در جهان امروز هستند، علاوه بر اینکه سبب افزایش اعتبار میهن عزیزمان در عرصه جهانی خواهیم شد جامعه علمی کشور را به مهمترین ابزار پیشرفته در علوم و تکنولوژی مجهز خواهیم کرد که با استفاده از آنها بتوان جامعه علمی کشور را از مصرف کنندگی محض علوم و تکنولوژی خارج و به تدریج به جرگه تولیدکنندگان دانش بشری وارد کرد.

نتیجه‌گیری کلی

مصرف بی‌رویه سموم کشاورزی جهت کنترل آفت و بیماری‌ها به منظور دسترسی به یک عملکرد مطلوب، اثرهای جانبی بیشماری را برای سلامت انسان و محیط زیست مانند رشد بی‌رویه آمار بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سرطان، تخریب منابع زیست - محیطی و زیستی به دنبال دارد که با توجه به دانش امروزی

تراریخته به بالا رفتن پتانسیل ژنتیکی نسبت داده شده است. همچنین، محصولات تراریخته باعث کاهش هزینه‌های مربوط به سموم تا میزان ۳۹ درصد شده‌اند. درحالی‌که این کاهش هزینه‌های مربوط به هر دو دسته سموم آفت‌کش و علفکش است اما صرفه‌جویی در میزان مصرف آفت‌کش‌ها نسبت به علفکش‌ها بیشتر اتفاق افتاده است که علت آن به متفاوت بودن تکنولوژی سموم آفت‌کش از علفکش است (Klumper and Qaim 2014). در هندوستان افزایش عملکرد معادل ۳۱ درصد و کاهش ۳۹ درصدی سموم شیمیایی و افزایش سود ۸۸ درصدی یا درآمد ۲۵۰ دلار اضافه از هر هکتار پنبه تراریخته اشاره به کارامدی و سودمندی محصولات تراریخته دارد (James 2006).

با تولید گیاهان تراریخته که نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی مقاوم هستند نه تنها می‌توان از خروج ارز از کشور جلوگیری کرد بلکه از طریق فروش این گیاهان مبالغ قابل توجهی ارز وارد کشور می‌شود. در صورت تولید گیاهان تراریخته نیازی به واردات سم، سم پاشی و هزینه سمپاشی نخواهد بود و سلامت انسان، دام و محیط زیست نیز تامین خواهد شد. کاهش واردات مواد غذایی، افزایش تولید و عملکرد، کاهش واردات سموم، کاهش هزینه‌های تولید، کاهش خسارت‌های زیست محیطی و کاهش هزینه‌های درمان مسمومین از نتایج اقتصادی این گونه محصولات است. از طرف دیگر، افزایش عملکرد محصول در گیاهان تراریخته از یک طرف می‌تواند با سودآوری بیشتر برای کشاورزان ایرانی امنیت شغلی بیشتری ایجاد کند و بخش قابل توجهی از نیروهای جوان و متخصص را به خود معطوف سازد و از طرف دیگر از مهاجرت روستائیان به شهرها بکاهد.

یکی از اولویت‌های اصلی برنامه ملی تحقیقات کشور خود کفایی و عدم وابستگی به بیگانگان است. برای نیل به خود کفایی در زمینه تولید مواد غذایی و به خصوص مواد استراتژیک بین تمام مسئولان و کارشناسان توافق نظر وجود دارد.

با کشت گیاهان تراریخته، دیگر به مصرف سموم شیمیایی که آلوده‌کننده محیط زیست هستند، نیازی نیست. عدم مصرف سموم، نه تنها باعث می‌شود که محیطی پاک و عاری از مواد سمی داشته باشیم، از نظر اقتصادی نیز منجر به صرفه‌جویی در

از انقراض نجات یابد و به چرخه طبیعی حیات بازگردد، بلکه باعث افزایش تنوع زیستی هم می‌شود.

ادعای دیگر منتقدان، عدم مصرف محصولات تراریخته توسط کشورهای تولید کننده است. واقعیت این است که این ادعا بی-اساس است. چرا که سطح زیر کشت سویا در دنیا ۱۱۱ میلیون هکتار است که در حدود ۹۵ میلیون هکتار آن سویای تراریخته است. آرژانتین که بزرگترین تولیدکننده سویای تراریخته است در حدود ۷ درصد مصرف داخلی دارد و ۱۰ درصد آن را به ایران صادر می‌کند. در آمریکا ۴۹ درصد کدوی حلوائی تراریخته، ۹۹ درصد یونجه تراریخته و ۹۵ درصد چغندر قند تراریخته مصرف داخلی دارد. نکته حائز اهمیت این است که نزدیک به دو دهه است که اینگونه محصولات وارد کشور می‌شوند، محصولاتی که هیچ اطلاعی از خصوصیات تراریختی و جنبه‌های علمی آن در دست نیست. آیا احتمال اثرات سوء آنها بیشتر است یا محصولی که بومی کشور است و کلیه اطلاعات تراریختی و علمی آن در دست است؟

با توجه به فواید عنوان شده برای این تکنولوژی و اینکه رهاسازی محصولات تراریخته پس از رفع کلیه نگرانی‌های زیست محیطی و اکولوژیکی مرتبط انجام می‌شود، جای نگرانی برای مصرف این محصولات باقی نمی‌ماند. چنانچه پیش بینی شده است که تا سال ۲۰۱۵ با کشت محصولات تراریخته، تعداد گرسنگان جهان به نصف کاهش یابد.

منابع

- Adeli N, Ghareyazie B. 2013.** Comparison between the Impact of Transgenic Insect Resistant Crop Plants and their Traditional Counterparts on Human Health and the Environment. *Genetic engineering and Biosafety Journal* 2(1), 1-28 (In Farsi with English abstract).
- Alavanja MC, Hofmann JN, Lynch CF, et al. 2014.** Non-Hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. *PLoS ONE* 9: e109332.
- Anonymous. 1995.** A discourse with the UNDP representative in I. R. Iran on Pesticides usage in Iran, Zeiton, Special issue no. 1. Pp. 9-11. (In Farsi).
- Askari M, Morowati M and Eimani S. 2013.** Determination of Diazinon residue levels in Cherry, *Cerasus avium* supplied

وسعت این صدمات بر کمتر کسی پوشیده باقی مانده است. به نظر می‌رسد در بین راهکار و تکنولوژی‌های مورد استفاده برای کاهش مصرف سموم کشاورزی استفاده از محصولات تراریخته از موفقیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده‌اند. علاوه بر این، فواید زراعی و اقتصادی این دسته از محصولات نیز با مطالعات وسیعی که از آغاز کشت این محصولات تا به امروز انجام شده، تایید شده است. عملکرد دانه و کاهش میزان مصرف سموم برای گیاهان تراریخته مقاوم به حشره کش نسبت به گیاهان مقاوم به علفکش بیشتر است. همچنین، منفعت حاصل از کشت این دسته از محصولات برای کشاورزان در کشورهای در حال توسعه نسبت به کشورهای توسعه یافته بیشتر عنوان شده است.

اگر چه مخالفت‌هایی از سوی بعضی مراکز به عمل می‌آید، اما تقریباً همه پذیرفته‌اند که برای به حداقل رساندن تغییرات زیست محیطی استفاده از این فناوری ضروری است. اما ایران با وجود نوپا بودن فناوری مهندسی ژنتیک توانسته است برای نخستین بار گیاه تراریخته مقاوم به آفت تولید نماید که نیاز به سم پاشی نداشته باشد، اما برخلاف سایر کشورها، دانشمندانی که به چنین کارهای دست می‌زنند مورد تشویق قرار می‌گیرند. در ایران دستیابی به این فناوری به ذائقه عده‌ای خوش نیامده و با درج مطالبی علیه آن بدون هیچ استناد علمی باعث تشویش اذهان عمومی می‌شوند. این رفتارهای غیر منطقی و علمی نه تنها باعث از بین رفتن انگیزه تحقیقات در بین محققان می‌شود، بلکه دانشجویان و محققانی که در این رشته تحصیل می‌کنند را نیز از ادامه فعالیت باز می‌دارد. چالش اصلی منتقدان، موضوع تنوع زیستی است. لازم به توضیح است که انتقال ژن مقاومت به آفت از گیاهان تراریخته به سایر گیاهان نه تنها باعث می‌شود که گیاه

to Tehran central fruit and vegetable market. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 2 (2), 126-129 (in Farsi with English abstract)

Brooks G, Barfoot P. 2005. GM crops: the global economic and environmental impact – the first nine years 1996-2004. *AgbioForum*, 8(2&3): 187-196.

Brukanlu P, Tohidfar M. 2012. Biosafety evaluation of Cry1Ab protein. *Biosafety Journal*, 1(4): 47-52. (In Farsi with English abstract)

Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, et al. 2001. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect*; 109: 471-79.

- DeVilliers SM, Hoisington DA. 2011.** The trends and future of biotechnology crops for insect pest control. *Afr J Biotechnol* 10: 4677–468.
- Eriksson M, Hardell L, Carlberg M, Akerman M. 2008.** Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *Int J Cancer* 123: 1657–63.
- FAO. 2011.** FAOSTAT Pesticide use Available at <http://faostat.fao.org/site/424/DesktopDefault.aspx?PageID=424#ancor>
- Grigg D. 1995.** Introduction to geography of agriculture. Routledge Press, New York, USA, pp 211.
- Hasani AH, Sayadi M, Jafari S. 2011.** Effect of Pesticides on water quality of wells surrounding shemiranat. *Water and Sewage* 1, 119-122 (In Farsi with English abstract).
- Heidari A. 2010.** Strategic program of Pesticides Research. Iranian Institute of Plant Protection publication. Pp. 6. (In Farsi).
- James C. 2006.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2014.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- Khosravi S, Tohidfar M. 2012.** Transgenic crops meeting the sustainable development goals. *Biosafety Journal* 4(4), 87-100. (In Farsi with English abstract).
- Klumper W, Qaim M. 2014.** A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS ONE* 9(11): e111629. doi:10.1371/journal.pone.0111629.
- Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti Ch, Mattock H, Straif K. 2015.** Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol* 16(5): p490–491.
- MAJ. 2011.** Ministry of Agriculture Jihad. Available at http://dbagri.maj.ir/cost/product/rep6_1.asp?o=99&y=90.
- McConnell R, Hruska AJ. 1993.** An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries. *American journal of public health* 83 (11): 1559-1562.
- McDuffie HH, Pahwa P, McLaughlin JR, et al. 2001.** Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1155–63.
- Mehrabani D, Tabei SZ, Heydari ST, et al. 2008.** Cancer occurrence in Fars Province, Southern Iran. *Iran Red Crescent Med Journal* 10:314-22 (In Farsi with English abstract).
- Morowati M and Azadvar M. 2012.** Determination of Diazinon residue levels and preharvest intervals in green house Cucumbers in Jiroft. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 1 (2): 29-36 (in Farsi with English abstract)
- National Toxicology Program. 1979.** Bioassay of parathion for possible carcinogenicity. *National Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser* 70: 1–123.
- Rezvani Moghadam P, Ghorbani R, Koochaki A. Alimoradi L, Azizi G, Siyarmagooyi A. 2009.** Evaluation of pesticide residue in agricultural products. *Environmental sciences* 6(3): 63-72 (In Farsi with English abstract).
- Salahi Ardekani A, Morovati M, Entesari M. 2012.** Residue of Endosulfan and diazinon in tomato and cucumber farms of Kohkiluyeh and boyer ahmad province. *Genetic engineering and Biosafety Journal* 2(1): 113-120 (In Farsi with English abstract).
- Shaieghi M, Khobdel M, Ghamisi A, Selseleh M, Abolhasani M and Nasirian H. 2008.** Investigation and determination of the amount of organophosphate insecticides malathion and diazinon residues in Karaj Dam catchment. *Environmental Science and Technology*. 10: 257-266 (In Farsi with English abstract).
- Stadler MB, Stadler BM. 2003.** Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J*. 17(9):1141-3.
- Tohidfar M, Ghareyazie B, Rahnama H, Mokhtari F. 2008.** Risk assessment of GM food. Andisheh press, Karaj, Iran, pp 77
- Tohidfar M, Khosravi S. 2015.** Challenges for releasing Bt transgenic plants. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7(3): 33-54. (In Farsi with English abstract).
- Tohidfar M, Khosravi S. 2015.** Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2015 19(1): 62-70.
- Tohidfar M, Zare N, Salhi G, Eftghari M. 2013.** Agrobacterium-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 113:227-235.
- Tohidfar M. 2012.** Transgenic cotton, scientific aspects and its impact on economy of Iran and developing countries. *Genetic Novin Journal* 7(1): 1-8 (In Farsi with English abstract).
- Tohidfar. M, Ghareyazie B, Mousavi M, Yazdani S. 2008.** Agrobacterium mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 6: 164-173.
- Ullah S, Zorriezhahra MJ. 2015.** Ecotoxicology: A Review of Pesticides Induced Toxicity in Fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3(1): 40-57.
- Waddell BL, Zahm SH, Baris D, et al. 2001.** Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among male farmers (United States). *Cancer Causes Control* 12: 509–17.
- Yazdi Z, Sarreshtedari M, Zohal MA. 2010.** Respiration disorders of workers in contact with organophosphorus pesticides. *Journal of medical faculty of Mashhad university* 4 (110), 206 (In Farsi with English abstract).

همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های ژن RGT2

از سویه ایرانی مخمر نان

Cloning and investigation of RGT2 gene characteristics from an Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

سولماز عزیزی^۱، علیرضا تارین‌ژاد^{۲*}

Azizi¹ S. and A.R. Tarinejad^{*2}

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی،

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

¹MSc. in Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

²Department of agriculture Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲)

چکیده

مخمر *Saccharomyces cerevisiae* دارای ۲۰ ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده هگزوز است که شامل *RGT2*، *SNF3*، *GAL2*، *HXT1-HXT17* می‌باشد. دو ژن *RGT2* و *SNF3* به عنوان حسگر گلوکز عمل کرده و ژن‌های *HXT1-HXT17* در انتقال مستقیم گلوکز نقش دارند. پژوهشگران ثابت کردند که با افزایش میزان بیان این ژن‌ها سرعت تخمیر الکلی افزایش و در نتیجه آن میزان تولید اتانول افزایش می‌یابد. هدف این مطالعه شناسایی و جداسازی ژن *RGT2* یا *Restores Glucose Transport2* از ژنوم مخمر *S. cerevisiae* از طریق PCR و همسانه‌سازی آن در پلاسمید دارای پیش‌ریبی مناسب به منظور پایه‌ای برای طراحی پلاسمید بیانی و در نهایت مخمر نوترکیب بود. در این تحقیق پس از تهیه آغازگرهای اختصاصی، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر شد و واکنش لیگاسیون بین قطعه تکثیر یافته و پلاسمید pGEM-T انجام و کلونی‌های ترانسفورم شده از طریق سیستم گزینش آبی-سفید شناسایی شدند و در نهایت برای تایید نهایی قطعات همسانه شده، پلاسمیدهای نوترکیب به توالی‌یابی فرستاده شدند. بررسی نرم‌افزاری نشان داد که این ژن پروتئینی با وزن مولکولی ۸۳/۱۷۳ کیلودالتون را کد کرده و دارای ۷۶۳ اسیدآمینو بوده و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۶۸ می‌باشد. در ادامه، ژن *RGT2* از طریق محل‌های برش آنزیمی *PstI* و *NcoI* در پلاسمید pGBKT7 همسانه‌سازی شد. توالی پروتئینی بدست آمده شباهت زیادی با RGT2p سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* موجود در NCBI از جمله سویه P301 (۱۰۰ درصد تشابه) نشان داده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از سایر ژن‌های خانواده انتقال‌دهنده‌های هگزوز نشان داد که *RGT2* بیشترین ارتباط و شباهت را با *SNF3* دارد. با جداسازی و همسانه‌سازی و تعیین ویژگی و در نهایت انتقال این ژن به مخمر می‌توان میزان تولید اتانول را طی تخمیر الکلی افزایش داد.

واژه‌های کلیدی

پلاسمید نوترکیب
RGT2
مخمر
S. cerevisiae
همسانه‌سازی

مقدمه

سیاست‌های جهانی، به ویژه در کشورهای توسعه یافته‌ای که با کمبود منابع انرژی روبرو هستند، سبب شده تا توجه خاصی را به منابع انرژی تجدیدپذیر معطوف نمایند. یکی از مهمترین این منابع انرژی، سوخت‌های زیستی (Biofuel) هستند. طی سالهای اخیر، برنامه‌های بلندمدتی برای تولید و استفاده از سوخت‌های زیستی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، به ویژه در صنعت حمل و نقل تهیه شده است (De Bari et al. 2013). قسمت اصلی سوخت‌های زیستی که امروزه در جهان تولید می‌شود، زیست سوخت و اتانول زیستی است. در حال حاضر اتانول به صورت مخلوط با بنزین برای افزایش عدد اکتان و یا به صورت خالص به عنوان سوخت استفاده می‌شود. پیش‌بینی می‌شود، تولیدات جهانی اتانول زیستی تا پایان سال ۲۰۱۶ به بیش از ۹۵ میلیارد لیتر برسد (Lee et al. 2011).

اتانول زیستی طی فرایندهای تخمیر مواد قندی حاصل می‌شود. تخمیر یک فرآیند بیولوژیک است که طی آن مخمر به عنوان یک کاتالیزور زنده باعث تبدیل کربوهیدراتها به اتانول و CO_2 می‌شود (Singh and Bishnoi 2012). در سالهای گذشته پژوهش‌های گسترده در مورد کاربرد مخمرها برای تولید اتانول انجام شده است. امروزه از روش‌های مختلف مولکولی نظیر روش همسانه‌سازی در ایجاد سویه‌های *S. cerevisiae* جهت بهبود راندمان تولید الکلی طی فرآیند تخمیر الکلی استفاده می‌شود (Rossi et al. 2010; Gutierrez-Lomeli et al. 2008). یکی از مهمترین روش‌ها کاربرد روش DNA نوترکیب است که در سال ۱۹۹۳ توسط Barre و در سال ۱۹۹۸ توسط Dequin و Blonding معرفی و وارد عرصه رقابت با سایر روش‌های ژنتیک مولکولی شد (Pretorius et al. 2003).

بررسی‌ها نشان می‌دهد فرآورده نهایی سوخت و ساز هگزوزها از جمله گلوکز، فروکتوز و مانوز در *S. cerevisiae* در شرایط بی‌هوازی اتانول یا اسیدلاکتیک است و اولین مرحله تنظیمی سوخت و ساز هگزوزها عبور آنها از طریق انتشار تسهیل شده و وابسته به پروتئین‌های انتقال دهنده غشایی می‌باشد. بر طبق اطلاعات موجود خانواده انتقال دهنده هگزوزها در این گونه

مخمر شامل پروتئین‌های Snf3p Gal2p Hxt1p-Hxt17p می‌باشد. با افزایش فعالیت این انتقال دهنده‌ها، تجمع اتانول یا اسید لاکتیک در سلولها بیشتر می‌شود (Guillaume et al. 2007). انتقال دهنده‌های Hxt1 تا Hxt17 در انتقال گلوکز نقش دارند، Gal2 برای انتقال گالاکتوز، *SNF3* و *RGT2* به عنوان حسگر گلوکز عمل می‌کنند. این خانواده ژنی الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آنها به شدت تحت ویژگی قدرت جذب (kinetic) انتقال دهنده‌ها می‌باشد و گلوکز اولین فاکتور کنترل کننده بیان این ژن‌ها می‌باشد (Ozcan and Johnston 1999; Perez et al. 2005). بیان این خانواده ژنی در مخمرها مورد مطالعه قرار گرفته و تولید اتانول در سویه وحشی مخمر با سویه مهندسی شده مقایسه شده است. داده‌های بدست آمده نشان دادند که تظاهر بیش از حد این انتقال دهنده‌ها منجر به افزایش دریافت گلوکز می‌شود و با تنظیم کردن اولین مرحله مسیر بیوستز گلوکز می‌توان منجر به تجمع اسیدلاکتیک شد که یک افزایشی در حدود ۱۵٪ در تولید اتانول در مقایسه با سویه وحشی مشاهده شد (Gutierrez-Lomeli et al. 2010; Rossi et al. 2008).

پیام‌رسانی گلوکز بوسیله حسگرهای *SNF3* و *RGT2* آغاز می‌شود. در این مسیر مهارکننده (Repressor) رونویسی *Rgt1* نقش مهمی دارد. در غیاب گلوکز این مهارکننده به پیشبر ژنهای *HXT* متصل و از رونویسی این ژن‌ها بوسیله یکسری مهارکننده دیگر از جمله *Mth1* *Tup1* *Cyc8* و *Std1* جلوگیری می‌کند (Lakshmanan et al. 2003). زمانی که گلوکز در محیط وجود دارد به حسگرهای *SNF3* و *RGT2* متصل و منجر به فسفریلاسیون *Mth1* و *Std1* بوسیله (Yeast casein kinase) *Yck1/2* مخمری می‌شود. سپس *Mth1* و *Std1* در کمپلکس (*SCF^{Grl}-ubiquitin-Ligase*) یوبی کوئیتینه شده و در نهایت در 26S پروتئازوم تخریب و تجزیه می‌شوند (شکل ۱). از طرفی *pKA* (protein kinase A) باعث فسفریلاسیون *Rgt1* شده و در نتیجه آن *Rgt1* فسفریله شده از پیشبر ژن‌ها جدا و رونویسی ژنهای *HXT* صورت می‌گیرد (Kim et al. 2003).

میزان حضور این دو حسگر در غشای پلاسمایی از طریق اندوسیتوز و انتقال آنها به واکوئل سلول و در نهایت تخریب و

مواد و روش‌ها

سویه مخمر *S. cerevisiae* سویه ایرانی بوده که در نانواپی و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. نژاد Top10 باکتری *Escherichia coli* مارکر VC 1kb DNA Ladder و آنزیم و بافر T4 DNA ligase شرکت Vivantis، PCR Master Mix شرکت سیناژن، سیستم pGEM-T Vector شرکت Promega و پلاسمید pGBKT7 شرکت Clontech، آنزیم‌های برشی از شرکت سیناژن، آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین، کانامایسین و آغازگرهای

F_{ext} : 5'-ATGAACGATAGCCAAAAGTCTG

F_{int} : 5'-TCATTTCCAGTTATCAGTGG

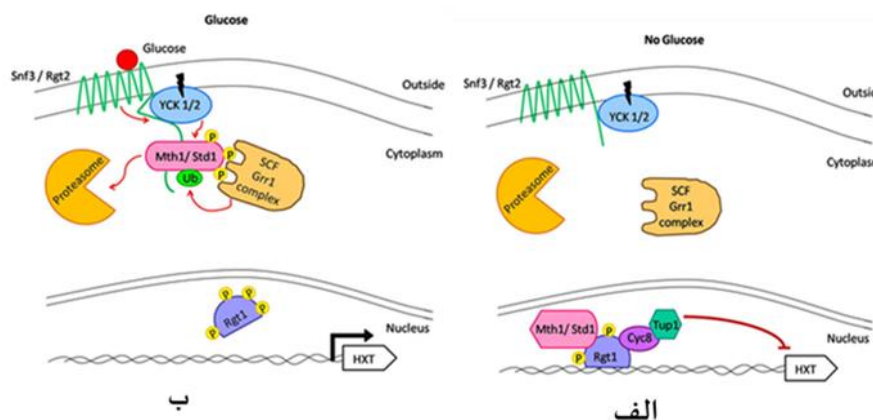
R_{int} : 5'-CAACTTTCCAGCGTTCTTGA

R_{ext} : 5'-TTATTGGGGGGAAGTGTATTG

استفاده شد. محیط کشت اختصاصی YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) حاوی دکستروز، پیتون و عصاره مخمر از شرکت Merck آلمان تهیه شده بود.

تجزیه در این اندامک سلولی کنترل می‌شود. با توجه به این مطلب *RGT2* میل ترکیبی کمی با گلوکز دارد و زمانی که میزان گلوکز در محیط بالاست، در سطح سلول پایدار می‌ماند و سیگنالینگ گلوکز از طریق آن صورت می‌گیرد. در حالی که *SNF3* میل ترکیبی زیادی با گلوکز دارد و زمانی که میزان گلوکز در محیط پایین است، پایدار می‌ماند. بنابراین یافته‌های جدید نشان می‌دهد گلوکز موجود در محیط و غلظت آن، سطح حسگرها را در غشای پلاسمایی مشخص می‌کند (Roy and Kim 2014). *RGT2* با ۷۳ درصد تشابه با *SNF3* حدود ۱۰۰kb پایین‌دست *SNF3* روی کروموزوم IV قرار دارد (Wolfl et al. 1996).

هدف این تحقیق همسازسازی ژن *RGT2* در داخل پلاسمید pGEM-T و بررسی آن از نظر ترادف ژنی و آمینواسیدی می‌باشد. بعد از تایید صحت توالی، ژن مورد نظر با آنزیم برشی متناسب با پلاسمید بیانی pGBKT7 برش داده شد و جهت افزایش راندمان تولید اتانول در پلاسمید بیانی مخمر همسازسازی شد. همچنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی توالی پروتئینی بدست آمده با استفاده از بررسی‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده صورت گرفت.



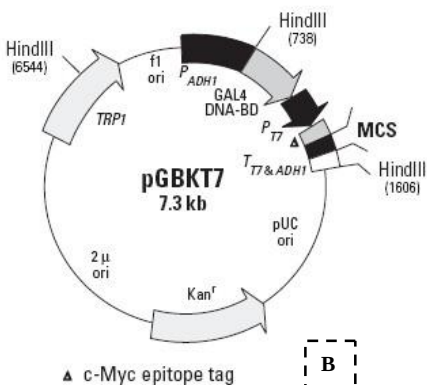
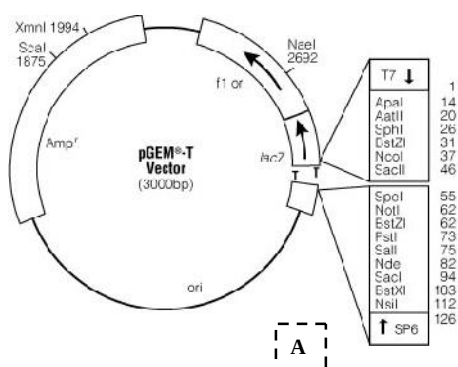
شکل ۱- الف- مسیر سیگنالینگ *SNF3/RGT2* در غیاب گلوکز. ب- مسیر سیگنالینگ *SNF3/RGT2* در حضور گلوکز (Gancedo 2008).

Figure 1- *SNF3/RGT2* signaling pathway in the absence of glucose (A), and in the presence of glucose (B)

درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، در نهایت DNA مخمر با استفاده از روش‌های رسوب و خالص‌سازی اسیدنوکلئیک خالص شده و در ۵۰-۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز و خالص سازی محصول تکثیری

ابتدا آغازگرهای مناسب به منظور جداسازی ژن *RGT2* با استفاده از توالی موجود در NCBI با کد دسترسی (NM: 001180198.1) طراحی شدند. به دلیل طولانی بودن اندازه ژن از دو آغازگر رفت و برگشت داخلی برای توالی‌یابی کامل ژن استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن مورد نظر از روی DNA و برای اثبات حضور ژن در وکتورها مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- شمایی از پلاسمیدهایی که در همسانه‌سازی ژن *RGT2* بکار گرفته شد: (الف) پلاسمید پایه pGEM-T برای همسانه‌سازی اولیه (ب) پلاسمید بیان pGBKT7

Figure 2- The schematic map of vectors used for cloning of *RGT2* gene: (A) pGEM-T vector for primary cloning (B) pGBKT7 expression vector.

pGEM-T یک پلاسمید خطی با T منفرد آویزان انتهایی در انتهاهای ۳' است که به این شکل از حلقوی شدن پلاسمید جلوگیری کرده و کارایی واکنش لیگاسیون را با محصول PCR تکثیرشده با DNA پلیمرزهای معین مقاوم به حرارت که یک A به انتهاهای ۵' آنها اضافه می‌کنند، افزایش می‌دهد. این پلاسمید شامل پیشبرهای T7 و SP6 آر آن ای پلیمرز در طرفین ناحیه سایت‌های برشی است. ناحیه سایت‌های برشی آن هم در داخل ناحیه کدکننده α -پپتید آنزیم β -گالاکتوزیداز واقع شده است (شکل ۲ الف).

پلاسمید pGBKT7 یک پلاسمید بیانی، حاوی توالی کدکننده دمین اتصال به DNA فاکتور رونویسی GAL4 (Galactose) مخمری و پیشبر ADHL (Alcohol dehydrogenase) است. این وکتور دارای چندین سایت برشی اختصاصی برای همسانه‌سازی بوده و امکان بیان در *S.cerevisiae* و *E.coli* را دارد. پلاسمید pGBKT7 حاوی ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش در محیط کشت *E.coli* و ژن TRP (Tryptophan) برای گزینش در محیط کشت مخمر می‌باشد (شکل ۲ ب).

کشت مخمر *S. cerevisiae*

پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰g دکستروز، ۲۰g پیتون، ۱۰g عصاره مخمر و ۱۵g آگار و رشد کلونی‌ها، تک کلونی‌ها با استفاده از لوپ به محیط کشت مایع منتقل و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰°C قرار داده و جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

جداسازی DNA

سوسپانسیون حاصل از کشت مخمرها در محیط کشت مایع YPD ابتدا توسط سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰rpm رسوب داده شد و بر روی رسوب حاصله بافر Harju (Harju et al. 2004) که حاوی 10 mM Tris-، 100 mM NaCl، 1% SDS، 2% Triton X-100، 1 mM EDTA، Hcl (pH 8.0) است اضافه شد. میکروتیوب‌ها دو دقیقه در اتانول مطلق سرد و یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، این مرحله تکرار و ورتکس شد در ادامه با افزودن کلروفرم، ورتکس و سانتریفیوژ، فاز بالایی به تیوب جدید منتقل، و بر روی آن اتانول مطلق اضافه و در دمای ۲۰-

آنتی‌بیوتیک به نمونه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۸۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرارگرفتند. در نهایت حدود ۲۰-۲۰۰ µl از سلولهای باکتریایی ترانسفورم شده، روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب و X-Gal و IPTG کشت شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کلونی‌های سفید رنگ با انجام PCR روی آنها تایید شدند و با استفاده از روش استخراج پلاسمید که به اختصار Miniprep نامیده می‌شود، مورد استخراج پلاسمید قرارگرفتند (رحیمی اسفنجانی و تارنژاد ۲۰۱۳). با انجام PCR دیگری روی پلاسمیدهای استخراج شده و تایید آنها، برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره‌جنوبی ارسال شدند.

همسازسازی در پلاسمید pGBKT7

پلاسمید pGEM-T (شکل ۲ الف) و ژن RGT2 موجود در آن با آنزیم‌های برشی *PstI* و *NcoI* برش یافته و روی ژل آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) الکتروفورز و بررسی شد (سایت‌های برشی *PstI* و *NcoI* در طرفین MCS پلاسمید pGEM-T قرار داشت)، باند مربوط به ژن از ژل جداسازی و خالص سازی شد. اتصال و لیگاسیون ژن RGT2 با پلاسمید pGBKT7 (شکل ۲ ب) که توسط دو آنزیم برشی *PstI* و *NcoI* خطی شده بود، انجام و در نهایت پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد *Top10* انتقال یافت و در مرحله بعد باکتری‌ها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین گزینش شدند. در ادامه تعدادی کلونی به عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب و با انجام PCR روی آنها تایید شدند. در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی توالی

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam و ProtScale تعیین گردید. توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مرکز ملی

برای تهیه ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR، ۴µl Master mix (5x)، ۲µl آغازگر رفت، ۲µl آغازگر برگشت و ۵۰ نانوگرم DNA به ۱۴/۶µl آب مقطر استریل اضافه شد. برنامه استاندارد PCR شامل مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه مرحله تکثیر که شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۶۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله پایانی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نیمی از محصول تکثیری PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد تا باندهای تکثیر شده، بررسی شوند. پس از آنکه باند مورد نظر مشاهده شد، باقی مانده فرآورده تکثیری PCR تایید شده خالص سازی و رسوب داده شد.

همسازسازی در پلاسمید pGEM-T

برای اتصال دو قطعه‌ی DNA، مواد لازم برای ۱۰µl واکنش لیگاسیون شامل ۳۰۰-۱۰۰ ng (۰/۵µl) پلاسمید pGEM-T، ژن RGT2 (فرآورده تکثیری PCR خالص سازی شده) به نسبت ۳ برابر پلاسمید (۹۰۰ ng یا ۱/۵µl) (۵µl) بافر T4-DNA ligase ۲× و ۵ واحد آنزیم T4-DNA ligase (۰/۵µl) و ۲/۵µl آب مقطر استریل در تیوب استریل ۵ ml ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (رحیمی اسفنجانی و تارنژاد ۲۰۱۳).

ترانسفورماسیون سلولهای باکتریایی به روش شوک حرارتی (Heat-shock)

برای ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی، ابتدا سلولهای مستعد باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد و محصول واکنش لیگاسیون از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس نصف محصول واکنش لیگاسیون (۵µl) به روی ۵۰µl سلول مستعد *Escherichia coli* اضافه و به آرامی مخلوط شدند و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها ۴۲ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و به سرعت ۲ دقیقه به روی یخ منتقل شدند. در ادامه ۸۵۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع بدون

ژن‌هایی انتقال دهنده هگزوز با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام شد. توالی‌های پروتئینی از سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* که برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دستیابی در جدول (۱) ذکر شده‌اند.

اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف Rgt2p و انواع

جدول ۱- شباهت توالی اسیدآمینه‌ای Rgt2p با سایر توالی‌های اسیدآمینه‌ای آن در سویه‌های دیگر مخمر

Table 1- Amino acid similarity of obtained Rgt2p with other amino acid sequences in different yeast strains

شماره دستیابی	نام اختصاصی ژن	نام سویه	درصد تشابه	درصد یکسانی
Acc. number	gene	Yeast strain	Similarity	Identity
CAY78369.1	Rgt2p	Saccharomyces cerevisiae EC1118	99	99
ED708408.1	Rgt2p	S. c P301	100	99
EHN08207.1	Rgt2p	S. c x S kudriavzevii VIN7	99	99
EEU08513.1	Rgt2p	S. c JAY291	99	99
NP 010143.1	Rgt2p	S. c S288c	99	99
EWG86946.1	Rgt2p	S. c R008	99	99
GAA22109.1	Rgt2p	S. c Kyokai no. 7	99	99
EGA59412.1	Rgt2p	S. c FostersB	99	99
EHN033394.1	Rgt2p	S. c x S kudriavzevii VIN7	87	99
EGA79645.1	Rgt2p	S. c Vin 13	99	76
EEU05315.1	Snf3p	S. c JAY291	64	89
EWG91618.1	Snf3p	S. c P301	64	89
GAA22058.1	Snf3p	S. c Kyokai no. 7	64	89

همسانه‌سازی DNA تکثیر شده در پلاسمید pGEM-T

DNA تکثیر شده از واکنش PCR برای ژن RGT2 پس از خالص سازی از روی باقی مانده محصول PCR در وکتور pGEM-T همسانه سازی شد. در این وکتور غیرفعال شدن α -پپتید با وارد شدن DNA الحاقی، اجازه شناسایی نوترکیب‌ها (کلونی‌های سفید) را از طریق غربالگری سفید-آبی می‌دهد. با استناد به این ویژگی پلاسمید، تعدادی از کلونی‌های نوترکیب (سفید) انتخاب و درستی واکنش لیگاسیون با PCR روی آن کلونی‌ها تایید شد (شکل ۴).

نتایج و بحث

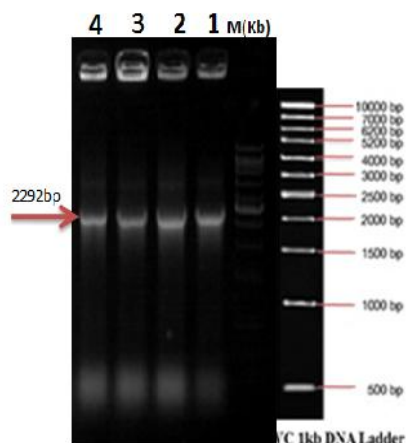
تکثیر ژن RGT2

پس از استخراج DNA ژنومی مخمر، ژن RGT2 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در دستگاه PCR تکثیر شد. محصول PCR یک باند ۲۲۹۲ جفت بازی روی ژل آگارز بود که با ژن RGT2 موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مطابقت داشت (شکل ۳).

E. مراحل تایید کلونی‌ها برای حضور ژن پس از تراریزش

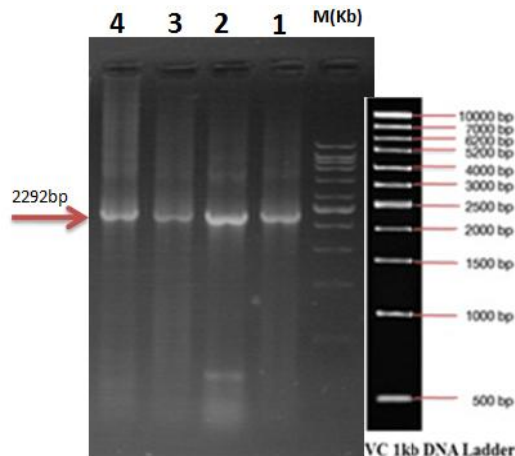
pGEM-T+ RGT2 با پلاسمید *coli*

با توجه به اینکه توالی‌یابی قطعه DNA همسانه‌سازی شده برای ژن *RGT2* هنوز مشخص نشده بود، بنابراین تعدادی از کلونی‌های رشد کرده پس از واکنش تراریزش با پلاسمید pGEM-T+ RGT2 برای تایید وجود قطعه کلون شده در سه مرحله آزمایش شدند. بدین ترتیب که ابتدا کلونی‌های انتخاب شده به روش PCR و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در همسانه‌سازی، مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۴). در مرحله دوم، تعدادی از کلونی‌هایی که در PCR مثبت بودند برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. پس از استخراج پلاسمید، PCR دیگری روی DNA پلاسمید استخراج شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در همسانه‌سازی انجام شد (شکل ۵). در نهایت برش آنزیمی پلاسمید pGEM-T+RGT2 با دو آنزیم برشی *NcoI* و *PstI* که در دو طرف سایت برش اختصاصی قرار دارند انجام شد. نتیجه این واکنش نشان داد که قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۲۲۹۲ جفت باز در این پلاسمید همسانه‌سازی شده است (شکل ۶).



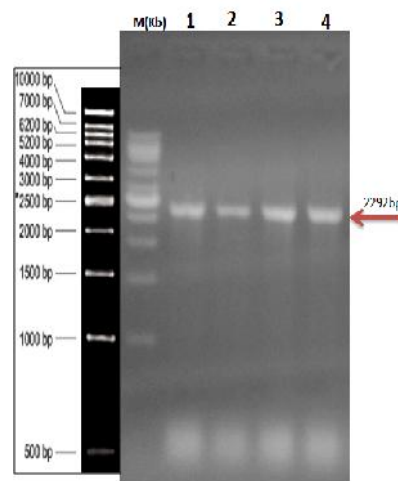
شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از کلونی‌های نوترکیب رشد کرده روی محیط انتخابی پس از تراریزش با محصول لیگاسیون با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *RGT2*، مشاهده باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده در کلونی‌ها را تایید می‌کند. ۱، ۲، ۳ و ۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر.

Figure 4- Electrophoresis of PCR product by using specific primers of *RGT2* gene on recombinant colonies after transformation with ligation product and growing on selectable media, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned vector into colonies. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.



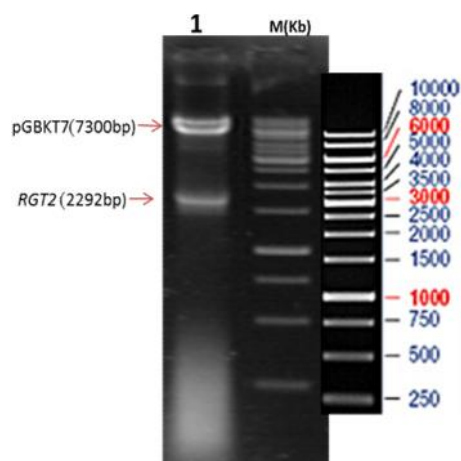
شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *RGT2*، مشاهده باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده در کلونی‌ها را تایید می‌کند. ۱، ۲، ۳ و ۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر.

Figure 5- Electrophoresis of PCR product by using specific primers of *RGT2* gene on extracted recombinant plasmid, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment into colonies. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA ژن *RGT2* با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، باند ۲۲۹۲ جفت بازی که با اندازه مورد انتظار مطابقت داشت. ۱، ۲، ۳ و ۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر ۱kb.

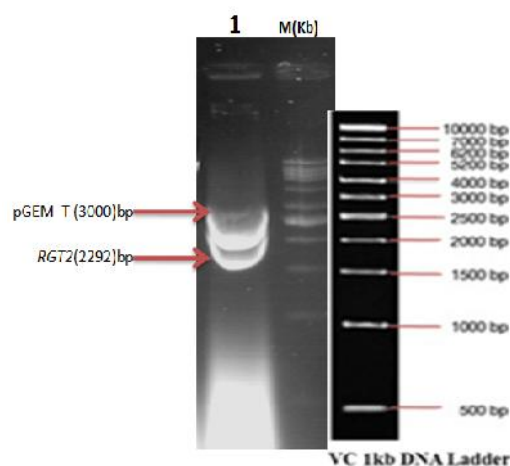
Figure 3- Electrophoresis of PCR product resulting from *RGT2* gene amplification with specific designed primers, 2292bp band Corresponds to expected size. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.



شکل ۷- تصویر الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب (pGBKT7+RGT2) استخراج شده با آنزیم‌های برشی *PstI* و *NcoI*. مشاهده‌ی باند ۲۲۹۲bp حضور فیزیکی قطعه همسانه‌سازی شده را تایید می‌کند. M(Kb) مارکر ۱kb.

Figure 7- Electrophoresis of recombinant plasmid (pGBKT7+RGT2) digested with *PstI* and *NcoI* restriction enzymes, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.

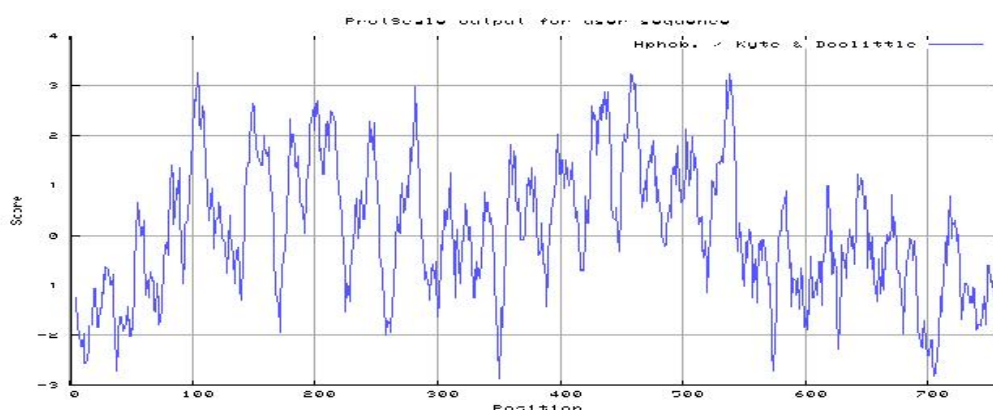
همچنین شاخص Aliphatic (به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه عمر این پروتئین در محیط *in vivo* محاسبه شده بوسیله برنامه ProtParam، به ترتیب ۹۵/۳۳ و در حدود ۲۰ ساعت محاسبه شد که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین در برابر حرارت می‌باشد (Gasteiger et al. 2005). شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle نشان داد که پروتئین Rgt2p، به دلیل خاصیت احیاءکنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز می‌باشد (Kyte and Doolittle 1982) (شکل ۸). C ترمینال گسترش یافته از این پروتئین شامل ۲۱۸ اسید آمینه است که از غشای پلاسمایی به سمت سیتوپلاسم قرار دارد. حسگر *RGT2* دارای ۱۲ دامنه انتقال دهنده درون غشایی است که در شکل نشان داده شده است (شکل ۹). پیام‌رسانی و سیگنالینگ گلوکز از طریق اتصال گلوکز به یکی از دامنه‌های غشایی که به عنوان گیرنده سیگنال عمل می‌کند ایجاد می‌شود (Ozcan et al. 1998).



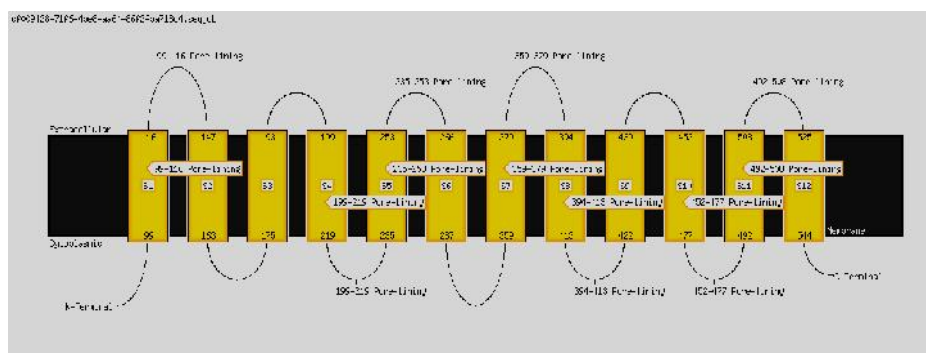
شکل ۶- تصویر الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب استخراج شده با آنزیم‌های برشی *PstI* و *NcoI*. مشاهده باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده را تایید می‌کند. M(Kb) مارکر.

Figure 6- Electrophoresis of recombinant plasmid digested with *PstI* and *NcoI* restriction enzymes, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.

بنابراین، تعداد چهار عدد از نمونه‌های DNA پلاسمید حاصل برای تعیین توالی به مرکز توالی‌یابی ارسال شد. نتایج توالی‌یابی با دو آغازگر T7 و SP6 برای ژن *RGT2* بر روی پلاسمید pGEM-T نمایانگر این بود که موقعیت قرارگیری آن روی سایت برشی اختصاصی (MCS) پلاسمید در جهت معمولی می‌باشد و کدون آغاز ATG در سمت T7 قرار دارد و یک پروتئین با ۷۶۳ اسید آمینه را رمز می‌نماید. در ادامه این ژن با استفاده از سایت‌های برشی *PstI* و *NcoI* در پلاسمید pGBKT7 همسانه‌سازی شد. برای تایید قطعه همسانه‌سازی شده از برش آنزیمی با دو آنزیم برشی *PstI* و *NcoI* که در دو طرف MCS پلاسمید pGBKT7 قرار دارد استفاده شد (شکل ۷). بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین Rgt2p با فرمول مولکولی $C_{3737}H_{5805}N_{97701}S_{23}$ ، به ترتیب برابر ۸۳/۱۷۳ کیلوالتون و ۵/۶۸ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۶/۳۹ می‌باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود.



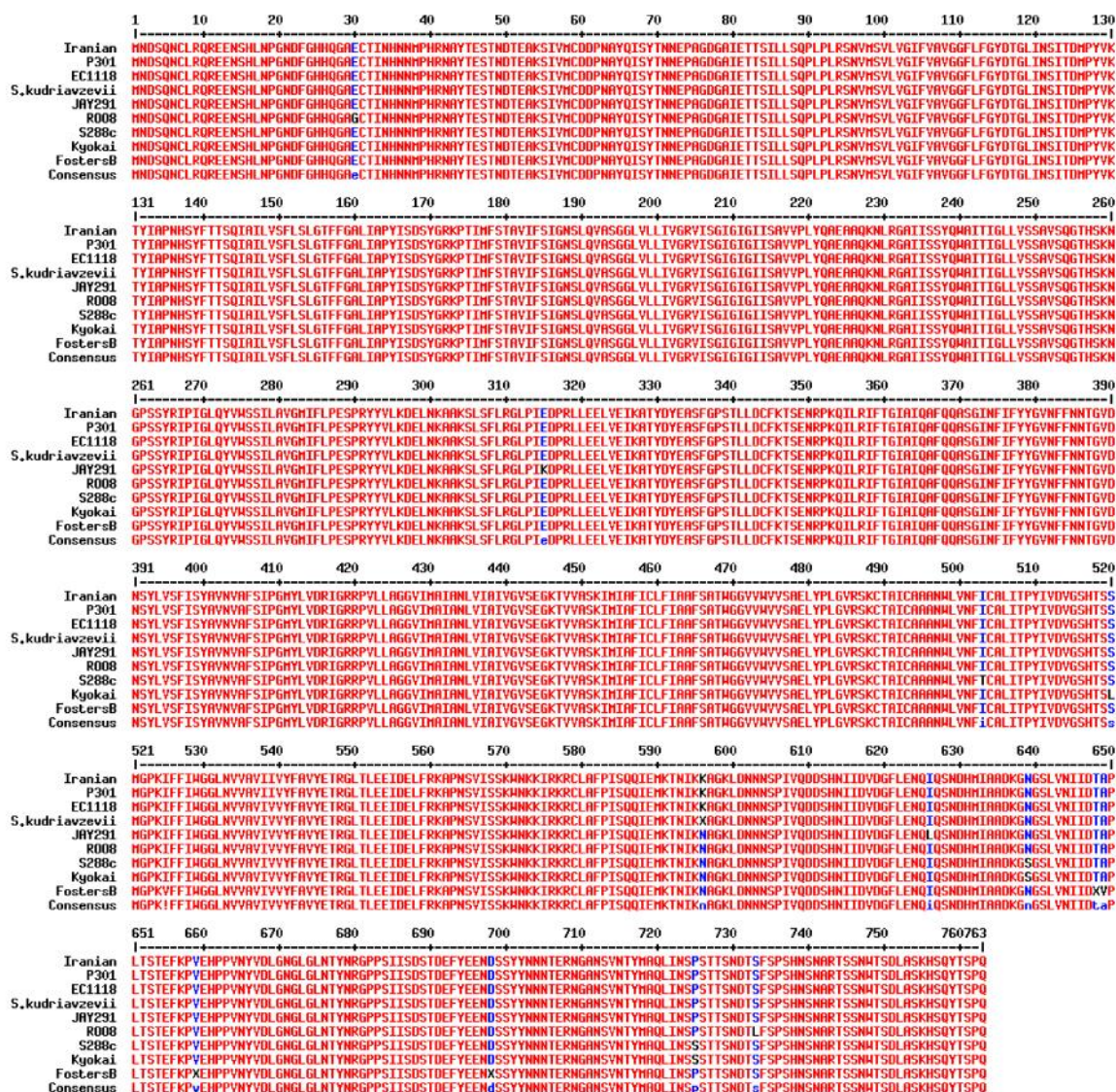
شکل ۸- بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین Rgt2p



شکل ۹- توپولوژی دو بعدی از حسگر گلوکز Rgt2p. دامنه‌های انتقال دهنده از ۱ تا ۱۲ شماره گذاری شده‌اند.

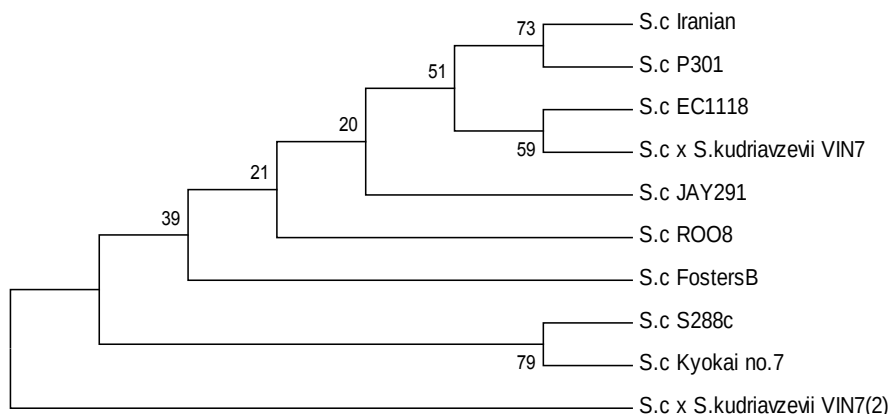
با سویه‌های JAY291, S. c. x S kudriavzevii VIN7, EC1118، Foster'sB, Kyokai no. 7, R008, S288c به میزان ۹۹٪ تشابه و ۹۹٪ یکسانی دارد (جدول ۱). بررسی درخت فیلوژنتیکی هم که با استفاده از نرم افزار MEGA4 رسم شده است نشان می‌دهد ژن مورد بررسی ارتباط خیلی نزدیک با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* دارد (شکل ۱۱).

توالی پروتئینی بدست آمده با سایر Rgt2p از سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* که بیشترین شباهت را داشتند با استفاده از نرم افزار آنالاین MultAlin مقایسه شد (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (شکل ۱۰). نتایج بدست آمده نشان داد که پروتئین بدست آمده بالاترین شباهت را با Rgt2p از مخمر *S. cerevisiae* سویه P301 به میزان ۱۰۰٪ تشابه و ۹۹٪ یکسانی (similarity and identity) دارد. همچنین



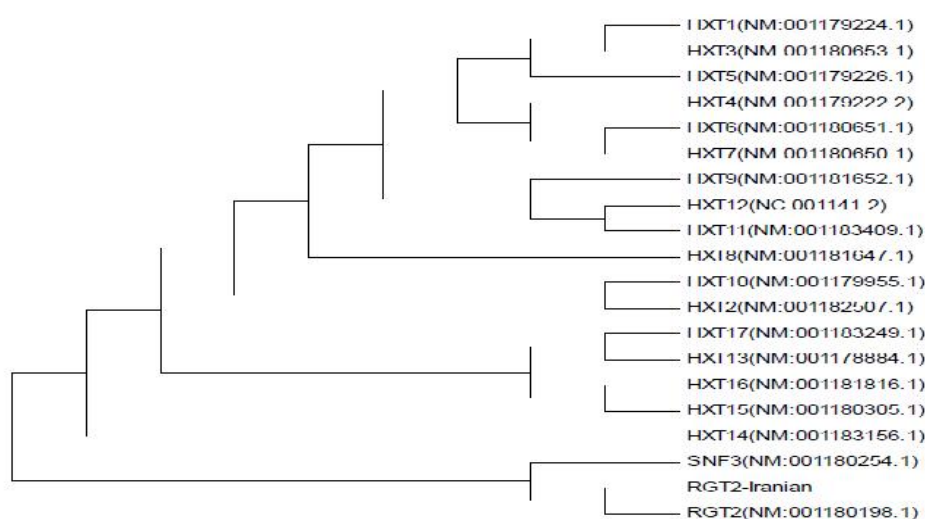
شکل ۱۰- هم‌ردیفی مقایسه‌ای توالی اسید آمینه‌ای Rgt2p همسازسازی شده در پلاسمید pGEM-T با توالی اسید آمینه‌ای سایر Rgt2p های سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* موجود در NCBI با استفاده از برنامه‌ی Multialign. ردیف آخر توالی‌های مورد توافق را پس از مقایسه نشان می‌دهد.

Figure 10- The obtained Rgt2 Amino Acid sequence was aligned with other sequences of the same protein in *S. cerevisiae* by using of Multialign program. The last row shows the consensus sequences after alignment.



شکل ۱۱- درخت فیلوژنتیکی توالی اسیدآمینه‌ای *Rgt2p* توالی‌یابی شده با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد.

Figure 11- Phylogenetic tree of *Rgt2* amino acid sequence with other peer genes existed in NCBI for other strain of *S. cerevisiae*. This tree was drawn by MEGA4 software



شکل ۱۲- درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن *RGT2* مخمر *S. cerevisiae* سویه ایرانی با سایر ژن‌های انتقال‌دهنده‌های هگزوز *S. cerevisiae* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد. کد دسترسی هر ژن داخل پرانتز آورده شده است.

Figure 12- Phylogenetic tree of *RGT2* gene sequence from Iranian strain of *S. cerevisiae* with other hexose transporter genes existed in NCBI. This tree was drawn by MEGA4 software and accession number of each gene was brought into parenthesis.

افزایش یابد. برای بیان این ژن نیاز به یک پیشبر قوی نظیر ADH-promoter (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) می‌باشد که این پیشبرها باعث افزایش میزان جذب قندهای هگزوز توسط سلول‌های مخمر و افزایش تولید الکل طی فرآیند تخمیری می‌شوند. در ادامه این ژن در پلاسمید pGBKT7 که حامل ADH-promoter است همسازسازی شد. این پلاسمید برای بیان پروتئین در مخمر بسیار مناسب می‌باشد و از آن برای انتقال ژن *RGT2* جهت بیان آن در مخمر استفاده خواهد شد.

نتیجه‌گیری نهایی

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی (همردیفی مقایسه‌ای، بلاست، درخت فیلوژنتیکی) مشخص شد قطعه توالی‌یابی شده شباهت زیادی با توالی ژن *RGT2* مخمر *S. cerevisiae* سویه‌های دیگر ثبت شده در NCBI دارد. این اولین گزارش از جداسازی و همسازسازی این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نو ترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. امید است با بررسی بیشتر روی این ژن و سایر ژنهای انتقال‌دهنده هگزوز احتمالاً در آینده مخمر نو ترکیب جهت افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر *S. cerevisiae* تهیه نمود.

تشکر و قدردانی: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر تامین مالی این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی ژن *RGT2* با ژن‌های خانواده انتقال‌دهنده هگزوز، آنالیز کلاستر انجام شد. براین اساس مشخص شد ژن *RGT2* ارتباط نزدیکی با ژن‌های این خانواده دارد و بیشترین ارتباط و شباهت را با ژن *SNF3* از این خانواده‌ی ژنی دارد (شکل ۱۱). نتایج BLAST در سطح پروتئین نشان داد پروتئین مورد بررسی شباهت ۶۴٪ (یکسانی ۸۹٪) با *Snf3p* حسگر مهم دیگر گلوکز در مخمر *S. cerevisiae* دارد (جدول ۱).

خانواده ژنی انتقال‌دهنده‌های هگزوز روی پلاسمیدهای مختلف همسازسازی و افزایش تولید اتانول در سویه مهندسی شده در مقایسه با سویه وحشی مخمر مشاهده شده است. به طور مثال Rossi و همکاران (۲۰۱۰) از بین این انتقال‌دهنده‌ها *HXT7* و *HXT1* را همسازسازی و افزایش تولید اتانول را در سویه مهندسی شده مشاهده کردند. در سال ۲۰۱۲ نیز *HXT1*، *HXT7*، *GXS1* و *GXF1* (انتقال‌دهنده‌ی زایلوز) از *Condida intermedia* را به پلاسمید pUPG1 همسازسازی و به مخمر MT8-1/XkdXI منتقل کردند. در نهایت نتیجه کار با پلاسمید شاهد مقایسه و افزایش تولید اتانول مشاهده شد. این نتایج به طور آشکار نشان می‌دهند که افزایش بیان انتقال‌دهنده‌ها در مخمر می‌تواند توانایی تولید اتانول را بوسیله تسهیل مصرف گلوکز بهبود بخشد (Takanori et al. 2012). در ایران نیز ژن *HXT2* از طریق بهینه سازی PCR از ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی جدا و در پلاسمید pTZ57R/T همسازسازی شد. این ژن با شماره دسترسی JQ 323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است (Amiri et al. 2011).

توالی ژن *RGT2* ابتدا در پلاسمید پایه‌ی pGEM-T همسازسازی شد تا محدوده استفاده از آنزیم‌های برشی برای همسازسازی

منابع

- Amiri S, Tarinejad A, Sharifi Sirchi Gh. 2011. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter2 gene from Iranian *Saccharomyces cerevisiae*. Iranian Journal of koomesh 2:138-143. (In Farsi with English abstract).
- De Bari I, De Canio P, Cuna D, Liuzzi F, Capece A, Romano P. 2013. Bioethanol production from mixed

sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. New biotechnology 30: 591-597.

- Gancedo JM. 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 32: 673-704.

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.
- Gutierrez-Lomeli M, Torres-Guzman JC, Gonzalez-Hernandez GA, Cira-Chavez LA, Pelayo-Ortiz C, Ramirez-Cordova Jde J. 2008.** Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Journal of Business* 93: 363-371.
- Guillaume C, Delobel P, Sablayrolles JM, Blondin B. 2007.** Molecular basis of Fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Applied and environmental Microbiology* 8: 2432-2439.
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. 2004.** Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Gab. *Bio Med Central Biotechnology* 21: 4-8.
- Kim JH, Polish J, Johnston M. 2003.** Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5208-5216.
- Kyte J and Doolittle RF. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.
- Lakshmanan J, Mosley AL, Ozcan S. 2003.** Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Current Genetics* 44: 19-25.
- Lee KH, Choi IS, Kim YG, Yang DJ, Bae HJ. 2011.** Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology* 102: 8191-8198.
- Ozcan S, Dover J, Johnston M. 1998.** Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Molecular Biology Organization Journal* 17: 2566-2573.
- Ozcan S, Johnston M. 1996.** Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology* 16: 5536-5545.
- Ozcan S, Johnston M. 1999.** Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 554-569.
- Perez M, Luyten K, Michel R, Riou CH, Blondin B. 2005.** Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 5: 351-361.
- Pretorius S, Toit M, Rensburg P. 2003.** Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21st Century. *Food Technology and Biotechnology* 41 (1) 3-10.
- Rahimi Esfanjani N, Tarinejad AR. 2013.** Isolation of partial cDNA of transferrin gene (Ttf) from Bam wheat cultivar under salinity stress treatment. *Biosafety and Genetic Engineering journal*. 2(1): 59-70. (In Farsi with English abstract).
- Rossi G, Sauer M, Porro D, Branduardi P. 2010.** Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microbial Cell Factories* 9: 1-10.
- Roy A, Kim JH. 2014.** Endocytosis and vacuolar degradation of the yeast cell surface glucose sensors Rgt2 and Snf3. *Journal of Biological Chemistry* 289: 7247-7256.
- Singh A, Bishnoi RN. 2012.** Optimization of ethanol production from microwave alkali pretreated rice straw using statistical experimental designs by *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Crops and Products* 37: 334-341.
- Takanori T, Tomonori I, Chiaki O, Naoto O, Takayuki O, Akihiko K. 2012.** Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(2): 209-211.
- Wolfl S, Hanemann V, Saluz H P. 1996.** Analysis of a 2675bp segment from the left arm of yeast chromosome IV. *Yeast* 12: 1549-1554.

تاثیر نانو الیستورهای کبالت و کیتوزان بر میزان تولید آرتمیزین و بیان دو ژن کلیدی SQS و DBR2 در گیاه *Artemisia annua*

The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in *Artemisia annua*

بی تا قاسمی^۱، رامین حسینی^۲، فاطمه دهقان نیری^۳

Bita Ghasemi¹, Ramin Hosseini², Fatemeh Dehghan Nayeri³

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

1- MSc in Agricultural Biotechnology, 2- Associate professor,
3- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini
International University, Gazvin, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raminh_2001@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۱۲)

چکیده

گیاه درمنه (*Artemisia annua*) به دلیل تولید آرتمیزین با خاصیت‌های مختلف مانند مقابله با پلاسمودیم‌های عامل بیماری مالاریا و درمان انواع سرطان‌ها، دارای اهمیت ویژه می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر الیستور نانو کبالت و نانو کیتوزان روی میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی آرتمیزین (*SQS* و *DBR2*) و مقدار تولید این ماده در سوسپانسیون سلولی درمنه از غلظت‌های ۰، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر نانو کبالت و ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر نانو کیتوزان در چهار بازه زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. بیشترین میزان تولید آرتمیزین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانو کبالت و بعد از ۲۴ ساعت حاصل شد. در تیمار فوق، تولید آرتمیزین نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۵ برابر افزایش داشت (۱۱۳/۳۵ µg/g d.wt). همبستگی معکوس و معنی-داری بین بیان دو ژن *DBR2* و *SQS* با میزان تولید آرتمیزین در تیمارهای مختلف نانو کبالت وجود داشت. همچنین افزایش میزان غلظت نانو کبالت در بازه زمانی ۷۲ ساعت و افزایش غلظت نانو کیتوزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت، باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های *DBR2* و *SQS* شد. نانو ذرات مورد مطالعه، در غلظت‌های بالا و در بازه‌های زمانی ذکر شده با کاهش بیان ژن-های *SQS* و *DBR2* به عنوان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزین، باعث افزایش میزان بیوسنتز این ماده شد.

واژه‌های کلیدی

Artemisia annua

آرتمیزین

نانو کبالت

نانو کیتوزان

HPLC

qRT-PCR

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهان یک منبع منحصر به فرد برای تهیه داروها هستند که اغلب هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون مانند الیستورها و یا مولکول‌های پیام‌رسان قرار می‌گیرند، تولید می‌شوند (Zhao et al., 2005). آرتیمیزین، متابولیت ثانویه موجود در گیاه *Artemisia annua* یک اندوسزکویی‌ترین لاکتون است که در درمان بیماری مالاریا، برخی انواع سرطان‌ها مانند سرطان خون، سرطان سینه، سرطان کولون و سرطان ریه استفاده می‌شود (Lei et al., 2011). سطح تولید این ماده در گیاه بسیار پایین بوده است که به همین دلیل سبب گران قیمت شدن داروهای مربوطه شده است. سنتز شیمیایی آن نیز بسیار پرهزینه است و صرفه اقتصادی ندارد. از زمان شناخته شدن خواص دارویی آرتیمیزین، تلاش‌های زیادی جهت افزایش تولید این ماده انجام شده است، ولی تا به امروز محققین به یک روش تجاری برای افزایش سطح تولید آن دست نیافته‌اند (Ferreira et al., 1995). کشت سلولی جایگزین بسیار مناسبی برای تولید ترکیباتی است که استخراج مستقیم آن‌ها از گیاهان و یا سنتز شیمیایی آن‌ها دشوار است. بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی مرتبط در یک مسیر متابولیتی مشخص در شناسایی و چگونگی تنظیم بیان ژن‌های آن مسیر متابولیتی کمک شایانی می‌کند. در واقع فهم چگونگی عملکرد ژن‌ها به محقق برای دستکاری هرچه بهتر و هدفمندتر بیان ژن‌ها و در نهایت افزایش تولید فرآورده مورد نظر اطمینان بالاتری می‌دهد (Zhao et al., 2005). استفاده از الیستور-ها در کشت سلولی یکی از روش‌های اصلی جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. القاء، با اضافه کردن مقدار کمی الیستور موجب می‌شود تا زمان دستیابی به غلظت بالای محصولات کاهش یابد (Mulabagal and Tsay 2004). تغییر غلظت ریزمغذی‌ها یک روش برای افزایش محصولات متابولیت-های ثانویه در کشت سلولی است (Jimenez-Aparicio and Gutierrez-Lopez, 1999). خصوصیات مواد با تغییر اندازه آن‌ها به سمت نانو تغییر می‌کند و درصد اتم‌ها در واحد سطح حائز اهمیت می‌شود. شاخص‌های مهم و غیر قابل انتظار نانوذرات تا حدود زیادی در نتیجه ویژگی‌های سطحی مواد است که به جای خصوصیات توده ای مواد غالب شده است. با افزایش نسبت اتم‌ها

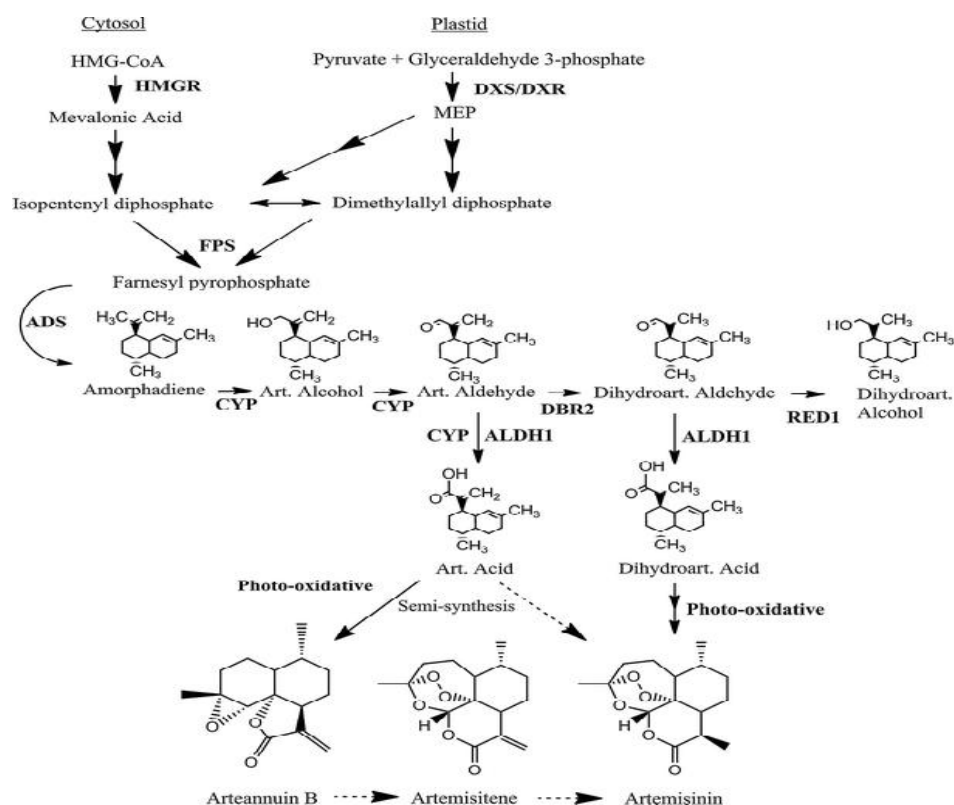
در سطح، انرژی آزاد ذرات بالا می‌رود که این خود باعث تغییرات زیادی در خواص ماده می‌شود. نانوفناوری زیستی می‌تواند سبب تغییرات شگرفی در کشاورزی شود البته مهندسی ژنتیک می‌تواند کمک شایانی به پیشرفت در این زمینه نماید. کیتوزان یک بیوپلیمر خطی با مونومرهای ان-استیل-گلوکزآمین با پیوندهای خطی (۴ به ۱ β) است. مونومرهای آن از نوع ۲-آمینو-۲-دزوکسی-β-D-گلوکان می‌باشد (Jahanshahi, 2011). امروزه نانوذرات کیتوزان به دلیل دارا بودن خواص گوناگون در زمینه‌های مختلفی از جمله تغذیه، دارویی و کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. پلی‌ساکارید کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی مؤثر جهت افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی در پژوهش‌های زیادی اثبات شده است (Cheng et al., 2006). در این پژوهش به بررسی اثر نانوکیتوزان روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز آرتیمیزین و مقدار تولید آن در کشت سلولی گیاه درمنه پرداخته شده است. کبالت یکی از فلزات سنگین (فلزاتی که چگالی بیش از ۵ گرم بر سانتی‌مترمکعب دارند) و جزو عناصر کم مصرف است (Fotouhi Ghaznini and Heidari, 2011). نانو ذرات جزو محرک‌های غیرزیستی و موادی هستند که بطور غیرمستقیم موجب القای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. اخیراً یون‌های دو ظرفیتی کبالت و روی به علت تأثیر مثبتی که روی تولید متابولیت‌های ثانویه دارند مورد توجه قرار گرفته‌اند (Trejo-Tapia et al., 2001). در این پژوهش اثر نانوکبالت روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز آرتیمیزین و مقدار تولید آن مورد بررسی قرار گرفت. شناخت ژن‌های مسیر تولید متابولیت‌ها و بررسی عملکرد الیستور بر بیان هر یک از آنها لازم است. در مسیر سنتز آرتیمیزین اولین مرحله تشکیل فارنزیل دی فسفات (FDP) از دو مسیر سیتوزولی و یا پلاستیدی است. بعد از آن انتخاب شاخه تولید سزکویی‌ترین‌ها و یا شاخه تولید استرول‌ها (از پیش ماده FDP) به صورت هماهنگ کنترل می‌شوند. برای تولید سزکویی‌ترین‌ها ابتدا آنزیم سزکویی‌ترین‌سیکلاز (SQS) Squalene Cyclase ساخته می‌شود و برای ساخته شدن استرول‌ها لازم است که ابتدا آنزیم اسکوالن سیتناز (SQS, Squalene Synthase) تولید شود. وقتی ساخت استرول افزایش می‌یابد تولید آرتیمیزین

هیدروآرتمیزینیک آلدئیدردوکتاز (Dihydroartemisinic Red1) (aldehyde reductase) در این مسیر شناخته شده است که باعث می‌شود دی‌هیدروآرتمیزینیک آلدئید (پیش ماده ساخت DHAA) به دی‌هیدروآرتمیزینیک الکل تبدیل شود و به این ترتیب سبب ایجاد رقابت و در نتیجه کاهش تولید آرتمیزین گردد (Ryden et al., 2010).

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از سوسپانسیون سلولی گیاه *A. annua* به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. برای تهیه کالوس‌های ترد از تیمار هورمونی NAA ۰/۵ mg/l و BAP ۰/۵ mg/l و قند ساکارز (۳۰g/l) استفاده شد. بعد از ۳ مرتبه بازکشت، کالوس‌ها به محیط کشت مایع با همان ترکیب‌های هورمونی انتقال داده شدند و پس از چند بازکشت و بدست آوردن سوسپانسیون حاوی سلول‌های منفرد و جدا از هم، تیماردهی (غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان) در ۳ تکرار انجام شد. به منظور به دست آوردن زمان مناسب جهت اعمال الیستورها، منحنی رشد سلولی بر اساس وزن خشک سلول‌ها محاسبه گردید. به این منظور، هر دو روز یک بار و به مدت یک ماه، تمام نمونه برداری تیمارهای اعمال شده در بازه‌های زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت انجام آزمایش‌های ملکولی انجام شد. سوسپانسیون سلولی در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ °C و تاریکی نگهداری شدند. استخراج RNA با روش ترایزول (Sigma, USA) انجام شد. غلظت نمونه‌های RNA پس از استخراج، بوسیله نانودراپ (Thermo nano drop 1000, US) تعیین شدند و مقدار ۲ µg از آن جهت تیمار با DNase I (Fermentas, Germany)، مورد استفاده قرار گرفت. در انتها صحت اثر آنزیم DNase روی RNA استخراجی، با استفاده از PCR و با بکارگیری آغازگرهای ژن یوبی‌کوئین و اکتین بررسی شد. تهیه cDNA (با 1 µg از RNA های تیمار شده با آنزیم DNase I) با استفاده از کیت RevertAid™ M-MuLV (Vivantis, Malaysia) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

کاهش می‌یابد و بالعکس (Lange et al., 2000). کنترل معکوس این دو ژن از طریق مهار ژن SQS توسط میکونازول، در گیاه درمنه نیز اثبات شده است (Weathers et al., 2004). تشکیل اولین پیش ماده مخصوص آرتمیزین، یعنی آمورفا-۴،۱۱-داین (Amorpha-4,11 dine) توسط سزکویی‌ترین سیکلاز ویژه‌ای به نام آمورفا-۴،۱۱-داین سیتتاز (ADS)، (Amorphadiene dine synthase) صورت می‌گیرد که باعث حلقوی شدن FDP می‌شود. سپس آمورفا-۴،۱۱-داین P450 به آرتمیزینیک الکل و سپس آلدئید آرتمیزینیک آلدئید و در نهایت به دی‌هیدروآرتمیزینیک آلدئید (Dihydroartemisinic acid: DHAA) تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Teoh et al., 2009). بعد از تشکیل آرتمیزینیک آلدئید مسیر تشکیل آرتمیزین و سایر محصولات به طور کامل مشخص نیست. به نظر می‌رسد دو مسیر پیش روی آرتمیزینیک آلدئید وجود دارد، یک مسیر منجر به تشکیل آرته‌آنوئین بی (Artemisinin (AB) و دیگری منجر به تشکیل آرتمیزین می‌شود. مسیر تشکیل AB با اکسیداسیون آرتمیزینیک آلدئید به آرتمیزینیک اسید (Artemisinic acid) (AA) توسط CYP و یا یک آلدئیددهیدروژناز (*Aldh1*) انجام می‌شود و در نهایت AB تشکیل می‌شود (Teoh et al., 2009). دینگرا و ناراسو (۲۰۰۱) اظهار داشته‌اند که AB می‌تواند به آرتمیزین (AT) (Artemisene) و سپس به آرتمیزین تبدیل شود (Dhingra and Lakshmi Narasu, 2001). براون و سی (۲۰۰۷) نشان دادند AA به آرتمیزین تبدیل نمی‌شود (Brown and Sy 2007). با دانش کنونی، هیچ سیستم آنزیمی در گیاه برای تبدیل AB به آرتمیزین به واسطه AT وجود ندارد (Nguyen et al., 2011). بنابراین، اینگونه به نظر می‌رسد که AB تنها محصول نهایی یکی از دو شاخه مسیر *seco-cadinanes* (شامل آرتمیزین و AB) در گیاه *A. annua* است (Nguyen et al., 2011). همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در شاخه دیگر از این مسیر آرتمیزینیک آلدئید توسط سیتوکروم و توسط آنزیم DBR2 به دی‌هیدروآرتمیزینیک آلدئید و سپس به دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید تبدیل می‌شود. در نهایت دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید احتمال دارد که با چند مرحله غیر آنزیمی و واکنش‌های اکسیداسیون نوری به آرتمیزین تبدیل می‌شود (Wallaart et al., 2001). اخیراً آنزیم جدیدی به نام دی-



شکل ۱- مسیر سنتز آرتمیزین، محصولات جانبی و آنزیم‌های دخیل در این مسیر (Nguyen *et al.*, 2011)

Figure 1. Artemisinin synthesis pathway, by products and enzymes involved in the pathway.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR

Table 1. The information of primers for each gene in Real Time PCR.

Gene name	Primer name	Primer sequence F/R [5'-3']	Primer Tm [°C]	% GC	Amplicon length [bp]
SQS	AF302464	F-TTTGAAAGCAGTATTGAAACAC	51.3	31.8	192
		R- CAGACAGCATCACGAAGC	52.8	55.6	
DBR2	EU704257	F- CATCAACAAGCAAGCCCATTTC	56.5	45.5	125
		R- GCGATAGTCTTCAACCACCTC	55.7	52.4	
ACT	U36376	F- AGTGCTCCTGGTTAGTTGTC	54.1	50	166
		R- CTTGTTGCCTCGTAATCTTCG	54.7	47.6	

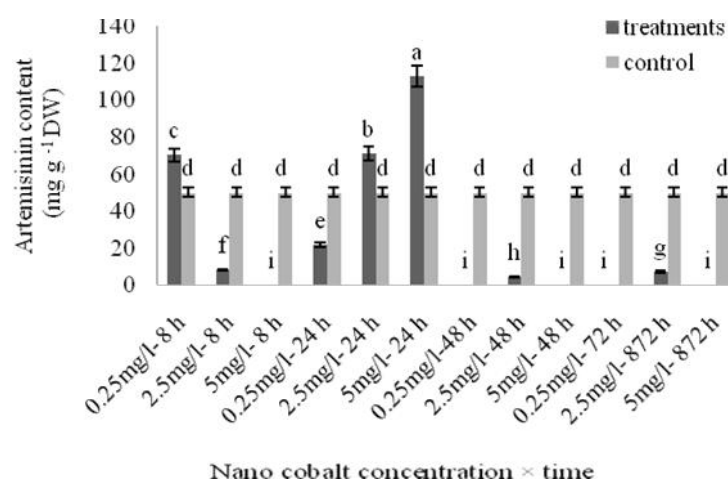
از نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای عصاره گیری نمونه ها از روش اسمیت و همکاران استفاده شد (Smith et al., 1997).

نتایج

با مقایسه میانگین صفت وزن خشک سلولی، بیشترین میزان رشد سلول ها در روز چهاردهم پس از بازکشت به دست آمد. در روز شانزدهم فاز لگاریتمی تمام و سلول ها وارد فاز سکون و سپس فاز مرگ شدند. بنا براین الیستورها جهت عملکرد بهتر در روز چهاردهم (دارای بیشترین میزان رشد سلولی) به سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. با توجه به نتایج حاصل از HPLC، سطوح مختلف نانوکبالت بعد از ۲۴ ساعت تأثیری در افزایش تولید آرتمیزین نداشتند. در تیمارهای mg/l ۰/۲۵ در ۸ ساعت، mg/l ۲/۵ در ۲۴ ساعت و تیمار mg/l ۵ در ۲۴ ساعت میزان آرتمیزین افزایش یافت. بیشترین میزان آرتمیزین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیستور به دست آمد (شکل ۲).

ژن SQS در بررسی بازه های زمانی مختلف، بیان ژن SQS، ۸ ساعت بعد از اعمال تیمارهای نانوکبالت بیشترین افزایش بیان را داشت و کمترین بیان ژن در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). بیان ژن SQS در غلظت mg/l ۰/۲۵ افزایش نشان داد و در دو غلظت ۲/۵ و ۵ mg/l بیان ژن SQS با نمونه شاهد (تیمار نشده) تفاوتی نشان نداد (شکل ۴). در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان، افزایش بیان ژن SQS نسبت به شاهد، در تیمارهای mg/l ۰/۲۵ در بازه زمانی ۷۲ ساعت، mg/l ۲/۵ در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن SQS در غلظت mg/l ۵ در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن SQS (شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزین مشاهده شد که به طور کلی با افزایش بیان ژن SQS، میزان تولید آرتمیزین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن SQS در غلظت های ۱۰ و ۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل ۶). بیشترین افزایش بیان ژن SQS در تیمار با الیستور نانوکیتوزان در بازه زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۷).

آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی جهت انجام واکنش PCR و qRT-PCR، براساس توالی ژن های مورد بررسی گیاه *A. annua* که در بانک داده های اطلاعاتی NCBI وجود دارد و با استفاده از نرم افزار Primer 3 (www.embnet.sk/cgi-bin/primer3) طراحی شد (جدول ۱). صحت آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر، با استفاده از Primer Blast و در کل ژنوم و در نهایت نیز با واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ مورد تأیید قرار گرفت. جهت مقایسه میزان تظاهر ژن های دخیل در مسیر بیوستز آرتمیزین، آزمون Real Time PCR برای ۲۵ نمونه انجام شد. در این آزمون، کمیت سنجی بیان ژن به صورت نسبی انجام شد. آزمون Real Time PCR با استفاده از معرف سایبرگرین شرکت بیوپارس (biopars, SYBR Green, GUASNR, Iran) و بوسیله دستگاه iQ5 (Biorad, USA) انجام گرفت. واکنش ها در میکروپلیت های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در ۴۰ سیکل انجام شد. پس از اندازه گیری میزان Ct برای ۳ ژن مورد مطالعه (۲ ژن دخیل در مسیر بیوستز آرتمیزین و نیز یک ژن خانه دار در ۲۴ نمونه تیمار شده (در ۳ غلظت متفاوت از نانوکبالت و نانو کیتوزان و در ۴ تیمار زمانی)، کارایی PCR با استفاده از نرم افزار LinRegPCR (version 11.0) تعیین و پس از محاسبات آماری میزان بیان نسبی هر نمونه (Ratio) با استفاده از فرمول Pfaffl و همچنین $\log_2 \text{Ratio}$ ، جهت مقایسه میزان بیان ژن های مورد مطالعه محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار MSTAT C و مقایسه میانگین های بیان هر یک از ژن ها با استفاده از روش دانکن صورت گرفت. جهت بررسی رابطه بیان دو ژن، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید. به منظور تعیین کمی مقدار آرتمیزین (برای تیمارهای نانوکبالت) از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مدل KNAUER آلمان)، دارای پمپ K-1001، ستون C8، دتکتور UV-K-2501 و نرم افزار eurochrom 2000 و از استونتریل / اسیداستیک (۳۰/۷۰ v/v) به عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت ۰/۲ ml/min در مدت زمان ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. منحنی استاندارد با ماده تجاری آرتمیزین و خلوص ۹۸٪ (Sigma, USA) به دست آمد. هر نمونه در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده



شکل ۲ - میزان تولید آرتمیزینین در تیمارهای مختلف نانوکبالت و در بازه‌های زمانی مختلف. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

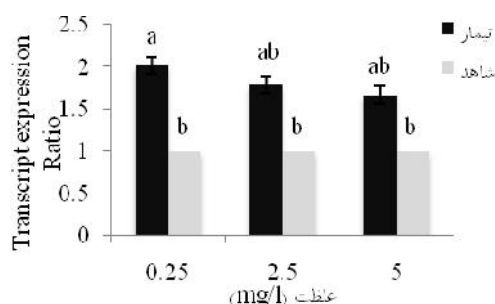
Figure 2. Artemisinin content in nanocobalt treatment, during different time courses.

* Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

(شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزینین مشاهده شد که به طور کلی با افزایش بیان ژن SQS، میزان تولید آرتمیزینین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن SQS در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل ۶). بیشترین افزایش بیان ژن SQS در تیمار با الیستور نانوکیتوزان در بازه زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۷).

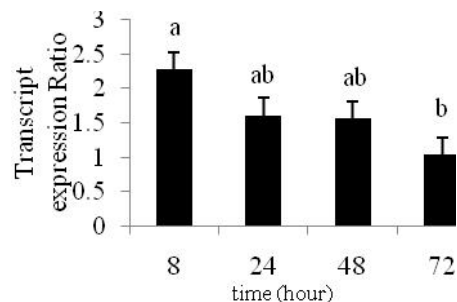
ژن SQS

در بررسی بازه‌های زمانی مختلف، بیان ژن SQS، ۸ ساعت بعد از اعمال تیمارهای نانوکبالت بیشترین افزایش بیان را داشت و کمترین بیان ژن در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). بیان ژن SQS در غلظت ۵ mg/l ۰/۲۵ افزایش نشان داد و در دو غلظت ۲/۵ و ۵ mg/l بیان ژن SQS با نمونه شاهد (تیمار نشده) تفاوتی نشان نداد (شکل ۴). در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان، افزایش بیان ژن SQS نسبت به شاهد، در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l در بازه زمانی ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن SQS در غلظت ۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن SQS



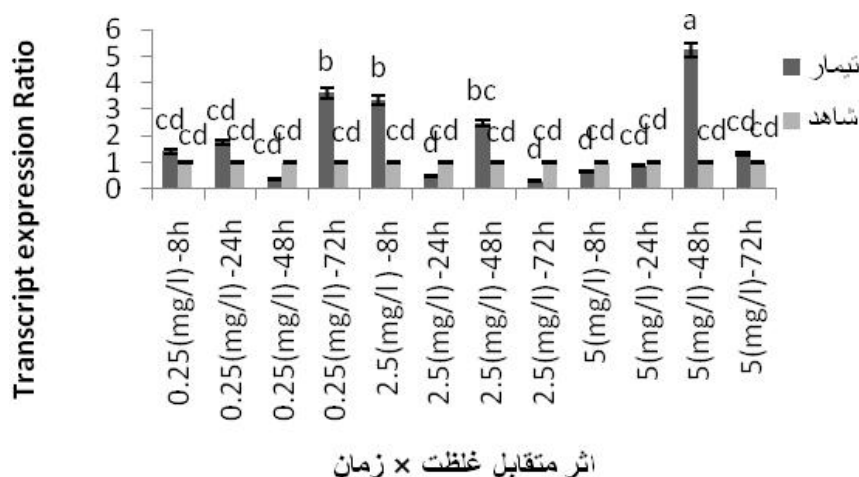
شکل ۴- میزان بیان ژن SQS در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

Figure 4. The expression levels of SQS gene in different concentrations of nanocobalt treatment



شکل ۳- میزان بیان ژن SQS در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت.

Figure 3. The expression levels of SQS gene in different time courses after nano cobalt treatment.



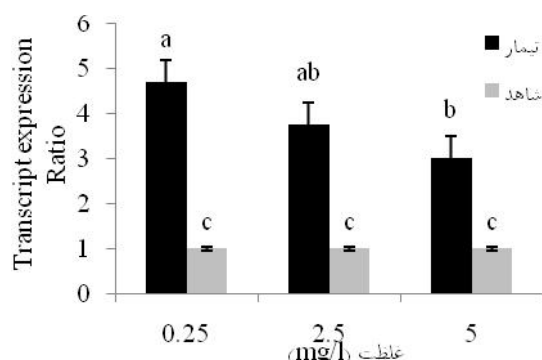
شکل ۵- میزان بیان ژن SQS در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 5. The expression levels of SQS gene in different times and concentrations of nanocobalt treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

ژن DBR2

همان طور که در شکل (۹) مشاهده می‌شود در تیمارهای ۵ mg/l و ۲/۵، ۰/۲۵ و ۵ نانوکبالت بیان ژن DBR2 نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت. در بررسی بازه‌های زمانی و صرف نظر از غلظت-های مختلف، بیشترین افزایش بیان ژن DBR2 در بازه زمانی ۸ ساعت مشاهده شد و با گذشت زمان میزان بیان ژن کاهش داشت (شکل ۱۰).

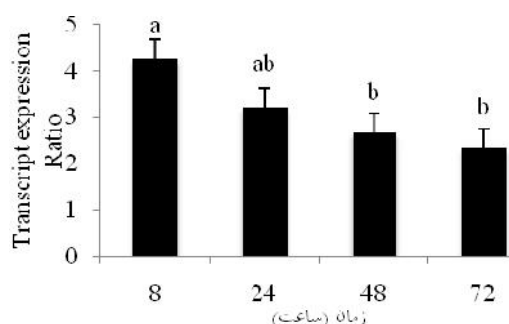
در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، تیمارهای ۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت، ۱۰ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت و نیز تیمار ۱۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند و در تیمارهای ۵ و ۱۰ mg/l در بازه زمانی ۷۲ ساعت و نیز تیمار ۱۵ mg/l در بازه زمانی ۸ ساعت افزایش بیان داشتند. در سایر تیمارها تفاوتی با نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۸).



شکل ۹- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 9. The expression level of *DBR2* in different time courses after nanocobalt treatment. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

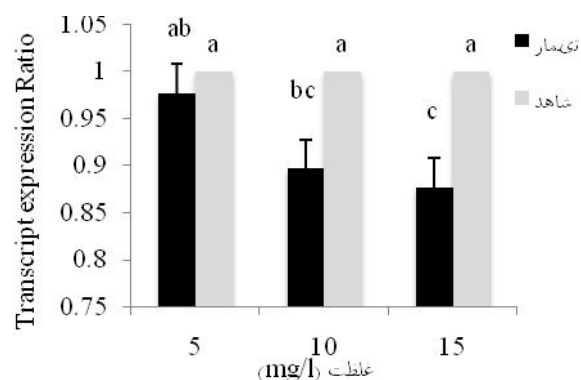


شکل ۱۰- میزان بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 10. The expression levels of *DBR2* in different nanocobalt concentration. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

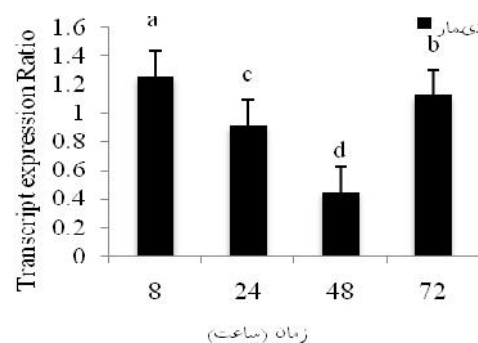
در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، ژن *DBR2* (شکل ۱۱) در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز تیمار ۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت افزایش بیان داشتند. در سایر تیمارها تفاوتی در بیان ژن *DBR2* با نمونه شاهد مشاهده نشد ۵ mg/l. بین میزان تولید آرتیمیزین و بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* همبستگی منفی وجود داشت در حالیکه میزان بیان این دو ژن با یکدیگر همبستگی مثبت نشان دادند. با توجه به شکل ۱۲، بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد افزایش بیان و تیمار ۱۵ میلی گرم در لیتر کاهش بیان داشت. در بررسی بازه‌های زمانی مختلف بیشترین افزایش بیان پس از ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۱۳).



شکل ۶- بیان ژن *SQS* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

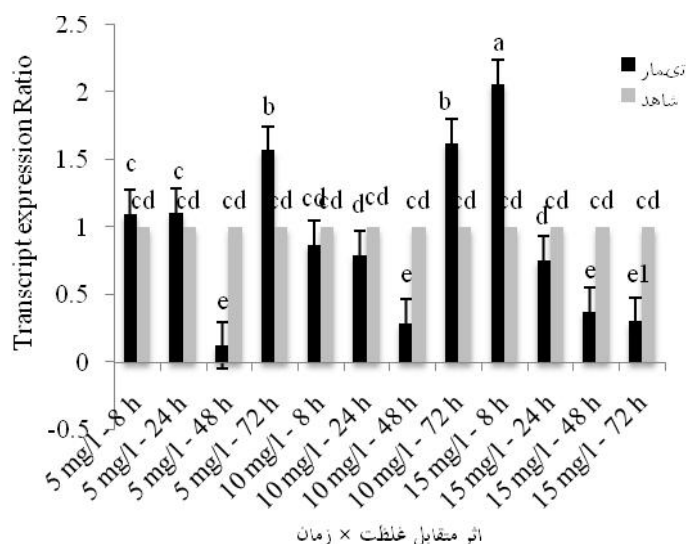
*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 6. The expression levels of *SQS* gene in nano chitosan treatments. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



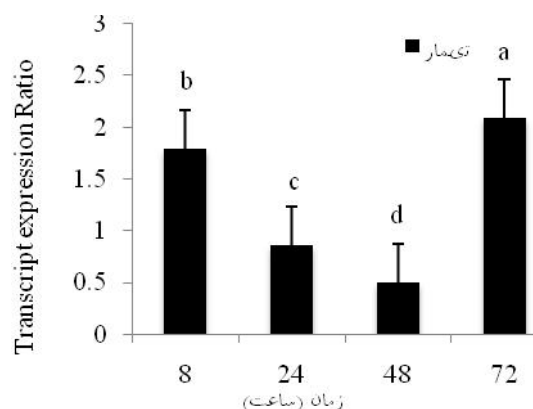
شکل ۷- بیان ژن *SQS* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان

Figure 7. The expression levels of *SQS* gene in different time courses after nano chitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۸- بیان ژن *SQS* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکیتوزان

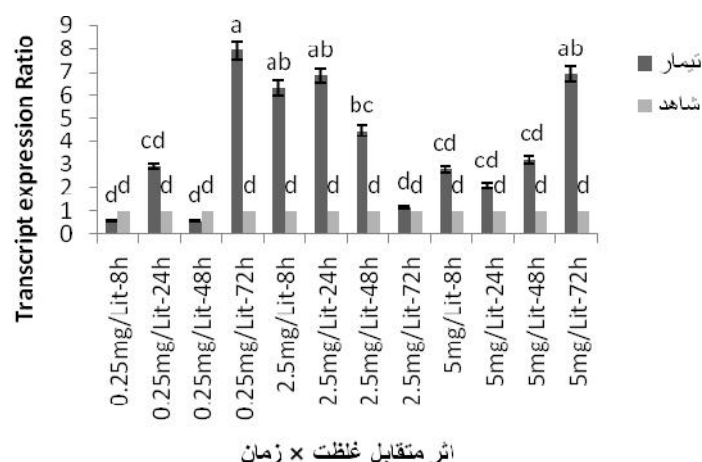
Figure 8. The expression levels of *SQS* in different time and concentration treatments of nanochitosan.



شکل ۱۳- بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

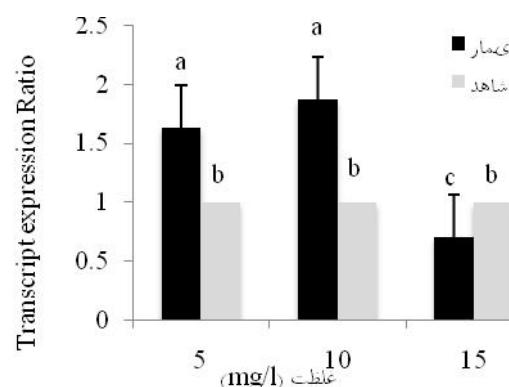
Figure 13. The expression levels of *DBR2* gene in different time courses after nanochitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۱۱- میزان بیان ژن *DBR2* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت

Figure 11. The expression levels of *DBR2* gene in different time and concentration treatments of nanocobalt.

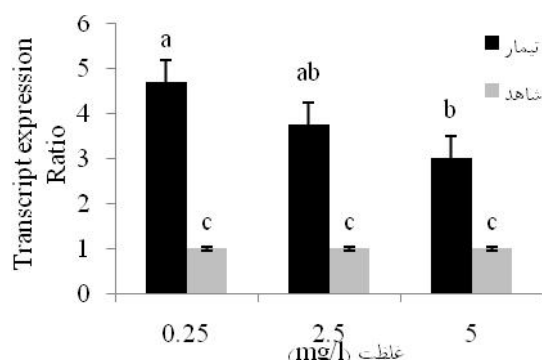
در بررسی اثر متقابل غلظت و زمان تیمارهای نانوکیتوزان، تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند و در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت، تیمار ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت، تیمارهای ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ ساعت افزایش بیان داشتند. بیشترین افزایش بیان ژن *DBR2* در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد. بیان ژن *DBR2* در سایر تیمارها تفاوتی با نمونه شاهد نشان نداد (شکل ۱۴).



شکل ۱۲- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است

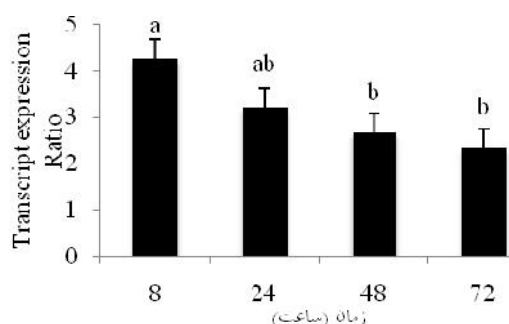
Figure 12. The expression of *DBR2* gene in different nanochitosan concentrations. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۹- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 9. The expression level of *DBR2* in different time courses after nanocobalt treatment. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

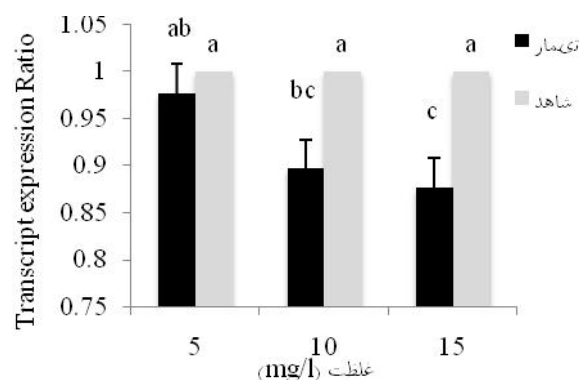


شکل ۱۰- میزان بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 10. The expression levels of *DBR2* in different nanocobalt concentration. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

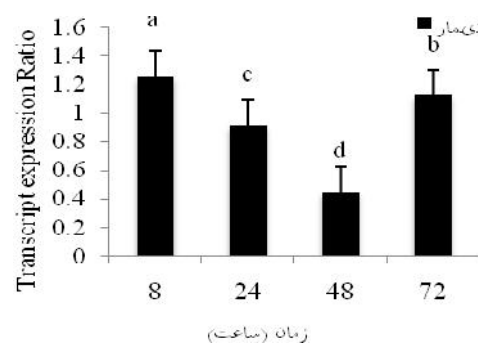
در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، ژن *DBR2* (شکل ۱۱) در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز تیمار ۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت افزایش بیان داشتند. در سایر تیمارها تفاوتی در بیان ژن *DBR2* با نمونه شاهد مشاهده نشد ۵ mg/l. بین میزان تولید آرتیمیزین و بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* همبستگی منفی وجود داشت در حالیکه میزان بیان این دو ژن با یکدیگر همبستگی مثبت نشان دادند. با توجه به شکل ۱۲، بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد افزایش بیان و تیمار ۱۵ میلی گرم در لیتر کاهش بیان داشت. در بررسی بازه‌های زمانی مختلف بیشترین افزایش بیان پس از ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۱۳).



شکل ۶- بیان ژن *SQS* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

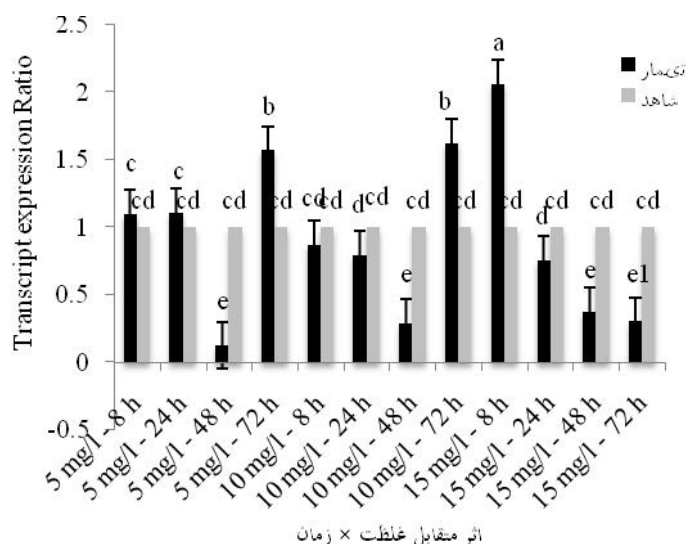
*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 6. The expression levels of *SQS* gene in nano chitosan treatments. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



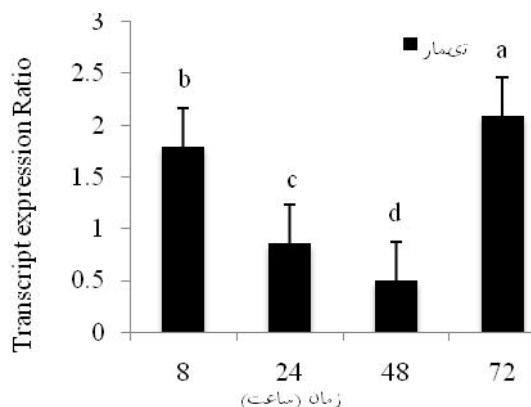
شکل ۷- بیان ژن *SQS* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان

Figure 7. The expression levels of *SQS* gene in different time courses after nano chitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۸- بیان ژن *SQS* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکیتوزان

Figure 8. The expression levels of *SQS* in different time and concentration treatments of nanochitosan.

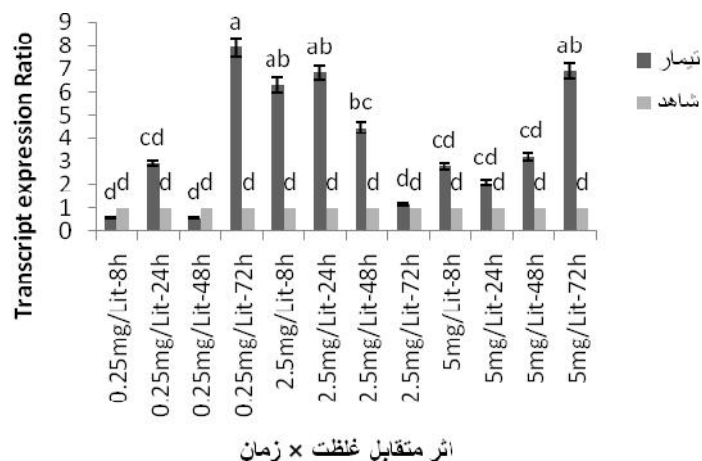


شکل ۱۳- بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

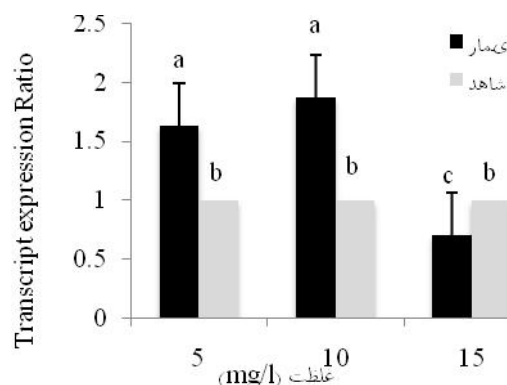
Figure 13. The expression levels of *DBR2* gene in different time courses after nanochitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

در بررسی اثر متقابل غلظت و زمان تیمارهای نانوکیتوزان، تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند و در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت، تیمار ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت و نیز تیمارهای ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ ساعت افزایش بیان داشتند. بیشترین افزایش بیان ژن *DBR2* در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد. بیان ژن *DBR2* در سایر تیمارها تفاوتی با نمونه شاهد نشان نداد (شکل ۱۴).



شکل ۱۱- میزان بیان ژن *DBR2* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت

Figure 11. The expression levels of *DBR2* gene in different time and concentration treatments of nanocobalt.



شکل ۱۲- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است

Figure 12. The expression of *DBR2* gene in different nanochitosan concentrations. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

۱۰۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان مقدار آرتمیزینیک اسید و آرتمیزین به ترتیب ۷۲٪ و ۵۳٪ در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش نشان دادند. آنها اعلام کردند با مصرف کیتوزان مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) در برگ‌های گیاه به ترتیب ۱/۴ و ۳ بار افزایش می‌یابد. تجمع انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) احتمال دارد که موجب تسریع تبدیل دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید به آرتمیزین می‌شود، به علاوه استفاده از کیتوزان روی برگ‌های *A. annua* اثر منفی روی رشد گیاه نداشت (Lei et al., 2011). بین و همکاران (۲۰۱۲) با اسپری کردن الیگو-ساکاریدکیتوزان (COS) و اسیدسالیسیلیک روی برگ‌های گیاه کامل *A. annua* به بررسی میزان بیان برخی ژن‌های دخیل در سنتز آرتمیزین پرداختند. تأثیر محدود الیگوساکاریدکیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر مقدار تولید آرتمیزین روی گیاه کامل نشان داد که الیستورها روش قطعی برای افزایش تولید آرتمیزین نیستند و یا ممکن است تحریک تولید آرتمیزین به زمان بیشتر از ۴۸ ساعت احتیاج داشته باشد (Yin et al., 2012).

با توجه به اثر مثبت کیتوزان بر تولید آرتمیزین در سایر پژوهش‌های و نیز اثر منفی نانوکیتوزان بر بیان ژن *SQS* (مسیر انحرافی تولید آرتمیزین) و براساس نتایج این پژوهش، انتظار می‌رود نانوکیتوزان در غلظت‌های بهینه شده، الیستوری مناسب جهت تحریک تولید آرتمیزین باشد.

بررسی ایمنی زیستی نانوکیتوزان و نانوکبالت و نتایج پژوهش-های پیشین

کیتوزان یک بیوپلیمر طبیعی است که از داستیلاسیون کیتین موجود در پوسته سخت پوستان دریایی مانند میگو و خرچنگ و یا کیتین موجود در ساختار بعضی از قارچ‌ها به دست می‌آید (جهانشاهی، ۱۳۹۰). نانو کیتوزان دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند تجزیه پذیری، سازگاری زیستی، خاصیت ضد توموری (از طریق القاء تحریک سیستم ایمنی بدن) (Aranaz et al., 2009) و کاهش جذب گلوکز و پایین آوردن سطح ATP در سلول‌های تومور موجب کاهش رشد تومور می‌شود (Ta et al., 2008)، خاصیت ضد میکروبی، چسبندگی موکوزی، افزایش

DBR2 مشاهده شد (Lei et al., 2011). هنگامی که الیستور میکونازول به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، میزان بیان ژن *DBR2* در بازه زمانی ۳۰ دقیقه، ۴ برابر و در بازه زمانی ۴ ساعت، ۳ برابر افزایش داشت و بعد از آن کاهش بیان ژن *DBR2* مشاهده شد (Duren et al., 2011). براساس مشاهدات این پژوهش و نیز نتایج سایر پژوهش‌های می‌توان اظهار داشت که بیان ژن *DBR2* به طور موقت و در بازه زمانی کوتاه مدت (قبل از ۲۴ ساعت) به طور کلی تحت تأثیر الیستورها قرار می‌گیرد و در پاسخ به الیستورهای گوناگون در طولانی مدت نقشی ندارد.

با توجه به مسیر سنتز آرتمیزین این احتمال وجود دارد که سلول‌ها در پاسخ اولیه به الیستور نانوکیتوزان به صورت موقت تولید آرتمیزین را متوقف می‌کنند (افزایش بیان ژن *SQS* و خروج از مسیر تولید آرتمیزین)، سپس در بازه زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت تولید آرتمیزین افزایش (کاهش بیان ژن *SQS*) می‌یابد که مطابق نتایج نانوکبالت است (شکل‌های ۳ و ۷).

نتایج حاصل از qRT-PCR نشان داد که غلظت (mg/l) ۱۵ نانوکیتوزان باعث کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن *SQS* نسبت به بیان این ژن در نمونه شاهد شد. همچنین بررسی تغییرات بیان این ژن در بازه‌های زمانی مختلف نشان داد که ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار نانوکیتوزان، میزان بیان ژن *SQS* بیش از ۲ برابر نسبت به نمونه شاهد، کاهش یافت. از آنجا که ژن *SQS* یک مسیر انحرافی را در مسیر بیوسنتز آرتمیزین کنترل می‌کند می‌توان انتظار داشت که اعمال (mg/l) ۱۵ نانوکیتوزان پس از ۴۸ یا ۷۲ ساعت، با کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن *SQS*، سبب القای میزان آرتمیزین درون سلولی گردد. نتایج حاصل از این بررسی با کمک مسیرهای بیوشیمیایی شناخته شده در بیوسنتز آرتمیزین نشان می‌دهد که تیمار نانوکیتوزان با کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزین می‌تواند در القای تولید درون سلولی آن نقش مثبت ایفا کند.

در کشت ریشه مؤین گیاه *A. annua* با اضافه کردن ۱۵۰ میلی-گرم بر لیتر کیتوزان، میزان تولید آرتمیزین تا ۶ برابر افزایش یافت (به مقدار ۱/۸ میکروگرم بر میلی گرم وزن خشک) (Putalun et al., 2007). Lee و همکاران (2011) با تیمار برگ *A. annua* با

نفوذپذیری (از طریق بازکردن اتصالات محکم و حلالیت پذیری در آب) است. به علاوه، به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل و آمین در ساختار کیتوزان می‌توان با تغییرات شیمیایی این پلیمر را کنترل کرد. از کیتوزان به عنوان حامل دارو (از دو طریق غیر فعال و هدفدار) در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود (Park et al., 2010).

فراوانی، زیست تخریب پذیری، عدم سمیت و منشاء طبیعی داشتن از جمله خصوصیات است که سبب استفاده از کیتوزان در کاربردهای کشاورزی می‌شود. استفاده در پوشش دانه، پوشش برگ و داروهای آهسته رهش نمونه‌هایی از کاربرد کیتوزان در کشاورزی می‌باشد. کیتوزان به عنوان یک محرک رشد با افزایش جوانه‌زنی، ریشه‌زنی، رشد برگ، بازدهی دانه و نگه‌داری رطوبت خاک، رشد گیاه را افزایش می‌دهد و سبب کاهش ابتلا به عفونت‌های قارچی و سایر آفات گیاهی می‌شود. همچنین پلی-ساکارید کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی مؤثر جهت افزایش بیوستز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی در پژوهش‌های زیادی به اثبات رسیده است (Cheng et al., 2006).

تأثیر الیستور کیتوزان روی رشد سلولی و تولید متابولیت ثانویه فیل اتانوئید گلیکوزیدها در کشت سلولی *Cistanche deserticola* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار متابولیت ثانویه ۳/۴ برابر بیشتر از نمونه شاهد به دست آمد و مشخص شد که افزایش متابولیت ثانویه پس از تحریک با الیستور کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم PAL مرتبط است (Cheng et al., 2006). بطور کلی اثر مثبت کیتوزان در تولید آرتمیزنین نیز پیشتر توسط دانشمندان به اثبات رسیده است.

یون‌های فلزات سنگین نظیر آهن، مس، روی، کبالت و نیکل جز عناصر کم مصرف می‌باشند که در فعالیتهای کارکردی بسیاری از پروتئین‌های مشارکت کننده در حفظ رشد و نمو موجودات زنده نقش دارند. با این وجود، این یون‌های فلزی در غلظت‌های بالا می‌توانند برای موجودات زنده مضر باشند (Fotouhi Ghazvini and Heidari, 2011). یون‌های فلزی نظیر نیکل، کبالت، روی و منگنز با وجود مسمومیت‌زا بودن در غلظت‌های

بالا، برای تنظیم فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها ضروری هستند (Ahmadikhah, 2011). تغییر غلظت میکروالمنت‌ها یک روش برای افزایش محصولات متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی است (Jimenez-Aparicio and Gutierrez-Lopez 1999). اثر مثبت فلزاتی مانند کبالت، نیکل، آهن و نقره را جهت تحریک تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان گزارش شده است (Mithöfer et al., 2004). در پژوهش انجام شده مشخص شد که فلزاتی مانند Ni^{2+} ، Co^{2+} ، Fe^{2+} و Ag^{2+} و V تولید گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را در گونه‌های مختلف گیاهان تحریک می‌کنند (Zhao et al., 2005). گرچه ساز و کار این فلزات برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه به طور واضح مشخص نیست ولی در پژوهش‌های Mithöfer و همکاران (2004) و نیز Zhao و همکاران (2005) تولید تنش‌های اکسیداتیو و یا تولید ROS (Reactive Oxygen Species) به وسیله این فلزات به اثبات رسیده است. مشخص شده است که الیستورهای زیستی مانند پاتوژن‌ها و الیستورهای غیرزیستی (مانند فلزات سنگین، تنش‌های شوری و آسمتیک اغلب سبب القای تجمع متابولیت‌های ثانویه در فعالیتهای دفاعی گیاه می‌شود (Zhao et al., 2005). پیش از این اثر مثبت کبالت (به صورت CoCl_2) در تولید پاکلی تاکسول در گیاه سرخدار (Zhang et al., 2007)، افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی *Vaccinium pahalae* (Shibli et al., 1997) و جنین‌زایی سوماتیکی در هویج (Roustan et al., 1989) (*Daucus carota*)، رشد ریشه موئین *Stizolobium hassojoo* (Sung and Huang 2000)، افزایش تولید متابولیت ثانویه اسکوپال آمین در کشت ریشه موئین *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al., 2000) به اثبات رسیده است.

سپاسگزاری

این پژوهش با کمک مالی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که به این وسیله تشکر می‌گردد.

منابع

- Ahmadikhah A. 2011.** Plants Reaction to Environmental Abiotic Stresses. Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan Publication.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G and Heras Á. 2009.** Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* 3: 203-230.
- Baldi A and Dixit V. 2008.** Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technology* 99: 4609-4614.
- Brown GD and Sy LK. 2007.** In vivo transformations of artemisinic acid in *Artemisia annua* plants. *Tetrahedron* 63: 9548-9566.
- Caretto S, Quarta A, Durante M, Nisi R, De Paolis A, Blando F and Mita G. 2011.** Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biology* 13: 51-58.
- Cheng XY, Zhou HY, Cui X, Ni W and Liu CZ. 2006.** Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of biotechnology* 121: 253-260.
- Dhingra V, Lakshmi and Narasu M. 2001.** Purification and Characterization of an enzyme involved in biochemical transformation of arteannuin B to artemisinin from *Artemisia annua*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 558-561.
- Durante M, Caretto S, Quarta A, De Paolis A, Nisi R and Mita G. 2011.** β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*: 1-9.
- Ferreira JFS, Simon JE and Janick J. 1995.** Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Medica-Journal of Medicinal Plant Research* 61: 167-170.
- Fotouhi Ghazvini R and Heidari R. 2011.** Physiology and Molecular Biology of Stress tolerance in Plants. ACECR Mashad.
- Jahanshahi M. 2011.** Molecular Nanotechnology and Bionanotechnology. Tehran University Publication.
- Jimenez-Aparicio A and Gutierrez-Lopez G. 1999.** Production of Food Related Colorants by Culture of Plant Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 464: 195-210.
- Lange BM, Rujan T, Martin W and Croteau R. 2000.** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13172.
- Lei C, Ma D, Pu G, Qiu X, Du Z, Wang H, Li G, Ye H and Liu B. 2011.** Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products* 33: 176-182.
- Liu B, Wang H, Du Z, Li G and Ye H. 2011.** Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant cell reports* 30: 689-694
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Mithöfer A, Schulze B and Boland W. 2004.** Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566: 1-5.
- Mulabagal V and 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.
- Nguyen KT, Arsenault PR and Weathers PJ. 2011.** Trichomes+ roots+ ROS= artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 329-338.
- Park JH, Saravanakumar G, Kim K and Kwon IC. 2010.** Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 28-41.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC and Giulietti AM. 2000.** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 252-258.
- Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H and Shoyama Y. 2007.** Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters* 29: 1143-1146.
- Roustan J, Latche A, Fallot J. 1989.** Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Reports* 8: 182-185.
- Ryden AM, Ruyter-Spira C, Quax WJ, Osada H, Muranaka T, Kayser O and Bouwmeester H. 2010.** The Molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Medica* 76: 1778-1783.

- Shibli RA, Smith M and Kushad M. 1997.** Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regulation* 23: 201-205.
- Smith TC, Weathers PJ and Cheetham RD. 1997.** Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33: 75-79.
- Sung LS and Huang SY. 2000.** Headspace ethylene accumulation on *Stizolobium hassjoo* hairy root culture producing L-3, 4-dihydroxyphenylalanine. *Biotechnology Letters* 22: 875-878.
- Ta HT, Dass CR and Dunstan DE. 2008.** Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 126: 205-216.
- Teoh KHTKH, Polichuk DRPDR, Reed DWRDW and Covello PSCPS. 2009.** Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue from the National Research Council of Canada-Plant Biotechnology Institute. *Botany* 87: 635-642.
- Trejo-Tapia G, Jimenez-Aparicio A, Rodriguez-Monroy M, De Jesus-Sanchez A and Gutierrez-Lopez G. 2001.** Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 19-23.
- Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, Poppinga L and Maijers NCA. 2001.** Amorpha-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 212: 460-465.
- Weathers P, DeJesus-Gonzalez L, Kim Y, Souret F and Towler M. 2004.** Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars. *Plant cell reports* 23: 414-418.
- Yin H, Kjaer A, Fretté XC, Du Y, Christensen LP, Jensen M and Grevsen. 2012.** Chitosan oligosaccharide and salicylic acid up-regulate gene expression differently in relation to the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*
- Zhang CH, Fevereiro PS, He G and Chen Z. 2007.** Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. *Plant Science* 172: 158-163
- Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM, Xu T, Pi Y, Wang Z and Zhang H. 2004.** Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6786
- Zhao J, Davis LC and Verpoorte R. 2005.** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.

شناسایی و گروه بندی خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو

Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley

بنیامین یزدانی^۱، رسول اصغری زکریا^۲، زهرا سادات شوبر^{۳*}
Beniamin Yazdani¹, Rasoul Asghari-Zakaria², Zahra-Sadat Shobbar³

۱- دانشجوی دکتری و ۲- دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، کرج، ایران

1. Ph.D. Student and 2. Associate Professor, Department of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۰)

چکیده

تنش‌های زیستی و غیرزیستی از مهمترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی مانند جو هستند. عوامل رونویسی در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به این تنش‌ها دخالت دارند که خانواده ژنی WRKY رمز کننده گروه بزرگی از آنهاست. بنابراین شناسایی و مطالعه این خانواده ژنی می‌تواند گامی موثر برای ایجاد تحمل به تنش‌ها در گیاهان باشد. در پژوهش حاضر، دانستنی‌های مربوط به اعضای خانواده WRKY جو از پایگاه‌های داده جمع آوری شدند. با انتخاب یک عضو از هر زیر گروه ژن‌های WRKY در برنج، tBLASTN در پایگاه داده‌های IBSC و NCBI انجام شد تا اعضای احتمالی دیگر این خانواده نیز اضافه شدند. بر اساس مدل مخفی مارکوف، جستجو برای توالی‌های دارای منطقه حفاظت شده WRKY علیه همه پروتئین‌های این خانواده و هر زیر گروه آنها انجام شد. اعضای پیدا شده که شامل ۹۶ عضو و یک توالی از هر زیرگروه عوامل رونویسی WRKY از گیاهان آراییدوپسیس، برنج و گندم بودند، به صورت چندگانه همردیف شده و درخت فیلوژنتیک آنها رسم شد. توالی‌های موجود بر مبنای تعداد پهنه‌های WRKY و ساختار انگشت روی موجود در سه گروه دسته‌بندی شدند. بر این اساس ۱۳ پروتئین در گروه ۳۰، I پروتئین با ساختار انگشت روی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و بقیه پروتئین‌ها با ساختار انگشت روی Cx₄₋₅Cx₂₂₋₂₃HxH در گروه II قرار گرفتند. با توجه به نقش گروه III در تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، فزونی درصد حضور اعضای این گروه در جو همانند گندم نسبت به میانگین گیاهان عالی را می‌توان با مضاعف شدگی در اجداد وحشی تک لپ‌ای‌ها و انتخاب طبیعی برای ارقام مقاوم‌تر در شرایط نامساعد محیطی در ارتباط دانست.

واژه‌های کلیدی

جو
خانواده ژنی WRKY
درخت فیلوژنتیک
عوامل رونویسی
مدل مخفی مارکوف

مقدمه

تنش های زیستی و غیرزیستی از مهمترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می شوند (Zhang et al. 2010). بسیاری از پاسخ های گیاهان به تنش های زیستی و غیر زیستی در نتیجه تنظیم بیان ژن ها در رونویسی توسط عوامل رونویسی هستند (Eulgem, 2005).

غلات مهمترین منبع تامین کننده غذای بشر هستند (Garcia, 2003). جو (*Hordeum vulgare* L.) از اولین گیاهانی است که اهلی گشته و یکی از مهمترین گیاهان زراعی است. جو دیپلوئید بوده و اندازه ژنوم هاپلوئید آن ۵/۱ گیگاباز (Gb) است رقم های تجاری جو مشتق شده از جد وحشی (*Hordeum vulgare* spp. *Spontaneum*) آنها بوده (Purugganan and Fuller, 2009) و بر اساس آمار فائو (جدول ۱) ۷۵ درصد تولید جهانی آن برای تغذیه دام، ۲۰ درصد در صنایع تولید نوشیدنی و ۵ درصد در تولید طیف وسیعی از غذاها استفاده می شود (Blake et al. 2011). در کشورهای فقیرتر همچنان از جو به عنوان منبع غذایی اصلی استفاده می شود و عملکرد مناسب آن در شرایط سخت محیطی مورد توجه است (Grando and Macpherson, 2005). جو به عنوان گیاهی خودگشن و معتدل، همیشه گیاهی مدل برای پژوهش های ژنتیکی بوده است (Bockelman and Valkoun, 2011).

عوامل رونویسی پروتئین هایی هستند که به طور اختصاصی به فعال کننده های اطراف ژن یا نواحی پیشبر متصل شده (Latchman, 1997) و بسته به نوع آن بعد از اتصال عامل رونویسی بیان ژن کم یا زیاد می شود (Babu et al. 2004). عوامل رونویسی با مهار یا تحریک فعالیت RNA پلیمراز موجب تنظیم بیان ژن می شوند. تعداد عوامل رونویسی در هر موجود زنده بستگی به اندازه ژنوم آن دارد، هر چه اندازه ژنوم بزرگتر باشد، تعداد عوامل رونویسی بیشتری وجود دارد (Nimwegen, 2006).

خانواده عوامل رونویسی WRKY - نام این خانواده از چهار اسید آمینه حفظ شده آن (-tryptophan-arginine lysine-tyrosine) گرفته شده است - از بزرگ ترین خانواده های تنظیم کننده رونویسی در گیاهان هستند و به عنوان فعال کننده و مهارکننده در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می کنند (Rushton et al 2010). WRKY یکی از قدیمی ترین خانواده های ژنی عوامل رونویسی است که در تکامل سلسله گیاهی دچار مضاعف شدگی گسترده شده اند (Berri et al. 2009). حدود ۲۰ سال از اولین گزارش مربوط به کشف عوامل رونویسی خانواده ی ژنی WRKY در سیب زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) می گذرد (Ishiguro and Nakamura, 1994). اولین بار نام گذاری اعضای این خانواده یک سال بعد در گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) با شناسایی سه عضو (ژن های WRKY1، WRKY2 و WRKY3) انجام شد (Rushton et al. 1995). عوامل رونویسی WRKY تنظیم کننده هایی هستند که هم فعالیت های تنظیمی مثبت و هم منفی دارند (Eulgem and Somssich, 2007). WRKY یکی از ده خانواده بزرگ ژنی است که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده است (Ulker and Somssich, 2004). ژن های این خانواده در طی تکامل خود را با پیچیدگی های زیاد سازوکارهای دفاعی مقابله کننده با پاتوژن ها وفق داده اند (Eulgem et al. 2000). تکامل اجدادی خانواده ژنی WRKY ویژه بوده و دامنه ژن های موجود در گیاهان از یک ژن در جلبک سبز تک سلولی کلامیدوموناس (*Chlamydomonas nivalis*)، ۳۷ ژن در خزه (Bryophytes)، ۷۴ ژن در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تا تقریباً ۲۰۰ ژن در سویا (*Glycine max*) متغیر است (Ulker and Somssich, 2004).

ساختار دمین WRKY (domain) شامل چهار صفحه بتا (b-sheet) است که اسید آمینه های حفظ شده سیستمین و هیستیدین در ساختار انگشت روی قرار دارند (Yamasaki et al. 2005). توالی آمینواسیدی WRKYGQK موجب

به پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی درگیر هستند (Chen and Chen, 2000) و با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در سیستم دفاعی به خصوص مسیر سالیسیلیک اسید (salicylic acid) کار خود را انجام می‌دهند (Du and Chen, 2000). عوامل رونویسی WRKY در تنظیم فعالیت‌های پیری در برگ دخیل هستند. پروفایل بیانی در آرآبیدوپسیس نشان دهنده این است که عوامل رونویسی WRKY به طور قابل توجهی در ترانسکریپتوم پیری موجود هستند (Guo et al. 2004). هدف از انجام این پژوهش شناسایی همه اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو و طبقه بندی آنها بر اساس مناطق حفاظت شده به منظور به کارگیری نتایج آن برای پژوهش‌های بعدی از جمله بررسی الگوی بیان این ژن‌ها است که می‌تواند کمک شایانی در راستای اصلاح این گیاه زراعی برای افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY با استفاده از پایگاه‌های داده مرتبط ابتدا تمامی اعضای ثبت شده خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو از پایگاه داده‌های PTFDB و GTFDB (جدول ۱) جمع‌آوری شدند. شناسایی اعضا از طریق tBLASTN بر اساس توالی‌های حفظ‌شده در برنج با انتخاب یک عضو از هر زیر گروه ژن‌های WRKY در برنج (Paul et al. 2010)، tBLASTN در پایگاه داده‌های IBSC و NCBI (جدول ۱) انجام شد تا اعضای احتمالی دیگر خانواده عوامل رونویسی WRKY نیز اضافه شوند.

برآمدگی بر سطح پروتئین شده و توانایی پروتئین را در اتصال به شیارهای DNA افزایش می‌دهد. این توالی از نظر طولی با توالی حفاظت‌شده W در DNA برابری می‌کند (Babu et al. 2006). عوامل رونویسی WRKY توالی حفاظت شده W (TTGACC/T) را به عنوان علامت موجود در پیشبر شناسایی کرده و موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند (Rushton et al. 1996). ویژگی خاص عوامل رونویسی WRKY در اتصال به DNA وجود پهنه تقریباً غیر قابل تغییر WRKY در انتهای آمینی پروتئین است (Rushton et al. 1996). آزمایش‌های جهش‌زایی نشان می‌دهد که اسید آمینه‌های حفظ‌شده سیستئین (cysteine) و هیستیدین (histidine) و پهنه WRKYGQK برای اتصال پروتئین به DNA ضروری هستند (Maeo et al. 2001). در تعداد کمی از این توالی‌ها در گیاهان مختلف تغییرات کمی مانند WKY, WVKY, WRRY, WSKY و WKKY گزارش شده است (Xie et al. 2005). عوامل رونویسی WRKY بر مبنای تعداد پهنه‌ها و ساختار انگشت روی (zinc finger) به سه گروه تقسیم می‌شوند (Eulgem et al. 2000). پروتئین‌های گروه I دارای دو پهنه و گروه II که شامل زیر گروه‌های IIa IIb IIc IId Iie بوده و III دارای یک پهنه WRKY بوده (Rushton et al. 2008) و الگوی انگشت روی در انتهای C آنها در گروه I و II به صورت Cx₄ Cx₇Cx₂₃HxC و در گروه III به صورت Cx₂₂₋₂₃HxH است (Zhang and Wang, 2005).

عوامل رونویسی WRKY در هنگام مواجهه گیاه با شوری زیاد، گرما، تنش اسمزی، غلظت‌های بالای CO₂ و سرما یا خشکی بیان می‌شوند (Li et al. 2009). در غلات آلفاآمیلاز (alpha amylase) یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرآیند جوانه‌زنی و فرآیندهای پس از جوانه‌زنی است، در جو بعضی از عوامل رونویسی WRKY به توالی W در پیشبرهای ژن آلفاآمیلاز متصل می‌شوند (Rushton et al. 1995). بیشتر پروتئین‌های خانواده WRKY در پاسخ گیاه

جدول ۱- اسامی و آدرس پایگاه داده‌های مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Name and URL address of the databases exploited in the current research

Database	URL
The international barley sequencing consortium (IBSC)	http://webblastipk-gaterslebende/barley
GeneBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Plant Transcription Factors Database (PTFDB)	http://planttfdbcbi.edu.cn
Gramineae Transcription factor database (GTFDB)	http://gramineaeatfdbpscribe.njp
Pfam	http://pfamsanger.ac.uk/
Ensemble Plants	http://plantsensembl.org/
Weblogo	http://weblogoberkeleyedu/logo.cgi
Fao	http://faostatfao.org

شایان ذکر است انواع رونوشت‌های گزارش شده یک ژن (شامل mRNA، cDNA، EST) در یک Unigene جمع‌آوری شده است. در صورت عدم وجود Unigene، توالی‌های تکراری از طریق هم‌ردیفی، شناسایی و تلفیق شدند.

هم‌ردیفی و ترسیم درخت فیلوژنتیک

بعد از حذف توالی‌های ترانسکرپت‌های یک پروتئین، هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی WRKY بدست آمده در جو به همراه یک توالی از هر زیر گروه خانواده عوامل رونویسی WRKY در گندم (Zhu et al. 2013)، برنج (Paul et al. 2010) و آرابیدوپسیس (Wu et al. 2005) با استفاده از نرم افزار Clustalx 2010 انجام و درخت فیلوژنتیک آنها بر اساس روش اتصال همسایه (neighbor-joining) و با انجام خودراه‌اندازی (bootstrap) با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم افزار MEGA 60 (Tamura et al. 2013) رسم شد.

تعیین محدوده کرموزومی

برای یافتن توالی ژنومی، توالی cDNA هر یک از اعضا به عنوان الگو برای BLASTN بر علیه ژنوم جو (در بین توالی‌های Morex) در پایگاه‌های IBSC و Ensemble Plants (جدول ۱) بارگذاری شدند.

حصول توالی‌های توافقی (consensus) مناطق حفاظت شده WRKY در زیر گروه‌های این خانواده توالی‌های توافقی مناطق حفاظت شده WRKY در هر کدام از زیر گروه‌های این خانواده با استفاده از پایگاه Weblogo طراحی شدند.

جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف (Hidden Markov

(Model)

برای جستجو بر اساس HMM ابتدا پروفایل hmm برای دمین حفاظت شده WRKY با کد PF03106hmm از پایگاه Pfam (Punta et al. 2014) (جدول ۱) گرفته شده و از آنها برای جستجو علیه مجموعه پروتئین‌های بدست آمده از IBSC (Mayer et al. (barley_HighConffa & barley_LowConffa) (2012) با استفاده از نرم افزار HMMER 31b1 (Finn et al. 2011) استفاده شد. در این مرحله پروفایل hmm دوباره بر اساس توالی‌های مناطق حفاظت‌شده همه پروتئین‌ها و ناحیه حفاظت شده در هر زیر گروه ایجاد و از پروفایل حاصل برای جستجوی مجموعه پروتئین‌های بدست آمده از IBSC استفاده شد.

در همه جستجوها فقط توالی‌هایی با $E\text{-value} < 1$ انتخاب شده و سپس همه آنها به صورت دستی برای وجود مناطق حفاظت شده WRKY بررسی شدند و این نتایج با داده‌های پایگاه Pfam برای مناطق حفاظت شده دوباره چک شدند. جهت جلوگیری از ثبت تکراری توالی‌های مشابه گزارش شده برای هر ژن، توالی‌های یافت شده در پایگاه‌های مختلف، در NCBI جستجو شدند تا Unigene توالی‌ها در صورت وجود پیدا شد.

نتایج

۹۶ توالی پروتئینی به عنوان اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو یافت شد که بر طبق طبقه بندی تعریف شده (Eulgem *et al.* 2000)، بر اساس تشابه در دمین حفاظت شده، در ۳ گروه دسته بندی شدند (جدول ۲).

بر این اساس ۱۳ پروتئین دارای ۲ دمین حفاظت شده WRKY در گروه I، ۳۰ پروتئین دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی $Cx_7Cx_{23}HxC$ در گروه III و پروتئین های دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی $Cx_{4-5}Cx_{22-23}HxH$ بر اساس شباهت های ساختاری به کار رفته برای طبقه بندی های مذکور برای گندم، برنج و آرابیدوپسیس به شرح زیر در زیرگروه های پنج گانه گروه II قرار گرفتند: ۵ پروتئین در زیرگروه IIa، ۴ پروتئین در زیرگروه IIb، ۲۲ پروتئین در زیرگروه IIc، ۱۳ پروتئین در

زیرگروه IId و ۹ پروتئین در زیرگروه IIe. در درخت فیلوژنتیک رسم شده مشاهده می شود که حدود ۳۱ درصد توالی های یافت شده در گروه III، حدود ۱۴ درصد آنها در گروه I و باقی در گروه II قرار دارند (شکل ۱).

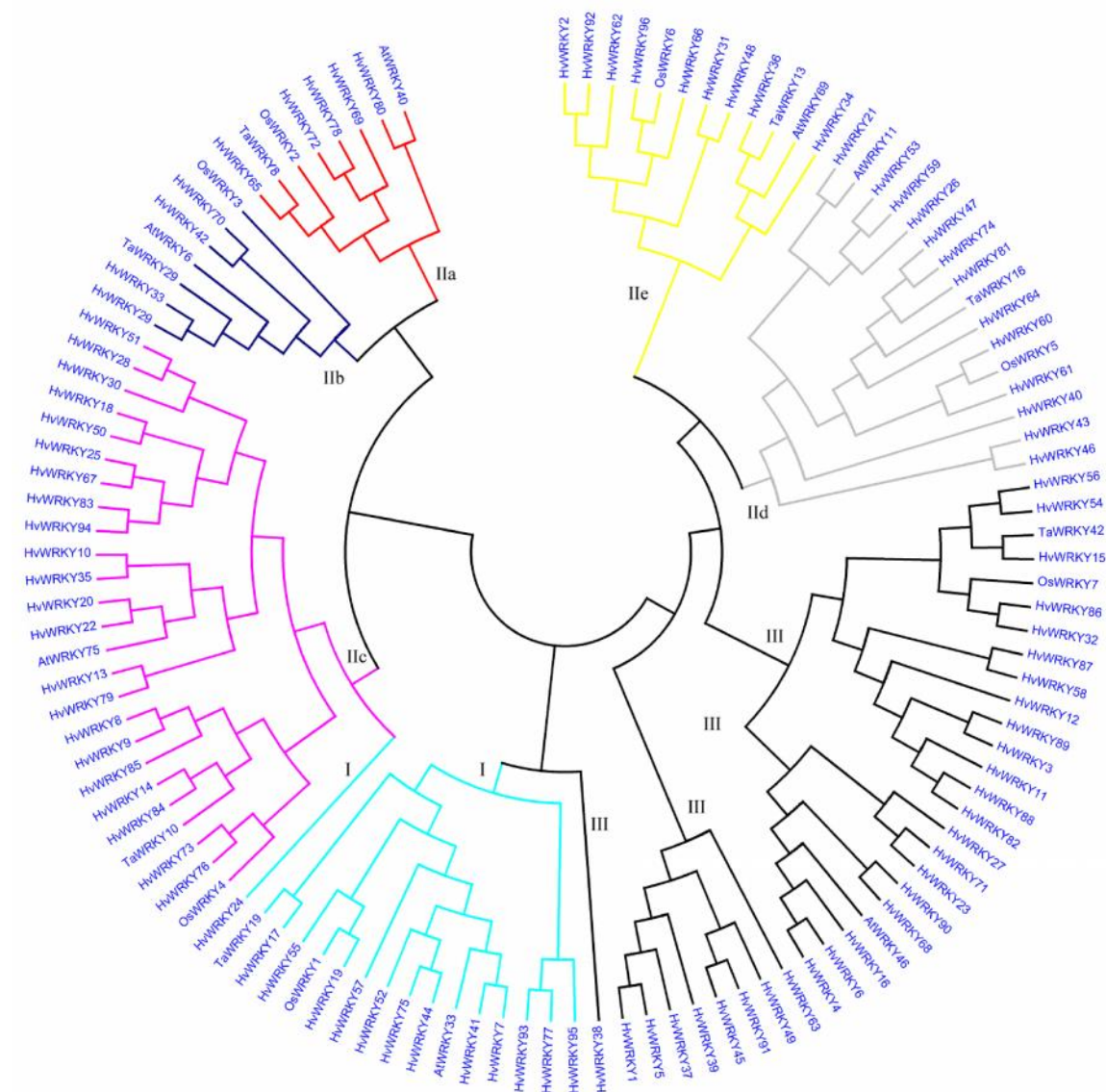
شباهت ساختاری دمین های حفاظت شده توالی ها بین گروه ها و زیرگروه های IIa، IIb و IIc و I و همچنین بین III و IId مشهود است که این گروه ها و زیرگروه ها در شکل ۱ نیز کنار یکدیگر قرار گرفته اند. توالی حفاظت شده WRKYGQK در دمین همه توالی های یافت شده به همراه ساختار انگشت روی $Cx_7Cx_{23}HxC$ در گروه III و ساختار انگشت روی $Cx_{4-5}Cx_{22-23}HxH$ در گروه های I و II مشهود هستند (شکل ۲).

جدول ۲- فهرست اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو، موقعیت کروموزومی، طول پروتئین، موقعیت دمین حفاظت شده و گروه بندی آنها

Table 2- List of WRKY transcription factor family members in barley, chromosomal position, protein length and the position of conserved domain

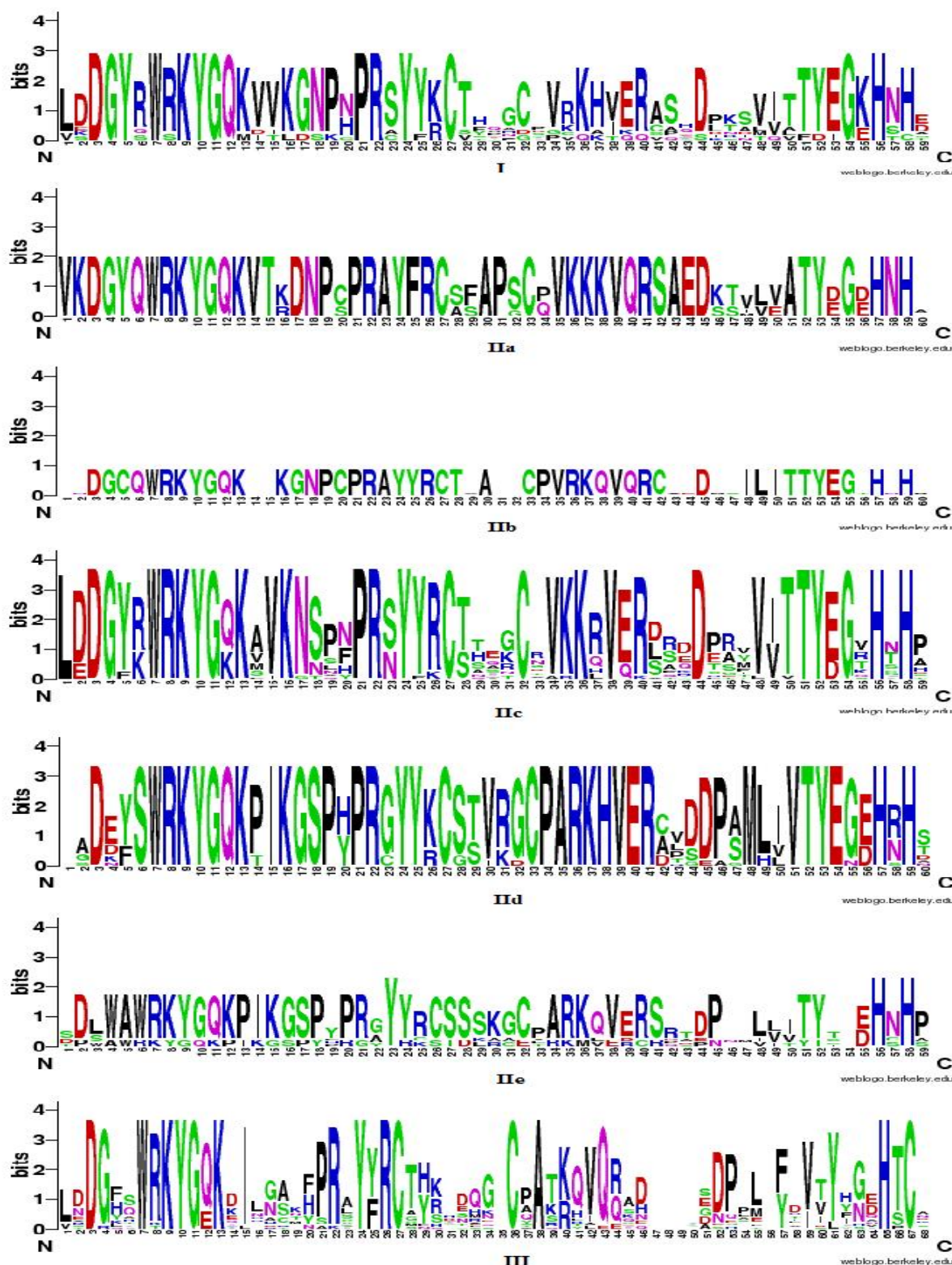
Name	Chromosome No	Pervious Name	UniGene	Protein ID	MIPS acc No	Protein Length (WRKY Domain)
HvWRKY1	1	-----	---	-----	MLOC_57051	290(138-199)
HvWRKY2	1	-----	---	-----	MLOC_71477	340(182-240)
HvWRKY3	1	-----	---	-----	MLOC_79171	140(1-50)
HvWRKY4	1	HvWRKY31	Hv29798	ABI13397	MLOC_5971	309(113-172)
HvWRKY5	1	-----	---	-----	MLOC_11088	289(135-196)
HvWRKY6	1	-----	---	-----	MLOC_15430	300(105-164)
HvWRKY7	1	HvWRKY43	Hv29827	ABI13408	MLOC_72586	512(178-235)-(344-402)
HvWRKY8	1	HvWRKY19	Hv15087	ABI13385	MLOC_81131	248(125-183)
HvWRKY9	1	HvWRKY20	Hv29796	BAJ94655	MLOC_10264	216(128-186)
HvWRKY10	1	HvWRKY13	Hv18628	ABI13379	MLOC_32433	139(60-118)
HvWRKY11	1	HvWRKY29	Hv29824	ABI13395	MLOC_65699	247(96-156)
HvWRKY12	1	-----	---	-----	MLOC_17779	149(1-53)
HvWRKY13	1	-----	---	-----	MLOC_44947	196(54-112)
HvWRKY14	1	HvWRKY17	Hv29828	BAJ98268	MLOC_12079	199(108-166)
HvWRKY15	2	HvWRKY30	Hv3567	BAJ92999	MLOC_71897	328(148-208)
HvWRKY16	2	-----	---	-----	MLOC_7000	321(140-204)
HvWRKY17	2	HvWRKY41	Hv9019	ABI13406	MLOC_5850	489(218-273)-(383-441)
HvWRKY18	2	-----	---	-----	MLOC_58026	285(127-184)
HvWRKY19	2	HvWRKY46	Hv15882	AAQ63880	MLOC_74884	573(189-246)-(362-420)
HvWRKY20	2	HvWRKY12	Hv14881	BAJ86072	MLOC_36657	216(123-181)
HvWRKY21	2	HvWRKY10	Hv7458	BAJ97150	MLOC_63184	318(247-305)
HvWRKY22	2	-----	---	-----	ABI13378	205(112-170)
HvWRKY23	2	HvWRKY4	Hv13574	BAK023311	MLOC_74606	348(117-175)
HvWRKY24	2	-----	Hv33030	BAK079591	MLOC_77883	736(300_356)-(530-587)
HvWRKY25	2	-----	---	-----	MLOC_66345	179(100-158)
HvWRKY26	2	HvWRKY7	Hv10971	BAK03156	MLOC_22106	326(230-278)
HvWRKY27	3	-----	---	-----	MLOC_68061	114(23-80)
HvWRKY28	3	-----	---	-----	MLOC_54895	205(183-205)
HvWRKY29	3	-----	Hv4932	BAJ96003	MLOC_68299	569(301-359)
HvWRKY30	3	-----	Hv16746	BAJ98040	MLOC_54606	364(168-225)s
HvWRKY31	3	-----	Hv33406	BAJ997161	MLOC_7126	320(137-198)
HvWRKY32	3	-----	Hv21259	BAJ89144	MLOC_44455	308(125-186)
HvWRKY33	3	-----	---	-----	-----	569(302-360)
HvWRKY34	3	HvWRKY45	Hv18266	ABI13410	MLOC_14821	297(74-132)
HvWRKY35	3	-----	---	-----	MLOC_54950	231(152-210)
HvWRKY36	3	HvWRKY39	Hv16074	ABI13404	MLOC_69778	275(105-163)

HvWRKY37	3	-----	---	-----	MLOC_3853	189(117-175)
HvWRKY38	3	-----	---	-----	MLOC_6114	256(54-112)
HvWRKY39	3	-----	---	-----	MLOC_34506	360(120-183)
HvWRKY40	3	HvWRKY36	Hv29825	ABI13412	MLOC_19031	197(37-97)
HvWRKY41	3	-----	---	-----	MLOC_67851	207(23-81)
HvWRKY42	3	HvWRKY37	Hv19834	BAJ992451	MLOC_7939	475(216-274)
HvWRKY43	3	-----	---	-----	MLOC_7470	230(152-208)
HvWRKY44	4	-----	---	-----	MLOC_31894	372(90-148)-(250-308)
HvWRKY45	4	-----	---	-----	MLOC_57764	206(33-94)
HvWRKY46	4	-----	---	-----	MLOC_16746	96(42-96)
HvWRKY47	4	-----	Hv26258	BAJ85995	MLOC_77258	360(225-283)-(286-344)
HvWRKY48	4	-----	---	-----	MLOC_56822	225(140-1198)
HvWRKY49	4	HvWRKY34	Hv1750	ABI13400	MLOC_34522	223(45-103)
HvWRKY50	5	HvWRKY15	Hv15485	BAK01500	MLOC_59259	303(136-193)
HvWRKY51	5	-----	Hv36645	BAJ950061	MLOC_59246	87(1-35)
HvWRKY52	5	-----	---	-----	MLOC_69575	360(92-148)-(248-306)
HvWRKY53	5	-----	---	-----	MLOC_22356	286(220-278)
HvWRKY54	5	HvWRKY22	Hv29810	ABI13388	MLOC_45055	187(130-188)
HvWRKY55	5	HvWRKY40	Hv29818	ABI13405	MLOC_10687	181(145-181)
HvWRKY56	5	HvWRKY28	Hv13249	ABI13394	MLOC_52504	346(123-181)
HvWRKY57	5	HvWRKY42	Hv15670	ABI13407	MLOC_58019	274(86-144)
HvWRKY58	5	HvWRKY24	Hv29804	ABI13390	MLOC_74974	214(18-56)
HvWRKY59	5	-----	---	-----	MLOC_66612	299(231_289)
HvWRKY60	5	HvWRKY9	Hv17161	ABI13375	MLOC_76441	339(269-328)
HvWRKY61	5	HvWRKY11	Hv15434	ABI13377	MLOC_67268	87(12-69)
HvWRKY62	5	-----	---	-----	MLOC_58349	256(154-215)
HvWRKY63	5	-----	---	-----	MLOC_68369	337(149-207)
HvWRKY64	5	HvWRKY8	Hv29784	BAK059431	MLOC_56247	355(289-346)
HvWRKY65	6	HvWRKY1	Hv20710	BAJ91478	MLOC_60890	353(187-244)
HvWRKY66	6	-----	Hv33156	BAK03476	MLOC_64446	488(234-291)
HvWRKY67	6	-----	---	-----	MLOC_12078	227(153-211)
HvWRKY68	7	-----	---	-----	MLOC_66134	308(110-168)
HvWRKY69	7	HvWRKY23	Hv4870	ABI13413	MLOC_70190	382(310-368)
HvWRKY70	7	-----	---	-----	MLOC_60283	609(230-258)
HvWRKY71	7	-----	---	-----	MLOC_78461	341(115-173)
HvWRKY72	-----	HvWRKY2	Hv13583	CAH68818	-----	314(166-224)
HvWRKY73	-----	HvWRKY5	Hv22109	CAH68821	MLOC_66204	245(123-181)
HvWRKY74	-----	-----	Hv26258	-----	-----	340(273-231)
HvWRKY75	-----	-----	Hv25183	-----	-----	493(208-266)-(376-434)
HvWRKY76	-----	-----	Hv22109	-----	-----	237(116-173)
HvWRKY77	-----	-----	Hv20442	-----	-----	521(199-255)-(367-424)
HvWRKY78	-----	-----	Hv13583	BAJ90162	-----	264(127-186)
HvWRKY79	-----	-----	Hv33326	BAJ98419	-----	314(165-223)
HvWRKY80	-----	-----	Hv32682	BAJ99717	-----	229(69-128)
HvWRKY81	-----	-----	Hv26258	BAK00560	-----	353(275-313)
HvWRKY82	-----	-----	Hv1115	BAK01005	-----	254(94-155)
HvWRKY83	-----	HvWRKY14	Hv29823	ABI13380	-----	88(11-69)
HvWRKY84	-----	HvWRKY16	Hv29833	ABI13382	-----	169(113-169)
HvWRKY85	-----	HvWRKY18	Hv29775	ABI13384	-----	187(127-185)
HvWRKY86	-----	HvWRKY21	Hv21259	ABI13387	-----	266(136-204)
HvWRKY87	-----	HvWRKY25	Hv29821	ABI13391	-----	168(27-85)
HvWRKY88	-----	HvWRKY26	Hv1115	ABI13392	-----	209(63-121)
HvWRKY89	-----	HvWRKY27	Hv29820	ABI13393	-----	173(125-163)
HvWRKY90	-----	HvWRKY32	Hv15495	ABI13398	-----	330(145-203)
HvWRKY91	-----	HvWRKY33	Hv16020	ABI13399	-----	142(70-128)
HvWRKY92	-----	HvWRKY44	Hv29819	ABI13411	MLOC_58423	144(46-104)
HvWRKY93	-----	-----	---	ABR87003	MLOC_21482	281(80-138)
HvWRKY94	-----	-----	---	ABL11228	-----	103(65-103)
HvWRKY95	-----	-----	---	-----	-----	53(23-53)
HvWRKY96	-----	HvWRKY6	---	-----	-----	219(186-219)



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustalx 2010 به صورت چندگانه هم‌ردیف شده و بر اساس روش اتصال همسایه و با انجام خودراندازی با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم‌افزار MEGA6 درخت فیلوژنتیک آنها رسم شد.

Figure 1- Phylogenetic tree of WRKY transcription factor family members in barley, multiple sequence alignment were performed using Clustalx 2010 software and phylogenetic trees were constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method with bootstrap values from 1,000 replicates and drawn by MEGA4.



شکل ۲- توالی‌های توافقی مناطق حفاظت شده در زیر گروه‌های خانواده عوامل رونویسی WRKY که با استفاده از پایگاه Weblogo (جدول ۱) طراحی شده‌اند.

Figure 2. The consensus sequences of the conserved regions in WRKY transcription factor family subgroups of barley, designed by Weblogo tool (table 1).

بحث

در این مطالعه به دلیل قرابت ژنتیکی جو به برنج و همچنین تک-لپه‌ای بودن هر دو گیاه، از توالی‌های پروتئینی حفاظت شده هر کدام از زیرگروه‌های برنج (Wu et al. 2005) برای پیدا کردن اعضای جدید خانواده WRKY در جو استفاده شد. در پایگاه‌های داده، بسیاری از توالی‌ها شرح نویسی نشده‌اند؛ بنابراین برای پیدا کردن اعضای جدید جستجوی توالی‌ها با BLAST آگاهی بیشتری را در دسترس قرار می‌دهد، از طرفی توالی‌های نوکلئوتیدی بسیار بیشتری نسبت به توالی‌های پروتئینی موجود هستند؛ و چون برای پیدا کردن اعضای جدید و داشتن عملکرد مشابه نیاز به توالی حفاظت‌شده پروتئین است، استفاده از tBLASTN برای پیدا کردن اعضای جدید از میان توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از توالی‌های حفاظت شده پروتئینی منطقی به نظر می‌رسد. در پیدا کردن اعضای خانواده ژنی WRKY داشتن ساختار حفاظت‌شده WRKYGQK و توالی انگشت روی به دقت بررسی و تأیید شد شایان ذکر است دلیل انتخاب توالی‌های ناقص گزارش شده به عنوان اعضای این خانواده، دارا بودن موتیف WRKYGQK و شباهت زیاد ساختاری با توالی‌های WRKY و یا ثبت در پایگاه NCBI به نام WRKY بوده است. مطالعات بیوانفورماتیک و عملکردی پیشبرهای گیاهی نشان می‌دهد توالی‌های W و توالی‌های مشابه آن در بسیاری از پیشبرهای القایی تحت تنش مشارکت فعال دارند (Maleck et al. 2000). گزارش‌های کمی درباره وجود اتصال پروتئین WRKY به توالی‌های حفاظت شده غیر از W وجود دارد (Cai et al. 2007). عامل رونویسی SUSIBA2 که نام دیگر عامل رونویسی HvWRKY46 است (Mangelsen et al. 2008) توانایی اتصال به دو توالی حفاظت شده W و SURE (TAAAGATTACTAATAGGAA) را دارد (Grierson et al. 1994).

ژن‌های تنظیم‌کننده بیان به فراوانی در ژنوم گیاهان و جانوران حضور دارند و تنوع و تکامل یوکاریوت‌ها مربوط به گسترش و تکامل انواع خاص ژن‌های تنظیم‌کننده بیان است (Riechmann et al. 2000). روند تکاملی خانواده WRKY از موجودات تک-سلولی به سمت موجودات پرسلولی است. گیاهان گل‌دار در

مقایسه با مخروطیان، سرخس‌ها و خزها دارای اعضای بیشتری از خانواده ژنی WRKY هستند و این عوامل رونویسی نقش تنظیمی بسیار مهمی را در گیاهان گل‌دار بازی می‌کنند (Berri et al. 2009). بر اساس مطالعات صورت گرفته در جلبک کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) به عنوان یک گیاه پست که قرابت ژنتیکی فراوانی با اجداد گیاهی دارد فقط یک ژن WRKY وجود دارد که این ژن جزء گروه I است (دارای دو دمین WRKY) و نشان‌دهنده این است که گروه I جد واقعی خانواده‌ی WRKY بوده و دیگر گروه‌های این خانواده از تکامل گروه اول حاصل شده‌اند. جستجو بر مبنای داده‌های موجود در GeneBank نشان می‌دهد ژن‌های WRKY مشابه گروه I در دو یوکاریوت غیرتوسستزکننده، یکی در کپک *Dictyostelium discoideum* (شماره‌ی شناسایی: AAO52331) و دیگری در یک تک‌یاخته‌ای به نام *Giardia lamblia* (شماره‌ی شناسایی: EAA40901) وجود دارد و به طور کلی مؤید این فرضیه هستند که جد واقعی ژن‌های WRKY گروه I هستند و قبل از اینکه ژن-های WRKY وارد سلسله گیاهی شوند، حدود یک و نیم تا دو میلیارد سال پیش از یوکاریوت‌های اولیه منشأ گرفته‌اند، اما چگونگی گسترش ژن‌های این خانواده در گیاهان و عدم وجود آنها در مخمرها و در جانوران مشخص نیست (Ulker and Somssich, 2004). در این مطالعه ۱۳ پروتئین دارای ۲ دمین حفاظت شده WRKY بر اساس شباهت‌های ساختاری به کاررفته برای طبقه‌بندی‌های مذکور برای گندم، برنج و آرابیدوپسیس در گروه I قرار گرفتند.

دلیل قرار گرفتن زیرگروه IIC در کنار گروه I در درخت فیلوژنتیک شباهت ساختاری در توالی‌های این دو گروه است به طوری که گمان می‌رود رابطه تکاملی این دو گروه نزدیک‌تر بوده و زیر گروه IIC در اثر حذف یکی از دو منطقه حفاظت شده WRKY از گروه I مشتق شده باشد. اما باید توجه داشت که ممکن است بعضی از اعضای زیرگروه IIC در واقع توالی‌های ناقص گروه I باشند. همچنین در مطالعاتی که بر روی آرابیدوپسیس و گوجه‌فرنگی صورت گرفته است نشان داده شده است که بعضی از ژن‌ها مثل *AtWRKY10* فقط دارای یک دمین

وجود آمده‌اند (Dong and chen, 2003; Kalde and Barth, 2003). گروه II فقط در گیاهان عالی وجود دارند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این گروه از ژن‌های خانواده WRKY در اثر مضاعف شدگی ایجاد شده‌اند و به دلیل ایفای نقش در تحمل فشارهای محیطی و تنش‌های وارده بر گیاه انتخاب شده‌اند. این میزان در پژوهش حاضر حدود ۳۱ درصد است. می‌توان فرونی حضور این گروه در جو نسبت به میانگین گیاهان عالی را با مقاومت بالای آن در بین غلات و انتخاب اجداد وحشی مقاوم‌تر برای بدست آوردن ارقام مقاوم‌تر و تکامل آن برای حصول عملکرد نسبی بالاتر در شرایط نامساعد در ارتباط دانست. ژن‌های گروه III نقش بسیار مهمی را در تک‌لپه‌ای‌ها بازی می‌کنند، این گروه از نظر تکاملی پیشرفته‌ترین گروه خانواده WRKY به حساب آمده و موجب سازگاری گیاه می‌شوند (Zhang and Wang, 2005). گروه III در برنج نسبت به آراییدوپسیس از نظر تکاملی بسیار فعال‌تر هستند، زیرا در توالی‌های گروه III برنج مضاعف شدگی پی‌درپی دیده می‌شود (Eulgem et al 2000). ۳۴ درصد از ژن‌های خانواده‌ی ژنی WRKY در برنج نیز مربوط به گروه III هستند (Christian et al. 2007). با توجه به نتایج به دست آمده گروه III در اجداد جو در دوران تکامل بعد از گروه II ایجاد شده‌اند و این گروه نسبت به گروه II قرابت ژنتیکی کمتری نسبت به گروه I به عنوان جد خانواده‌ی WRKY دارند (شکل ۲) و این نشان‌دهنده‌ی تأیید مباحث مبتنی بر حفاظت شدگی گروه II در جو همانند گندم به دلیل سازگاری این گیاه با شرایط و فشارهای محیطی است.

با توجه به اهمیت پدیده‌ی در حال گسترش خشکسالی در جهان و ایران، و محدودیت‌های گسترده‌ای که بر کشاورزی کشور تحمیل می‌کند، تلاش برای ایجاد گیاهان متحمل به خشکی و شوری اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد. از آنجایی که صفاتی مانند تحمل به تنش خشکی دارای کنترل چند ژنی هستند، بررسی ژن‌های تنظیمی که خوشه‌های ژنی را تنظیم می‌کنند یکی از راهکارهای امید بخش برای متحمل کردن گیاهان حساس به تنش خشکی است. نظر به وقت و هزینه بالای مورد نیاز برای بررسی‌های آزمایشگاهی و به ویژه مهندسی ژنتیک، منطقی است قبل از اقدام به هرگونه دستورزی ژنتیکی، خانواده‌های ژنی مهم و

هستند. اما در گروه‌بندی این ژن در گروه ژن‌های دو دمینی (گروه I) قرار گرفته است (Rushton et al. 2000) بنابراین به دلیل قرابت ژنتیکی بالای گروه IIc با دمین کربوکسیلی ژن‌های گروه I می‌توان نتیجه گرفت که زیرگروه IIc در طی دوران تکامل دمین انتهایی آمینی خود را ازدست داده‌اند که این مساله تایید کننده این است که گروه I جد واقعی خانواده‌ی WRKY هستند و دیگر گروه‌های این خانواده از تکامل گروه اول حاصل شده‌اند (Ulker and Somssich, 2004). در پژوهش‌های دیگر به ایجاد و تکامل گروه II از گروه I به دلیل از دست رفتن دمین انتهایی آمینی (N) اذعان شده و نتایج نشان داد که گروه II از تکامل دمین کربوکسیلی (C) گروه I ایجاد شده‌اند (Zhang and Wang, 2005). در پروتئین‌های گروه I دمین کربوکسیلی کار اتصال به DNA و دمین آمینی به تخصصی بودن این اتصال کمک می‌کند، بنابراین به دلیل ماهیت یک عامل رونویسی مبنی بر اتصال به DNA، تکامل گروه II از دمین کربوکسیلی منطقی است.

با توجه به اینکه گروه‌های II و III تک دمینی هستند برای جداسازی و مشخص کردن آن‌ها از یکدیگر تفاوت ساختار انگشت روی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که مطابق گزارش‌های قبلی (Zhang, 2005) توالی‌های دارای ساختار انگشت روی با الگوی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و توالی‌هایی که دارای ساختار انگشت روی با الگوی Cx₄₋₅Cx₂₂₋₂₃HxH هستند در گروه I و II قرار گرفتند گروه II نیز در برنج به چهار زیرگروه IIa, IIb, IIc و IId تقسیم‌بندی می‌شوند (Guo et al. 2005). توالی‌های گروه II در این مطالعه مانند تقسیم بندی خانواده عوامل رونویسی WRKY در گندم (Zhu et al. 2013) به زیرگروه‌های IIa, IIb, IIc, IId و IIe تقسیم شدند. اساس این طبقه بندی شباهت ساختاری توالی‌های پروتئین‌های WRKY است. در گروه‌بندی گروه II به ترتیب ۵، ۴، ۲۲، ۱۳ و ۹ عضو در زیرگروه‌های IIa, IIb, IIc, IId و IIe قرار گرفتند.

به‌طور میانگین حدود ۲۰ درصد از ژن‌های خانواده‌ی ژنی WRKY در گیاهان عالی مربوط به گروه III هستند. درحالی‌که اعضای این گروه در خزهی فیسکومترا (Physcomitrella patens) وجود ندارند و نشان دهنده این است که این گروه از ژن‌های WRKY در طی دوران تکامل بعد از گروه‌های I و II

یکی از مهم ترین تنظیم کننده های رونویسی در گیاهان با توجه به نقش اثبات شده ی آنها در تحمل به تنش های زیستی و غیرزیستی می تواند ما را در ایجاد بستری برای افزایش تحمل به خشکی یاری کند.

منابع

- Babu MM, Iyer LM, Balaji S, Aravind L. 2006.** The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic acids research* 34: 6505-6520.
- Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. 2004.** Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current opinion in structural biology* 14: 283-291.
- Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, Brasileiro A, Fumasoni I, Satoh K, Kikuchi S, Mizzi L, Morandini P, Pè M. 2009.** Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. *BMC plant biology* 9: 120-126.
- Blake T, Blake V, Bowman J, Abdel-Haleem H. 2011.** In *Barley: Production Improvement and Uses* (ed SE Ullrich) 522-531 (Wiley-Blackwell).
- Bockelman HE, Valkoun J. 2011.** In *Barley: Production Improvement and Uses* (ed SE Ullrich) 144-159 (Wiley-Blackwell).
- Brivanlou AH, Darnell Jr J E. 2002.** Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-818.
- Cai M, Qiu D, Yuan T, Ding X, Li H, Duan L, Xu C, Li X, Wang S. 2007.** Identification of novel pathogen-responsive cis-elements and their binding proteins in the promoter of OsWRKY13 a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell & Environment* 31: 86-96.
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE. 2008.** Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant molecular biology* 68: 81-92.
- Chen C, Chen Z. 2000.** Isolation and characterization of two pathogen-and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant molecular biology* 42: 387-396.
- Collins HM, Burton RA, Topping DL, Liao ML, Bacic A, Fincher GB. 2010.** Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry* 87: 272-282.
- Christian AR, Liu Y, Shen QJ. 2007.** The WRKY Gene Family in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(6): 827-842.
- De Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J. 1996.** Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from Arabidopsis. *Nucleic acids research* 24: 4624-4631.
- Dong J, Chen C. 2003.** Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51(1):21-37.
- Du L, Chen Z. 2000.** Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 24: 837-847.
- Eulgem T. 2005.** Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* 10: 71-78.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-205.
- Eulgem T, Somssich IE. 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology* 10: 366-371.
- FAO. 2009.** FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available on: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.
- Garcia DELM. 2003.** Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions. An ontogenic approach *Agronomy Journal* 95: 266-274.
- Grando S, Macpherson HG. 2005.** In *Proceedings of the International Workshop on Food Barley Improvement 14-17 January Hammamet Tunisia 156* (ICARDA Aleppo Syria).
- Grierson S, Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M. 1994.** Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal* 5: 815-826.

- Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004.** Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell & Environment* 27: 521-549.
- Kalde M, Barth M. 2003.** Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular plant-microbe interactions* 16(4): 295-305.
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K. 2005.** RARTF: database and tools for complete sets of Arabidopsis transcription factors. *DNA research* 12: 247-256.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994.** Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein SPF1 that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics* MGG 244: 563-571.
- Jiang W, Yu DQ. 2009.** Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and post-germination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biology* 22: 994-996.
- Karin M. 1990.** Too many transcription factors: positive and negative interactions. *The New biologist* 2: 126-131.
- Latchman DS. 1997.** Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29: 1305-1312.
- Li S, Fu QT, Huang WD, Yu DQ. 2009.** Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor WRKY25 in heat stress. *Plant Cell Rep* 28: 683-693.
- Mao K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. 2001.** Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience biotechnology and biochemistry* 65: 2428-2436.
- Mangelsen E, Kilian J, Berendzen K, Kolukisaoglu Ü, Harter K, Jansson C, Wanke D. 2008.** Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC genomics* 9: 194-201.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2000.** The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics* 26: 403-410.
- Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, Platzer M, Fincher GB, Muehlbauer GJ, Sato K, Close TJ, Wise RP, Stein N. 2012.** A physical genetic and functional sequence assembly of the barley. *Genome Nature* 491(7426): 711-716.
- Mitchell PJ, Tjian R. 1989.** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-376.
- Nevo E, Bi Fu Y, Pavlicek T, Khalifa S, Tavasi M, Beiles A. 2012.** Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *Proceeding of National Academy Science of USA* 109 3412-3415.
- Nimwegen E. 2006.** Scaling laws in the functional content of genomes. *Power Laws Scale-Free Networks and Genome Biology*: 236-253.
- Paul J, Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Qingxi Shen J. 2010.** WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15: 1360-1385.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP. 2009.** MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* 23: 80-92.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. 2014.** Nucleic Acids Research The Pfam protein families database. *Database Issue* 42:D222-D230.
- Purugganan MD, Fuller DQ. 2009.** The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457:843-848.
- Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, Chen X, Laudeman TW, Timko MP. 2008.** Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the solanaceae. *Plant Physiology* 147: 280-291.
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R. 1995.** Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of α -Amy2 genes. *Plant molecular biology* 29: 691-702.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. 2010.** WRKY transcription factors *Trends in Plant Science* 15: 247-258.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. 1996.** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO journal* 15: 569- 576.
- Riechmann J, Heard LJ. 2000.** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ülker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P. 2007.** Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315: 1098-1107.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S .2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 60. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC). 2012.** A Physical genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711-717.
- Ulker B, Somssich IE. 2004.** WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current opinion in plant biology* 7: 491-498.
- Wu KL, Guo HH, Wang J. 2005.** The WRKY family of transcription factor in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA research* 12: 9-26.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. 2005.** Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology* 137: 176-189.
- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. 1999.** Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development* 9: 140-147.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y. 2005.** Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *The Plant Cell Online* 17: 944-956.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R. 2010.** Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2 8 enhances tolerance to drought salt and low temperature in Arabidopsis. *PLoS One* 5(12): e16041.
- Zhang Y, Wang L. 2005.** The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolution Biology* 5: 1-6.
- Zhu X, Liu S, Meng C, Qin L, Kong L, Xia G. 2013.** WRKY Transcription Factors in Wheat and Their Induction by Biotic and Abiotic Stress. *Plant Molecular Biology Rep* 10: 1105-1113.

بررسی تاثیر سیانید هیدروژن در القای مقاومت به شوری در گیاه *Aeluropus littoralis* هالوفیت

Study of Hydrogen Cyanide Effects on Salt Stress Induction in *Aeluropus littoralis*

میلاذ احمدی نجف آبادی^{۱*}، حسین عسکری^۱، مسعود سلطانی نجف آبادی^۲

Ahmadi N. Milad^{1*}, Askari H¹, Soltani N. Masood²

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی،

تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

1. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: milad.ah2005@gmail.com
(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۰)

چکیده

تنش شوری به عنوان یک خطر جدی برای رشد و نمو گیاهان محسوب می شود. *Aeluropus littoralis* که یک هالوفیت تک لپه محسوب می شود، به عنوان یک مدل ژنتیکی جهت تجزیه و تحلیل رفتار فیزیولوژیک و مولکولی تحمل به شوری به کار می رود. تنش شوری، تولید اتیلن را در بافتهای گیاهی افزایش خواهد داد و در نتیجه این افزایش غلظت، سیانید هیدروژن نیز افزایش خواهد یافت. همچنین مکانیسم پالایش سیانید از طریق سه آنزیم *Cyanase*، *Rhodanese* و β -*cyanoalanine synthase* اجرا می شود. مطالعه حاضر به منظور درک پاسخ رشد و نمو سلولهای گیاهی در شرایط تنش و همچنین بررسی الگوی بیان افتراقی ژن های درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در سوسپانسیون سلولی گیاه فوق، در پاسخ به غلظت های مختلف شوری و سیانید پتاسیم انجام گرفت. در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل با غلظت های ۰، ۰،۰۰۲، ۰،۰۰۴، ۰،۰۰۶، ۰،۰۰۸، ۰،۰۱۰ میلی مولار NaCl، KCN استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز وزن خشک سلولی و نیز آنالیز qRT-PCR ژن های درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن نشان داد که اعمال تیمار سیانید پتاسیم در غلظت خاصی از شوری، احتمالاً می تواند امکان مدیریت رشد گیاه را در شرایط شوری فراهم کند.

واژه های کلیدی

Aeluropus littoralis

تنش شوری

اتیلن

سیانید هیدروژن

qRT-PCR

مقدمه

تنش های محیطی زنده و غیر زنده به طور مؤثری تولیدات زراعی را با بحران مواجه می کند (Breusegem *et al.* 2001). شوری خاک، پیش از به وجود آمدن انسان وجود داشته و شاید یکی از دلایل از بین رفتن تمدن سومریان باستان باشد (Jacobson and Adams, 1958). امروزه نیز شوری خاک به عنوان یکی از مهمترین عوامل نامساعد و تنش زای غیر زنده، مطرح است و بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی تاثیر نامطلوب دارد (Boyer, 1982). گزارشات اخیر حاکی است که در حدود ۲۰٪ از اراضی کشاورزی جهان به عنوان خاک شور نامیده می شوند (Flowers and Yeo, 1995). تنش شوری در خاک یا آب به عنوان یک تنش جدی، اثرات خاصی روی رشد و عملکرد گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک اعمال می کند و با افزایش شدت آن پتانسیل عملکرد تا ۲۵ سال آینده بیش از ۳۰٪ و در سال ۲۰۵۰ تا ۵۰٪ کاهش خواهد یافت. در برنامه های اصلاحی به منظور انتخاب صفات مطلوب در زمینه های مختلف ژنتیک نیاز به درک مکانیسم های فیزیولوژیک و ژنتیک است. عوامل محیطی موجود در شرایط مزرعه ای، پاسخ به شوری را در گیاهان تحت تأثیر قرار می دهند و از انتخاب مستقیم ژنوتیپ های متحمل به شوری ممانعت می کند. در نتیجه اجرای تحقیقات مولکولی اجتناب ناپذیر است. درک مکانیزم های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تحمل به شوری با استفاده از یک سیستم مدل هالوفیتی می تواند اطلاعات مفیدی در اختیار بگذارد. گیاه آلروپوس به عنوان یک گیاه تک لپه هالوفیت با دارا بودن بیش از ۹۵ درصد هومولوژی ژنومی با برنج، به منظور انتقال مقاومت به برنج مورد توجه است. متأسفانه هنوز در بهره برداری از پتانسیل مطلوب این گیاه در تحمل به شوری اقدامی صورت نگرفته است، چرا که گیاه مورد نظر در حوزه کشاورزی چندان شناخته شده نیست. مطالعات در زمینه تولید اتیلن و نقش آن در گیاه در پاسخ به شرایط تنش از

دیر باز مورد توجه دانشمندان و محققان بوده است. به طوری که به آن، هورمون تنش اطلاق می شود (Abeles *et al.* 1995; Hall and Smith, 1992). در گیاهان سیانید هیدروژن به عنوان یک ماده همراه در مسیر بیوسنتز اتیلن تولید می شود. در این واکنش آنزیم ACC Oxidase ترکیب 1-Aminocyclopropane-1-carboxylicacid را به اتیلن و HCN تبدیل می کند (شکل ۱). بر خلاف اتیلن که تقریباً اکثر مطالعات انجام گرفته بر روی تنش، به نقش این هورمون در مقابله با استرس پرداخته است، نقش سیانید هیدروژن به عنوان یک محصول جانبی در مسیر تولید اتیلن در گیاه، در تنظیمات درون سلولی در واکنش به تنش های محیطی، بندرت مورد توجه قرار گرفته است. این در حالی است که سیانید هیدروژن همگام با اتیلن به میزان برابر و در پاسخ به تنشهای زنده و غیر زنده در گیاه تولید می شود (شکل ۱). سیانید هیدروژن در گیاه علاوه بر القای مسیرهای تنفسی مقاوم به سیانید و پنتوز فسفات در گیاه (Bogatek and Lewak, 1991; Bogatek *et al.* 1999)، پیش ساز آمینواسید آسپاراژین و محرک تولید اتیلن در گیاه، در غلظت های غیر سمی می باشد (Oracz *et al.* 2008). همچنین سیانید در یک اثر پس خوری، باعث افزایش فعالیت ژن کد کننده ACC Synthase- ژن کلیدی مسیر بیوسنتز اتیلن- شده و در نتیجه باعث افزایش تولید اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس می شود (Pirrung and Brauman, 1987; Smith and Arteca, 2000). بنابراین تولید این عنصر به ظاهر سمی و خطرناک، در پاسخ به استرس بی مورد نبوده و به عنوان یک عامل دفاعی در برابر تنش در گیاه نقش ایفا می کند. همچنین بررسی تغییرات بیان ژن های عامل بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در واکنش به اثرات متقابل استرس شوری و سیانید در گیاه، به عنوان یک خلاء بزرگ در مطالعات پیشین روی سیانید هیدروژن مشاهده می شود. در این مطالعه به بررسی الگوی رشد سلولی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* در واکنش به تنش های شوری،

مواد و روش‌ها

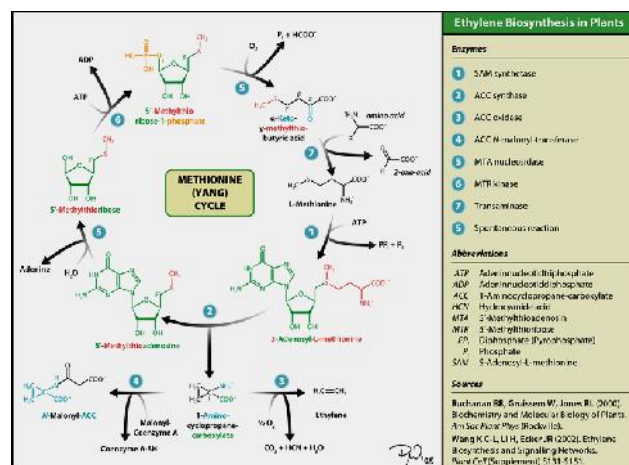
تهیه ماده گیاهی

در این آزمایش از سوسپانسیون سلولی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. به این منظور بذور *A. littoralis* از بانک ژن کرج تهیه گردید. بذور پس از استریل با هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد، جهت کالوس زایی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر BAP به عنوان ترکیب هورمونی جهت کالوس زایی در محیط کشت جامد مورد استفاده قرار گرفت. سپس کالوسهای ترد و شکننده به محیط کشت مایع انتقال داده شد و پس از چند بار واگشت و بدست آوردن سوسپانسیون حاوی سلولهای منفرد و جدا از هم، تیماردهی در تکرارهای معین انجام گرفت. غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر kinetin به عنوان ترکیب بهینه هورمونی در سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند.

تیمار NaCl و سیانید

تیمار شوری با غلظت های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ میلی مولار در ارلن های ۱۰۰ml حاوی سلول های یکنواخت با ۳ تکرار اعمال شد و با اندازه گیری وزن خشک سلولی، منحنی رشد سلولی در شرایط شوری بدست آمد. بدین صورت که مدت زمانی که سلول ها در معرض تیمار شوری قرار گرفتند ۲۰ روز بود و به منظور ارزیابی تاثیر تیمارهای مختلف شوری بر رشد سلول ها هر ۲ روز یکبار از هر یک از ارلن ها به میزان ۱/۵ میلی لیتر نمونه برداری شد و با اندازه گیری وزن خشک سلول ها، منحنی رشد سلولی برای هر تیمار رسم شد و در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از این منحنی رشد، غلظت های محرک رشد و مهار کننده ی رشد سلولی در مقایسه با نمونه ی شاهد بدست آمد. همچنین تیمار سیانید پتاسیم در غلظت های ۰،

سیانید پتاسیم و اثرات متقابل این دو تنش پرداخته و به نقش سیانید هیدروژن به عنوان پاسخ گیاه در واکنش به تنش شوری پرداخته می شود، همچنین به بررسی تغییرات بیان ژن های کد کننده *ACC Oxidase* و *AdoMet Synthase* آنزیم های کلیدی درگیر در تولید سیانید هیدروژن و نیز ژن های کد کننده *Cyanase*، *β -cyanoalanine Synthase*، *Rhodanese* آنزیم های درگیر در پالایش و سم زدایی سیانید هیدروژن در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* با استفاده از qRT-PCR می پردازیم.



شکل ۱- چرخه یانگ و آنزیم های درگیر در این مسیر: اتیلن و سیانید هیدروژن به عنوان فرآورده های جانبی این چرخه توسط آنزیم *ACC Synthase* سنتز می شوند.

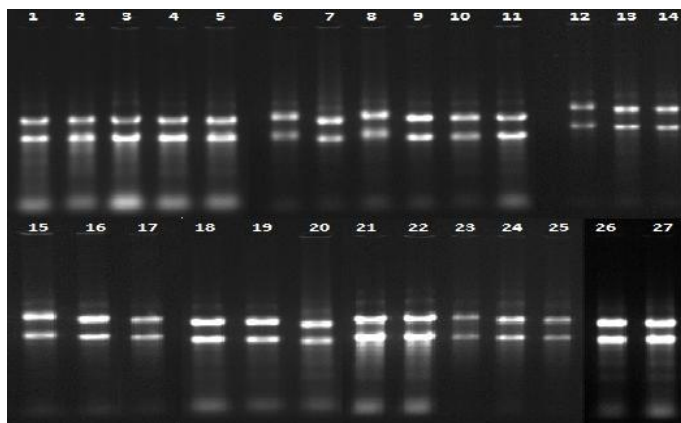
Figure 1. Yang cycle and Ethylene Biosynthesis pathway in plants

استخراج RNA و تیمار DNaseI

نمونه های برداشت شده با استفاده از هاون چینی دو بار اتوکلاو و ازت مایع به خوبی پودر گردید و در دمای ۸۰- نگهداری شد. سپس استخراج RNA طبق پروتوکل RNX-Plus انجام گرفت (شکل ۲). نمونه های RNA پس از استخراج، توسط NanoDrop غلظت سنجی شد و مقدار 2µg از آن جهت تیمار با DNaseI شرکت Cinnagen، مورد استفاده قرار گرفت. در انتها صحت اثر DNase روی RNA استخراجی، با استفاده از PCR و با بکارگیری آغازگرهای α.tubulin بررسی شد. وجود باند در نمونه RNA تیمار نشده با DNase بیانگر آلودگی ژنومی می باشد.

واکنش RT-PCR

تهیه cDNA با استفاده از کیت-M RevertAid™ MuLV شرکت Vivantis صورت گرفت. مقدار غلظت RNA مورد استفاده 2µg بود.



شکل ۲- RNA استخراج شده از ۲۷ نمونه با استفاده از کیت RNX-Plus روی ژل آگارز ۱ درصد

Figure 2. The Extracted RNAs on Agarose Gel (27 plant samples by RNX-Plus extraction kit)

۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ میلی مولار در ارلن های حاوی سلول های یکنواخت با ۳ تکرار اعمال شد و با اندازه گیری وزن خشک سلولی به شیوه ای که در رابطه با شوری بیان شد، منحنی رشد سلولی در این حالت نیز بدست آمد و غلظت های محرک رشد و مهار کننده ی رشد سلولی در مقایسه با نمونه ی شاهد بدست آمد.

با بررسی منحنی های بدست آمده از رشد سلول های تحت تیمار شوری و سیانید پتاسیم، غلظت های مناسب ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم انتخاب و تیمار ترکیبی در ۹ غلظت مختلف ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۲، ۲/۰، ۴/۰، ۶/۰، ۸/۰ و ۱۲/۰ میلی مولار NaCl, KCN اعمال شد. پس از ۱۰ روز از اعمال تیمار، برداشت نمونه ها صورت گرفت و ماده گیاهی لازم جهت انجام آزمایشات ملکولی فراهم آمد. همچنین وزن تر توده سلولی برداشت شده (پس از ۱۰ روز) اندازه گیری و ثبت گردید.

طراحی آغازگر برای واکنش qRT-PCR

بدلیل عدم وجود توالی ژن های مورد مطالعه در گیاه *Aeluropus littoralis* در بانک ژن، ابتدا آغازگرهای اولیگونوکلوئیدی جهت انجام واکنش PCR، بر اساس نواحی حفاظت شده ی توالی ژنهای مورد نظر در سایر گیاهان مشابه با استفاده از ClustalW و NCBI BLAST طراحی شد. سپس قطعات ژنی حاصل از واکنش PCR با استفاده از وکتور TA به باکتری *E.Coli* DH5α منتقل و همسانه سازی قطعات ژنی صورت گرفت. پلاسمیدهای نو ترکیب جهت توالی یابی فرستاده شدند. پس از توالی یابی قطعات ژنی مورد نظر، آغازگرهای مناسب جهت واکنش qRT-PCR با استفاده از نرم افزار Primer Express V3.0 و Primer3 طراحی شد (جدول ۱). صحت آغازگرهای طراحی شده با استفاده از Primer Blast و نرم افزار آنالین IDT (Integrated DNA Technologies) تایید شد.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR

Table 1. Used primers in real time PCR

Gene name	Primer sequence F/R [5'-3']	Primer Tm[°C]	% GC	Amplicon length [bp]
<i>AdoMetS</i>	ACATGGTCATGGTCCTTGTTG	59.1	52	75 bp
	GGCAGGTCTCCCTGACAATCT	59.1	57	
<i>ACO</i>	GAGCTGATGGACGAGGTGGA	59.8	60	153 bp
	GTGGCGGACGAAGAAGGTG	60.2	63	
<i>CAS</i>	TGGGAACATGGGCATAGGAT	58.7	50	70 bp
	CGGCATCGTAAGAATGAGTTCA	58.8	45	
<i>RHO</i>	TTAGATGGAGGTTTGCCCCAGT	60.6	50	150 bp
	TGCTTCAAATGTGACAGGACCA	60.1	45	
<i>CYN</i>	GGAATCATGTCGGCCATTG	58.3	53	72 bp
	CACACGATCTTTCCATCGG	57.6	50	
<i>α-Tub</i>	TGGAGTTGGAGATCATGCTCA	58	48	64 bp
	ACAGTTGTGCCAGGTGGTGAC	60	57	
<i>Actin1</i>	GGATCTTTACGGCAATGTC	51.7	47	123 bp
	GGCGCAACTACCTTCACCT	54.2	53	
<i>Actin2</i>	TTGCTGGCCGAGACCTTAC	57.5	58	113 bp
	GGCGAGCTTTTCCTTGATG	57.1	53	

واکنش Real Time PCR

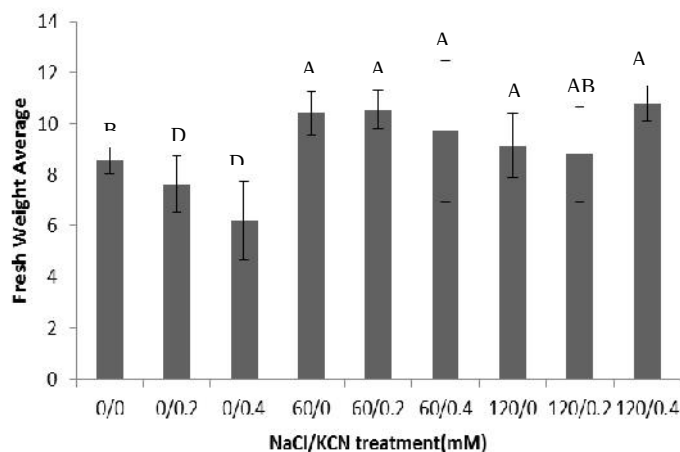
جدول ۲- مواد لازم جهت انجام Real time PCR

Table 2. Composition of Real time PCR reactions

Materials مواد	Quantities مقدار
SYBR GREEN Master Mix(2X)	6 µl
ROX Reference Dye(50x)	0.24 µl
cDNA Template(100 ng/ µl)	1 µl
Primers (5 µM each) F/R	0.6 + 0.6 µl
Distillated Water	3.56 µl
Total volume	12 µl

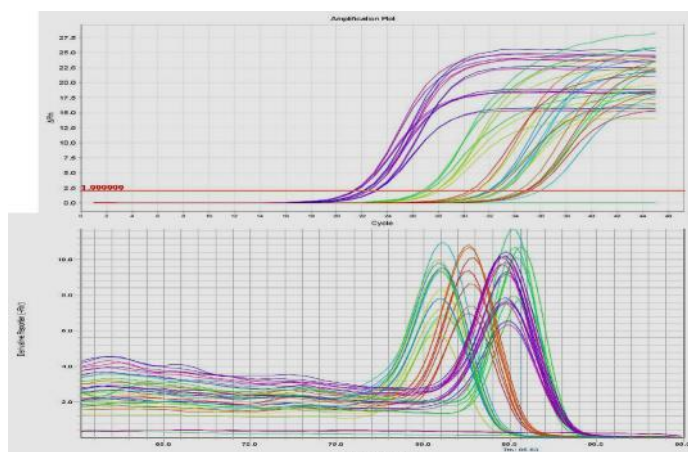
بعد از ۴۵ سیکل به منظور آزمون اختصاصی بودن تکثیر، از منحنی دمای ذوب استفاده شد که برنامه آن به شرح زیر می باشد: ابتدا به ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه و افزایش دما با سرعت ۰/۳°C در دقیقه از دمای ۶۰°C تا دمای ۹۵°C و توقف در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه صورت گرفت. مطابق مقالات منتشر شده توسط Oracz 2008 و Caldana 2007 ژن های خانه دار α .tubulin و actin1

جهت مقایسه میزان تظاهر ژن های درگیر در مسیر بیوستز و متابولیسم سیانید هیدروژن، آزمون Real Time PCR برای ۲۷ نمونه (۹ نمونه تیمار شده و از هر کدام ۳ تکرار) انجام گرفت. در این آزمون، کمیت سنجی بیان ژن به صورت نسبی انجام گرفت. آزمون Real Time PCR با استفاده از معرف سایبر گرین (SYBR GREEN) شرکت Bioneer انجام گرفت. دستگاه مورد استفاده، دستگاه ترمال سایکلر مدل ABI StepOne ساخت شرکت Applied Biosystems بود و واکنش Real Time PCR در میکروپلیت ۴۸ چاهکی و در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در واکنش، طبق جدول ۲ می باشد. چرخه های دمایی نیز، به شرح زیر انتخاب شدند: واسرشت سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ چرخه دمایی شامل واسرشت سازی در ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، و اتصال پرایمر و تکثیر در دمای ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه انجام گرفت.



نمودار ۱- میانگین وزن تر سلول ها در پاسخ به غلظت های مختلف شوری و سیانید پتاسیم.

Graph 1. The wet weight means of cells in response to different concentrations of NaCl and KCN



شکل ۳- رسم منحنی تکثیر PCR (بالا) و منحنی ذوب (پایین) ژنهای مورد مطالعه در چند تیمار متفاوت، با استفاده از Real Time PCR.

Figure 3. The obtained graphs of qPCR

واکنش Quantitative RT-PCR

جهت مقایسه میزان تظاهر شبکه ژنی درگیر در مسیر بیوستتر و متابولیسم سیانید هیدروژن، آزمون Real Time PCR برای ۲۷ نمونه انجام گرفت. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی

actin2 به عنوان کنترل درونی انتخاب و با استفاده از واکنش q-RT-PCR در ۲۷ نمونه (۹ تیمار به همراه ۳ تکرار) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس بر اساس مقایسه تغییرات بیان هر یک از این ژن ها با مقایسه میزان Ct و نیز ارزیابی پایداری بیان هر کدام از آنها، بهترین ژن خانه دار به عنوان کنترل درونی، α .tubulin شناخته شد. سپس آزمون qRT-PCR برای کلیه ژن های مورد مطالعه و نیز ژن α .tubulin، برای هر نمونه انجام گرفت. جهت اطمینان از عدم آلودگی ترکیبات به کار رفته در واکنش، از کنترل منفی استفاده شد.

آنالیز واکنش qRT-PCR

کمیت سنجی بیان ژن در آزمون Real Time PCR به صورت نسبی انجام گرفت. در این ارزیابی میزان بازده PCR دارای اهمیت می باشد. پس از اندازه گیری میزان Ct، برای ۶ ژن مورد مطالعه (۵ ژن درگیر در مسیر بیوستتر و متابولیسم سیانید هیدروژن و نیز یک ژن کنترل درونی) در ۲۷ نمونه تیمار شده در غلظت های مختلف NaCl و سیانید، کارایی پی سی آر با استفاده از نرم افزار LinRegPCR تعیین و پس از محاسبات آماری با استفاده از برنامه Excell، میزان بیان هر ژن طبق فرمول Pfaffl محاسبه گردید (Pfaffl 2001).

نتایج و بحث

تیمار همزمان NaCl و سیانید

با آنالیز و بررسی منحنی های بدست آمده از رشد سلول های تحت تیمار شوری و سیانید پتاسیم، غلظت های مناسب ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم انتخاب و تیمار همزمان اعمال گشت. نتایج حاصل از اندازه گیری وزن تر سلول ها در مرحله برداشت در نمودار شماره ۱ آمده است.

ذوب در این مطالعه نشان داد که تکثیر تمام ژنها به صورت اختصاصی و فاقد محصولات غیر اختصاصی نظیر پرایمر دایمر است. شکل ۳ منحنی ذوب ژن های مورد مطالعه را در تعدادی از تیمارها نشان می دهد.

میانگین بیان و انحراف معیار برخی ژن های درگیر در متابولیسم و پالایش سیانید هیدروژن در گیاه *Aeluropus littoralis* در غلظت های مختلف سیانید پتاسیم و شوری و اثرات متقابل این دو تیمار در جدول ۳ آورده شده است. سپس با استفاده از نرم افزار SAS، آنالیز آماری نتایج حاصل از میزان بیان ژن های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف، انجام گرفت. جدول ۴ نتایج حاصل از تجزیه واریانس و جدول ۵ نتایج حاصل از مقایسه میانگین در سطح ۰/۰۵ به شیوه آزمون LSD را نشان می دهند.

میزان بیان شبکه ژنی درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و

برهمکنش های متفاوت این دو تیمار، بررسی و مطالعه شد. بررسی و مقایسه میزان تظاهر شبکه ژنی درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در غلظت های ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم و همچنین افزایش غلظت سیانید پتاسیم در یک غلظت ثابت از شوری و افزایش غلظت شوری در یک غلظت ثابت از سیانید پتاسیم انجام گرفت. نمودارهای ۲ تا ۶، میزان بیان ژن های مورد مطالعه را در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های متفاوت این دو تیمار نشان می دهد. همچنین نمودارهای مربوط به رشد سوسپانسیون سلولی گیاه آلروپوس لیتورالیس تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری و سیانید پتاسیم و برهمکنش های مختلف این دو تیمار، رسم و با میزان تظاهر ژن های مورد مطالعه تحت این تیمارها مقایسه گشت.

جدول ۳- مقایسه اثرات متقابل شوری و سیانید پتاسیم بر میزان بیان برخی ژنهای درگیر در متابولیسم و پالایش سیانید هیدروژن در گیاه

Aeluropus littoralis

Table 3. The effect of NaCl and KCN treatments on the expression of some genes in Hydrogen Cyanide metabolism in *Aeluropus littoralis*

Treatment	Genes											
NaCl,KCN(mM)	AdoMet S.		CAS		RHO		CYN		ACO			
	Ratio	Average	STDEV	Ratio	Average	STDEV	Ratio	Average	STDEV	Ratio	Average	STDEV
0,0 mM	1	0		1	0		1	0		1	0	
0,0,2 mM	0.675407306	0.090354666		0.846505301	0.059813682		1.508548372	0.709069141		0.947872754	0.062010359	
0,0,4 mM	0.997400271	0.03159976		1.062982028	0.056353122		1.083596421	0.040019962		0.988466253	0.013649846	
60,0 mM	0.836165056	0.076993867		1.050064388	0.045815188		0.984480532	0.002230736		1.00201949	0.005768918	
60,0,2 mM	1.065925174	0.054647263		0.997049115	0.03038948		3.888757837	1.941537097		1.013274837	0.02823638	0
60,0,4 mM	1.038153694	0.034786373		0.975195463	0.026190332		1.056623476	0.047810584		1.021002904	0.054976387	0
120,0 mM	0.954202183	0.070123171		1.021408528	0.045023525		1.095016424	0.063666122		0.998488778	0.001824087	
120,0,2 mM	0.756449585	0.144049465		0.971733351	0.030124894		1.018481197	0.037001618		1.004154782	0.004899679	
120,0,4 mM	1.024993377	0.050063248		0.93831741	0.025136527		2.027850242	1.506330548		0.970667034	0.049930347	

Abbreviations: AdoMet S.: S-adenosylmethionine synthetase, CAS: β -cyanoalanine synthase, RHO: Rhodanese, CYN: Cyanase, ACO: acc oxidase, STDEV: standard deviation

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف شوری و سیانید، بر روی ژن های مورد مطالعه

Table 4. Analysis of variance of NaCl and cyanide treatments on the studied Genes

نام ژن	تغییرات	DF	SS	MS	F value	Pr>F
AdoMet S.	Model	8	0.458751	0.057344	10.87**	<.0001
	Error	18	0.094922	0.005273	-	
	Total	26	0.553672	-	-	
CAS	Model	8	0.100927	0.012616	8.09**	0.0001
	Error	18	0.028057	0.001559	-	
	Total	26	0.128983	-	-	
RHO	Model	8	21.79052	2.723814	3.74**	0.0095
	Error	18	13.10138	0.727855	-	
	Total	26	34.8919	-	-	
CYN	Model	8	0.012081	0.00151	1.3 ^{ns}	0.3021
	Error	18	0.020835	0.001158	-	
	Total	26	0.032916	-	-	
ACO	Model	8	4.202994	0.525374	42.1**	<.0001
	Error	18	0.224603	0.012478	-	
	Total	26	4.427597	-	-	

** معنی دار در سطح ۱ درصد. ns: non significant

جدول ۵- مقایسه میانگین بیان ژن های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف شوری و سیانید

Table 5. The Expression levels of studied genes in different NaCl and cyanide treatments

تیمار NaCl,KCN(mM)	تکرار	میانگین بیان ژن				
		AdoMet S.	CAS	RHO	CYN	ACO
0,0	3	1	1	1	1	1
		A	ABC	B	AB	D
0,0.2	3	0.67541	0.84651	1.5085	0.94787	1.40798
		D	D	B	B	A
0,0.4	3	0.9974	1.06298	1.0836	0.98847	1.11624
		A	A	B	AB	DC
60,0	3	0.83617	1.05006	0.9845	1.00202	1.03464
		BC	A	B	AB	DC
60,0.2	3	1.06593	0.99705	3.8888	1.01327	0
		A	ABC	A	A	E
60,0.4	3	1.03815	0.9752	1.0566	1.021	1.38812
		A	BC	B	A	AB
120,0	3	0.9542	1.02141	1.095	0.99849	1.20925
		AB	AB	B	AB	BC
120,0.2	3	0.75645	0.97173	1.0185	1.00415	1.06615
		DC	BC	B	AB	DC
120,0.4	3	1.02499	0.93832	2.0279	0.97067	1.20279
		A	C	B	AB	BC

مقایسه میانگین در سطح 0.05 با آزمون LSD انجام شد.

بررسی تاثیر شوری بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید

هیدروژن

نتایج نشان داد افزایش غلظت شوری به تنهایی و بدون اعمال سیانید پتاسیم، تاثیر معنی داری بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید (نمودارهای ۴ و ۵) و همچنین رشد سلولی (نمودار ۱) ندارد. این نتایج نشان داد که سلول های آلروپوس در طول دوره این آزمایش امکان مدیریت شرایط شوری را فراهم کرده اند.

بررسی تاثیر برهم کنش سیانید پتاسیم و شوری بر بیان ژن های

درگیر در پالایش سیانید هیدروژن

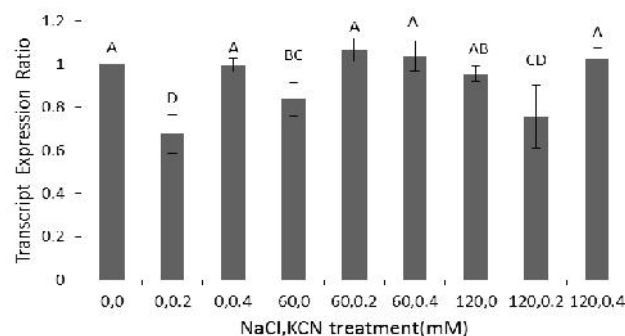
افزایش شوری در غلظت ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم (غلظت های ۰/۴ و ۶۰/۴ و ۱۲۰/۴ میلی مولار NaCl, KCN)، تاثیر معنی داری در رشد سلولی داشت (نمودار ۱). طوری که تا بیش از ۴۰٪ امکان افزایش رشد را فراهم نمود. در این غلظت میزان بیان ژن CAS به طور معنی داری کاهش یافت (نمودار ۴).

بررسی بیان ژن کلیدی ACO، مسئول مستقیم بیوستز سیانید

درون سلولی

افزایش شوری در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار سیانید پتاسیم (غلظت های ۰/۲ و ۶۰/۲ و ۱۲۰/۲ میلی مولار NaCl, KCN)، منجر به کاهش معنی دار بیان ژن ACO -ژن کلیدی بیوستز سیانید هیدروژن و اتیلن- شد (نمودار ۳). همچنین در این دامنه غلظت، ما شاهد افزایش معنی دار رشد توده سلولی بودیم (نمودار ۱). با استناد بر آزمایشات صورت گرفته در این تحقیق و نیز با توجه به اثر مهاري اتیلن بر رشد گیاه (Siddikee et al., 2011)، می توان گفت احتمالا کاهش بیان ژن ACO در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار سیانید خارجی باعث کاهش تولید اتیلن و سیانید درون سلولی و به دنبال آن افزایش رشد شده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که علیرغم اثرات کاهنده سیانید بر رشد سلول، تیمار سیانید هیچ نقشی در القای ژن های درگیر در سمیت زدایی سیانید هیدروژن ندارد. این در حالی است که احتمالا به نظر می رسد اعمال سیانید در یک غلظت معین در حضور شوری می تواند در یک هماهنگی مولکولی امکان ارتقاء رشد سلولی را فراهم کند.

AdoMet S.

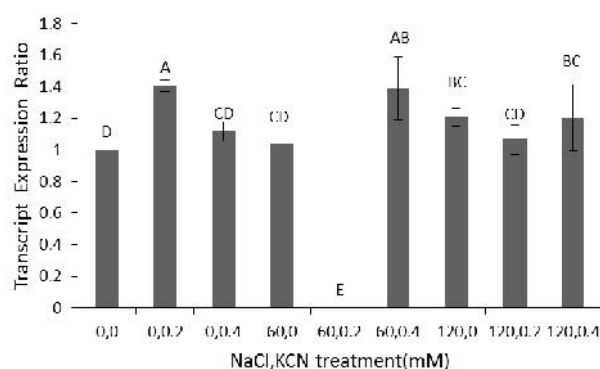


نمودار ۲- میزان بیان ژن کد کننده *AdoMet Synthase* در غلظت های

مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 2- The expression level of AdoMet Synthase gene in different NaCl and KCN treatments

ACO



نمودار ۳- میزان بیان ژن کد کننده *ACC Oxidase* (ACO) در غلظتهای

مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 3- The expression level of ACC Oxidase gene in different NaCl and KCN treatments

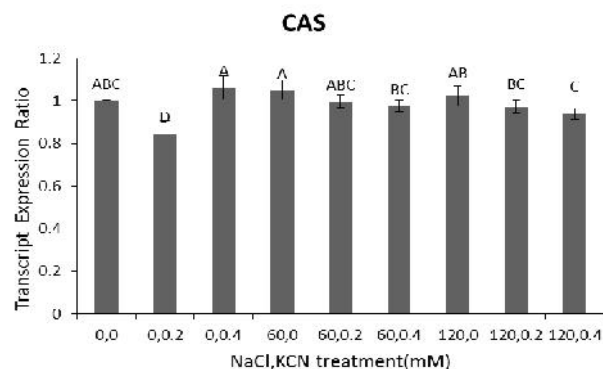
بررسی تاثیر سیانید پتاسیم بر بیان ژن های درگیر در پالایش

سیانید هیدروژن

افزایش غلظت سیانید پتاسیم به تنهایی و بدون اعمال سیانید پتاسیم، علاوه بر اینکه تاثیر معنی داری برافزایش بیان ژن های درگیر در حذف سیانید درون سلولی نداشت (نمودارهای ۴ و ۵)، باعث کاهش رشد توده سلولی نیز شد (نمودار ۱).

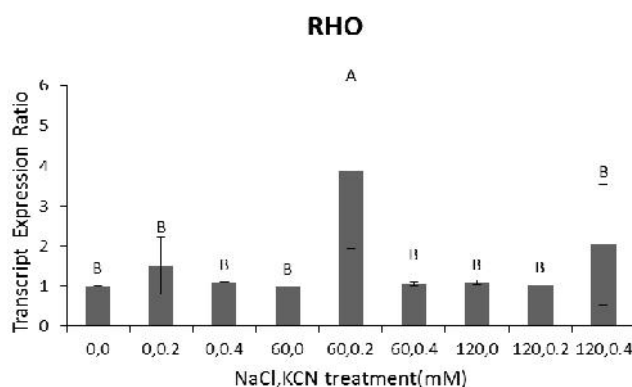
منابع

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., and Saltveit, M.E. Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. San Diego, CA, Academic.
- Ahmad R., S.H. Zaheer and S. Ismail. 1992. Role of silicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Science 85(1), 43-50.
- Bogatek R, Co^{me} D, Corbineau F, Picard MA, Z_{arska}- Maciejewska B, Lewak S. 1999. Sugar metabolism as related to the cyanide-mediated elimination of dormancy in apple embryos. Plant Physiology and Biochemistry 37, 577-585.
- Bogatek R, Lewak S. 1991. Cyanide controls enzymes involved in lipid and sugar catabolism in dormant apple embryos during culture. Physiologia Plantarum 83, 422-426.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. J.Exp.Bot, 55, 307-319.
- Fowler, S. and Thomashow, M.F. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell 14, 1675-90.
- Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvorak J, Hollington PA, Luo MC, Khan JA. 1997. Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K⁺/Na⁺ discrimination in wheat. New Phytol 137, 109-116.
- Hall M. A., Smith A.R. 1995. Ethylene and the responses of plants to stress, BULG. J. PLANT PHYSIOL., 1995, 21, 71-79.
- Oracz K., Hayat El-Maarouf-Bouteau, Renata Bogatek, Francoise Corbineau and Christophe Bailly. 2008. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway, Journal of Experimental Botany, 59(8), 2241-2251.
- Petrizzelli L, Coraggio I, Leubner-Metzger G. 2000. Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. Planta 211, 144-149.
- Pfaffl Michael W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Research, 29(9).
- Pirrung MC, Brauman JI. 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis. Plant Physiology and Biochemistry 25, 55-61.
- Smith JM, Arteca RN. 2000. Molecular control of ethylene production by cyanide in Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum 109, 180-187.



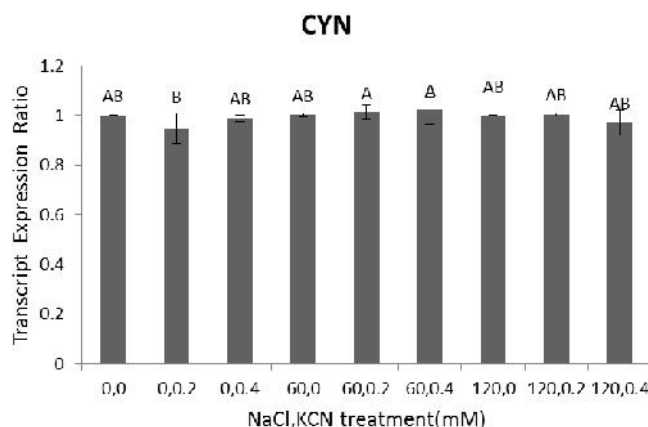
نمودار ۴- میزان بیان ژن کد کننده β . Cyanoalanine Synthase (CAS) در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 4- The expression level of β . Cyanoalanine Synthase (CAS) gene in different NaCl and KCN treatments.



نمودار ۵- میزان بیان ژن کد کننده β . Rhodanese (RHO) در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 5- The expression level of Rhodanese (RHO) gene in different NaCl and KCN treatments.



نمودار ۶- میزان بیان ژن کد کننده Cyanase (CYN) در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 6- The expression level of Cyanase (CYN) gene in different NaCl and KCN treatments.

بررسی الگوی پروتئومی جو بهاره (*Hordeum vulgare*) تحت تنش

سرماي کوتاه مدت

The Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves under Short term Cold Stress

رعنا ولی زاده کامران^{۱،۲}، محمود تورچی^{۱*}، محمد مقدم^۱ و حمید محمدی^۳

Rana valizadeh kamran^{1,2}, Mahmood Toorchi^{1*}, Mohammad Moghaddam¹,
Hamid Mohammadi³

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- گروه بیوتکنولوژی، ۳- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
کیلومتر ۳۵ جاده تبریز مراغه

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biotechnology and 3. Department of Agronomy - Faculty of
Agriculture Azarbaijan Shahid Madani University, km35 Tabriz-Maragheh Road

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۱)

چکیده

سرما یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که باعث ایجاد محدودیت در رشد گیاهان و کاهش تولید محصول در مناطق سردسیر و معتدل می‌شود. برای درک مکانیسم مولکولی سازش گیاهچه‌های جو بهاره با سرماي کوتاه مدت، تغییرات پروتئومی برگ جو مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور سرماي ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی گیاهچه‌های جو رقم *Aths* اعمال گردید. سپس برگهای سوم برداشت شده و با گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط نرمال ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی آبی کوماسی انجام شد. ۱۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای اختلاف معنی دار از نظر بیان بین شرایط تنش و کنترل شناسایی شدند که ۱۰ لکه افزایش بیان و ۵ لکه کاهش بیان در تنش سرماي چهار درجه را نشان دادند. با استفاده از طیف سنجی جرمی MALDI-TOF ۷ لکه پروتئینی شناسایی شدند که این پروتئین‌ها در مسیرهای چرخه کالوین، انتقال الکترون، واکنش نوری و ترانسانی علامت درگیر بودند. افزایش بیان در پروتئین‌هایی مشاهده گردید که در یکپارچگی کلروپلاست، متابولیسم انرژی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتز دخالت داشتند. این بررسی نشان داد که تنش سرما در جو بهاره فتوسنتز را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

جو
پروتئوم
سرما
الکتروفورز دو بعدی
MALDI-TOF

مقدمه

تنش سرما تاثیر شدیدی بر رشد و نمو و بقای گیاهان دارد (Xu et al. 2008). عدم تحمل به سرما یکی از عوامل اصلی کاهش تولید محصول می باشد. گیاهان وقتی در معرض دماهای پائین قرار می گیرند برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می نمایند (Gomat et al. 2011). گیاه جو در انواع بهاره و زمستانه وجود دارد. برای جلوگیری از تنش گرما و خشکی آخر فصل، لازم است که ارقام بهاره زودتر کشت شوند (Gusta and Fowler, 1977). بنابراین احتمال اینکه تیپ بهاره مورد تنش سرمای بهاره قرار گیرد وجود دارد. سرمای بهاره در اواخر مراحل رویشی و شروع مرحله زایشی به غلات آسیب می رساند و عملکرد آنها را حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش می دهد (Shroyer et al. 1995; Zhong et al. 2008). برنامه های اصلاحی نسبت به عادت دهی به سرما و انجماد زمستانی، کمتر مورد بررسی قرار گرفته شده است (Galiba et al. 2009). تنش سرما باعث ایجاد طیف گسترده ای از پاسخ های فیزیو-بیوشیمیایی و تغییرات بیان ژن در گیاهان می شود (Chinnusamy et al. 2007; Heidarvand and Maali Amiri, 2010) که باعث تحمل گیاه به تنش سرما می شوند. پروتئین ها نقش بسیار مهمی را در پاسخ گیاهان به تنش ایفا می کنند چرا که در تغییرات ساختاری و هم تغییرات متابولیکی گیاه نقش دارند. پروتئین ها در تنش سرمای گندم و جو در قسمت های سوخت و ساز انرژی، فنوستت، مهار گونه های فعال اکسیژن، تنظیم چرخه سلولی، رشد گیاه و حفاظت در برابر تنش درگیر هستند (Kosová et al. 2014). مطالعات پروتئومی باعث شناسایی پروتئین های جدید درگیر در پاسخ به تنش سرما در گیاهان شده اند که در غلات نیز چندین مطالعه تجزیه پروتئوم پاسخ به تنش سرما انجام گرفته است (Vitamvase et al. 2007; Sarhadi et al. 2010; Rinalducci et al. 2011; Vitamvase et al. 2012; Xu et al. 2013; Kosova et al. 2013; Gharechahi et al. 2014). علیرغم تلاش های زیاد در مورد درک پروتئین های پاسخگو به سرما اطلاعات محدودی در مورد پاسخ پروتئومی جو وجود دارد. بنابراین لازم است تجزیه پروتئوم جو در پاسخ به تنش سرما مورد

تجزیه و تحلیل قرار گیرد تا اطلاعات مفیدی از درک مکانیسم مولکولی سرما در این گیاه به دست آید. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر تنش سرمای کوتاه مدت بر الگوی پروتئینی برگ جو بهاره و شناسایی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش با استفاده از راهکار پروتئومیکس می باشد. استفاده از این اطلاعات در کنار سایر تکنیک های مولکولی ضمن شناسایی دقیق تر اثرات تنش سرما بر گیاه و مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش سرما، می تواند بستر مناسبی را جهت بهبود صفت تحمل به سرما را در جو و گیاهان مشابه فراهم آورد.

مواد و روش ها

شرایط گیاه و نحوه اعمال سرما

بذور جو بهاره Aths از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در ۳ تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. بذور در مخلوط پرلیت و ماسه به نسبت ۵ به ۲ در گلدان کاشته شد. گلدان ها در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد، رطوبت ۷۰٪ و طول روز ۱۶ ساعت قرار گرفتند و تا زمان رسیدن به مرحله سه برگه هر روز آبیاری شدند. زمانی که گیاهان به مرحله سه برگه رسیدند، تنش سرمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال قابل برنامه ریزی سرما روی تعدادی از گلدان ها به صورت تصادفی به مدت ۴۸ ساعت اعمال گردید و با گیاهان رشد داده شده در شرایط دمایی طبیعی گلخانه از نظر الگوی پروتئوم مورد مقایسه قرار گرفتند. با توجه به اینکه گیاهان تحت تنش سرما در یخچال در تاریکی قرار می گرفتند گیاهان شاهد هم به مدت دو روز در تاریکی قرار گرفتند.

استخراج پروتئین

نیم گرم از بافت برگ در ازت مایع خرد شد و سپس در محلولی که شامل ۵ میلی لیتر (۱۰۰٪) TCA، ۴۵ میلی لیتر استون سرد و ۷۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول بود، هموژنیزه گردید. عصاره پروتئینی توسط سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۹۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد. بر روی رسوب به دست آمده بافر لیز (اوره، تیو اوره، چپس، آمفولین ۱۰-۳ pH) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در

دانیسومتر GS800 ساخت شرکت Bio-Rad تصویربرداری شدند و سپس توسط نرم افزار PDQuest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و لکه های دارای تغییر بیان معنی دار از ژلها جدا شدند.

شناسایی پروتئین ها از طریق روش طیف سنجی جرمی و جستجو در بانکهای اطلاعاتی

به منظور شناسایی پروتئین از انگشت نگاری جرم پپتید استفاده گردید که برای این منظور از روش MALDI-TOF در استفاده شد. شناسایی پروتئینها در مرکز ژنومیکس و پروتئومیکس دانشگاه Tucsia ایتالیا انجام گردید.

نتایج و بحث

بعد از کمی کردن لکهها توسط نرم افزار و انجام آزمون t مجزا برای لکههای پروتئینی، تعداد ۷۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای تفاوت معنی دار بین دو شرایط شاهد و تنش سرمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، شناسایی شد از ۱۵ لکه پروتئینی، ده لکه پروتئینی ۱۸۰، ۱۰۶۶، ۲۱۱۵، ۲۱۷۳، ۲۲۱۵، ۲۳۳۵، ۲۳۶۲، ۲۹۰۶، ۳۲۴۸، ۳۲۶۲ افزایش بیان و پنج لکه ۶۸۰، ۲۴۴۷، ۲۸۸۹، ۲۹۹۹ و ۳۷۷۰ کاهش بیان نشان دادند. از این تعداد با استفاده از روش MALDI-TOF، خصوصیات و نقش هفت پروتئین درگیر در تنش سرما مشخص شد و مشخصات این پروتئینها در جدول شماره ۱ آورده شده است. پروتئینهای دارای تغییر بیان معنی دار در چهار گروه عملکردی قرار گرفتند (شکل ۱). پروتئینهای مرتبط با چرخه کالوین، انتقال الکترون، واکنش نوری فتوسنتز هر کدام ۲۸/۵٪ و پروتئینهای دخیل در ترانسانی پیام ۱۴/۲۵٪ از پروتئینها را به خود اختصاص دادند. لکههای پروتئینی دارای تغییر بیان در شکل ۲ نشان داده شده است.

پروتئینهای دخیل در واکنش نوری فتوسنتز

لکه های پروتئین ۲۱۱۵ و ۳۷۷۰ در این گروه قرار گرفتند. لکه شماره ۲۱۱۵ پروتئین متصل شونده به ساخنا ساقه حلقه کلروپلاستی یا Chloroplast stem-loop binding protein of 41b (CSP41b) می باشد که افزایش بیان نشان داده است.

دمای ۲۵°C با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و محلول روئی جمع آوری و به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

تعیین غلظت پروتئینها

برای اندازه گیری میزان غلظت پروتئینها از روش برادفورد استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفومتر با محلول BSA کالیبره و منحنی استاندارد رسم گردید، سپس میزان جذب نمونهها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

الکتروفورز دو بعدی

الکتروفورز بعد اول

در بعد اول الکتروفورز پروتئینها بر حسب بار الکتریکی در یک میدان الکتریکی از یکدیگر تفکیک شدند که در این تحقیق از تیوب ژلهایی با طول ۱۱ سانتی متر و قطر ۳ میلی متر استفاده شد (O'Farrell, 1975). برای تهیه ژل بعد اول از اوره، پلی آکرلامید ۳۰٪، NP-40، آمفولینهای با pH (۳-۱۰) و pH (۵-۸) APS و TEMED استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله به ترتیب ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت اجرا گردید.

الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE)

در الکتروفورز بعد دوم پروتئینها بر اساس وزن مولکولی از یکدیگر جدا می شوند. ژل بعد دوم به صورت دو قسمتی شامل ژل جدا کننده و ژل نگهدارنده تهیه گردید. قبل از انجام بعد دوم نوار ژلها به مدت ۱۵ دقیقه در SDS sample buffer شناور گردیدند سپس نوار ژل بر روی ژل آکرلامید قرار گرفت و با محلول ژل آگارز ۰/۵ درصد پوشانده شد. به ازای هر ژل ۲۰۰ میکرولیتر (برای دو ژل ۴۰۰ میکرولیتر) نشانگر آبی بروموفنول بلو داخل بافر ریخته شد تا میزان حرکت اولین (سبکترین) لکه پروتئینی به انتهای ژل کنترل شود و عملیات توقف گردد. سپس عملیات رانش با جریان ثابت ۳۵ میلی آمپر برای هر ژل و مدت زمان ۳-۲/۵ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید.

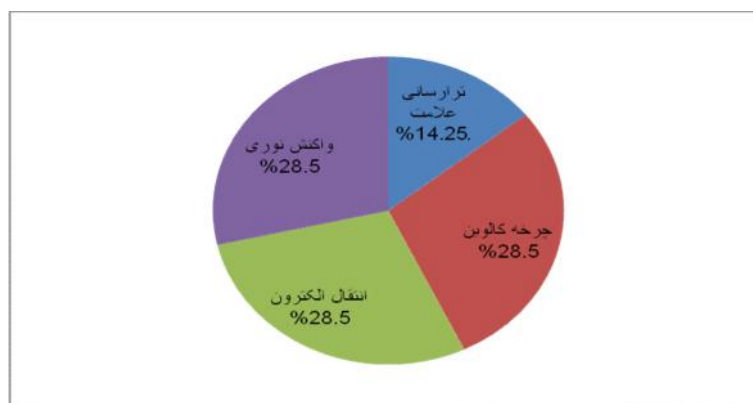
رنگ آمیزی و تصویر برداری

بعد از اتمام الکتروفورز بعد دوم، ژلها توسط محلول رنگ آمیزی آبی کوماسی رنگ آمیزی شدند. ژلها توسط دستگاه

جدول ۱- اسامی و خصوصیات پروتئین های پاسخ دهنده به تنش سرما در رقم Aths

Table 1: Cold responsive proteins of Aths leaves (susceptible barley) during short- term cold stress with LC – MS/MS

گروه عملکردی	شماره لکه	Score	نام پروتئین	طبقه بندی	Accession No	Theoretical MW (kDa)	Theoretical pI	Experimental MW (kDa)	Experimental pI
انتقال الکترون	۲۱۷۳	۱۶۷	ATPase beta subunit chloroplast	Hordeum vulgare	gi 11583	۵۳.۸۹۹	۵.۱۱	۱۱۴.۱	۵.۶
	۳۲۴۸	۵۶	Mitochondrial thioredoxin	Hevea brasiliensis	gi 329750617	۲۰.۳۴۱	۹.۴۱	۲۷.۲	۴.۴
چرخه کالوین	۱۸۰	۷۹	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Pentas lanceolata	gi 294117	۵۳.۴۷۸	۶.۱۳	۸۷.۲	۶.۲۴
	۲۳۶۲	۵۴	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase activase isoform 1	Hordeum vulgare	gi 167096	۴۷.۳۴۱	۸.۶۲	۴۳.۲	۵.۴۸
واکنش نوری	۲۱۱۵	۸۳	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic-like	Oryza brachyantha	gi 573963758	۴۱.۶۳۶	۸.۳۱	۳۸.۳	۷.۴
	۳۷۷۰	۵۳	Photosystem I reaction Ncenter subunit IV	Hordeum vulgare	gi 131176	۱۵.۴۴۷	۹.۸۲	۲۲.۱	۹.۷۰
ترارسانی علامت	۲۴۴۷	۳۰۸	protein homologue ۳-۳-۱۴	Hordeum vulgare subsp. vulgare	gi 22607	۲۹.۳۶۱	۴.۸۳	۳۱.۱	۵.۱۷

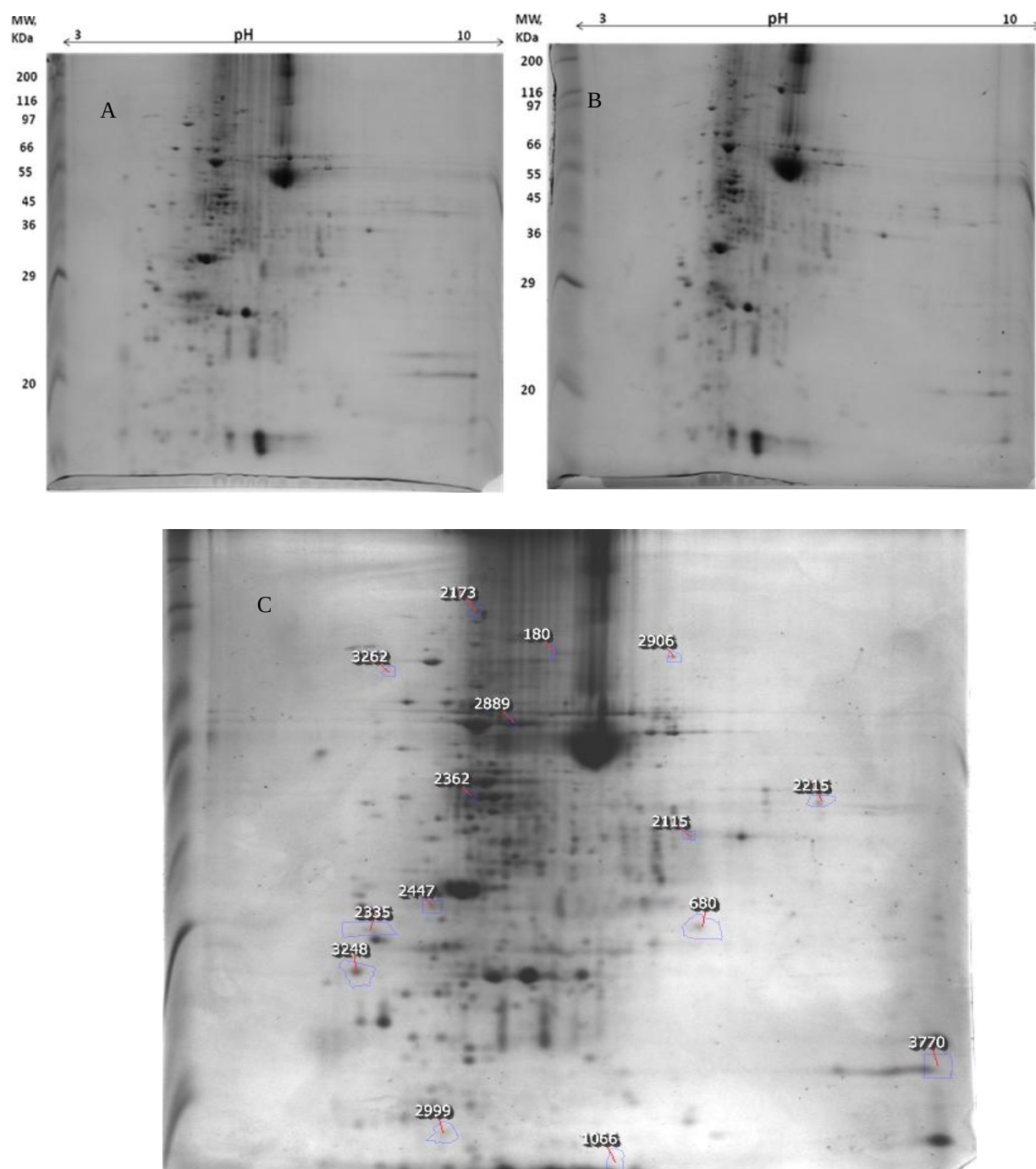


شکل ۱- فراوانی نسبی گروه های عملکردی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش سرما در رقم Aths

Fig. 1. The relative frequency of protein functional groups responding to cold stress.

قسمت 3'UTR است که باعث اتصال پروتئین های متصل شونده از جمله CSP41b به این قسمت می شود که CSP41 پیرایش mRNA PetD را انجام داده و باعث ثبات آن می گردد (Yang et al., 1995). بیان این پروتئین همچنین در پاسخ به محرک های رشدی، محیطی، پیری و کم آبی تحت تاثیر قرار می دهد (Raab et al., 2006).

بیان ژن های کلروپلاستی برای تجمع فراورده های فتوسنتزی ضروری می باشد. مجموعه رونویسی و ترجمه نیز به طور قابل توجهی متکی بر پروتئین های کلروپلاستی است که به نوبه خود تا حد زیادی به وسیله فاکتورهای کد کننده هسته ای تنظیم می شوند. گروه های به خصوصی از تنظیم کننده ها شامل پروتئین های هسته ای هستند که یا RNA را برش می دهند و یا به RNA متصل می شوند و پیرایش RNA را واسطه گری می کنند و باعث ثبات پیرایش و ترجمه می شوند. از پروتئین های کلروپلاستی متصل به RNA که خصوصیات بیوشیمیایی آنها مشخص شده می توان به CSP41 اشاره کرد که دارای همولوگهای a و b می باشد (Bollenbach et al., 2008). در کلروپلاست اسفناج CSP41a هم به عنوان ریبونوکلاز (اتصال به ساختار ساقه- حلقه RNA و برش آن) و هم به عنوان پروتئین متصل شونده به RNA برای فعالیت آن در mRNA30s مطرح شده است (Yang et al., 1996). CSP41b نیز به عنوان همولوگی از CSP41a از گیاه توتون خالص سازی شده (Pfanschmidt et al., 2000) و نشان داده شده که در گیاهچه های آرابیدوپسیس می تواند به RNA متصل شود که RNA هدف این پروتئین PetD RNA می باشد (Raab et al., 2006). ژن PetD کلروپلاستی، کد کننده زیر واحدی از کمپلکس سیتوکروم b6 است که انتقال الکترون بین PSI و PSII را واسطه گری می کند. mRNA این ژن ها همانند بیشتر mRNA های کلروپلاستی، دارای ساختار ساقه حلقه در



شکل ۲- مقایسه الگوی الکتروفورز دو بعدی رقم Aths در شرایط شاهد (A) و تنش سرمای چهار درجه سانتیگراد (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار روی ژل مرجع (C)

Fig. 2. The two-dimensional gel electrophoresis pattern of Aths in the control condition (A), cold stress at 4 °C (B), and protein spots with significant expression changes on the representative gel (C)

علاوه بر وظایف ذکر شده، وظایف دیگری مانند تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست، یکپارچگی کلروپلاست، تجمع واحدهای ریبوزومی و تنظیم هترو پلی ساکاریدها را به این پروتئین نسبت داده‌اند. بنابراین افزایش بیان این پروتئین در شرایط تنش می‌تواند برای مقابله با اثرات تنش سرما صورت گیرد که باعث تخریب کلروپلاست و کاهش رونویسی خواهد شد. از طرف دیگر احتمالاً به صورت غیرمستقیم از طریق افزایش ثبات پروتئین Pet D باعث افزایش انتقال الکترون بین PSI و PSII گردد که این امر ممکن است بدلیل تلاش کلروپلاست برای رسیدن به یک وضعیت بازایی در انتقال الکترون از PSII و تولید انرژی باشد.

لکه شماره ۳۷۷۰ که در واکنش نوری فتوسنتز دخیل است، پروتئین مرکز واکنش فتوسیستم I زیر واحد Photosystem I IV (reaction center subunit IV) می‌باشد که در اثر تنش سرما بیان آن کاهش یافته است. این پروتئین به اختصار PSaE نامیده می‌شود. کمپلکس PSI در بیشتر گیاهان از ۱۳ زیر واحد تشکیل شده است که ۵ زیر واحد آن به وسیله ژنوم کلروپلاستی و هشت زیر واحد آن توسط ژنوم هسته رمز می‌گردند. از زیر واحدهای اصلی آن می‌توان به PSaA PSaB PSaC PSaD و PSaE اشاره کرد. PSaE یک زیر واحد آبدوست در معرض استرومای کلروپلاستی بوده و ۸ کیلو دالتون وزن دارد (Falzone et al., 1994). دارای لوپ یا حلقه ای است که این حلقه با PSaA PSaB و PSaC درگیر است. عملکردهای مختلفی برای PSaE گزارش شده که از آن جمله می‌توان به کمک به اتصال فردوکسین به PSI و بر هم کنش با فردوکسین NADP اکسیدوریداکتاز، اشاره کرد (Andersen et al., 1992). شواهد متعددی نشان داده است که در شرایط سرما و یخ بندان PSI می‌تواند مورد هدف بازدارندگی نوری قرار گیرد که در این حالت زنجیره انتقال الکترونی نامتعادل می‌گردد (Sonoike and Terashima, 1994). از طرف دیگر کاهش فعالیت یا حساسیت PSI به شرایط سرمایی را به علت کاهش توانایی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سم زدایی ROS ها بیان کرده‌اند (Ivanov et al., 1998). به عبارت دیگر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باعث کاهش فعالیت فتوسیستم I می‌گردد. بنابراین

کاهش بیان PSaE در رقم حساس Aths می‌تواند به علت افزایش تولید H_2O_2 و OH- در چرخه مهلر (Mehler) باشد که این کاهش بیان به نوبه خود باعث کاهش اتصال فردوکسین به PSI شده و در انتقال الکترون در زنجیره الکترونی مشکل به وجود می‌آید و باعث کاهش تولید NADPH می‌گردد. گزارشاتی در مورد کاهش فعالیت PSI و اجزای آن در تنش‌های مختلف وجود دارد. در تنش خشکی بر روی گندم کاهش بیان پروتئین PSI subunit PSaC(VII) مشاهده شده است (Ford et al., 2011). قبولی و همکاران (Ghabooli et al., 2013) با بررسی تنش خشکی بر روی جو نیز کاهش فعالیت PSI و PSaC را گزارش کرده‌اند. همچنین کاهش PSaC در شرایط تنش شوری روی برگ جو توسط رسول نیا و همکاران (Rasoulnia et al., 2011) مشاهده گردیده است. در تنش فلزات نیز کاهش PSaC گزارش گردیده (Li et al., 2013) که علت آن را کاهش رنگدانه ها و کاهش فعالیت فتوسنتزی عنوان کرده‌اند.

انتقال الکترون

لکه شماره ۲۱۷۳ مربوط به ATPase زیر واحد بتا کلروپلاستی است که افزایش بیان نشان داده است. ATPase از دو بخش جدا از هم تشکیل شده است یک بخش آبدوست به نام F1 یا CF1 و یک بخش آب گریز به نام F0 یا CF0. F1 یا CF1 دارای پنج زیر واحد آلفا ، بتا (لکه شماره ۲۱۷۳ رقم حساس)، گاما، دلتا و اپسیلون است در حالی که CF0 دارای سه زیر واحد a, b و c می‌باشد (Godinot and pietro, 1989; Van Ballmooss and Dimorth, 2007). زیر واحد b نقش مهمی در متابولیسم انرژی به واسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون درون غشایی دارد (Ye et al., 2013). وو و همکاران (Wu et al., 2014) در تجزیه پروتئوم برگهای درخت توس تحت تنش سرما اعلام کردند که زیر واحد b، ATPase افزایش بیان داشته است. افزایش بیان زیر واحد بتای این آنزیم در آرابیدوپسیس تحت تیمار سرمایی نیز مشاهده گردیده است (Goulas et al., 2006). در این گزارش اعلام شده که این افزایش بیان به علت فرآیند دفاعی در مقابل تنش سرماست. در پژوهش حاضر می‌توان اظهار نظر کرد که افزایش بیان این آنزیم احتمالاً

احتمالاً می‌تواند به عنوان سازوکاری برای سم زدایی رادیکالهای آزاد در شرایط تنش سرما و مقاومت بخشیدن به این رقم باشد.

افزایش تیوردوکسین کلروپلاستی در برگ گندم در شرایط سرما و یخ بندان (Kosova et al., 2013)، در تجزیه پروتئوم پروتئین‌های برگ گندم در تنش یخ زدگی (Han et al., 2013) گزارش شده است. سرحدی و همکاران نیز در بررسی تنش سرما بر روی دو رقم مقاوم و نیمه مقاوم گندم اعلام نمودند که مقدار تیوردوکسین تیپ M در نیمه مقاوم بیشتر از مقاوم بود (Sarhadi et al., 2010).

مسیر ترارسانی پیام

پروتئین درگیر در این مسیر لکه شماره ۲۴۴۷ رقم حساس *Aths* می‌باشد این پروتئین ۳-۳-۱۴ نام دارد که بیان آن در اثر تنش سرما کاهش نشان داده است. ۳-۳-۱۴ یک خانواده از پروتئین‌های تنظیمی هستند که در یوکاریوت‌ها منحصر به فرد بوده و در تمامی آنها از نظر تکاملی حفاظت شده‌اند و در واکنش‌های پروتئین پروتئین کاملاً درگیر هستند و مسیرهای ترارسانی پیام را واسطه‌گری می‌کنند (Gokirmak et al., 2010). واکنش‌های پروتئین پروتئین نقش اساسی در فرآیندهای سلولی مانند ترارسانی پیام، چرخه سلولی، تنظیم متابولیسم و ساختار پروتئین دارند این خانواده پروتئینی در تنش‌های محیطی نقش ایفا می‌کنند و با انتقال ژنهای این خانواده، مقاومت به تنش خشکی نیز در آرابیدوپسیس القا شده است (Yan et al., 2004). در آرابیدوپسیس، عادت دهی به سرما توسط یک شبکه پیچیده مسیر ترارسانی پیام به وجود می‌آید. یکی از مسیرها به وسیله بیان CBFها واسطه‌گری می‌شود و به طور قابل ملاحظه‌ای سازگاری به سرما را تنظیم می‌کند (Medina et al., 2011). مسیر دیگر ترارسانی علامت مربوط به سرما به وسیله آبسیزیک اسید (ABA) واسطه‌گری می‌شود و این هورمون در پاسخ به سرما افزایش می‌یابد (Lang et al., 1994). علاوه بر ABA تجمع هورمون‌های دیگری مانند اتیلن در آرابیدوپسیس در سازگاری به سرما نیز دخالت دارد به طوری که در چاودار تحمل به انجماد را افزایش می‌دهد (Yu et al., 2001). گزارش شده است که بیان پروتئین-های ۳-۳-۱۴ در آرابیدوپسیس تولید اتیلن را به وسیله ثابت

به علت درخواست انرژی زیاد سلول برای تقویت بخشیدن گیاه به تنش سرما باشد. افزایش بیان ATP سنتاز در تنش سرمای برنج به مدت ۲۴ ساعت (Cui et al., 2005) گزارش شده است. گزارشات نیز در مورد کاهش بیان این پروتئین در تنش سرما ارائه شده است (Jonmohammadi et al., 2014; Rinalduci et al., 2013; Xu et al., 2009; Gao et al., 2011) که علت آنرا تاثیر سرما بر روی تخریب کلروپلاست و یا استراتژی گیاه برای سازگاری با فتوسنتز اعلام کرده‌اند.

یکی دیگر از پروتئین‌های درگیر در این مسیر، لکه شماره ۳۲۴۸ است که مربوط به پروتئین تیوردوکسین میتوکندریایی می‌باشد و در اثر تنش افزایش بیان نشان داده است. تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی سولفید ردوکنزهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از یوکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت می‌شوند و در تنظیم اکسید و احیا سلولی دخالت دارند (Maeda et al., 2003). این پروتئین‌ها با داشتن یک گروه سولفیدی فعال، نقش تنظیم‌کنندگی را در بسیاری از فرآیندهای سلولی دارند (Laloi et al., 2004). اعتقاد بر این است که در میتوکندری، سیستم تیوردوکسین نقش محوری در تعدیل اکسیداسیون-احیا محیط و تنظیم فعالیت آنزیم هدف از طریق احیا پل دی سولفیدی ایفا می‌کند (Buchman and Balmer, 2005). بوچمن و باسمر (۲۰۰۵) در بررسی فعالیت تیوردوکسین، فهرستی از پروتئین‌های هدف این پروتئین را شناسایی کردند که ۹ پروتئین در سیستم دفاعی آنتی اکسیدان قرار داشتند. از طرفی برانکو و همکاران (۲۰۰۸) نیز اعلام کردند که TRX-O با پراکسیداسیون IIF واکنش نشان داده که تضمینی برای سم زدایی بالای H_2O_2 است. همچنین Trx یک شاخص منفی برای فعالیت اسکوربات پراکسیداز می‌باشد (Gelhay et al., 2006). در کل می‌توان گفت که سیستم تیوردوکسین به طور گسترده با پروتئین-های آنتی اکسیدان در میتوکندری ارتباط دارد. در پژوهش حاضر، مقدار تیوردوکسین در شرایط تنش سرما افزایش پیدا کرده است و می‌توان پیشنهاد نمود که افزایش این پروتئین در جهت دفاع آنتی اکسیدانی و تنظیم مقاومت در برابر تنش سرما است. با توجه به یافته‌های فیزیولوژی، مقدار H_2O_2 در این رقم در شرایط تنش سرما افزایش نشان داد. بنابراین افزایش مقدار تیوردوکسین

(Chen et al., 2015) گزارش شده است. زیر واحد بزرگ روبیسکو در فرآیندهایی مانند مرگ سلولی، تا خوردگی پروتئین-ها، عکس العمل به سرما و مقاومت اکتسابی نقش ایفا می‌کند (Jonmohammadi et al., 2014). همچنین این افزایش می‌تواند به علت نسبت پائین دی اکسیدکربن به اکسیژن حاصل از کاهش هدایت روزنه‌ای در طی تنش باشد که این آنزیم فعالیت اکسیژنازی خود را برای تنفس نوری آغاز می‌کند (Wingler et al., 2000).

علاوه بر این آنزیم، لکه شماره ۲۳۶۲ مربوط به آنزیم ریبولوز ۱ و ۵- بی فسفات کربوکسیلاز اکتیواز ایزوفرم I است که افزایش بیان داده است. روبیسکو اکتیواز نقش اساسی در تمام سلسله موجودات بازی می‌کند. آنها ممکن است به عنوان مولکولهای چارپرونی در کمک به تجمع یا جداسازی قطعات پروتئینی فعالیت داشته باشند. نقش اصلی این آنزیم حفظ فعالیت روبیسکو است. این آنزیم با هیدرولیز ATP، سایت فعال روبیسکو را از مهار کننده‌های قند فسفاتی مانند ریبولوز ۱ و ۵- بی فسفات دور نگه می‌دارد به طوری که CO_2 به وسیله کربامیلایسون، آنزیم روبیسکو را فعال نگه می‌دارد (Jordan and chollet, 1983; Portis, 2003). در این پژوهش هم آنزیم روبیسکو و هم آنزیم روبیسکو اکتیواز فعال شده اند که احتمالاً افزایش بیان آنزیم روبیسکو به علت افزایش تنفس نوری نبوده بلکه به خاطر افزایش تثبیت CO_2 برای مقاومت در برابر تنش سرما یا رفع هرگونه CO_2 باقی مانده است که این امر از اتلاف انرژی توسط واکنش اکسیژنازی تنفس نوری جلوگیری می‌کند. افزایش بیان روبیسکو اکتیواز در گیاه توت فرنگی (Gua et al., 2013) و گندم (Rinalduci et al., 2011) نیز تحت تنش سرما گزارش شده است و افزایش آن را مربوط به نقش این آنزیم در حفظ شکل فعال روبیسکو دانسته اند. پارتیس و همکاران (Portis et al., 2008) نیز اعلام کرده اند که مجموعه ای از تغییرات بین روبیسکو اکتیواز و زیر واحد بزرگ و کوچک روبیسکو، می‌تواند اکتیواز را برای کربامیلایسون قابل دسترس‌تر کند که نتیجه این افزایش فعالیت اکتیواز، تثبیت CO_2 برای مقاومت در برابر تنش سرما است. از طرف دیگر می‌توان چنین استنباط کرد که با توجه به اینکه PSI تحت تنش سرما در رقم حساس Aths کاهش یافته است و

ایزوفرم‌های ACS (پیش ماده اتیلن) افزایش می‌دهد (Yoon and Kieber, 2013). با توجه به مطالب ذکر شده، در این پژوهش، اگر پروتئین ۳-۳-۱۴ به عنوان تنظیم کننده رونویسی آبسزیک اسید ایفای نقش کند، با کاهش بیان باعث کاهش تولید و تجمع ABA و متعاقباً باعث کاهش تحمل به سرما شده است و اگر به عنوان تثبیت کننده ACS در نظر بگیریم، با کاهش بیان باعث کاهش ثبات پیش ماده تولید اتیلن و در نتیجه کاهش مقدار اتیلن می‌شود و موجب حساسیت در برابر تنش سرما می‌گردد. پس احتمالاً یکی از عوامل حساسیت رقم Aths به تنش سرما می‌تواند به علت کاهش بیان این پروتئین بوده باشد. کاهش بیان این پروتئین در لاین های گندم تحت تنش سرما نیز گزارش شده است (Vitamvase et al., 2012). البته در یک بررسی دیگر بر روی گندم های زمستانه نیز کاهش بیان این پروتئین بیان مشاهده شده بود (Vitamvas et al., 2007) افزایش بیان این پروتئین در گندم تحت سرمای بهاره توسط هان و همکاران (۲۰۱۳) نیز اعلام شده و پیشنهاد شده که این پروتئین نقش مهمی در مسیرهای ترانسسانی پیام برای تنظیم بیان ژن در تنش سرما ایفا می‌کند.

چرخه کالوین

لکه شماره ۱۸۰ زیر واحد بزرگ روبیسکو را نشان می‌دهد. روبیسکو آنزیم کلیدی مسئول تثبیت کربن فتوسنتزی است و فراوان ترین پروتئین در گیاهان می‌باشد و ۱۲ الی ۳۵ درصد از کل پروتئین‌های برگ و ۵۰ درصد از پروتئین‌های محلول را به خصوص در گیاهان C3 تشکیل می‌دهد (Zhaug et al., 2014). این لکه در شرایط سرما نسبت به شاهد افزایش بیان دارد. در این مطالعه وزن مولکولی این آنزیم حدود ۵۳/۷ کیلو دالتون می‌باشد. لکه روبیسکو معمولاً به صورت نواری در pH ۶ تا ۷ مشاهده می‌شود. ولی در ژل مورد مطالعه، این آنزیم به صورت نواری نیست و احتمالاً توسط ROSها تخریب شده است. یان و همکاران (Yan et al., 2006) نیز قطعات تخریب شده از زیر واحد بزرگ روبیسکو را که توسط دمای کم، افزایش بیان نشان داده بود را شناسایی کردند. افزایش بیان زیر واحد بزرگ روبیسکو در مرحله رویشی گندم در آخر پائیز (Jonmohammadi et al., 2014)، در رقم مقاوم گندم تحت تنش یخ زدگی $-8^{\circ}C$ (Xu et al., 2013) و در تنش سرمای $4^{\circ}C$ به مدت ۷ روز در برگ یونجه

رونوئسی در شرایط تنش می‌شوند. ATPase نیز به علت فرآیند دفاعی در مقابل تنش سرما و همچنین درخواست انرژی زیاد سلولها برای مقابله با این تنش افزایش بیان نشان می‌دهد. تیورودوکسین میتوکندریایی با افزایش بیان باعث سم زدایی رادیکالهای آزاد و دفاع آنتی اکسیدانی در تنش سرما می‌شود. افزایش بیان آنزیم‌های چرخه کالوین برای افزایش تثبیت CO₂ باقی‌مانده تثبیت شود و در برابر تنش سرما مقاومت نشان دهد.

به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی جو بهاره باعث تغییر بیان پروتئین‌ها به صورت افزایش و کاهش بیان می‌گردد. از بین این پروتئین‌ها، پروتئین‌های کلروپلاستی با افزایش بیان در صدد کاهش اثرات تنش سرما به گیاه هستند. این پروتئین‌ها در تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست و یکپارچگی آن نقش دارند و با تجمع واحدهای ریبوزومی باعث افزایش

واکنش نوری فتوسنتزی مهار شده، رویسکو وارد چرخه تنفس نوری شده و افزایش بیان نشان داده است که محصولات تنفس باعث بسته شدن سایت فعال رویسکو شده (Pears and Andrews, 2003) و آنزیم رویسکو اکتیواز با افزایش بیان این سایت را آزاد نگه می‌دارد (Portis and Parry, 2007) تا CO₂ باقی مانده تثبیت شود و در برابر تنش سرما مقاومت نشان دهد.

به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی جو بهاره باعث تغییر بیان پروتئین‌ها به صورت افزایش و کاهش بیان می‌گردد. از بین این پروتئین‌ها، پروتئین‌های کلروپلاستی با افزایش بیان در صدد کاهش اثرات تنش سرما به گیاه هستند. این پروتئین‌ها در تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست و یکپارچگی آن نقش دارند و با تجمع واحدهای ریبوزومی باعث افزایش

منابع

- Andersen B, Scheller HV, Møller BL. 1992. The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin: NADP+ oxidoreductase. FEBS letters 311(2):169-173.
- Barranco-Medina S, Krell T, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ, Dietz KJ. 2008. Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. Journal of experimental botany 59(12):3259-3269.
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB. 2009. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in Arabidopsis. Plant Molecular Biology 69:541-552.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72(1):248-254.
- Buchanan BB, Balmer Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. Annual Review of Plant Biology 56:187-220.
- Chen J, Han G, Shang C, Li J, Zhang H, Liu F, Wang J, Liu H, Zhang Y. 2015. Proteomic analyses reveal differences in cold acclimation mechanisms in freezing-tolerant and freezing-sensitive cultivars of alfalfa. Frontiers in Plant Science 6:18-30
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends in Plant Science 12(10):444-451.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J. 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics 5(12):3162-3172.
- Falzone CJ, Kao YH, Zhao J, Bryant DA, Lecomte JT. 1994. Three-dimensional solution structure of Psae from the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002, a photosystem I protein that shows structural homology with SH3 domains. Biochemistry 33(20):6052-6062.
- Ford KL, Cassin A, Bacic A. 2011. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Frontiers in Plant Science 2:44.
- Galiba G, Vágújfalvi A, Li C, Soltész A, Dubcovsky J. 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. Plant Science 176(1):12-19.
- Gao F, Zhou Y, Zhu W, Li X, Fan L, Zhang G. 2009. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in Thellungiella rosette leaves. Planta 230(5):1033-1046.
- Gelhay E, Navrot N, Macdonald IK, Rouhier N, Raven EL, Jacquot JP. 2006. Ascorbate peroxidase-thioredoxin interaction. Photosynthesis Research 89(2-3): 193-200.
- Ghabooli M, Khatabi B, Ahmadi FS, Sepehri M, Mirzaei M, Amirkhani A, Jorrín-Novo JV, Salekdeh GH. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by Piriformospora indica in barley. Journal of Proteomics 94:289-301.
- Gharechahi J, Alizadeh H, Naghavi MR, Sharifi G. 2014. A proteomic analysis to identify cold acclimation associated proteins in wild wheat

- (*Triticum urartu* L.) . Molecular Biology Reports 41(6):3897-3905.
- Godinot C, Di Pietro A. 1986.** Structure and function of the ATPase-ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. *Biochimie* 68(3): 367-374.
- Gökirmak T, Paul AL, Ferl RJ. 2010.** Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Current Opinion in Plant Biology* 13(5):527-532.
- Gomat HY, Deleporte P, Moukini R, Mialounguila G, Ognouabi N, Saya AR et al. 2011.** What factors influence the stem taper of eucalyptus: growth, environmental conditions, or genetics? *Annals of Forest Science* 68:109-120.
- Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardeström P, Schröder W, Hurry V. 2006.** The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short-and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal* 47(5):720-734.
- Gu X, Gao Z, Zhuang W, Qiao Y, Wang X, Mi L, Zhang Z, Lin Z. 2013.** Comparative proteomic analysis of rd29A: RdreB1BI transgenic and non-transgenic strawberries exposed to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 170(7):696-706.
- Gusta LV, Fowler DB. 1976.** Effects of temperature on dehardening and rehardening of winter cereals. *Canadian Journal of Plant Science* 56(3):673-678.
- Han Q, Kang G, Guo T. 2013.** Proteomic analysis of spring freeze-stress responsive proteins in leaves of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 63:236-244.
- Heidarvand L, Amiri RM. 2010.** What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum* 32(3):419-431.
- Hlaváčková I, Vítámvás P, Šantrůček J, Kosová K, Zelenková S, Prášil IT, Ovesná J, Hynek R, Kodíček M. 2013.** Proteins involved in distinct phases of cold hardening process in frost resistant winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv Luxor. *International Journal of Molecular Sciences* 14(4):8000-8024.
- Ivanov AG, Morgan RM, Gray GR, Velitchkova MY, Huner NPA. 1998.** Temperature/light dependent development of selective resistance to photoinhibition of photosystem I. *FEBS Letters* 430(3):288-292.
- Janmohammadi M, Matros A, Mock HP. 2014.** Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field condition. *Icelandic Agricultural Sciences* 27:3-15.
- Jordan DB, Chollet R. 1983.** Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1, 5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 258(22):13752-13758.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT. 2014.** Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 5(711):10-3389.
- Kosová K, Vítámvás P, Planchon S, Renaut J, Vanková R, Prášil IT. 2013.** Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *Journal of Proteome Research* 12(11):4830-4845.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP. 2004.** The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134(3):1006-1016.
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET. 1994.** Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 104(4):1341-1349
- Li G, Peng X, Xuan H, Wei L, Yang Y, Guo T, Kang G. 2013.** Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions. *Journal of Proteome Research* 12(11):4846-4861.
- Maeda K, Finnie C, Østergaard O, Svensson B. 2003.** Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry* 270(12):2633-2643.
- Medina J, Catalá R, Salinas J. 2011.** The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science* 180(1):3-11.
- Pearce FG, Andrews TJ. 2003.** The relationship between side reactions and slow inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a loop 6 mutant of the tobacco enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 278(35):32526-32536.
- Pfannschmidt T, Ogrzewalla K, Baginsky S, Sickmann A, Meyer HE, Link HE. 2000.** The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). *European Journal of Biochemistry* 267(1):253-261.
- Portis Jr AR, Parry MA. 2007.** Discoveries in Rubisco (Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research* 94(1):121-143.
- Portis Jr AR. 2003.** Rubisco activase–Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75(1):11-27.
- Portis AR, Li C, Wang D, Salvucci ME. 2008.** Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of Experimental Botany* 59(7):1597-1604.
- Raab S, Toth Z, de Groot C, Stamminger T, and Hoth S. 2006.** ABA-responsive RNA-binding proteins are involved in chloroplast and stromule function in *Arabidopsis* seedlings. *Planta* 224(4):900-914.
- Rasoulnia A, Bihamta MR, Peyghambari SA, Alizadeh H, Rahn timer A. 2011.** Proteomic response of barley leaves to salinity. *Molecular Biology Reports* 38(8):5055-5063.
- Rinalducci S, Egidi MG, Karimzadeh G, Jazii FR, Zolla L. 2011.** Proteomic analysis of a spring wheat

- cultivar in response to prolonged cold stress. *Electrophoresis* 32(14):1807-1818.
- Sarhadi E, Mahfoozi S, Hosseini SA, Salekdeh GH. 2010.** Cold acclimation proteome analysis reveals close link between the up-regulation of low-temperature associated proteins and vernalization fulfillment. *Journal of Proteome Research* 9(11):5658-5667.
- Shroyer JP, Mikesell ME, Paulsen GM. 1995.** Spring freeze injury to Kansas wheat. Cooperative Extension Service, Kansas State University.
- Sonoike K, Terashima I. 1994.** Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* 194(2):287-293.
- Vítámvás P, Prášil IT, Kosova K, Planchon S, and Renaut J. 2012.** Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics* 12(1):68-85.
- Vítámvás P, Saalbach G, Prášil IT, Čapková V, Opatrná J, Ahmed J. 2007.** WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology* 164(9):1197-1207.
- Von Ballmoos C, Dimroth P. 2007.** Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* 46(42):11800-11809.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000.** Photorespiration: metabolic pathway and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 335(1402):1517-1529.
- Xu W, Rosenow DT, Nguyen HT. 2000.** Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breeding* 119(4): 365-367.
- Xu J, Li Y, Sun J, Du L, Zhang Y, Yu Q, Liu X. 2013.** Comparative physiological and proteomic response to abrupt low temperature stress between two winter wheat cultivars differing in low temperature tolerance. *Plant Biology* 15(2):292-303.
- Yan J, He C, Wang J, Mao Z, Holaday SA, Allen RD, Zhang H. 2004.** Overexpression of the Arabidopsis 14-3-3 protein GF14λ in cotton leads to a "stay-green" phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant and Cell Physiology* 45(8):1007-1014.
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN. 2006.** Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics* 5(3):484-496.
- Yang J, Schuster G, Stern DB. 1996.** CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *The Plant Cell* 8(8):1409-1420.
- Yang J, Usack L, Monde RA, Stern DB. 1994.** The 41 kDa protein component of the spinach chloroplast petD mRNA 3'stem-loop: protein complex is a nuclear encoded chloroplast RNA-binding protein. *Nucleic Acids Symposium Series* 33:237-239.
- Ye J, Wang S, Zhang F, Xie D, Yao Y. 2013.** Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG 6000 stress and rewatering. *Plant Omics* 6(4):286.
- Yoon GM, Kieber JJ. 2013.** 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25(3):1016-1028.
- Yu XM, Griffith M, Wiseman SB. 2001.** Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology* 126(3):1232-1240.
- Zhang M, Lv D, Ge P, Bian Y, Chen G, Zhu G, Li X, Yan Y. 2014.** Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteomics* 109:290-308.
- Zhong X, Mei X, Li Y, Yoshida H, Zhao P, Wang X, Han L, Hu X, Huang S, Huang J, Sun Z. 2008.** Changes in frost resistance of wheat young ears with development during jointing stage. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(5):343-349.

Reduction of applied pesticides and cancer with the cultivation of transgenic crops

Solmaz Khosravi¹ and Masoud Tohidfar^{2*}

1. Agricultural research institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), 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

Pests are considered as one of the most important constraints that cause production loss. Although use of pesticides is the most common solution nowadays for pest control in agriculture, this approach has many harmful effects for human health and the environment. Up to now, almost 50 lung cancers provoked by agricultural pesticides have been recognized. Furthermore, pesticide residues can remain in the soil for a long time and can represent a threat for microbial life and can be absorbed through the root system of plants and enter the human food chain. Although strategies like organic agriculture or integrated pest management have been promulgated, the correct use of pesticides is far from having been achieved. However, new technologies like genetic engineering can help overcome the problem of yield loss while still providing healthy GM food with no pesticide residue. Since the first cultivation of GM crops, 18 years have now passed and GM crops have gained significant public acceptance among farmers and consumers. In this review, disadvantages of pesticides on human health (especially cancer) and environment will be discussed.

Key Words

Cancer, environment, GM crops, Pesticides

Cloning and investigation of *RGT2* gene characteristics from an Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Azizi¹ S. and A.R. Tarinejad^{*2}

1. MSc. in Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University

2. Department of agriculture Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* Corresponding Author, Email: atarinejad@yahoo.com

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has 20 genes that encode Hexose Transporter proteins, including *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* and *RGT2*. Two of these genes (*SNF3* and *RGT2*) act as glucose sensors while the *HXT1-HXT17* genes function in direct transportation of glucose. Earlier research has shown that alcohol fermentation can be augmented by increasing the expression of these genes, resulting in increasing ethanol production. The aim of this study was the identification and isolation of the Restores Glucose Transport 2 (*RGT2*) gene from *Saccharomyces cerevisiae* genome. Specific primers were employed in PCR so as to clone *RGT2* into a vector under a suitable expression promoter for recombinant yeast. After gene amplification, ligation was achieved between the amplified fragments and pGEM-T vector and the recombinant colonies were identified by the blue-white screening method. Candidate recombinant plasmids were sequenced. The nucleotide sequence of the open reading frame was found to be 2292 bp long with a deduced amino acid of 763 residues. The estimated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 83.173 kDa and 5.68 respectively. The deduced protein sequence showed a high similarity to *RGT2* sequences in the NCBI database, especially with P301 strain of *Saccharomyces cerevisiae* (100 % similarity). Finally, the *RGT2* gene was cloned into the pGBKT7 expression vector which is suitable for protein expression in yeast via the restriction sites *NcoI* and *PstI*. A phylogenic study of the *RGT2* gene and other hexose transporter families showed that this gene has the most similarity with *SNF3*. Therefore, by isolation, cloning and sequence identification and transformation of this gene into yeast, ethanol production via alcohol fermentation can be increased.

Key Words

Cloning, *RGT2*, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in *Artemisia annua*

Bitah Ghasemi¹, Ramin Hosseini², Fatemeh Dehghan Nayeri³

1- MSc in Agricultural Biotechnology, 2- Associate professor, 3- Assistant Professor,
Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Gazvin, Iran

*Corresponding Author, Email: raminh_2001@yahoo.com

ABSTRACT

A *Artemisia annua* is particularly important for the production of artemisinin, a bioproduct which can be used to combat the causal agent of malaria, treat some kind of cancers and in other activities. The low artemisinin content in the plant has caused this compound to be among the more expensive medicines. Several attempts have been made to increase artemisinin production, for example by using different elicitors, but none of the approaches has been cost effective. In this study, the expression levels of two important genes in the artemisinin biosynthetic pathway, *SQS* and *DBR2* and artemisinin content were investigated in *Artemisia* cell suspension cultures. *SQS* and *DBR2* genes have essential roles in the regulation of artemisinin pathway. For this purpose, nano-cobalt particles in concentrations of 0.25, 2.5 and 5 mg/L were used for cell culture treatment and samples were collected after 8, 24, 48 and 72 h. The highest artemisinin content was observed 24 h after 5 mg/L nanocobalt treatment. In this case, artemisinin production was 2.25 times (113.35 mg/g d.wt) higher than that of the control. Our results showed a negative and significant correlation between *SQS* and *DBR2* gene expression and artemisinin content at different levels of nano cobalt treatments. Results also showed an increase in nano cobalt concentration after 72 hour and an increase in nano chitosan after 4h hour caused a significant decrease in the expression of *SQS* and *DBR2* genes. In conclusion, it appears that the content of artemisinin was increased by high concentrations of the nano cobalt particles because of a decrease in the expression of *SQS* and *DBR2* genes.

Key Words

Artemisia annua, Artemisinin, Nano Cobalt, Nano Chitosan, HPLC, qRT-PCR,

Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley

Beniamin Yazdani¹, Rasoul Asghari-Zakaria², Zahra-Sadat Shobbar^{3*}

1. Ph.D. Student and 2. Associate Professor, Department of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding Author, Email: shobbar@abrii.ac.ir

ABSTRACT

Biotic and abiotic stresses are the most important constraints on production by crop plants, including barley. Transcription factors are involved in the regulation of biotic and abiotic stress- response genes and the WRKY transcription factor family encodes a large group of them. Therefore, identification and classification of these factors represent important steps in our quest to find smart strategies for enhancing stress tolerance in plants. In an attempt to identify WRKY transcription factors in barley, multiple searches were done in Plant TFDB and Gramineae TFDB databases. Rice WRKY-conserved sequences were used as the templates for tBLASTN searches in the nr, EST and HTGS datasets for finding new members in barley. An HMM search was used to find sequences containing WRKY conserved domains. The identified 96 HvWRKYs as well as one member of each WRKY subgroup from Arabidopsis, rice and wheat were subjected to multiple alignment using clustalx software and phylogenetic trees were reconstructed using MEGA6 software based on neighbor-joining method with a 1000 repeats bootstrap index. Sequences were divided into 3 groups based on the number of WRKY domains and the structure of zinc-finger motifs. Conclusively, there were 13 proteins with 2 WRKY conserved domain in group I, 30 proteins with 1 WRKY conserved domain and Cx₇Cx₂₃HxC zinc-finger motif in group III and other proteins with 1 WRKY conserved domain and Cx₄₋₅Cx₂₂₋₂₃HxH zinc-finger motif in group II. Regarding the role of group III in plant tolerance to abiotic and biotic stresses, it can be argued that the higher percentage presence of group III members in barley that are similar to rice than to other higher plants can be attributed to duplications in wild monocotyledonous ancestors and natural selection for more resistant genotypes in harsh conditions.

Key Words

Abiotic stresses, Transcription factors, HMM, Phylogenetic tree, Multiple alignment.

Study of Hydrogen Cyanide Effects on Salt Stress Induction in *Aeluropus littoralis*

Ahmadi N. Milad ^{1*}, Askari H¹., Soltani N. Masood²

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

2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* Corresponding Author, Email: milad.ah2005@gmail.com

ABSTRACT

Salt stress is a serious problem for plant growth and development. To analyze salt stress resistance and physiological behavior of plants, the halophyte *Aeluropus littoralis* was studied. Salt stress augments ethylene hormone production in plant tissue and this leads to increased hydrogen cyanide levels. In the other hand, there is a cyanide purge mechanism involving three enzymes: Cyanase, Rhodanese and β -cyanoalanine synthase. To study plant cell growth and development under salt stress conditions, an analysis of differential expression of genes involved in biosynthesis and purge of cyanide is needed. In this study, *Aeluropus littoralis* cell suspensions were subjected to different concentrations of salt and potassium cyanide in the medium. Factorial analysis of NaCl and KCN in 0, 0/0.2, 0/0.4, 60/0, 60/0.2, 60/0.4, 120/0, 120/0.2 and 120/0.4 mM concentrations were assessed. Our study demonstrated that KCN treatment significantly reduced production of dry material. The results showed that, although cyanide has negative effect on cell growth, the cyanide detoxification gene network was not activated in these conditions. In addition, the interaction between cyanide and salinity indicated that salt stress in the presence of 0.4 mM KCN increases cell growth by 40 percent because expression of the CAS gene was reduced enormously. An increase of salinity in the presence of 0.2 mM KCN, however, reduced expression of ACO, a key gene in HCN and ethylene production. As intracellular level of HCN declined, cell growth rose. Thus external treatment of cyanide increases plant dry material and plant resistance in salt stress conditions.

Key Words

Aeluropus littoralis, Ethylene, Salt stress, Hydrogen Cyanide, qRT-PCR

Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves Under Short Term Cold Stress

Rana valizadeh kamran^{1,2}, Mahmood Toorchi^{1*}, Mohammad Moghaddam¹, Hamid Mohammadi³

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biotechnology and 3. Department of Agronomy - Faculty of Agriculture Azarbaijan Shahid Madani University, km35 Tabriz-Maragheh Road

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

ABSTRACT

Cold is one of the most significant abiotic stresses which restrict crop growth and productivity worldwide. In order to investigate how spring barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings adapt to short-term periods of low temperature, the present study explored proteomic changes in leaves. Cold stress at 4 °C was applied to barley seedlings for 48 hours; third leaves were harvested and compared with seedlings grown in normal conditions (25° C). The proteomic analysis was conducted by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and the Coomassie blue staining procedure. Fifteen reproducible protein spots showing a significant difference between the control condition and cold stress were identified; 10 of the spots demonstrated an increase in expression while 5 spots showed a decrease under 4 °C cold stress for 48 hours. By applying MALDI-TOF analysis, 7 spots were identified. These responsive proteins were involved in the Calvin cycle, photosynthetic electron transport, light reaction, and signal transduction. The upregulation of proteins involved in the regulation of the chloroplast system, the integrity of chloroplasts, energy metabolism, antioxidant defense, and photosynthesis has probably acclimatized the plant to cold stress. These findings indicate that there was greater cold stress affecting photosynthesis in spring barley and it is of crucial importance to maintain the efficiency of photosynthesis under cold stress.

Key Words

Barley, Cold, Proteome, 2DE, MALDI-TOF