

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره پنجم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵

شماره پیاپی ۹

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سرمدیر: دکتر مقصود پژوهنده

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: دکتر الهام باقری راد 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 امید (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر علی اکبر حبشی (دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)
دکتر فضل‌الله افراز (دانشیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)
دکتر بهزاد قره‌یاضی (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)
دکتر مسعود توحیدفر (دانشیار، دانشگاه شهید بهشتی)

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

ویرایش خلاصه‌های 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 تخریب 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 پنجم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵
شماره پیاپی ۹

فهرست مطالب

صفحات

مقاله‌های پژوهشی

- ۱-۱۴ ایجاد گیاه سیب زمینی مقاوم به ویروس PVX با استفاده از مکانیسم RNA Silencing
شهلاسادات فاطری رضوانی، مقصود پژوهنده، اکبر شیرزاد و سکینه لطفی
- ۱۵-۲۲ گونه‌های شدید و خفیف ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی Tomato leaf curl virus مورد هدف
miRNAهای متفاوتی از میزبان قرار می‌گیرند نفیسه طوسی و امید عینی
- ۲۳-۳۰ انتقال ژن آنتی ژن سطحی ویروس هیپاتیت B به گیاه توتون
ماجده نیسی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی، سیروس قبادی، حمید رجبی معماری، غزاله خاکسار
- ۳۱-۳۹ توصیف پروتئین‌های محافظت شده فرضی از *Xanthomonas citri* subsp. *citri*، با فعالیت محرک
تولید اتیلن گیاه *Arabidopsis thaliana* وحید فلاح زاده ممقانی
- ۴۱-۵۰ تاثیر ژن *rolC* در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*)
امین سهندی خلیفه‌کندی، مقصود پژوهنده و هانیه محجل شجاء
- ۵۱-۵۹ ارزیابی تاثیر شوری بر میزان جوانه زنی و بیان ژنهای آنتی اکسیدان در دو رقم گیاه گوجه فرنگی
پروانه محمودی چراغیلی، هانیه محجل شجاء، الهام محجل کاظمی
- ۶۱-۶۶ بررسی ارتباط چندشکلی ژن کاپاکازین با میزان تولید و ترکیبات شیر در شترهای استان گلستان
رقیه طعنه گنبدی، مجتبی آهنی آذری، سعید زره داران، علیرضا خان احمدی و عبدالحکیم توغدری

English Abstracts

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol5, Number1, Spring and Summer 2016

Bi-seasonal, Research Journal (ISC)

English Abstracts

A. Production of Potato Resistant Plant to PVX using an RNA Silencing Mechanism

ShahlaSadat Fateri Rezvani, Maghsoud Pazhouhandeh, Akbar Shirzad, and Sakineh Lotfi

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

Nafiseh Tousi and Omid Eini

C. Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

Majedeh Neisi, Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei, Cyrus Ghobadi, Hamid Rajabi Memari and Ghazaleh Khaksar

D. Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from Proteome of *Xanthomonas citri subsp. citri*, with Ethylene Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

E. The effect of rolC gene on the medicinal plant *Catharanthus roseus*

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy, Maghsoud Pazhouhandeh and Hanieh Mohajjel-Shoja

F. Evaluation of the effect of salinity on the germination and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant

Parvaneh Mahmoodi Jaraghili, Hanieh Mohajjel Shoja and Elham Mohajjel Kazemi

G. Study of kappa-casein gene polymorphism association with milk production and composition in Golestan province camels

Tane Gonbadi R., Ahani Azari M., Zerehdaran S., Khan Ahmadi AR. and Toghdory A.

ایجاد گیاه سیب‌زمینی مقاوم به ویروس PVX با استفاده از مکانیسم RNA Silencing

شهلاسادات فاطری رضوانی^۱، مقصود پژوهنده^{۲*}، اکبر شیرزاد^۳ و سکینه لطفی^۴

Production of potato resistant plant to PVX using an RNA silencing mechanism

ShahlaSadat Fateri Rezvani, Maghsoud Pazhouhandeh*, Akbar Shirzad, and
Sakineh Lotfi

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی
۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، ۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی
دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۴)

چکیده

یکی از عوامل اصلی کاهش محصول سیب‌زمینی ویروسها هستند. ویروس X سیب‌زمینی (Potato X Potexvirus: PVX) از مهمترین ویروسهای این گیاه می‌باشد و عمده‌ترین روش مبارزه با آن استفاده از ارقام مقاوم است. در این تحقیق سعی شد با بهره‌گیری از تکنیک RNA silencing گیاهان سیب‌زمینی مقاوم به این ویروس تولید شود. برای این کار ابتدا با دو همسانه‌سازی متوالی یک سازه سنجاق‌سری برای انتهای ژن P25 ویروس PVX در ناقل pFGC5941 تحت پیشبر CaMV 35S ساخته شد. پروتئین P25 نقش ممانعت از RNA Silencing را در میزبان ویروس به عهده دارد. ناقل نو ترکیب حاصل پس از تایید، به آگروباکتریوم منتقل شده و قطعات برگ و میانگره سیب‌زمینی رقم آگریا به وسیله آگروباکتریوم سویه LBA4404 تراریزش شدند. پس از کالوس‌زایی، جوانه‌زنی و ریشه‌زایی، گیاهان تراریخته انتخاب و تکثیر شدند. بررسی مولکولی با PCR روی DNA گیاهان، با RT-PCR روی RNA آنها وجود تراژن و بیان شدن آن را تایید کرد. گیاهان تراریخته تکثیر شده و در گلخانه به روش مکانیکی با PVX تلقیح شدند. نتایج ELISA با آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پوششی PVX مقاومت دو لاین تراریخته را نشان داد. تایید مولکولی این دو لاین مقاوم سیب‌زمینی به PVX با RT-PCR روی RNA گیاهان به کمک آغازگرهای ژن پروتئین پوششی ویروس انجام شد. نتیجه این تحقیق منجر به تولید دو لاین مستقل سیب‌زمینی مقاوم به PVX گردید که بررسی مقاومت و این همانی آنها در شرایط مزرعه بایستی انجام پذیرد و مینی تیوبرهای آنها جهت تکثیر تولید شود.

واژه‌های کلیدی

سیب‌زمینی
PVX
مقاومت
تراریخته
خاموشی ژن

مقدمه

ویروس X سیب زمینی (Potato X Potexvirus: PVX) از مهمترین ویروس های این گیاه می باشد که باعث کاهش قابل توجه عملکرد آن می شود. این ویروس در سال ۱۹۳۱ توسط اسمیت توصیف شد. این ویروس از خانواده Flexiviridae و از جنس Potexvirus با پیکره نخی شکل خمش پذیر، با ژنوم +ssRNA و اندازه ذرات حدود 550×12 نانومتر است. میزان خسارت این ویروس بسته به نژاد و رقم سیب زمینی بین ۱۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده است. آلودگی توام این ویروس با ویروس های PVA و PVY باعث ایجاد خسارت بیشتر می شود. این ویروس به آسانی از طریق مکانیکی، پیوند و غده منتقل می شود ولی انتقال از طریق بذر و شته گزارش نشده است (Beemster & de Bokx, 1987; Salazar, 1996; Verchot-Lubicz et al., 2007). در ایران این ویروس از اکثر مناطق کشور و گروه های نژادی یک و سه آن از استان های خراسان و اردبیل گزارش شده است (Foroutani et al., 2004). ویروس ها باعث کاهش عملکرد سیب زمینی از سالی به سال دیگر بخاطر تکثیر رویشی آن می شوند و در بین عوامل بیماریزای این گیاه اهمیت بسزایی داشته و روش درمان موثری برای آنها وجود ندارد. از این رو تنها راه رهایی از خسارت آنها استفاده از ارقام مقاوم، بذر عاری از ویروس و کنترل ناقلین در مزرعه می باشد. ژنهای مقاومتی مثل Rx در سیب زمینی در مقابل ویروس ها شناسایی شده است (Kohm et al., 1993; Verchot-Lubicz et al., 2007)، تاکنون چندین مطالعه منجر به گزارش گیاهان مقاوم به ویروس به کمک انتقال ژنهای ویروسی به میزبان شده اند. در تحقیقی نشان دادند که بیان پروتئین پوششی PVX در سیب زمینی باعث ایجاد مقاومت به این ویروس گردید (Bai et al., 2009) و یا در تحقیقی دیگر نشان دادند که بیان ژن رپلیکاز PVX در سیب زمینی مقاومت خوبی به PVX نتیجه داد (Longstaff et al., 1993). همچنین در تحقیقی مشابه P25 ویروس PVX در توتون بیان شد و مقاومت خوبی به PVX، TMV و سایر توباموویروس ها ایجاد نمود. در گیاهان توتون تراریخت دو ویروس مذکور هیچ علائمی نشان نداده و نتوانستند تکثیر شوند (Ares et al., 1998).

یکی از مکانیسم های جدید ایجاد مقاومت به ویروس که امروزه کاربرد فراوانی دارد RNA Silencing می باشد (Duan et al., 2012). RNA Silencing فرایند دفاعی قدرتمندی در یوکاریوتهاست که سبب تجزیه RNA ویروس و ممانعت از همانند سازی آن می شود. اما بسیاری از ویروس ها می توانند این فرایند را مختل کنند. این ویروس ها پروتئین های سرکوب کننده ای بنام Silencing Suppressors Protein (SSP) را بیان می کنند که RNA Silencing را سرکوب و باعث تکثیر ویروس می شود (Pazhouhandeh, 2009). این پروتئین ها بدون هومولوژی توالی با اجزاء مختلفی در مسیر RNA Silencing تداخل دارند. در مورد ویروس PVX پروتئین P25 به عنوان ممانعت کننده RNA Silencing شناخته شده است که با چسبیدن به پروتئین آرگونات در کمپلکس RISC و با تجزیه کردن آن از طریق پروتازوم باعث سرکوب RNA Silencing در سلول می شود تا ویروس به راحتی تکثیر پیدا کند (Chiu et al., 2010).

اخیرا تحقیقاتی برای ایجاد مقاومت به ویروس از طریق RNA silencing انجام شده است که یا به کمک طراحی سازه های سنجاق سری تکرار معکوس و یا به کمک سازه های تولید کننده microRNA بوده است (Duan et al., 2012). در این تحقیق سعی شده با بهره گیری از تکنیک RNA silencing و تراریزش گیاهان سیب زمینی بوسیله سازه سنجاق سری طراحی شده برای انتهای ژن P25 گیاهان مقاوم به این ویروس ایجاد شود.

مواد و روشها

تهیه گیاه آلوده به ویروس PVX و استخراج RNA از برگ های سیب زمینی آلوده: از گیاه آلوده سیب زمینی (جداسازی شده از اطراف تبریز) که با ELISA و آنتی بادی اختصاصی PVX شناسایی شده بود، استخراج RNA با بافر Trizol به روش توصیف شده انجام شد (Chomczynski & Sacchi, 1987).

سنتز cDNA و تکثیر قطعه ای از ژن P25 ویروس PVX: با ۴ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت SuperscriptIII (Invitrogen) سنتز cDNA انجام و به کمک

ولتاژ ۲/۵ کیلوولت به مدت پنج میلی ثانیه انجام شد. برای گزینش کلنی‌های مثبت بعد از تراریزش، با توجه به ساختار وکتور و وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین روی وکتور، از محیط LB حاوی کانامایسین ۵۰ µg/ml استفاده شد. استخراج پلاسمید به روش mini prep (Sambrook et al., 1989) انجام گردید. به منظور تأیید بیشتر، وکتورهای نوترکیب، چهار وکتور نوترکیب برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی IBMP-CNRS فرانسه ارسال گردید. یکی از وکتورهای تأیید شده به روش الکتروپوراسیون به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 منتقل شد. برای گزینش، کلنی‌های مثبت روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین و ریفامپیسین ۱۰۰ µg/ml به مدت دو شب در انکوباتور ۲۸°C کشت شدند. سلول‌های آگروباکتریوم حامل وکتور نوترکیب pFGC5941 در محیط LB مایع دارای کانامایسین و ریفامپیسین تکثیر یافتند تا OD₆₀₀ آن به ۰/۷ تا ۱ رسید. بعد از حذف محیط کشت، ته‌نشست سلول‌های باکتری با محیط MS مایع مخلوط شد.

تراریزش گیاه سیبزمینی: گیاهان درون شیشه‌ای سیب-زمینی رقم آگria برای اطمینان کامل از عاری بودن از ویروس PVX، با آزمون DAS-ELISA و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از محیط MS (Murashige and Skoog 1962) درون شیشه‌های کشت تکثیر شدند. قطعات نیم تا یک سانتی‌متری میانگره ساقه گیاهان سیبزمینی تکثیر یافته برای انجام تراریزش استفاده شدند. کشت همزمان قطعات گیاه با سلول‌های شایسته آگروباکتریوم در دمای ۲۰°C به مدت یک ساعت، روی شیکر با سرعت ۵۰ rpm و در تاریکی درون ۲۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع با نصف غلظت بدون آنتی‌بیوتیک انجام شد. ریزنمونه‌های گیاهی سپس به محیط MS غنی شده با (۰/۲ GA3، ۰/۲ NAA و ۰/۳ TDZ)، ساکارز ۲/۵٪ و آگار ۸٪ حاوی آنتی‌بیوتیک (350 mg/l Cefotaxime) برای حذف آگروباکتریوم انتقال داده شده و در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند تا کالوس‌زایی صورت گیرد. در این تحقیق از ۱۲۰ ریزنمونه برای تراریزش استفاده گردید. در ادامه کالوس‌های ایجاد شده به محیط کشت جدید حاوی Cefotaxime (PPT: 10 و Phosphinothricin

آغازگرهای اختصاصی دارای سایت‌های برشی P25Fint (AAAtctagactcgagATACCAGGCACTTTTTGCTGAC) به-عنوان آغازگر رو به جلو و P25R (AAGgatcccatggCTATGTCCCTGCGCGGACATA) به-عنوان آغازگر برگشتی با واکنش PCR قطعه ۴۰۰ جفت بازی انتهای P25 تکثیر شد.

همسانه سازی قطعه ژن P25 در وکتور pFGC5941

قطعه ژن ۴۰۰ نوکلئوتیدی P25 (Gene Bank: GQ863228.1) ویروس X سیبزمینی (PVX) ابتدا در بالادست ایترون pFGC5941 (11407 bp) وکتور Chalcone Synthase (CHSA) (Pazhouhandeh et al., 2006) به کمک آنزیمهای برشی NcoI و XhoI و واکنش الحاق با T4 DNA Ligase (Fermentase) در جهت sense قرار داده شد و وکتور حاصل پس از تأیید برای همسانه سازی دوم بکار رفت (شکل ۵۱). این بار قطعه فوق در پائین‌دست ایترون به کمک آنزیمهای برشی BamHI و XbaI و لیگاسیون قطعات برش یافته در جهت antisense به منظور تهیه سازه سنجاق سری P25 همسانه سازی شد. تأیید کلون‌های ایجاد شده با PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی وکتور pFGC5941 (AATCCCACTACCTTCGCAAGACC) به‌عنوان آغازگر رو به جلو و Rint و pFGC5941 (CTTTCTACCTTCCCACAATTG) به‌عنوان آغازگر برگشتی برای همسانه سازی اول در جهت sense و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fint و pFGC5941 (CAGACAGATGTTTCCCAGCGAA) به‌عنوان آغازگر رو به جلو و Rext و pFGC5941 (AAACCGGCGGTAAGGATCTGAG) به‌عنوان آغازگر برگشتی جهت تأیید همسانه سازی دوم در جهت antisense انجام شد.

تکثیر وکتور pFGC5941 نوترکیب و انتقال آن به

آگروباکتریوم: از باکتری *Escherichia coli* نژاد Top10 برای انجام مراحل همسانه سازی قطعه ژن P25 استفاده شد. بعد از تهیه سلول‌های شایسته باکتری تراریزش باکتری به روش الکتروپوراسیون توسط دستگاه (Eppendorf) Multiporator

برگشتی) واکنش PCR برای بررسی تکثیر یا عدم تکثیر ویروس انجام شد.

نتایج

همسانه سازی قطعه ژن P25 ویروس PVX در وکتور

pFGC5941: در این تحقیق برای ایجاد مقاومت به PVX، خاموش کردن ژن P25 از ژنوم PVX مورد نظر می‌باشد. بدین منظور سازه سنجاق سری تکرار معکوس قطعه انتهایی ژن P25 در وکتور pFGC5941 مطابق شکل (۱-الف) طراحی و ساخته شد تا به گیاه سیب‌زمینی منتقل شود. پس از بدست آوردن ویروس از روی نمونه های سیب‌زمینی و استخراج RNA و سنتز cDNA واکنش PCR برای تکثیر قطعه ژن با آغازگرهای اختصاصی (P25Fint, P25R) حاوی سایت‌های برشی انجام شد (شکل ۱-ب). پس از تایید محصول ۴۰۰ جفت بازی PCR روی ژل آگارز الکتروفورز، خالص سازی آن و برش آنزیمی ابتدا با آنزیمهای *XhoI* و *NcoI* انجام گردید. برش آنزیمی همزمان روی وکتور خالی نیز صورت گرفت. پس از برش آنزیمی، قطعات مورد نیاز از روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (LMP) جداسازی و خالص سازی شد. با توجه به اینکه در آغازگرهای P25Fint و P25R، به ترتیب مکان آنزیمهای *XhoI* و *NcoI* تعبیه شده است، از واکنش برش آنزیمی محصول PCR باند ۴۰۰ bp بدست آمد (شکل ۱-ج). از برش آنزیمی وکتور خالی بخاطر نزدیک بودن دو سایت برشی با حذف تقریباً ۸۰ bp وکتور به شکل خطی درآمد (شکل ۱-د).

بعد از انجام واکنش لیگاسیون بین محصول PCR و وکتور برش یافته و خالص سازی آن، محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* منتقل و از کلنی‌هایی که بر روی محیط حاوی کانامایسین (ژن مقاومت در وکتور pFGC5941) رشد کرده بودند، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور pFGC5941 در جهت sense (Fext و Rint) انجام شد (شکل ۲-الف).

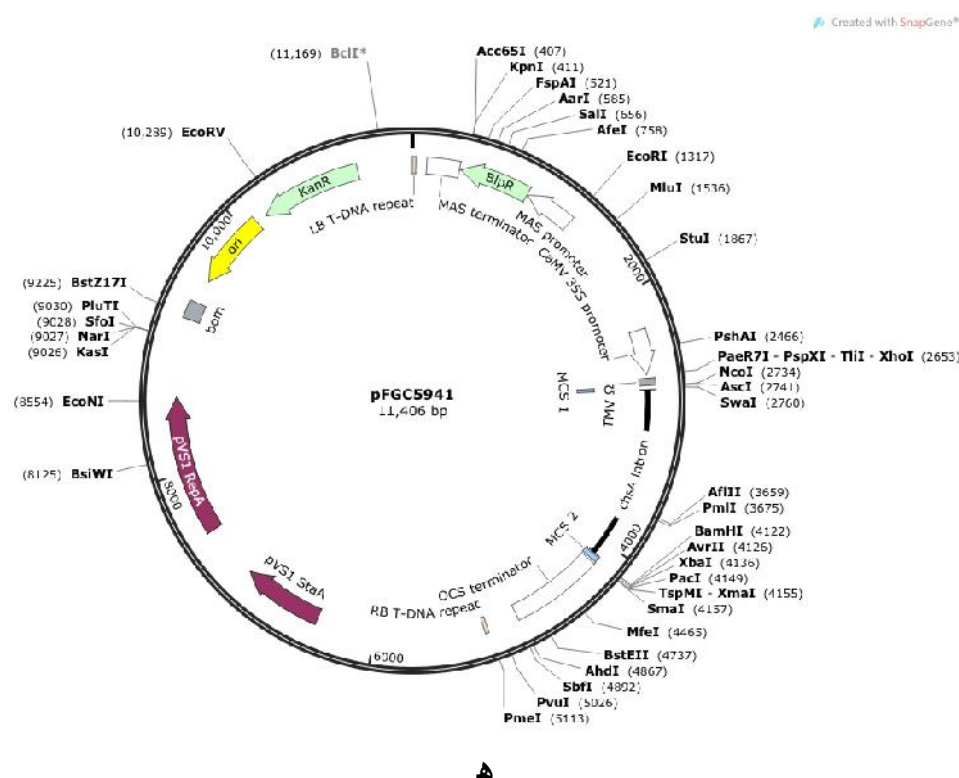
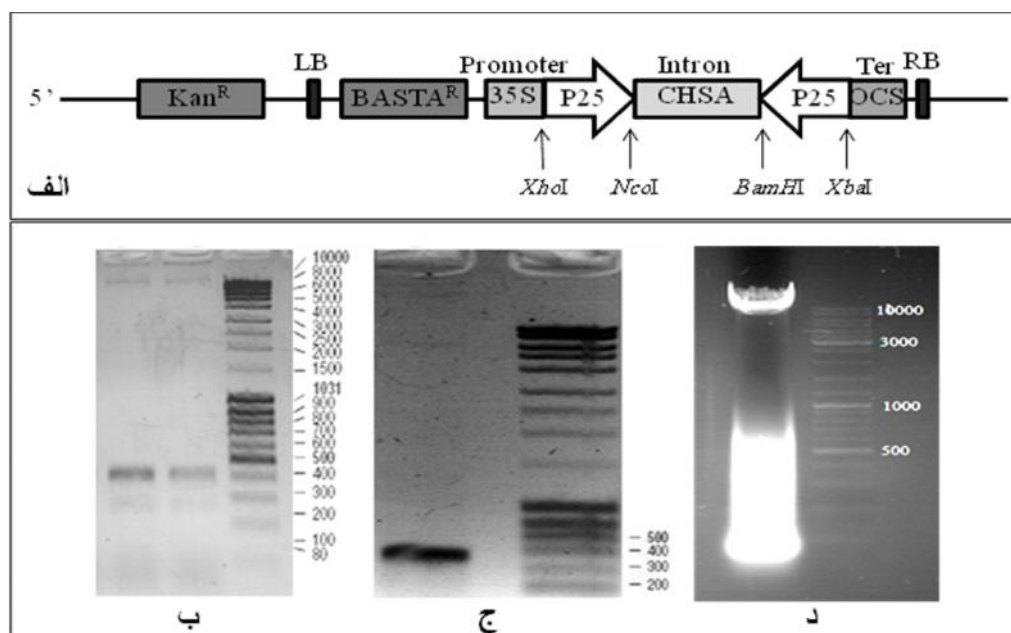
(mg/l) برای گزینش نمونه‌های تراریخت منتقل شدند. کالوس زایی ادامه یافت و جوانه‌زنی آغاز شد. فقط گیاهان تراریخت با T-DNA مورد نظر که ژن مقاومت به PPT را دریافت کرده بودند، در این مرحله به رشد ادامه دادند. کالوسهای گزینش شده پس از ریشه زایی به محیط جدید حاوی (۰/۰۲ mg/l) GA3، (۰/۰۲ mg/l) NAA و (۰/۳ mg/l) TDZ منتقل شدند تا جوانه زنی صورت گیرد. گیاهان کامل به‌دست آمده به صورت مستقل نامگذاری و برای تایید تراریخت بودن مجدداً به مدت دو هفته دیگر در شرایط گزینش واکنش شدند.

روش‌های مولکولی تایید تراریخت بودن گیاهان و بررسی

انتقال و رونویسی ژن هدف: استخراج DNA ژنومی از سه گیاه تراریخت به روش CTAB صورت گرفت (Doyle & Doyle, 1987). برای تایید وجود T-DNA در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده P25 و همچنین آغازگرهای مربوط به وکتور استفاده شد. پس از تکثیر گیاهان تراریخت، استخراج RNA به روش Trizol انجام شد (Chomczynski & Sacchi, 1987). سپس cDNA با کیت SuperscriptIII (Invitrogen) سنتز و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه ژن P25 جهت بررسی وجود mRNA انجام گردید.

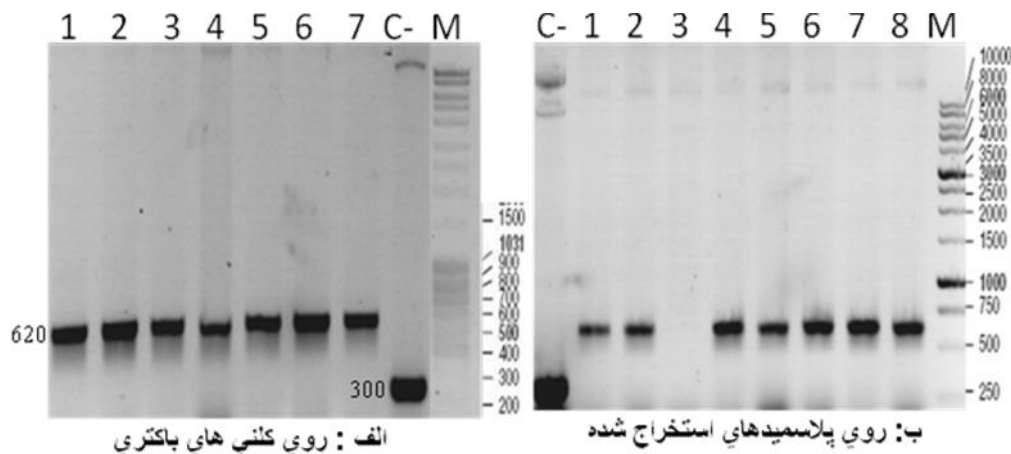
بررسی مقاومت گیاهان تراریخت به PVX: گیاهچه‌های

درون شیشه‌ای تراریخت تکثیر یافته به همراه گیاهان غیرتراریخت به بستر کشت حاوی پرلیت ۲۰٪، کوکوپیت ۲۰٪ و خاک ۶۰٪ منتقل و پس از دو هفته آبیاری با محلول MS نصف غلظت به محیط خاک سازگاری یافتند. ویروس PVX پس از تکثیر در گیاه توتون و تایید آلودگی از طریق آزمون ELISA به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین پوششی ویروس، برای تلقیح به روش مکانیکی روی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت استفاده گردید. دو هفته پس از تلقیح، RNA گیاهان از برگهای جدید تلقیح نشده بالایی استخراج و سنتز cDNA انجام گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس PVX (aaGGATTCatgtcagcaccagctagcaca) PVXCPF: آغازگر رو به جلو و (aaGAATTCttatggtgtgggagagtgc) PVXCPR: آغازگر



شکل ۱- همسانه سازی P25 در وکتور pFGC5941: الف) نقشه خلاصه شده وکتور و استراتژی همسانه سازی قطعه‌ای از ژن P25 در جهت sense و antisense. از چپ به راست شامل کاست ژن مقاومت به کانامایسین خارج از T-DNA، حاشیه چپ (LB)، کاست ژن مقاومت به بستا داخل T-DNA، پروموتور CaMV-35S، محل ورود ژن در جهت sense، اینترون ژن *Chalcone Synthase A*، ترمیناتور ژن *Octopine Synthase* و حاشیه راست (RB) می‌باشد. محل سایت برشی آنزیم‌ها مشخص شده است ب) محصول PCR قطعه ژن P25 روی cDNA ویروس PVX با آغازگرهای اختصاصی P25R و P25Fint روی ژل آگارز الکتروفورز. هر دو لاین دارای باند ۴۰۰ جفت بازی می‌باشند. ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR پس از برش آنزیمی با *XhoI* و *NcoI* روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. د) نتیجه الکتروفورز وکتور خالی pFGC5941 با اندازه ۱۱۴۰۷ جفت باز پس از برش آنزیمی با *XhoI* و *NcoI* روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. ه) نقشه وکتور pFGC5941

Fig1. Cloning of PVX P25 in pFGC5941 plasmid (sense).



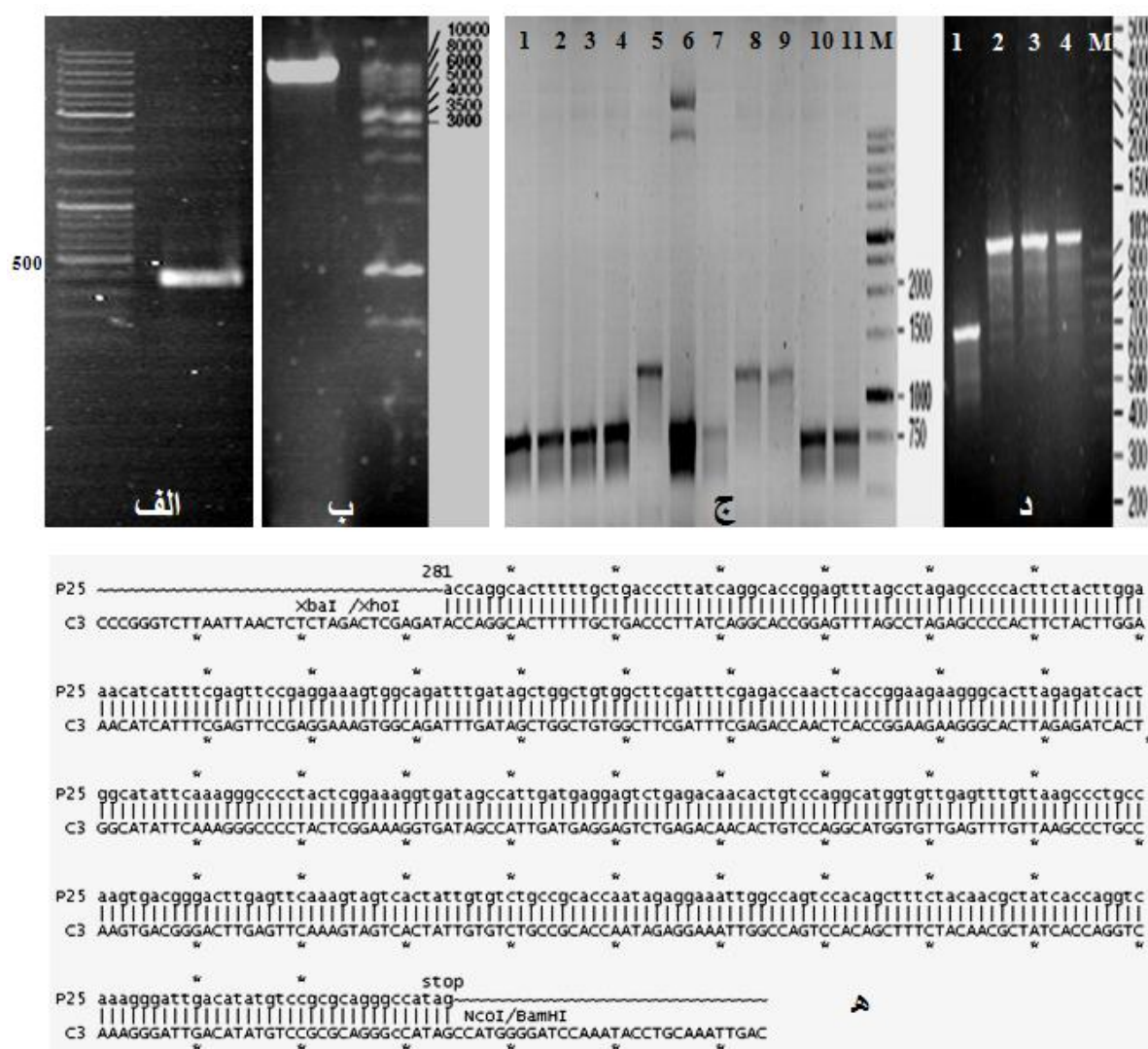
شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Rint و Fext) روی کلنی‌های باکتری (الف) و روی پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری (ب) حاوی وکتور نوترکیب pFGC5941 محصول همسانه‌سازی اول قطعه ژن P25 در جهت sense. (الف) در هفت ستون ۱-۷ باند ۶۲۰ جفت بازی دیده می‌شود. در ستون آخر (C-) باند تقریباً ۳۰۰ جفت بازی نتیجه PCR روی وکتور خالی به عنوان کنترل می‌باشد که در آن فاصله این دو آغازگر ۳۰۰ جفت باز است. (ب) در ستون اول (C-) باند ۳۰۰ جفت بازی مربوط به کنترل منفی (وکتور خالی) و در بقیه ستون‌ها باند ۶۲۰ جفت بازی قابل مشاهده است. (در ستون ۳ بخاطر مشکل در PCR بانندی مشاهده نمی‌شود)

Fig2. The Electrophoresis of PCR products on bacterial (a) and Plasmid DNA (b) with plasmid primers

جداسازی و خالص سازی شد و واکنش لیگاسیون بین آنها صورت پذیرفت. پس از انتقال به باکتری و گزینش کلنی‌ها، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Rext و Fint) روی کلنی‌ها انجام و از کلنی‌های مثبت حاوی قطعه ژن، باند تقریباً ۱۱۷۲ bp به دست آمد (شکل ۳-ج). آغازگر Rext از نوکلئوتید ۴۲۹۱ و آغازگر Fint از نوکلئوتید ۳۵۰۵ به وکتور pFGC5941 اتصال پیدا می‌کنند، لذا باند حاصله روی وکتور خالی باید دارای ۷۸۶ bp باشد (شکل ۳-ج)، و در صورت داشتن قطعه P25 در جهت آنتی سنس با افتادن ۱۴ bp هنگام برش بایستی باند ۱۱۷۲ bp (۷۸۶+۴۰۰-۱۴) بدست آید. سه کلنی گزینش شده چنین بانندی را نشان دادند (شکل ۳-ج) از این سه کلنی، استخراج پلاسمید صورت گرفت و برای تأیید آن‌ها واکنش PCR دوباره انجام یافت (شکل ۳-د). برای تأیید بیشتر پلاسمیدهای نوترکیب حاصل، این سه وکتور نهائی برای توالی-یابی ارسال گردید. توالی یکی از این وکتورها برای هر چهار آغازگر روی وکتور pFGC5941 با توالی P25 چاپ شده در NCBI به شماره GQ863228 بررسی و به‌خوبی تأیید شد (شکل ۳-ه) که از آن برای ادامه کار استفاده گردید.

وکتور نوترکیب جدید بایستی بانندی معادل ۶۲۰ bp (۸۰+۴۰۰+۳۰۰) می‌داد که در شکل مشخص می‌باشد. ۴۰۰ bp اندازه قطعه ژن P25 وارد شده و ۳۰۰ bp فاصله پرایمرها روی وکتور خالی و ۸۰ bp قطعه افتاده از وکتور در برش آنزیمی می‌باشد. تقریباً تمام کلنی‌هایی که روی محیط انتخابی رشد کرده بودند، باند درستی را نشان دادند که در شکل (۲-الف) نتیجه PCR روی هفت کلنی آورده شده است. جهت تأیید نهایی کلنی‌های مثبت، پلاسمیدهای آن‌ها استخراج و از آن‌ها نیز PCR با شرایط فوق انجام شد (شکل ۲-ب). از یکی از آن‌ها برای شروع همسانه سازی دوم در جهت antisense استفاده شد.

به منظور قرارگیری قطعه P25 در جهت antisense در وکتور pFGC5941 بار دیگر واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعه ژن P25 (P25R و P25Fint) انجام و قطعه ۴۰۰ bp تکثیر شد (شکل ۳-الف). پس از تأیید نتیجه، بقیه محصول PCR مانند قبل خالص سازی و برای برش آنزیمی، این بار از دو آنزیم *Bam*HI و *Xba*I استفاده شد. وکتور محصول همسانه سازی اول نیز همزمان با این دو آنزیم برش یافت (شکل ۳-ب). قطعات مطلوب پس از برش آنزیمی روی ژل آگارز LMP



شکل ۳- همسانه سازی قطعه ژن P25 در جهت آنتی سنس در وکتور pFGC5941: الف) نتیجه الکتروفورز محصول PCR قطعه ژن P25 ۴۰۰ جفت باز پس از برش آنزیمی با *XbaI* و *BamHI* روی ژل آگارز LMP. ب) نتیجه الکتروفورز وکتور نو ترکیب pFGC5941-P25 محصول همسانه سازی اول پس از برش آنزیمی با آنزیمهای فوق. ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای تایید همسانه سازی دوم قطعه ژن P25 در جهت آنتی سنس روی کلنی های گزینش شده در محیط انتخابی با آغازگرهای اختصاصی وکتور (Rext و Fint). در ستون های ۵، ۸ و ۹ دارای باند ۱۱۷۲ جفت بازی و بقیه فاقد P25 هستند. ستون ۶ باند ۷۸۶ جفت بازی نتیجه PCR روی وکتور خالی به عنوان کنترل است. د) نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای تایید مجدد همسانه سازی دوم قطعه ژن P25 در جهت آنتی سنس روی سه پلاسمید استخراج شده از کلنی های مثبت که باند با اندازه ۱۱۷۲ جفت باز دارند و ستون اول نتیجه PCR روی وکتور خالی به عنوان کنترل است. M: مارکر اندازه DNA. ه) همردیفی نتیجه توالی-یابی یکی از سه پلاسمید مثبت pFGC5941 دارای قطعه ژن P25 در هر دو جهت سنس و آنتی سنس با چهار آغازگر وکتور و مقایسه قطعه ژن P25 جهت آنتی سنس موجود در آن با توالی ثبت شده P25 در NCBI، به کمک نرم افزار APE.

Fig3. Cloning of PVX P25 in pFGC5941 plasmid (antisense).

آگروباکتریوم منتقل و وجود این پلاسمید در آنها با PCR تایید شد. این کلنی تکثیر و برای تراریزش گیاهان سیب زمینی در ادامه کار استفاده شد. گیاهچه های درون شیشه های سیب زمینی رقم آگریا در محیط MS تکثیر شده و قبل از شروع از جهت وجود

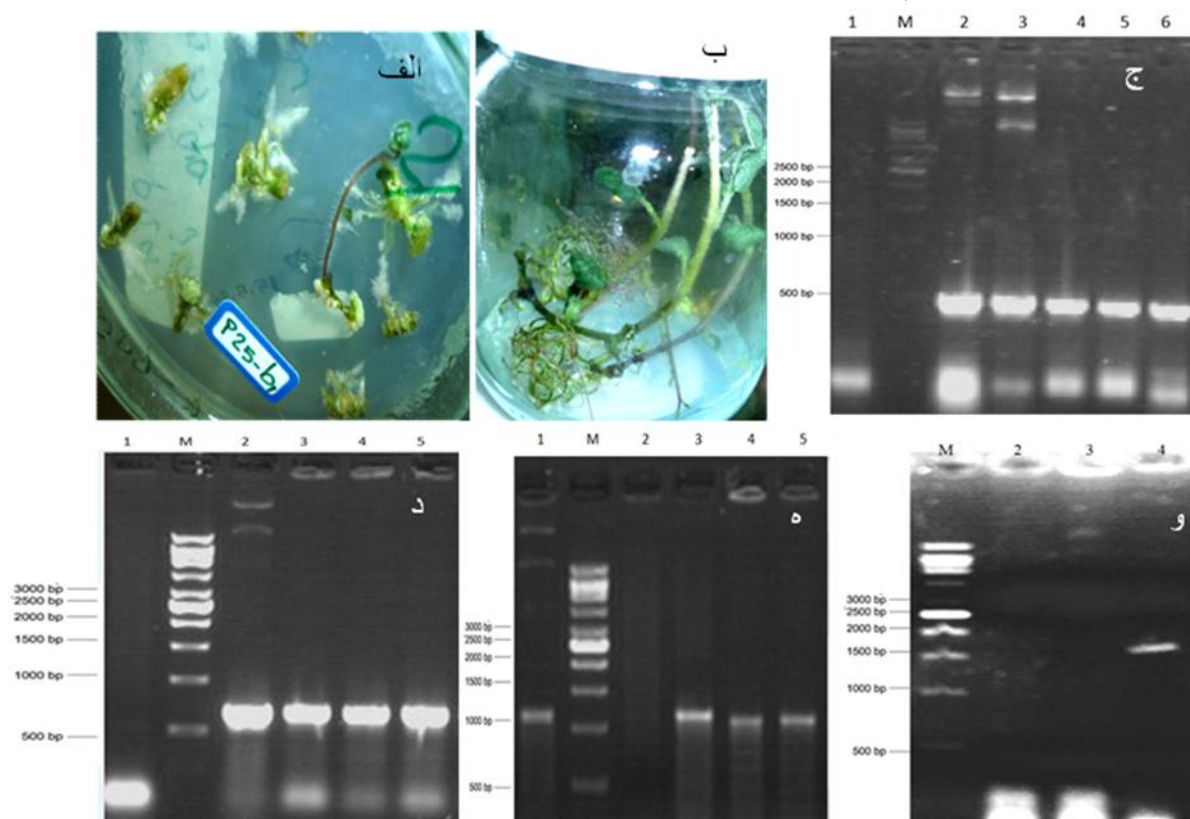
تراریزش گیاه سیب زمینی با وکتور نو ترکیب pFGC5941 تولید کننده سازه سنجا ق سری P25 ویروس PVX به کمک آگروباکتریوم: ناقل نو ترکیب pFGC5941 بعد از اینکه در هر دو جهت سنس و آنتی سنس توسط توالی یابی تایید شد، به سلول های

ظرف کشت تنها یک گیاه حاصل از تراریزش قرار گرفت و نامگذاری مستقل شده و تکثیر یافت. این گیاهان در سن چهار هفتگی برای آنالیزهای مولکولی استفاده شدند.

بررسی وجود تراژن در DNA گیاهان تراریخت: DNA

ژنومی سه گیاه از بین گیاهان حاصل از محیط انتخابگر استخراج شد. برای تأیید وجود T-DNA در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای مختلف قطعه کلون شده در وکتور استفاده شد. بدین منظور سه نوع PCR مختلف بصورت زیر انجام پذیرفت.

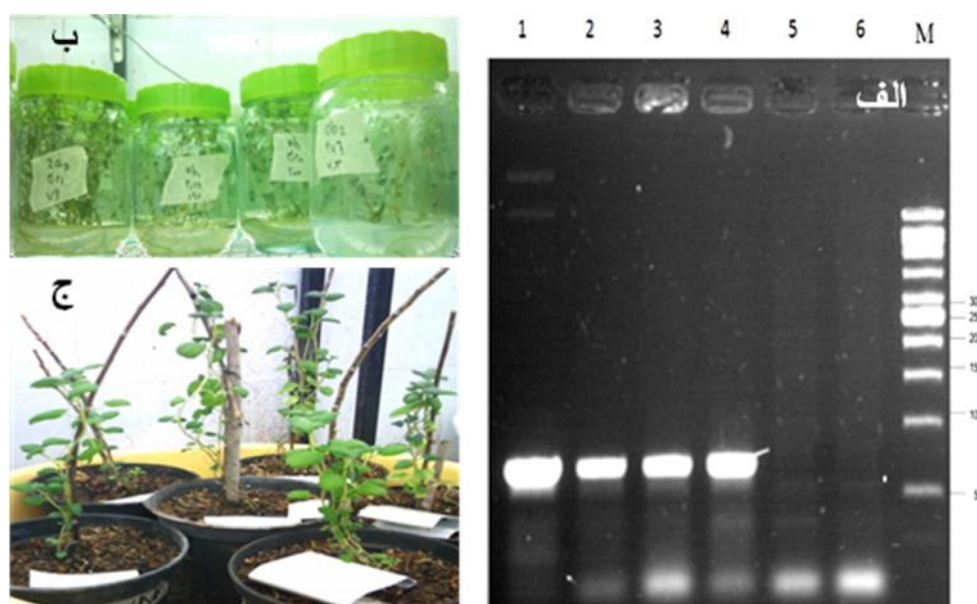
چند ویروس مهم با ELISA تست شدند. سپس، میانگره‌های آنها به طول نیم تا یک سانتی‌متر تهیه و جهت همکشتی با آگروباکتریوم حاوی پلاسמיד نو ترکیب pFGC5941 استفاده شد. نمونه‌ها بعد از یک ساعت هم کشتی در محیط کالوس‌زایی حاوی آنتی بیوتیک Cefotaxime برای حذف آگروباکتریوم قرار داده شدند و تقریباً بعد از ۱۴ روز کالوس‌ها تشکیل یافتند. سپس گیاهان به مدت ۴ هفته در محیط جوانه‌زنی حاوی عامل انتخاب-گر روی T-DNA، یعنی PPT و همچنین Cefotaxime برای اطمینان از عدم رشد آگروباکتریوم‌های باقیمانده برده شدند و جوانه زنی گیاهانی که در برابر PPT مقاوم بودند آغاز شد. در هر



شکل ۴- تأیید وجود تراژن در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی: (الف) کالوس‌زایی و جوانه‌زنی ریزنمونه‌های تراریخت سیب‌زمینی با سازه سنجا ق‌سری P25 و ویروس PVX. (ب) جداسازی جوانه‌ها و ریشه‌زایی و بازکشت گیاهان سیب‌زمینی تراریخت. (ج) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای P25 R و P25 Fint روی DNA ژنومی گیاهان سیب‌زمینی تراریخت (ستون‌های ۴، ۵، ۶ مربوط به سه گیاه حاوی باند ۴۰۰ bp)، ستون ۱ مربوط به کنترل منفی روی DNA گیاه سیب‌زمینی غیرتراریخت انجام شده است. ستون ۲ و ۳ محصول PCR به ترتیب روی وکتور pFGC5941 نو ترکیب و وکتور pPVX به عنوان کنترل مثبت. (د) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Rint و pFGC5941 Fext، روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت، باند موجود در ستون‌های ۳، ۴ و ۵، ۶ جفت باز است که این باند با PCR کنترل مثبت که روی وکتور pFGC5941 نو ترکیب انجام شده (ستون ۲) برابری می‌کند. ستون ۱، کنترل منفی روی گیاه غیرتراریخت. (ه) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Rext و pFGC5941 Fint، روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت، باند موجود در ستون‌های ۳ تا ۵، ۱۱۷۲ جفت باز بوده و با باند کنترل مثبت که روی وکتور pFGC5941 نو ترکیب انجام شده (ستون ۱) برابر است، ستون ۲ نتیجه PCR کنترل منفی روی گیاه غیرتراریخت. (و) نتیجه الکتروفورز محصول RT-PCR با آغازگرهای pFGC5941 Rext و pFGC5941 Fext، روی cDNAهای سنتز شده از RNAهای گیاهان تراریخت. از دو گیاه تراریخت باندی رویت نشد

ولی در ستون شماره چهار که مربوط به گیاه سوم بود باند دیده می‌شود. با در نظر گرفتن حذف توالی ایترون در cDNA، با حذف ۱۳۵۲ جفت باز طول ایترون CHAS باندی در محدوده ۲۰۰۰-۱۵۰۰ جفت باز حاصل خواهد شد که باند ستون ۳ در این محدوده قرار گرفت.

Fig4. Confirmation of transgene presence in transgenic potato plants (DNA and PCR).



شکل ۵- الف) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای pFGC5941 Rint و pFGC5941 Fext روی cDNAهای سنتز شده از RNAهای استخراج شده از گیاهان تراریخت. باند ۶۲۰ جفت بازی در ستون های ۲، ۳ و ۴ که با اندازه باند کنترل مثبت در ستون ۱، یعنی pFGC5941 نو ترکیب برابری می‌کند. دو ستون آخر، نتیجه PCR روی cDNA گیاه غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی می‌باشد. (ب) تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان تراریخت سیب‌زمینی در لاین های مستقل. (ج) انتقال و سازگاری گیاهان تراریخت سیب زمینی به گلدان.

Fig5. Confirmation of transgene expression (RNA and RT-PCR) in transgenic potato plants.

(ج) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fint و pFGC5941 Rext: این PCR با جفت آغازگرهای دو طرف محل ورود قطعه P25 در جهت آنتی‌سنس انجام شد. نتیجه این PCR نشان داد که قطعه ژن P25 در جهت آنتی‌سنس هم به DNA ژنومی هر سه گیاه تراریخت وارد شده است (شکل ۴-ج). **بررسی بیان تراژن در گیاهان تراریخت با RT-PCR:** از سه لاین انتخاب شده از گیاهان تراریخت پس از تکثیر و تایید حضور تراژن در درون DNA ژنومی آنها، استخراج RNA با استفاده از روش مبتنی بر Trizol صورت گرفت و سپس تیمار DNase انجام شد. پاسخ منفی PCR اولیه روی RNA ها پس از تیمار DNase نشان داد که آلودگی DNA وجود ندارد. آنگاه از روی RNAها، cDNA سنتز شده و با استفاده از آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rext واکنش PCR انجام شد. هدف از این کار، بررسی حضور

الف) PCR با آغازگرهای P25 R و P25 Fint روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت: نتیجه این PCR برای هر سه DNA ژنومی مثبت بود. از وکتورهای pFGC5941 نو ترکیب و PVX به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۴). ستون‌های ۳، ۴ و ۵ از روی DNA سه گیاه مختلف حاصل از محیط انتخابگر انجام شد. بدین ترتیب وجود تراژن در این گیاهان تایید گردید.

ب) PCR با آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint: PCR با آغازگرهای مربوط به وکتور در ناحیه بالادست و پایین دست محل ورود قطعه P25 در جهت سنس یعنی pFGC5941 Rint و pFGC5941 Fext انجام شد. باند موجود در ژنوم گیاه، با نتیجه حاصل از وکتور pFGC5941 نو ترکیب در جهت سنس مطابقت داشت (شکل ۴-ب).

نتیجه الکتروفورز آنها نشان داد که سنتز cDNA در همه نمونه‌ها تقریباً بصورت یکسان به خوبی انجام شده است. آنگاه واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی CP-PVX صورت گرفت. نتیجه الکتروفورز محصول PCR نشان داد که گیاهان تراریخت لاین اول و دوم مقاوم به PVX هستند (شکل ۶- ب). اندازه باند محصول PCR ژن پروتئین پوششی ۷۱۴ جفت باز است که در کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخت دیده شد اما در تکرارهای دو لاین تراریخت مشاهده نشد. بدین وسیله نتیجه ELISA با RT-PCR تایید شد.

نتایج مجموعاً نشان داد که دو لاین از رقم آگریا سیب زمینی تراریخت شده‌اند و حاوی سازه سنجا ق سری قطعه‌ای از ژن P25 ویروس PVX که ممانعت کننده از RNA Silencing در میزبان است بوده و مقاومت به این ویروس را دریافت کرده‌اند و تاکنون تغییر ریختی ناهنجاری در گیاهان تراریخت مشاهده نشده است. در ادامه بایستی گیاهان این دو لاین تکثیر شده و ضمن کشت در گلخانه و بررسی مرفولوژی آنها به تولید مینی تیوبر اقدام و میزان تولید آنها با گیاهان غیر تراریخت مقایسه شود.

بحث و نتیجه گیری

ویروس‌ها برای ایجاد بیماری در میزبان و جهت همانندسازی و تکثیر خود نیازمند غلبه بر RNA Silencing میزبان هستند. در طول زمان و در تکامل با میزبان ویروس‌ها پروتئین‌هایی در ساختار خود تعبیه کردند که از RNA Silencing میزبان ممانعت می‌کند. چنین پروتئین‌هایی بنام Suppressor of Silencing یا ممانعت کننده از RNA silencing مشهور هستند که کم و بیش در تمام جنس‌های ویروسی شناسایی شده‌اند یا در حال شناسایی می‌باشند (Pazhouhandeh, 2009; Moissiard & Voinnet, 2004). این پروتئین‌ها، با توالی‌های مختلف هر کدام بطور مستقل و اختصاصی، بخشی از مکانیسم RNA Silencing را از کار می‌اندازند (Voinet, 2001). P25 یکی از پروتئین‌هایی است که از ژنوم PVX کد می‌شود و دارای چند وظیفه مهم مثل ممانعت کننده از RNA Silencing و پروتئین حرکتی ویروس می‌باشد (Chiu et al., 2010). در سال ۲۰۱۰ توسط گروه

mRNAهای حاصل از رونویسی سازه سنجا ق سری بود (شکل ۴- و). فقط در cDNA سنتز شده از RNA گیاه سوم باندی در محدوده ۲۰۰۰ جفت باز دیده شد که می‌تواند تأیید حضور P25 dsRNA در رونوشت‌های کل این گیاه باشد. در مورد گیاهان ۱ و ۲ احتمالاً dsRNAهای این گیاهان در مکانیسم RNA Silencing قرار گرفته‌اند و به siRNAهای ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتیدی تبدیل شده‌اند. برای اطمینان از بیان شدن تراژن در گیاهان تراریخت روی cDNA آنها واکنش PCR به کمک آغازگرهای pFGC5941 Fext و pFGC5941 Rint (مخصوص تأیید جهت سنس) انجام شد و در هر سه گیاه وجود باند ۶۲۰ جفت بازی همچون کنترل مثبت که روی وکتور انجام شد مشاهده گردید (شکل ۵- الف).

بررسی مقاومت گیاهان تراریخت به ویروس PVX با

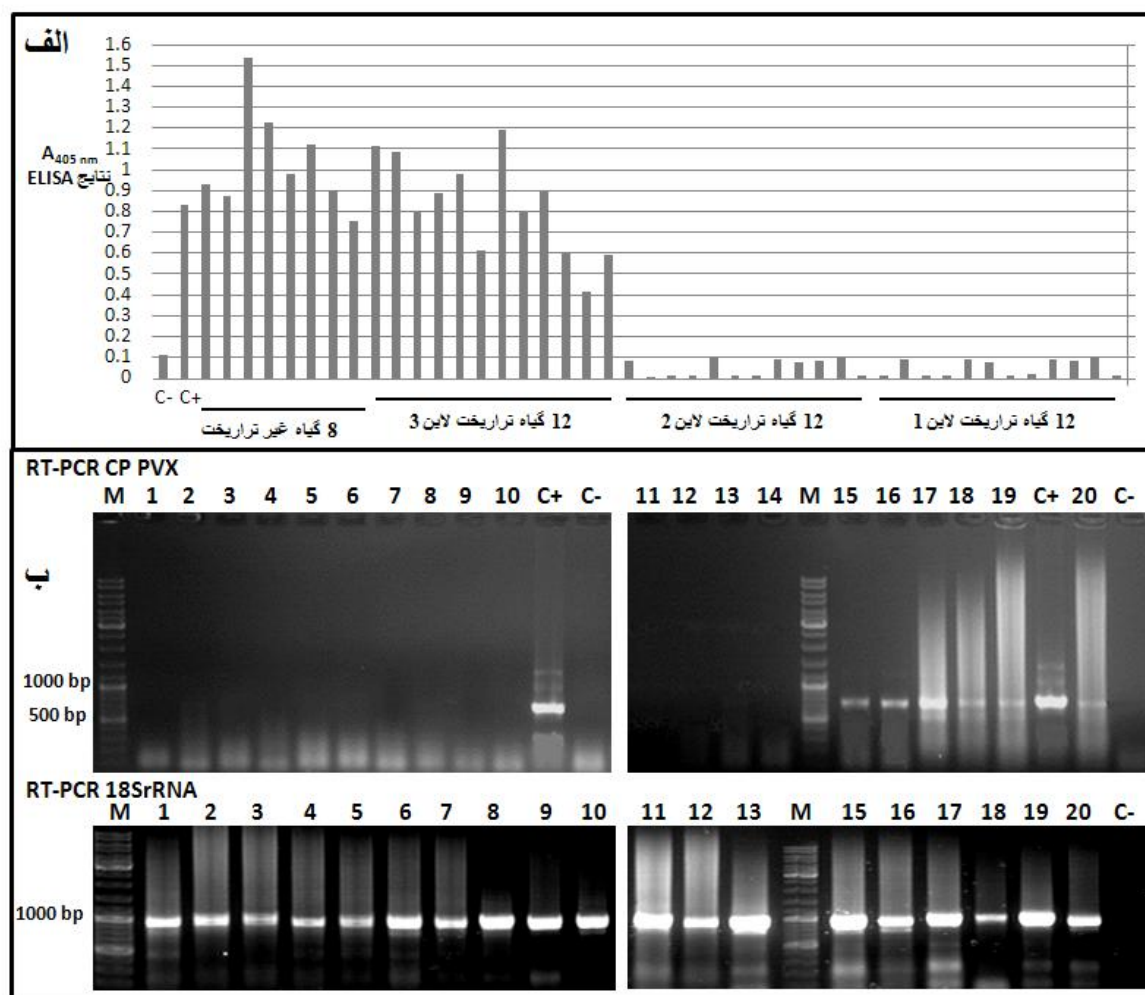
ELISA: پس از تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان تراریخت (شکل ۵- ب) و انتقال آنها به گلدانهای حاوی پرلیت و کوکوپیت، سازگار کردن آنها با آبیاری با محیط کشت MS مایع یک پنجم غلظت صورت گرفت (شکل ۵- ج). عصاره ویروس PVX تکثیر شده در آزمایشگاه به صورت مکانیکی به این گیاهان تراریخت و همچنین گیاهان غیر تراریخت به عنوان کنترل که در موازات تراریخت‌ها کشت شده بودند، تلقیح شد. تلقیح به روش مکانیکی روی دو برگ میانی گیاهان انجام شد. بعد از گذشت دو هفته برگ‌های بالایی گیاهان برای عصاره گیری تست ELISA و استخراج RNA استفاده شد. نتایج ELISA با آنتی بادی اختصاصی کت پروتئین PVX نشان داد که از سه لاین انتخاب شده تراریخت، دو لاین مقاومت به PVX را دریافت کرده‌اند (شکل ۶- الف).

تایید مقاومت گیاهان تراریخت به ویروس PVX با RT-

PCR: RNA استخراج شده از گیاهان دو لاین تراریخت و همچنین گیاهان غیر تراریخت پس از تیمار با DNase و اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA با PCR کنترل، برای سنتز cDNA استفاده شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده و درستی سنتز cDNA ابتدا یک واکنش PCR با آغازگرهای 18SrRNA مربوط به توتون انجام شد (شکل ۶- ب پایین) و

مهمترین آرگونات در مسیر RNA Silencing در گیاه آراییدوپسیس است که بدون وجود آن حیات گیاه به مخاطره می-افتد (Chiu et al., 2010).

تحقیقاتی Baulcombe، تاثیر P25 بر AGO1 در گیاه آراییدوپسیس بررسی شده و نشان دادند که P25 و AGO1 دارای میانکشی مولکولی قوی بوده و میزان AGO1 در حضور P25 کاهش می‌یابد که وابسته به فعالیت پروتئازوم است. AGO1



شکل ۶- بررسی و تایید مقاومت گیاهان تراریخت سیب زمینی به PVX: الف) نتیجه تست ELISA با آنتی پروتئین پوششی ویروس PVX. هر ستون نمایشگر میانگین سه چاهک تکرار برای هر گیاه است. C+ و C- به ترتیب کنترل منفی فاقد عصاره گیاهی و کنترل مثبت می‌باشند. حد آلودگی در این تست ۰/۱۳۵ بود. هر دوازده گیاه تلقیح شده و تست شده لاین یک و دو گیاهان تراریخت به ویروس مقاومت نشان دادند اما لاین سوم مثل گیاهان غیرتراریخت به ویروس آلوده شد. ب) نتیجه الکتروفورز محصول RT-PCR روی دو لاین تراریخت که در تست ELISA مقاومت نشان دادند. پایین با آغازگرهای اختصاصی 18S rRNA مربوط به توتون به اندازه تقریباً ۱۰۰۰ bp برای اطمینان از درستی cDNA ها. بالا با آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس PVX به اندازه ۷۱۴ bp. M مارکر اندازه DNA، ۱ تا ۱۰ مربوط به ده گیاه لاین اول و ۱۱ تا ۱۴ مربوط به چهار گیاه لاین دوم تراریخت، ۱۵ تا ۲۰ مربوط به شش گیاه غیرتراریخت سیب‌زمینی، C+ کنترل مثبت روی DNA وکتور pPVX و C- کنترل منفی فاقد cDNA.

Fig6. Resistance assay of potato transgenic plants to PVX by ELISA and RT-PCR.

گیاهان هدف گزارش کردند (Ai et al., 2011). در تحقیقی دیگر با استفاده از قطعاتی از ویروس تریستزای مرکبات در گیاه توتون مقاومت به این ویروس بر مبنای RNA Silencing ایجاد شد (Roy et al., 2006). به کمک همین فرایند گیاه مقاوم سیب زمینی شیرین در مقابل ویروسهای SPFMV، SPCSV، SPVG و SPMVMV ایجاد شده است (Sivparsad & Gubba, 2014).

روش ایجاد مقاومت در این تحقیق مبتنی بر ساختن سازه سنجا ق سری قطعه ای به طول ۴۰۰ باز از ژن P25 ویروس PVX بود. هرچه طول این قطعه بیشتر باشد امکان خاموش کردن ژن افزایش می یابد اما امکان غیر اختصاصی عمل کردن و هدف قراردادن ژنهای دیگر در گیاه نیز بیشتر می شود. در این خصوص از قطعه ای از P25 استفاده شد (Gene Bank: GQ863228.1) که هیچ شباهتی در ژنوم سیب زمینی و گیاهان دیگر نداشته باشد و بدین منظور هنگام انتخاب قطعه از طریق Blast در بانک های اطلاعاتی بررسی عمیق گردید. با توجه به اطلاعات موجود و طبیعی بودن مرفولوژی و فیزیولوژی گیاهان تراریخت حاصل، به نظر نمی رسد که ژنی از میزبان با این سازه سنجا ق سری مورد هدف قرار گرفته باشد. بررسی های بیشتر مرفولوژیکی روی گیاهان تراریخت در گلخانه و مزرعه لازم است تا گیاهان مقاوم حاصل هم از لحاظ ریخت شناسی و هم میزان تولید محصول تایید شوند. در این مطالعه گیاهان تراریخت به صورت مکانیکی با ویروس PVX تلقیح شده و بعد از تکثیر و گسترش ویروس داخل گیاهان آزمایشات ELISA و RT-PCR روی آنها انجام شد که نتایج همدیگر را ثابت نمودند. نتایج PCR روی cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده از گیاهان، نشان می دهد که احتمالاً قطعه ژن P25 در گیاهان تراریخت به صورت hairpin بیان شده و با RNA Silencing مانع از همانند سازی و تکثیر ویروس در این گیاهان شد. بررسی siRNA ها با نورترن بلات این احتمال را می تواند ثابت نماید. عدم وجود باند مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس در گیاهان تراریخت شاید این احتمال را بوجود آورد که سنتز cDNA و استخراج RNA در آنها به خوبی انجام نشده است اما انجام PCR برای یک ژن خانه دار در این نمونه ها و مشاهده باند مربوطه این احتمال را خنثی می کند. سنتز cDNA روی RNA گیاهان در این تحقیق دو بار انجام گرفت و نتایج

بیشتر کارهای مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به ویروس های گیاهی که بر اساس پاتوژن طراحی شده بود و مقاومت های کم و بیشی ایجاد کرده بود با کشف مکانیسم RNA Silencing از سال ۲۰۰۰ میلادی جهت دهی دقیق شد. تمام تلاش های انجام یافته تا آن زمان برای ساخت گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس، بخاطر متوقف شدن RNA silencing توسط پروتئین های ویروسی ممانعت کننده از RNA Silencing میزبان، بی ثمر بوده و انتظار مقاومت کامل در این گیاهان بیهوده است. چون با حمله ویروس سیستم دفاعی القا شده در گیاه، دیگر قادر به حفظ گیاه از آثار مخرب ویروس نیست. اما هدف قراردادن پروتئین های ویروسی ممانعت کننده از RNA Silencing در ایجاد مقاومت می تواند موثرتر باشد. مهمترین برتری و تفاوت این تحقیق با کارهای مشابه قبلی هدف قراردادن و متوقف کردن بیان پروتئین P25 ویروس PVX در گیاه است. سازه سنجا ق سری ایجاد شده در گیاه برای P25، میزبان را به تولید دائمی siRNA های P25 وادار می کند تا به محض حمله ویروس RNA های آن را از محل P25 مورد حمله قرار دهد. با این روش، دیگر ویروس قادر به خاموش کردن و از کار انداختن سیستم RNA Silencing در میزبان نخواهد بود و توسط همین مکانیسم از بین خواهد رفت. در تحقیقی مشابه P25 ویروس PVX در توتون بیان شد و مقاومت خوبی به TMV، PVX و سایر توپامو ویروسها ایجاد کرد. در گیاهان توتون تراریخت دو ویروس مذکور هیچ علایمی نشان نداده و نتوانستند تکثیر شوند (Ares et al., 1998).

برای خاموش کردن یک ژن در گیاه می توان از دو ابزار استفاده کرد که یکی قرار دادن بخشی از آن بصورت تکرار معکوس در سازه سنجا ق سری است و دیگری هدف قرار دادن آن با یک microRNA مصنوعی و استفاده از سازه های آماده تولید کننده microRNA است. به عنوان مثال گزارش شده که با استفاده از miR159a، miR171a و miR167b از گیاه *Arabidopsis thaliana* و نوع miRNA توانستند توالی های mRNA ژن P25 ویروس PVX و ژن HCPro ویروس PVY را در گیاهان توتون تراریخت آلوده به این دو ویروس مورد هدف قرار دهند و بدین ترتیب مقاومت بسیار بالایی در برابر این دو ویروس در

تولید سازه سنجاق‌سری مربوطه، مقاومت بصورت دائمی در گیاه و در تمامی بافتهای آن ایجاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت مالی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و همکاری مرکز توالی‌یابی انستیتو IBMP استراسبورگ فرانسه جهت توالی‌یابی وکتورهای نو ترکیب. این مقاله نتیجه تحقیقات دو پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و بیماری‌شناسی گیاهی در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان می‌باشد.

منابع

- Ai, T., Zhang, L., Gao, Z., Zhu, C.X. & Guo X. (2011). Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology*, 13,304-16.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N. & Mentaberry, A. (1998). Transgenic Plants Expressing Potato Virus X ORF2 Protein (P24) Are Resistant to Tobacco Mosaic Virus and other Tobamoviruses. *Journal of Virology*, 72,731-738.
- Bai, Y., Guo, Z., Wang, X., Bai, D. & Zhang, W. (2009). Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Progress in Natural Science*, 19,543-548.
- Beemster, A.B.R. & de Bokx, J. A. (1987). Survey of properties and symptoms. In: de Bokx, J.A. and van der Want, J.P.H. (eds) *Viruses of Potato and Seed Potato Production*. eds Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C. & Tsai, C.H. (2010). The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, 11,641-9.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162,156-9.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19,11-15.
- Duan CG, Wang CH, & Guo HS. 2012. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*. 3:5. doi:10.1186/1758-907X-3-5
- Forootani, S., Jafarpour, B., Falahati Rastegar, M., & Beigzadeh, N. (2004). Identification of races 1 and 3 of PVX in Khorasan and Ardebil Provinces. *Proceedings of the 16th. Iranian Plant Protection Congress*, Vol. II. Plant Diseases. Tabriz University, Tabriz, Iran. p222 (in Farsi).
- Kohm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A. & Baulcombe, D.C. (1993). A Potato Virus X Resistance Gene Mediates an Induced, Nonspecific Resistance in Protoplasts. *Plant Cell*, 5,913-920.
- Longstaff. M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. & Baulcombe, D. (1993). Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO Journal*, 12,379-86.
- Moissiard, G. & Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathology*, 5, 71-82.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15,473-497.
- Pazhouhandeh, M. (2009). *Virus and RNA Silencing*. Lambert Academic Publishing (LAP), Germany.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2006). F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *PNAS*, 103,1994-1999.

- Roy, G., Sudarshana, M.R., Ullman, D.E., Ding, S.W., Dandekar, A.M. & Falk, B.W. (2006).** Chimeric cDNA Sequences from Citrus tristeza virus Confer RNA Silencing-Mediated Resistance in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plants. *Phytopathology*, 96,819-27.
- Salazar, L.F. (1996).** Potato Viruses and Their Control. International Potato Center. Peru. 214 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sivparsad, B.J. & Gubba, A. (2014).** Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA). *Transgenic Research*, 23,377-88.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M. & Bamunusinghe, D. (2007).** Molecular biology of Potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88,1643-55.
- Voinnet, O. (2001).** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, 17, 449-459.

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

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

نفیسه طوسی^۱ و امید عینی^{۲*}
Nafiseh Tousi¹ and Omid Eini^{2*}

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

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

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک
ToLCV
miRNA
RNA hybrid
گوجه فرنگی

مقدمه

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

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

غربالگری miRNAهای پیش‌بینی شده

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

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

نتایج

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

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

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

مواد و روش‌ها

گونه‌های ویروسی و بررسی RNA hybrid

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

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

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

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

جدول ۱- توالی های miRNAهای گوجه فرنگی که توانایی اتصال به ژنوم ویروس ToLCV-Au و نواحی کدکننده آن را دارند.
Table 1. Tomato miRNA sequences binding to ToLCV-Au genome and its encoded Open Reading Frames (ORFs).

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

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

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

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

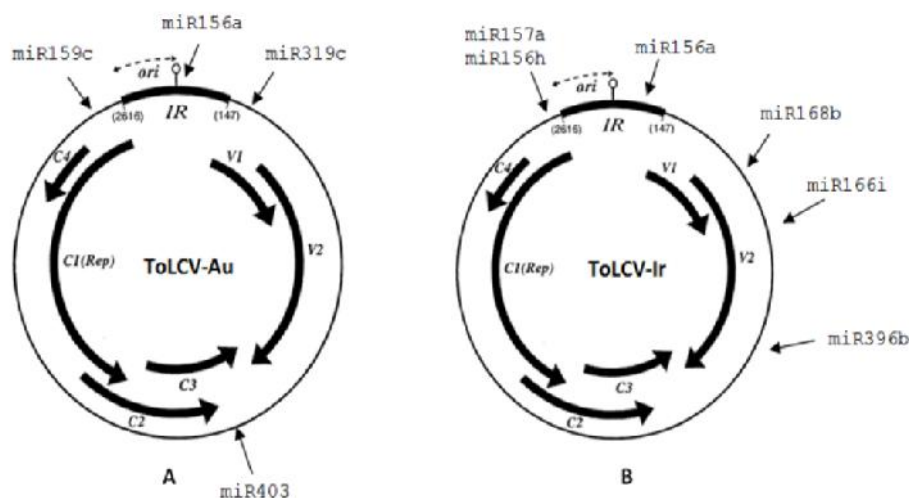
گیاه میزبان را در برابر ویروس از طریق دخالت miRNA ها افزایش دهد. همچنین مشخص شد که ژن V2 در ویروس ToLCV-Ir نیز می‌تواند در محل‌های مختلف مورد هدف miRNA ها قرار گیرد (miR166i و miR396b، miR168b). این مسأله نشان دهنده اهمیت نقش تنظیمی این ژن توسط miRNA ها است. ژن V2، که پروتئین پوششی ویروس را کد می‌کند،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

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

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

بحث

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



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

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

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

درمورد ToLCV-Au، دو ژن C2 و C4 به عنوان بازدارنده‌های خاموشي گزارش شده‌اند (Dogra et al., 2009; Selth et al., 2004) که می‌تواند تولید علائم شدید توسط این ویروس را با وجود امکان اتصال miRNAهای مختلف میزبان به ژنوم آن توجیه نماید. درمورد گونه خفیف، ToLCV-Ir، ژن موثر در بازدارندگی از مسیر خاموشي ژن هنوز شناسایی و معرفی نشده است. فقدان یا ضعیف بودن بازدارنده خاموشي ژن به وسیله این گونه خفیف ToLCV ممکن است به miRNAهای پیش‌بینی شده این امکان را بدهد که ژنوم ویروس را به طور موثرتری مورد هدف قرار دهند.

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

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

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

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

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

منابع

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

انتقال ژن آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B به گیاه توتون

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

ماجده نیسی^۱، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی^{۲*}، سیروس قبادی^۳،

حمید رجبی معماری^۴ و غزاله خاکسار^۵

Majedeh Neisi¹, Badraddin Ebrahim Sayed Tabatabaei^{2*}, Cyrus Ghobadi³, Hamid Rajabi Memari⁴, Ghazaleh Khaksar⁵

۱- دانش آموخته ارشد بیوتکنولوژی ۲- استاد گروه بیوتکنولوژی ۳- استادیار گروه علوم باغبانی

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۴- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

۵- دانش آموخته دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

¹ MSc in Biotechnology, ² Prof, Department of Biotechnology,

³ Assistance Prof, Department of Horticulture,

Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴ Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

⁵ Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sayedt@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۴)

چکیده

یکی از شایع ترین آلودگی های ویروسی انسانی در سراسر جهان آلودگی ویروس هپاتیت B است. مؤثرترین شیوه برای کنترل و درمان این بیماری، تزریق واکسن می باشد، اما با توجه به گران بودن داروهای شیمیایی، تولید پروتئین نو ترکیب ویروس هپاتیت B به عنوان واکسن خوراکی در گیاهان طی چند سال گذشته با بیورآکتورهای مناسب برای تولید ارزان و فراوان اهمیت یافته است. بنابراین در این پژوهش سعی شده است که ژن HBsAg با کمترین هزینه به گیاه مدل توتون منتقل شود. بدین منظور ابتدا ناقل دوگانه pCAMBIA 1304 حاوی ژن HBsAg در باکتری *Escherichia coli* سویه JM107 و اگروباکتریوم سویه LBA4404 کلون و به روش قطعات برگی به گیاه توتون منتقل شد. بازرایی ریزنمونه های تلقیح شده در محیط کشت انتخابی MS حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و همچنین تنظیم کننده های رشد در غلظت های یک میلی گرم در لیتر BAP و یک دهم میلی گرم در لیتر NAA انجام گرفت. در آخر پس از رسیدن گیاهچه های غربال شده به ارتفاع ۱۵ سانتیمتر، به روش CTAB از گیاهان تراریخته احتمالی DNA استخراج شد و جهت شناسایی و تأیید حضور ژن با آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR و جهت بررسی بیان ژن واکنش RT-PCR انجام گرفت و بدین ترتیب حضور و بیان این ژن در گیاهان تراریخته توتون تأیید شد

واژه های کلیدی

اگروباکتریوم

تراریختی

توتون

ژن HBsAg

واکسن خوراکی

مقدمه

هپاتیت B یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی است و نزدیک به یک سوم جمعیت جهان در خطر ابتلا به این بیماری و ۳۵۰ میلیون نفر حامل این بیماری می‌باشند. سالیانه بیش از یک میلیون نفر در اثر ابتلا به سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma) ناشی از این ویروس می‌میرند (Rizzetto and Ciancio 2008). ویروس هپاتیت B حاوی ژنوم DNA می‌باشد و بر این اساس عضو خانواده هپادناویریده (Hepadnaviridae) طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس در ساختار خود دارای یک DNAی منحصر به فرد کروی و دو رشته‌ای، به طول ۳۲۰۰ جفت باز می‌باشد. در قسمت خارجی ویروس پوشش لیپوپروتئینی (آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg)) و در قسمت مرکزی آن هسته نوکلئوکسیدی (آنتی-ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg)) به طول ۲۷ نانومتر موجود است (Ram Maya et al. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B مهم‌ترین قسمت پوشش خارجی ویروس و محصول ژن S می‌باشد. این آنتی‌ژن از سه گلیکوپروتئین کوچک، متوسط و بزرگ به نام‌های SHBs، MHBs و LHBs ساخته شده و به ترتیب توسط ناحیه pre-s₂، pre-s₁ و s و ژن S کد می‌شوند (Sunil Kumar et al. 2007). این آنتی‌ژن از ویروس HBV پاسخ ایمنی مناسب علیه بیماری را القا و موجب تولید آنتی‌بادی خنثی‌ساز (Neutralizing) می‌شود (Guan et al. 2012).

یکی از مؤثرترین و پیشرفته‌ترین روش‌های کنترل عفونت هپاتیت B واکسیناسیون می‌باشد (Guan et al. 2012). اولین واکسن نوترکیب HBV در مخمر تولید شد که از لحاظ اقتصادی گران و مقرون به صرفه نبود (Marcondes and Hasen 2008). در سال‌های گذشته گیاهان تراریخته به عنوان بیورآکتور-های مناسب برای تولید ترکیبات دارویی و نوترکیب متنوعی از جمله آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌های نوترکیب، آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی، فاکتورهای رشد، واکسن‌های خوراکی و انواع زیادی از پروتئین‌های نوترکیب جانوری و انسانی به کار برده شده‌اند (Shereen et al. 2009). واکسن‌های مشتق شده از گیاهان تراریخته از نظر امنیت زیستی، پایداری، راندمان بالا و هزینه تولید نسبت به واکسن‌های نوترکیب مشتق شده از سلول‌های

پستانداران و مخمر توجه زیادی را در سراسر جهان به خود جلب کرده‌اند (Baesi et al. 2011; Li et al. 2011). به طور کلی استفاده از گیاهان تراریخته برای تولید واکسن مزیت‌های زیادی نسبت به سیستم‌های سنتی دارد. گیاهان فقط بخش مختص عفونت یا مسمومیت ذاتی را بیان کرده و بدین ترتیب باعث کاهش دیگر عکس‌العمل‌های مضر می‌شوند (Shereen et al. 2009)؛ گیاهان میزبان پاتوژن‌های انسانی و جانوری نمی‌باشند بنابراین در اثر تولید واکسن، خود آلوده نمی‌شوند (Shereen et al. 2009)؛ هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰-۲ درصد سیستم فرمتاسیون باکتری‌ها و ۱/۰ درصد کشت سلول-های پستانداران بوده (Giddings 2001) و همچنین قیمت تمام شده تولید آنتی‌بادی در گیاهان حدود ۱/۰- ۰/۰۰۱ تولید آن در سیستم‌های دیگر است (Daniell 2003).

با توجه به قیمت گزاف داروهای شیمیایی، نیاز به سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت مناسب، در مقیاس بالا و بیشترین فعالیت زیستی و ایمنی در اختیار بیماران قرار دهد، امری ضروری می‌باشد. بنابراین در حال حاضر مؤثرترین روش در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب، واکسن‌های خوراکی مشتق شده از گیاهان تراریخته است. تولید واکسن هپاتیت B در گیاه می‌تواند روش مناسبی برای پیشگیری از این بیماری باشد و از نظر اقتصادی، امکان‌پذیر و عملی است (Sunil Kumar et al. 2007). گزارش‌های زیادی از انتقال و بیان ژن HBsAg در گیاهان مختلف وجود دارد (Shereen et al. 2009; Li et al. 2011; Choi et al. 2011; Guan et al. 2012). ولی توتون به جهت سهولت در انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخته، تولید بذر فراوان و تولید انبوه زیست توده (بیوماس)، کاندید مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نسبت به گیاهان دیگر می‌باشد (Daniell 2003; Ahangarzadeh et al. 2012). این مطالعه به منظور بررسی امکان انتقال ژن HBsAg به صورت پایدار و بیان آن در گیاهان تراریخته توتون در جهت تولید ارزان و انبوه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت (Sambrook and Russel 2001).

ارزیابی میزان حساسیت ریزنمونه‌های برگ‌ی به هیگرومایسین

جهت بررسی میزان حساسیت ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین، ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت MS دارای غلظت‌های مختلفی از این آنتی‌بیوتیک (صفر، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) کشت و به مدت یک ماه در اتاق رشد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از یک ماه اثر این آنتی بیوتیک بر باززایی و نکروز شدن ریزنمونه‌های برگ‌ی بررسی شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم جهت انتقال ناقل به گیاه بدین‌منظور، یک همسانه از باکتری *A.tumefaciens* حاوی ناقل مورد مطالعه به محیط‌کشت LB مایع دارای 50 mg l^{-1} استرپتومایسین و 100 mg l^{-1} کانامایسین منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد روی شیکر (۱۸۰ دور در دقیقه) نگهداری شد تا باکتری به میزان مناسبی از رشد برسد. سپس جهت دست‌یابی به غلظت مناسبی از باکتری (۰/۸ - ۰/۶ OD_{600})، باکتری رشد یافته به محیط‌کشت LB مایع جدید منتقل شد. پس از رسیدن باکتری به OD مناسب، لوله‌های حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در 6000 g و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. با حذف فاز رویی، سلول‌های ته‌نشین شده باکتری در محیط‌کشت MS مایع رقیق و حل شدند.

سویه‌های باکتری و ناقل‌های ژنی

در این پژوهش از دو باکتری *Escherichia coli* و *Agrobacterium tumefaciens* و ناقل بیانی pCambia1304 استفاده شد. از باکتری *E.coli* سویه JM107 به‌عنوان میزبان جهت نگهداری و تکثیر ناقل و از باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 و ناقل بیانی دوگانه pCambia1304 جهت انتقال ژن موردنظر و تراریختی گیاه توتون استفاده شد. این ناقل دارای نشانگر انتخابی کانامایسین جهت گزینش باکتریایی و نشانگر هیگرومایسین جهت گزینش گیاهان تراریخته می‌باشد (شکل ۱).

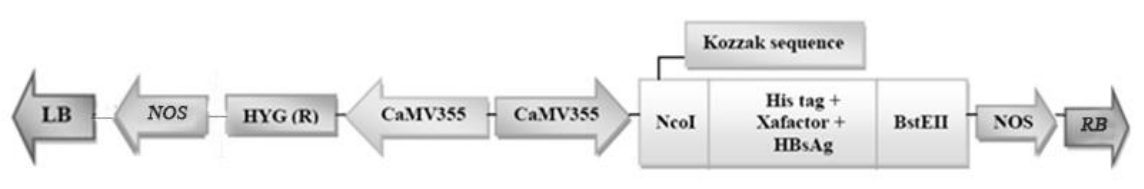
آغازگرهای اختصاصی ژن

به‌منظور شناسایی و تکثیر ژن مورد نظر از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای توالی ژن *HBsAg*، آغازگرهای اختصاصی با رعایت شرایطی همچون عدم تشکیل حلقه، عدم تشکیل دو رشته‌ای و درصد GC توسط نرم افزار oligoanalyzer طراحی شد. توالی این آغازگرها عبارتند از: آغازگر رفت:

5'-ATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA-3' و آغازگر برگشت:
5'-TCATCCATATAGCTGAAAGCCAAACAG-3'

انتقال ناقل به باکتری *Agrobacterium tumefaciens*

در این مطالعه ناقل pCambia - HBsAg تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35s)، به روش انجماد و ذوب



شکل ۱- ناحیه T-DNA ناقل pCambia1304 حاوی ژن *HBsAg*

Figure 1. T-DNA Region of pCambia1304 containing *HBsAg* gene.

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

در این پژوهش، ابتدا بذره‌های توتون با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد به همراه یک قطره تویین ۸۰ (جهت افزایش چسبندگی سطحی مواد ضد عفونی کننده با بذور) به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، ضد عفونی شده و در محیط جوانه‌زنی MS بدون هورمون (Murashige and Skoog 1962) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از سه هفته برگ‌های جوان توتون به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن انتخاب شده و به مدت سه روز در محیط کشت MS دارای هورمون ($1 \text{ BAP} + 0.1 \text{ NAA}$) قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون اگروباکتریوم ($0.6 - OD_{600nm} = 0.8$) جهت انتقال ژن مورد نظر تلقیح شدند. برای مایه‌کوبی، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در پتری دیش‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اگروباکتریوم و در دمای اتاق قرار گرفته و پس از خشک شدن نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل به ظروف دارای محیط کشت ($1 \text{ BAP} + 1 \text{ mg l}^{-1} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$) منتقل و به مدت سه روز در این محیط در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده و دارای 500 mg l^{-1} سفوتاکسیم شسته و روی کاغذ صافی استریل خشک گردید. سپس، نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (محیط کشت $1 \text{ BAP} + 1 \text{ mg l}^{-1} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ + سفوتاکسیم 500 mg l^{-1} + هیگرومایسین) منتقل و به مدت دو هفته در این محیط و در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول بر ثانیه بر مترمربع) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از باززایی ریزنمونه‌ها، جوانه‌های باززا شده از کالوس انتخاب شده و برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شد (Ahangarzadeh et al. 2012). در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی پرلایت و پیت‌ماس انتقال یافته و برای انجام مطالعات بعدی نگهداری شدند.

تأیید حضور ژن HBsAg در گیاهان با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جهت شناسایی و تکثیر ژن HBsAg از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Murray and Thompson 1998) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن انجام گرفت. بدین منظور ابتدا واسرشت‌سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس واکنش در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی، اتصال و تکثیر هریک به مدت یک دقیقه به ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT-PCR

به منظور بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج RNA توسط کیت (Rneasy Micro Kit شرکت QIAGEN، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت (شرکت Fermentas، آلمان) استفاده شد. سپس واکنش RT-PCR با همان شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) صورت گرفت.

نتایج

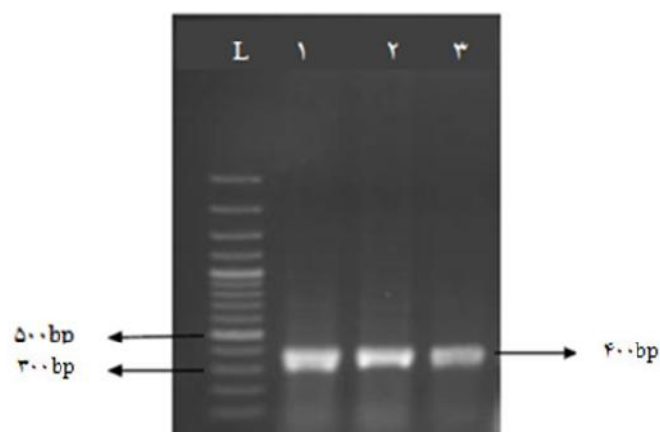
تأیید مولکولی حضور ناقل در اگروباکتریوم با انجام Colony PCR

کلونی‌های رشد یافته در محیط کشت LB حاوی کانامایسین و استرپتومایسین صحت انتقال را تأیید کرد. همچنین با انجام واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر و الگوی همسانه‌های حاوی ناقل pCambia 1304-HBsAg قطعه DNA به طول تقریبی ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد. (شکل ۲).

شدند در حالی که در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر، نمونه‌ها قهوه‌ای و نکروز شده و باززا نشدند. بنابراین غلظت 15mg l^{-1} هیگرومایسین به عنوان سطح مؤثر انتخاب شد به گونه‌ای که نمونه‌هایی که پس از تلقیح در این غلظت باززا شدند به علت دریافت ژن مقاومت به هیگرومایسین که در ناحیه T-DNA و در مجاورت ژن *HBsAg* قرار دارد، به عنوان نمونه‌های تراریخته احتمالی انتخاب شدند (Ahangarzadeh et al. 2012).

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون با آگروباکتریوم حاوی ژن مورد مطالعه و انتقال آن‌ها به محیط کشت انتخابی، برگ‌های توتون در حدود دو هفته، متورم و بزرگ شده و آثار کالوس‌زایی در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۳-الف). پس از دو هفته جوانه‌ها از کالوس، باززا شده (شکل ۳-ب) و سه هفته بعد، ریشه‌ها ظاهر شد (شکل ۳-ج). گیاهچه‌هایی با ارتفاع مناسب (۱۵ سانتیمتر) (شکل ۳-د)، به عنوان گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به خاک منتقل شدند (شکل ۳-ه).

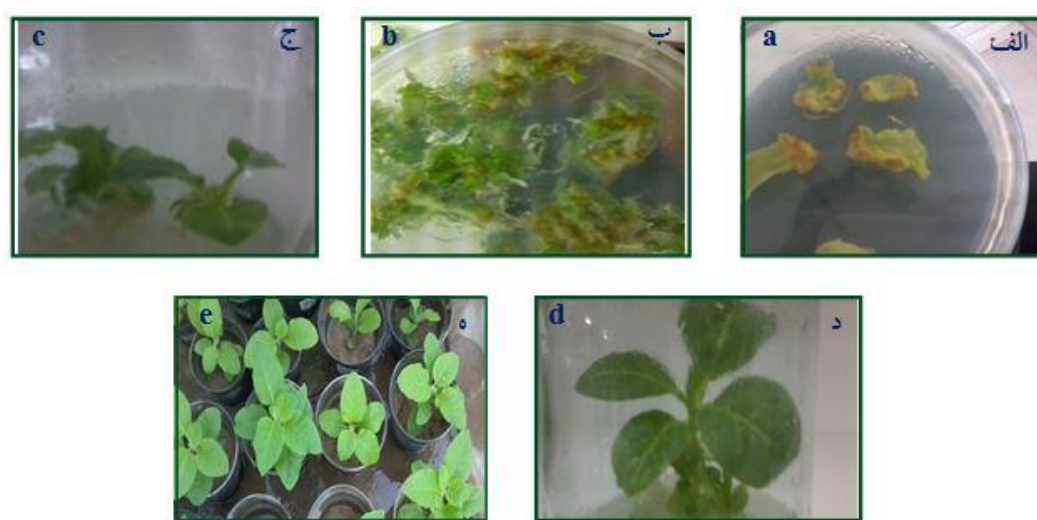


شکل ۲- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام واکنش Colony PCR با آغازگرهای *HB_R* و *HB_F*. L- نشانگر اندازه ۱۰۰ bp، ۱ تا ۳- همسانه‌های آگروباکتریوم نو ترکیب

Figure 2- Confirmation of Cloning of *HBsAg* Gene in *A. tumefaciens* by Colony PCR Technique. L: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentase), Lane 1-3: Transformed Colonies.

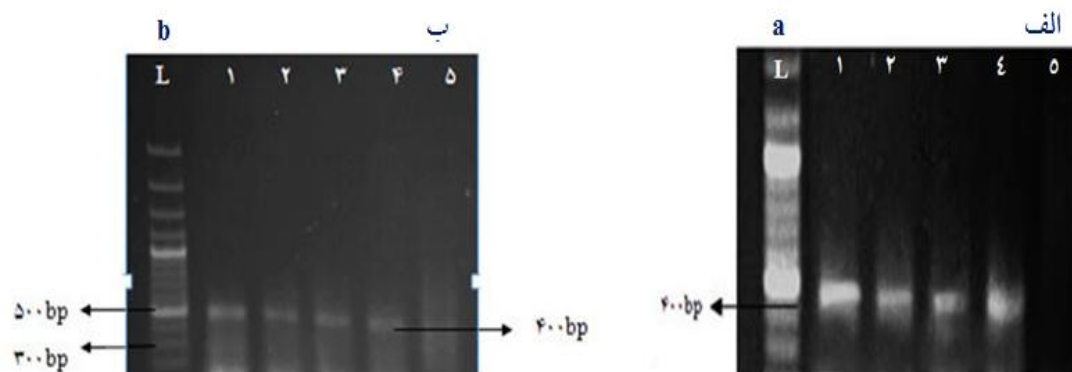
تعیین سطح مؤثر هیگرومایسین بر ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون

نتایج این بررسی نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین نمونه‌ها همچنان سبز مانده و باززا



شکل ۳- مراحل باززایی ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون پس از تلقیح با آگروباکتریوم: الف- بزرگ و متورم شدن ریزنمونه‌های برگ‌ی و ظهور کالوس. ب- باززایی جوانه‌ها ۱۰ روز پس از کالوس‌زایی. ج- ریشه دار شدن جوانه‌ها در محیط کشت بدون هورمون. د- رسیدن گیاهچه‌ها به حد مناسبی از رشد. ه- انتقال گیاهچه‌ها به خاک.

Figure 3- Regeneration of tobacco explants following co-culture with *Agrobacterium*. a: callus formation, b: shoot formation (2 weeks old), c: root formation (4-6 weeks old), d: transgenic plantlets, e: plants were transferred to soil.



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام PCR (الف) و RT-PCR (ب) در گیاهان تراریخته توتون. L- نشانگر اندازه ۱۰۰bp، ۱- پلاسمید حاوی قطعه موردنظر، ۲ تا ۴- گیاهان توتون تراریخته، ۵- گیاه توتون غیرتراریخته

Figure 4- PCR and RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants. a: PCR, b: RT-PCR. L: TM 100 bp DNA Ladder (Fermentase), 1: Positive Control (pCAMBIA-HBsAg), 2-4: transgenic plants, 5: untransformed plant (negative control).

بیماری‌های کبدی بوده و شدت آن از فردی به فرد دیگر متغیر است (Ram Maya 2008).

زراعت مولکولی و تکنولوژی گیاه تراریخته در ابتدا به عنوان راهی جهت رسیدن به مقاومت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفت، اما ظرفیت بالای سلول‌های گیاهی برای تاخوردگی صحیح و سریع پروتئین‌های بیگانه با ساختارهای پیچیده و همچنین حفظ ساختار اصلی آن‌ها در گیاهان نشان داد که گیاهان دارای پتانسیل بالقوه‌ای جهت تولید بهینه و مقرون به صرفه پروتئین‌های نوترکیب دارویی و صنعتی می‌باشند (Lopez et al. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B تولید شده در گیاهان تراریخته از نظر صفات آنتی‌ژنی و فیزیکی شباهت بسیاری به ذرات HBsAg مشتق شده از سرم انسانی و مخمر نوترکیبی دارد که تاکنون به عنوان واکسن استفاده شده‌اند (Mason et al. 1992).

ژن HBsAg در سیستم‌های گیاهی مختلفی از جمله گوجه‌فرنگی (Srinivas et al. 2008)، سیب زمینی (Richter et al. 2000; Shulga et al. 2004)، موز (Sunil Kumar et al. 2005)، هویج (Imani et al. 2002)، لوبین و کاهو (Kapusta et al. 1999) بیان شده است. در سال‌های گذشته نیز گزارش‌های بسیاری از های-پنگ و همکاران (۲۰۰۹)، شرین و همکاران (۲۰۰۹)، لی و همکاران (۲۰۱۱)، چوی و همکاران (۲۰۱۱) و گوان و همکاران (۲۰۱۲) وجود دارد که در آن‌ها انتقال و بیان ژن HBsAg

بررسی حضور ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش PCR

نتایج حاصل از تکثیر ژن مورد مطالعه با الگوی DNA حاصل از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته و آغازگرهای اختصاصی ژن نشان داد که حداقل یک نسخه از ژن HBsAg در ژنوم گیاهان تراریخته وجود دارد. عدم مشاهده باند در گیاهان شاهد نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ۴-الف).

بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT-PCR

طبق نتایج حاصل از واکنش RT-PCR و مشاهده قطعه‌ای با اندازه ۴۰۰ جفت باز، بیان ژن مورد مطالعه در گیاهان تراریخته تأیید شد (شکل ۴-ب). اما در گیاهان شاهد، عدم مشاهده تکثیر قطعه فوق بیانگر فقدان بیان ژن HBsAg در این گیاهان بود.

بحث

کارسینوم سلول کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است که علت حداقل ۷۵ درصد از این سرطان‌ها ویروس هپاتیت B (HBV) می‌باشد (Rizzetto and Ciancio 2008). این ویروس عامل اصلی

پیشبر CaMV 35S در گیاهان دو لپه انتخابی مناسب، قوی و سازنده بوده و باعث افزایش بیان ژن انتقال یافته در بخش‌های مختلف گیاه می‌شود به طوری که استفاده از این پیشبر در توتون می‌تواند میزان بیان را در مقایسه با پیشبرهای دیگر چندین برابر افزایش دهد (Sunil Kumar et al. 2003). همچنین از توالی کوزاک (Kozak sequence) جهت افزایش بیان ژن (Rajabi Memari et al. 2010)، از توالی His tag جهت سهولت شناسایی و تخلیص پروتئین موردنظر از سایر پروتئین‌ها در پژوهش‌های آنتی و از فاکتور هگزا (X) به منظور حذف توالی His tag بعد از تخلیص پروتئین، استفاده شد (Leelavathi and Reddy 2003).

در این مطالعه ریزنمونه‌های برگ توتون به طور موفقیت‌آمیزی توسط ناقل گیاهی بیانی pCAMBIA1304 و با واسطه‌گری اگروباکتریوم تراریخته شدند. حضور ژن *HBsAg* و بیان آن در گیاهان تراریخته نیز توسط بررسی‌های مولکولی PCR و RT-PCR تأیید شد. در گزارشاتی از گوان و همکاران، شرین و همکاران، باعثی و همکاران، لی و همکاران و سرینیواس و همکاران نیز حضور ژن *HBsAg* به ترتیب در گیاهان تراریخته گیلان، موز و گوجه فرنگی با انجام واکنش PCR تأیید شده است (Guan et al. 2012; Li et al. 2011; Srinivas et al. 2008; Baesi et al. 2011; Shereen et al. 2011). سرینیواس و همکاران نیز بیان این ژن را در گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی با RT-PCR تأیید کردند (Srinivas et al. 2008). اما براساس نتایج این پژوهش استفاده از ناقل فوق به‌تنهایی برای افزایش بیان ژن *HBsAg* و تولید پروتئین به‌عنوان واکسن خوراکی کافی نبوده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد در مطالعات آینده باید از توالی‌های افزایش‌دهنده در ناقل ژن موردنظر برای افزایش بیان و در نتیجه تولید انبوه پروتئین *HBsAg* استفاده کرد.

سلول‌های گیاه جینسنگ، موز، گوجه فرنگی، یونجه و گوجه-فرنگی مینیاتوری تأیید شده است (Hai-peng et al. 2009; Shereen et al. 2009; Li et al. 2011; Choi et al. 2011; Guan et al. 2012). علاوه بر این در گزارشی از های‌پنگ و همکاران (۲۰۰۹) و ریشتر و همکاران (۲۰۰۰)، *HBsAg* مشتق شده از گیاه جینسنگ و سیب زمینی تراریخته به طور موفقیت‌آمیزی در موش پاسخ ایمنی ایجاد کرد (Hai-peng et al. 2009; Richter et al. 2000). در گزارشی از کاپوستا و همکاران نیز پس از بیان این ژن در کاهو و لوبین و تغذیه موش از کالوس‌های تراریخته، آنتی‌بادی خاصی در آن‌ها حاصل گردید (Kapusta et al. 1999). اما آنچه حایز اهمیت است بیان متغیر ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته در شرایط محیطی متفاوت می‌باشد. بنابراین میزان تولید پروتئین فوق و در نتیجه پاسخ ایمنی پس از مصرف گیاهان تراریخته در موش و انسان، متفاوت است.

استفاده از سیستم گیاهی به‌عنوان بیوراکتورهای طبیعی، راه حل مناسبی برای تولید در مقیاس زیاد پروتئین *HBsAg* و تولید واکسن خوراکی می‌باشد. این پروژه با هدف گسترش زراعت مولکولی واکسن هپاتیت B (*HBsAg*) در گیاه توتون انجام پذیرفت. توتون گیاهی غیرعلوفه‌ای بوده و در مقایسه با گیاهان دیگر کشت بافت و باززایی آن راحت‌تر، انتقال ژن به آن ساده‌تر و نسبت به دستورزی ژنتیکی دارای انعطاف‌پذیری نسبی می‌باشد. با تکثیر توتون تراریخته در مدت زمان کوتاهی می‌توان محصول پروتئین نو ترکیب موردنظر را در سطح وسیع و به طور بهینه و ارزان تولید و وارد بازار کرد (Daniell 2003). از این رو در مطالعه حاضر از گیاه توتون و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 استفاده شد تا بر بیان ژن *HBsAg* افزوده شود. این ناقل دارای پیشبر CaMV 35S و ترمیناتور NOS می‌باشد.

منابع

- Ahangarzadeh Sh, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied Kh. 2012. Cloning, Transformation and Expression of Human Interferon $\alpha 2b$ Gene in Tobacco Plant (*Nicotianatabacum cv. xanthi*). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 7:111-116.
- Baesi M, NabatiAhmadi D, Rajabi-Memari H, Siahpoosh MR, Abdollahi MR, Jaberolansar N. 2011. Cloning and Transformation of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Gene to Tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill.). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 6:32-41.
- Choi JW, Park HS. 2011. Development of Transient Gene Expression System using Seedlings. Journal of Agricultural Science 45:193-199.
- Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 371-376.
- Giddings G. 2001. Transgenic plants as protein factories. Current Opinion in Biotechnology 12: 450-454.
- Guan ZJ, Guo B, Hao HY, Huo YL, Dai JK, Wei YH. 2012. Expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene in transgenic cherry tomato. African Journal of Biotechnology 11:7186-7192.
- Hai-peng YU, Yan XUE, Wei AN, Dan LIU, Shu-mei HAO, Jun SH. 2009. Expression of Hepatitis B Surface Antigen Gene in Ginseng Cells. Chemical Research in Chinese Universities 25: 695-698.
- Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich WH, Neumann KH. 2002. The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. Plant Cell Tissue And Organ Culture 71:157-164.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M. 1999. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. The Faseb Journal 13:1796-1799.
- Leelavathi S, Reddy VS. 2003. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Molecular Breeding 11:49-58.
- Li T, Sun JK, Lu ZH, Liu Q. 2011. Transformation of HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) Gene into Tomato Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 47: 69-77.
- Lopez A, Rosabal Y, Hernandez A, Gonzalez B, Rios J, Perez M, Clark Y, Boffill R, Fuentes A, Rodriguez L, Penton E, Falcon V, Menendez I, Rosa MCDL, Enriquez G. 2008. Expression of the Hepatitis A virus empty capsids in suspension cells and transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Biotechnologia Aplicada 25:42-46.
- Marcondes J, Hasen E. 2008. Transgenic lettuce carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. Brazilian Journal of Infectious Diseases 12:469-471.
- Mason SH, Lam DMK, Arntzen CJ. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. The Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 89:11745-11749.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 5:473-479.
- Murray MG, Thompson WF. 1998. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.
- Rajabi- Memari H, Ramanan RN, Ariff AB. 2010. Comparison of expression systems for the production of human interferon- $\alpha 2b$. Central European Journal of Biology 5:446-55.
- Ram-Maya M, Gershwin E, Shoenfeld Y. 2008. Hepatitis B Virus (HBV) and Autoimmune Disease. Clinical Reviews in Allergy and Immunology 34:85-102.
- Richter L, Thanavala JY, Arntzen CJ, Mason HS. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotechnology 18:1167-1171.
- Rizzetto M, Ciancio A. 2008. Chronic HBV-related liver disease. Molecular Aspects of Medicine 29:72-84.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 1448.
- Shereen FE, Roba MI, Bahieldin A, Sadik AS, Madkour MA. 2009. Expression of Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) gene in transgenic banana (*Musa* Sp.). Arab Journal of Biotechnology 12:291-302.
- Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, Melnikov VA, Bykov VA. 2004. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. Biochemical 69:1158-1164.
- Srinivas L, Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathia CJ, Bapat VA. 2008. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Biotechnology Reports 2:1-6.
- Sunil P, Sanjay Y, Vinod S. 2012. Pharmacognostical investigation and standardization of *capsicum annum* L. Roots. International Jurnal of Pharmacogn Phytochem 4:21-24.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KSN, Bapa VA. 2003. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. Science direct, Protein Expression and Purification 32:10-17.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. Planta 222:484 -493.

توصیف پروتئین‌های محافظت شده فرضی از *Xanthomonas citri*
subsp. citri، با فعالیت محرک تولید اتیلن در گیاه آراییدوپسیس

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۳۹-۳۱

Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from
Proteome of *Xanthomonas citri* subsp. citri, with Ethylene
Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*

وحید فلاح‌زاده ممقانی

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

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

Assistant Prof. of Plant Protection Dept. Agriculture Fac.
Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۱)

چکیده

در پژوهش‌های پیشین از بخش خالص شده پروتئوم باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) که قابلیت محرک تولید اتیلن در گیاه آراییدوپسیس را داشت، حدود ۶۰ پروتئین مختلف شناسایی شدند که از بین آنها هشت پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده بودند. هدف از انجام این پژوهش توصیف این پروتئین‌ها توسط ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف می‌باشد. همه پروتئین‌های مورد بررسی دارای جرم مولکولی متوسطی بودند. پروتئین NP_640497.1 با ۴۳/۸۴ کیلودالتون دارای بیشترین جرم مولکولی بود. نقطه ایزوالکتریک (pI) محاسبه شده برای پروتئین‌ها بین ۵/۳۴ تا ۹/۵ متغیر بود. نوع خانواده‌های پروتئینی و دامین‌های پروتئین‌ها توسط ابزار پایگاه اطلاعاتی دامین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro تعیین شد. از بین موارد مورد بررسی در پروتئین NP_640912.1 دامین HTH (Helix-turn-Helix)، از بخش مرکزی پروتئین NP_640497.1، دامین Enoyl_reductase، از پروتئین NP_641576.1 دو موتیف متصل شونده به یون کلسیم (EF-hand, calcium binding motif) و در پروتئین NP_643454.1 دامین 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase از بالا خانواده Hot_dog شناسایی شد. سرور COACH برای پیش‌بینی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت و ساختار سه بعدی آنها توسط سرور Phyre 2 مدل سازی شد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در شناخت بهتر باکتری Xcc و همچنین شناسایی پروتئین‌هایی با خاصیت الیستوری از این باکتری به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

زانتوموناس
بیوانفورماتیک
شانکر مرکبات
محرک
پروتئین

مقدمه

باکتری (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (*Xcc*) عامل بیماری شانکر مرکبات است، یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی می‌باشد که تمام مرکبات مهم را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سالانه خسارت سنگینی به تولید کنندگان مرکبات در دنیا و از جمله ایران وارد می‌کند (Montakhabi et al. 1389). منشأ این بیماری ژاپن و جنوب شرقی آسیا است و به غیر از اروپا به تمام قاره‌هایی که در آنها مرکبات تولید می‌شوند انتشار یافته است (Agrios, 2005).

در مناطقی که بیماری بومی نمی‌باشد، ممکن است با از بین بردن اینوکولوم از طریق نابود کردن درختان آلوده بتوان بیماری را ریشه‌کن کرد (Agrios, 2005). در صورتی که بیماری به صورت بومی درآید، بیماری را می‌توان تنها با روش‌هایی مثل کاشت درختان مقاوم و سالم، بهداشت مزرعه و استفاده از سموم مسی تا حدی کنترل کرد. هرچند هیچکدام از این اقدامات منجر به کنترل موفق و موثر این بیماری نمی‌شود (Agrios, 2005; Moreira et al., 2010). در سال‌های اخیر یافته‌های نوین در علم بیماری‌شناسی گیاهی مولکولی و به طور کلی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی درجه‌های نوینی را به روی پژوهشگران گشوده است و با به کارگیری این یافته‌ها از یک سو گیاهان تراریخته‌ای با مقاومت بیشتر نسبت به بیماریهای گیاهی معرفی شده است و از سوی دیگر روش‌هایی برای اختلال فرآیند بیماریزایی عوامل بیماریزای گیاهی معرفی شده است (Collinge et al., 2010; Chen et al., 2013). استفاده از شیوه‌های نوین در کنترل بیماریهای گیاهی هنوز در ابتدای راه است و برای پیشرفت و توسعه هر چه بیشتر این علوم نیاز به اطلاعات وسیعی در خصوص ژنوم و پروتئوم گیاهان و همچنین عوامل بیماریزای گیاهی می‌باشد.

ژنوم کامل باکتری *Xcc* برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ توالی‌یابی گردید و بعد از آن ژنهای کد کننده پروتئین‌ها در آن شناخته شده و در NCBI ثبت شدند (da Silva et al., 2002). با وجود اینکه تعداد زیادی از این ژن‌ها و پروتئین‌های مربوطه به طور کامل توصیف شده‌اند، اما هنوز هم تعدادی از ژنها و پروتئین‌های مربوط به آنها به صورت ناشناخته باقی مانده‌اند. این پروتئین‌ها به اصطلاح پروتئین‌های فرضی (Hypothetical proteins) نامیده

می‌شوند. شناسایی و توصیف عملکرد این پروتئین‌ها در باکتری *Xcc* می‌تواند کمک زیادی به شناخت هر چه بیشتر خصوصیات سلولی و مولکولی این بیمارگر مهم بکند.

در پژوهش‌های پیشین مشخص شد که عصاره سلولی حاصل از گونه‌های مختلف جنس زانتوموناس فعالیت محرکی (Elicitor activity) شدیدی بر روی گیاه آراییدوپسیس تالیانا دارند و بعد از تیمار برگ‌های گیاه با مقادیر بسیار ناچیز عصاره سلولی باکتری-های زانتوموناس تولید اتیلن گیاه به شدت افزایش می‌یابد (Jehle et al., 2013; Fallahzadeh 2012). با خالص سازی عصاره فعال و بررسی بخش فعال بدست آمده از کروماتوگرافی تبادل آنیونی لیستی از ۶۰ پروتئین مختلف شناسایی و توالی‌یابی شدند (Fallahzadeh, 2016). از بین ۶۰ پروتئین شناسایی شده هشت پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده مشخص شدند. هدف از پژوهش حاضر توصیف این پروتئین‌ها با ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

توالی‌های پروتئینی مورد استفاده: توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در این پژوهش حاصل خالص‌سازی و توالی‌یابی بخشی از پروتئوم باکتری *Xcc* می‌باشد که خاصیت محرک تولید اتیلن گیاه را داشت. این پروتئین‌ها با روش کروماتوگرافی آنیونی خالص‌سازی شده و با دستگاه طیف سنجی جرمی متوالی توالی‌یابی شده بودند (Fallahzadeh, 2016). در این بررسی ۶۰ پروتئین از عصاره مورد بررسی بدست آمد که از بین آنها ۸ پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده شناسایی شدند.

توصیف خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها: به منظور توصیف فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های مورد بررسی از سرور پروتپارام اسکپازی (<http://us.expasy.org/tools/protparam>) استفاده شد. با استفاده از این سرور وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک نظری (theoretical isoelectric point)، تعداد کل اسیدهای آمینه مثبت و منفی، شاخص بی‌ثباتی (Guruprasad et

تفاوت زیادی با همدیگر ندارند. با این حال از بین پروتئین‌های مورد بررسی پروتئین NP_640497.1 با ۴۳/۸۴ کیلودالتون دارای بیشترین جرم مولکولی است.

نقطه ایزوالکتریک (pI) محاسبه شده برای پروتئین‌ها از ۵/۳۴ تا ۹/۵ متغیر بود. نقطه ایزوالکتریک pI است که در آن یک آمینواسید و یا پروتئین بار خود را از دست می‌دهد و بنابراین در میدان الکتریکی با جریان مستقیم قادر به حرکت نمی‌باشد. اطلاع از نقطه ایزوالکتریک یک پروتئین می‌تواند برای انتخاب و بهینه سازی روش‌های مورد استفاده برای خالص سازی پروتئین اعم از کروماتوگرافی تبادل یونی و الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ بسیار مفید باشد.

شاخص بی‌ثباتی محاسبه شده برای پروتئین‌های مورد بررسی بین ۲۲/۵۹ تا ۴۴/۴۷ بود. بررسی‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌هایی که شاخص بی‌ثباتی آنها کوچک‌تر از ۴۰ باشند با ثبات و در غیر اینصورت بی‌ثبات خواهند بود. بنابراین بر اساس این تخمین می‌توان گفت که از بین پروتئین‌های مورد بررسی پروتئین‌های NP_641190.1 و NP_643454.1 بی‌ثبات محسوب می‌شوند.

شاخص دیگری که در این بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت شاخص آلفاتیک (Aliphatic Index-AI) بود (جدول ۱). این شاخص در واقع عبارت است از حجم نسبی پروتئین که با زنجیره‌های آلفاتیک اشغال شده‌اند (A, V, I, و L) و به عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئین‌های گلوبول مانند محسوب می‌شود و به همین دلیل در باکتری‌های مقاوم به گرما پروتئین‌ها دارای شاخص آلفاتیک بالایی می‌باشند (Akai, 1998). پروتئین‌هایی با شاخص آلفاتیک بسیار بالا (بالتر از ۱۰۰) ممکن است در دامنه دمایی بسیار بالایی از خود ثبات نشان دهند. در بررسی حاضر شاخص آلفاتیک اکثر پروتئین‌های مورد بررسی بین ۸۰-۱۰۰ بود و تنها در مورد NP_641576.1 ۴۸/۳۴ اندازه‌گیری شد.

متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY) محاسبه شده برای پروتئین‌ها در این بررسی بین ۰/۱۸۱- تا ۰/۹۸۷- بود. عدد GRAVY از تقسیم مجموع هیدروپاتی محاسبه شده برای تمام اسیدهای آمینه در پروتئین بر تعداد کل اسیدهای آمینه آن پروتئین بدست می‌آید.

(al., 1990). شاخص آلفاتیک (Ikai, 1980) و متوسط هیدروپاتی کل (Kyte and grand average hydropathy-GRAVY) (Doolittle, 1982) پروتئین‌ها محاسبه گردید.

تعیین نوع دمین‌های (Domains) محافظت شده: نوع دمین‌های محافظت شده پروتئین‌ها با استفاده از ابزار پایگاه اطلاعاتی دمین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro (http://www.ebi.ac.uk/interpro) تعیین شد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd). نتایج حاصل از هر دو ابزار با همدیگر مقایسه شد و مناسب‌ترین نتیجه گزارش شد.

تخمین جایگاه سلولی و پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌ها: برای تخمین جایگاه سلولی پروتئین‌ها از سرور Cell-PLoc 2.0 استفاده شد. این سرور از ابزارهای مختلفی برای تخمین جایگاه سلولی پروتئین‌ها در موجودات مختلف تشکیل شده است که از بین آنها Gneg-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gneg-) و multi (به صورت ویژه برای باکتری‌های گرم منفی طراحی شده است). تعیین پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌ها توسط سرور DISULFIND (http://disulfind.dsi.unifi.it) صورت گرفت.

تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها و جایگاه اتصال لیگاند در آنها: برای تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها از Phyre 2 استفاده شد (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/). برای تخمین جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها از سرور COACH (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COACH) استفاده شد.

نتایج و بحث

توصیف خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند برای شناخت بهتر پروتئین‌ها و شناسایی آنها بسیار سودمند باشد. با توجه به جدول ۱ می‌توان مشاهده کرد که همه پروتئین‌های مورد بررسی در این تحقیق دارای جرم مولکولی متوسطی هستند و

جدول ۱- تعیین خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها با استفاده از سرور پروتپارام اسکپازی

Table 1- Determination of physicochemical properties of proteins by Expasy's Protparam server.

پروتئین‌ها	NA	MW	pI	PR	NR	Gravy	AI	II
NP_640650.1	157	17.85	7.82	24	23	-0.334	89.49	35.17
NP_638186.1	257	27.39	7.91	36	35	-0.450	84.94	37.21
NP_640912.1	154	17.1135	9.51	22	19	-0.395	93.44	22.59
NP_640497.1	402	43.84	5.34	45	55	-0.181	87.19	26.53
NP_641576.1	199	21.41	9.15	35	32	-0.987	48.34	23.24
NP_643454.1	152	17.43	5.44	19	22	-0.245	84.08	44.47
NP_641190.1	212	23.73	7.79	20	19	-0.505	86.93	42.70
NP_644577.1	222	24.06	5.88	24	28	-0.245	100.41	35.33

NA: تعداد اسیدهای آمینه، MW: جرم مولکولی، pI: نقطه ایزوالکتریک، PR: تعداد اسیدهای آمینه با بار مثبت،

NR: تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی، Gravy: متوسط هیدروپاتی کل، AI: شاخص آلیفاتیک، II: شاخص بی ثباتی

شوگ فازی در حالت عادی غلظت بسیار پایینی در داخل سلول باکتری دارند و غیر قابل شناسایی هستند اما بعد از حمله فاژهای رشته‌ای سنتز آنها تحریک شده و غلظت آنها افزایش می‌یابد (Brissette *et al.*, 1990). علاوه بر این تنش‌های گرما، اتانول و فشار اسمزی نیز منجر به تحریک سنتز این پروتئین می‌شوند.

پروتئین NP_640912.1 دارای دمین HTH (Helix-turn-Helix) می‌باشد. بیشتر اعضای این بالاخانواده جزء پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند. دمین شناسایی شده در پروتئین NP_640912.1 شباهت زیادی به PadR دارد که در تنظیم منفی متابولیسم فتولیک اسید نقش دارد (Fibriansah *et al.*, 2012).

به دلیل بزرگ بودن پروتئین NP_640497.1، تعداد بیشتری از دمین‌ها شناسایی شد. در بخش مرکزی این پروتئین دمین Enoyl_reductase قرار دارد که در واقع ناحیه کاتالیک آنزیم ترنس-۲-انوئل-کوآنزیم A (Trans-2-enoyl-CoA reductase-) است. این خانواده از ردوکتازها حامل سایتهای کاتالیتیکی (TER) از آنزیم هستند که حاوی موتیف‌های محافظت شده YNThhhFxxK و YShAPxxR می‌باشند. این آنزیم از طریق مسیری غیر معمول احیاء کروتونیل کوآنزیم آ (Crotonyl-CoA)

در صورتی که GRAVY محاسبه شده برای یک پروتئین منفی باشد بدین معنی است که آن پروتئین غیر قطبی است و در صورت مثبت بودن آن قطبی محسوب می‌شود (Kyte and Doolittle, 1982). بنابراین با توجه به اعداد محاسبه شده در جدول ۱ می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تمامی پروتئین‌های مورد بررسی غیر قطبی محسوب می‌شوند.

تعیین نوع خانواده‌های پروتئینی و دمین‌های (Domains) محافظت شده

نوع خانواده‌های پروتئینی در پروتئین‌های مورد بررسی و دمین‌های موجود در آنها توسط ابزار پایگاه اطلاعاتی دمین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro تعیین شد (جدول ۲). از بین موارد مورد بررسی پروتئین NP_640650.1 دارای دو دمین محافظت شده DUF1456 (از بالا خانواده DUF1456) و YehS (از خانواده YehS) می‌باشد. پروتئین‌های بالا خانواده DUF1456 شامل پروتئین‌هایی محافظت شده در باکتری‌ها هستند که از حدود ۱۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و عملکرد خاصی برای آنها شناخته نشده است. در پروتئین NP_638186.1 دمین PspA (پروتئین شوگ فازی A) شناسایی شد (جدول ۲). پروتئین‌های

مورد بررسی، پروتئین NP_640497.1 و NP_640650.1 هم سیتوپلاسمی بوده و همچنین مرتبط با غشاء داخلی باکتری هستند. تنها در مورد NP_641576.1 جایگاه پروتئین در پری-پلاسم باکتری تعیین گردید. علاوه بر این، با بررسی‌هایی که در سرور DISULFIND صورت گرفت هیچگونه باند دی سولفیدی در هیچکدام از پروتئین‌های مورد بررسی شناسایی نشد. این نتایج نشان دهنده این است که این پروتئین‌ها از لحاظ دمایی بی ثبات هستند. علاوه بر این، پل‌های دی سولفیدی نقش مهمی در تثبیت فرایندهای تا شدن بسیاری از پروتئین‌ها دارند.

جدول ۲- تعیین جایگاه سلولی پروتئین‌ها با Cell-PLoc 2.0
Table 2- Localization of cellular location of proteins by Cell-PLoc 2.0

پروتئین	جایگاه سلولی
NP_640650.1	غشای داخلی و سیتوپلاسم
NP_638186.1	غشای داخلی
NP_640912.1	غشای داخلی
NP_640497.1	غشای داخلی و سیتوپلاسم
NP_641576.1	پری پلاسم
NP_643454.1	سیتوپلاسم
NP_641190.1	غشای داخلی
NP_644577.1	غشای داخلی

تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها و جایگاه اتصال لیگاند در آنها

برای تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها از Phyre2 استفاده شد (شکل ۱). مدل سازی در این سرور با همتراز سازی (alignment) مدل‌های مخفی مارکو (hidden Markov models) صورت می‌گیرد که دقت همتراز سازی خود را به صورت معنی-داری افزایش می‌دهد (Soding, 2005; Jefferys, 2010). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_638186.1، دو مارپیچ به هم پیچیده (Coiled-coil) دیده می‌شود (شکل ۱، B) که ساختار معمول مشاهده شده در دمن‌های PspA است. در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_640912.1، چندین مارپیچ آلفا با چندین دور قابل مشاهده است که مربوط به دمن متصل شونده به DNA است (شکل ۱، C). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_640497.1 صفحات بتای احاطه شده در بین مارپیچ‌های آلفا قابل مشاهده

را به بوتیریل کوآنزیم آ (Butyryl-CoA) کاتالیز می‌کند که در مجموع این مسیر در سنتز اسیدهای چرب نقش دارد (Hu et al., 2013). از آنجایی که این آنزیم از NADH به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند، در انتهای N این پروتئین دمن متصل شونده به NADH با توالی محافظت شده GA/CSpGYG (p هر اسید آمینه قطبی می‌تواند باشد) نیز شناسایی شد. علاوه بر این در انتهای C این پروتئین دمن متصل شونده FAD شناسایی شد که دارای توالی محافظت شده FGFxxxxxXDY می‌باشد.

در پروتئین NP_641576.1 دو موتیف متصل شونده به یون کلسیم (EF-hand, calcium binding motif) شناسایی شد. این نوع موتیف از مارپیچ-لوپ-مارپیچ تشکیل شده است و شکل فضایی آن شبیه وضعیت قرارگیری انگشتان شست و اشاره دست انسان است. در توالی بیشتر پروتئین‌های متصل شونده به پروتئین دو موتیف از این نوع مشاهده می‌شود. اتصال یون کلسیم به این پروتئین‌ها منجر به تغییر ساختار فضایی آنها شده و آنها را فعال یا غیر فعال می‌کند (Denessiouk et al., 2014). تعداد زیادی از پروتئین‌های متصل شونده به یون کلسیم در پروکاریوت‌ها وجود دارد که نقش‌های تنظیمی متنوعی در بیان ژن‌های مختلف پروکاریوتی دارند (Zhao et al., 2010; Bylsma et al., 1992).

در پروتئین NP_643454.1 دمن 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase از بالاخانواده Hot_dog شناسایی شد. این دمن در آنزیم‌هایی از پروکاریوت‌ها مشاهده می‌شود که فعالیت تیواسترازی دارند و 4-hydroxybenzoyl-CoA را هیدرولیز کرده و از آن 4-hydroxybenzoyl-CoA و CoA ایجاد می‌کنند (Song et al., 2012). ساختار سه بعدی این آنزیم در استرین CBS-3 از باکتری *Pseudomonas sp.* شناسایی و مشخص شده است که از ۵ تا ۶ صفحه بتا تشکیل شده است که در کنار یک مارپیچ آلفای طویل قرار می‌گیرد.

تخمین جایگاه سلولی و پل‌های دی سولفیدی پروتئین‌ها

برای تشریح عملکردهایی از پروتئین که در فرایندهای مختلف سلولی دخیل می‌باشند، تعیین جایگاه زیر سلولی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. با بررسی‌هایی که در ابزار Cell-PLoc 2.0 صورت گرفت مشخص شد که بیشتر پروتئین‌های مورد بررسی مرتبط با غشاء داخلی باکتری هستند. از بین پروتئین‌های

سرور COACH برای پیش بینی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین-ها مورد استفاده قرار گرفت. این سرور از طریق دو روش TM-SITE و S-SITE و به صورت مقایسه‌ای جایگاه اتصال پروتئین‌ها به لیگاند مربوطه را تخمین می‌زند. در این دو روش الگوهایی از پایگاه اطلاعاتی عملکرد پروتئین BioLip برای تخمین مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این بررسی نوع لیگاند احتمالی متصل شونده به پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه درگیر در این اتصال معرفی شد (جدول ۳). همانطور که در نتایج حاصل از جستجوی دامین‌ها در CDD-Blast اشاره شد، اطلاع زیادی در خصوص عملکرد این پروتئین بدست نیامد و عملکرد دامین‌های ذکر شده نیز ناشناخته می‌باشند. اما شاید بتوان نتایج حاصل از COACH را برای پی بردن به عملکرد این پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. لیگاند معرفی شده برای این پروتئین با درجه اطمینان تخمین ۰/۱، AE8 معرفی شد (جدول ۳).

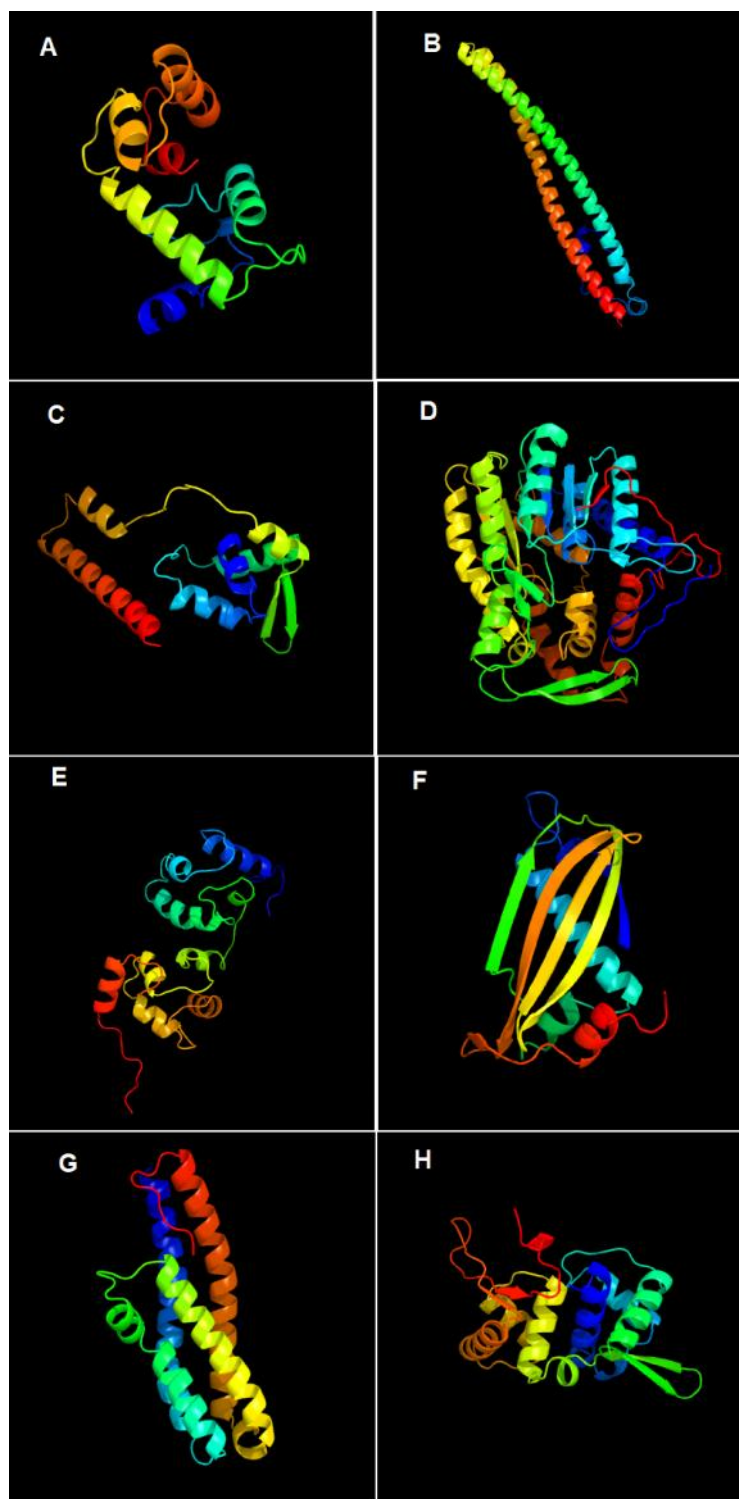
است که دامین متصل شونده به کوفاکتور می‌باشد (شکل ۱، D). علاوه بر این دامین قسمت پایینی که دارای دو صفحه بتا است نیز دامین متصل شونده به سوبسترا محسوب می‌شود (Hu et al., 2013). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_6401576.1، موتیف-های مایچ-دور-مارپیچ قابل مشاهده است که مربوط به موتیف-های متصل شونده به کلسیم هستند. در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_643454.1، چهار صفحه بتا به صورت موازی هم قرار گرفته‌اند که با دورها و مارپیچ‌های آلفای کوچک به هم وصل شده‌اند و در کنار آنها یک مارپیچ آلفای نسبتاً بلند دیده می‌شود (شکل ۱، F). این دامین که مربوط به آنزیم 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase می‌باشد در چند باکتری دیگر نیز گزارش شده و ساختار آن شناخته شده است (Song et al., 2012). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_641190.1 سه مارپیچ آلفای نسبتاً طویل و دو مارپیچ کوتاه دیده می‌شود که با دورهایی به هم وصل شده‌اند (شکل ۱، G).

جدول ۳- تخمین ناحیه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها توسط سرور COACH سرور

Table 3. Prediction of ligand binding site in proteins by COACH server.

پروتئین	اسم لیگاند	اسیدهای آمینه درگیر Binding Residues	درجه اطمینان تخمین* C-score of prediction
NP_640650.1	AE8	۳۷، ۴۱، ۴۴، ۵۶	۰/۱
	اسید نوکلئیک	۷، ۱۳، ۳۶، ۳۷، ۵۳، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۶۴، ۶۷، ۶۸، ۷۰	۰/۰۸
NP_638186.1	پپتید	۳۵، ۳۹، ۷۳، ۹۱، ۹۴، ۹۵، ۱۵۳	۰/۰۳
NP_640912.1	اسید نوکلئیک	۲۵، ۲۶، ۲۷، ۴۵، ۴۹، ۵۳، ۶۳، ۶۹، ۷۰	۰/۳۳
	اسید نوکلئیک	۶، ۱۱، ۱۲، ۴۴، ۴۶، ۴۷، ۵۰، ۵۱	۰/۱
NP_640497.1	NADH	۴۸، ۵۰، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۷۳، ۷۴، ۷۵، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۳، ۱۳۹، ۱۴۰، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۴۳، ۱۴۴، ۱۴۵، ۲۴۵، ۲۷۱، ۲۷۲، ۲۷۳، ۲۷۴، ۲۷۶، ۲۷۸، ۲۷۹	۰/۹۵
	AEW	۱۴۱، ۱۴۲، ۲۳۲، ۲۳۶، ۲۷۳، ۲۸۴، ۲۸۵	۰/۳
NP_641576.1	کلسیم	۱۳۱، ۱۵۳، ۱۵۵، ۱۵۷، ۱۵۹، ۱۶۴	۰/۳۲
	کلسیم	۱۲۵، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۳۱، ۱۳۶	۰/۱۶
NP_643454.1	Phenacyl coenzyme A	۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۷۷، ۷۸، ۷۹، ۸۰، ۱۱۳	۰/۶
NP_641190.1	FADH2	۵۷، ۶۸، ۷۱	۰/۰۶
NP_644577.1	اسید نوکلئیک	۹۵، ۹۷، ۹۸، ۱۳۰، ۱۳۱، ۱۳۵، ۱۳۸، ۱۵۴، ۱۵۵، ۱۵۶	۰/۰۹

* درجه اطمینان تخمین، عددی بین ۰ تا ۱ می‌تواند باشد که هر چه به یک نزدیکتر باشد دقت تخمین نیز بالاتر است



شکل ۱- تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها با استفاده از سرور Phyre 2. A. NP_640650.1, B. NP_638186.1, C. NP_640912.1, D. NP_640497.1, E. NP_6401576.1, F. NP_643454.1, G. NP_641190.1, H. NP_644577.1.

Fig 1- Prediction of three-dimensional proteins by Phyre 2 server. A. NP_640650.1, B. NP_638186.1, C. NP_640912.1, D. NP_640497.1, E. NP_6401576.1, F. NP_643454.1, G. NP_641190.1, H. NP_644577.1.

شد. این نتایج مطابق با نتایج حاصل از CDD-Blast است که در آن دمین‌های متصل شونده به DNA شناسایی شد. این نوع پروتئین‌ها با اتصال به DNA در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند (Fibriansah et al., 2012).

با مراجعه به بانک اطلاعاتی پروتئین (RCSB PDB) مشخص شد که AE8 مولکولی است که به عنوان بازدارنده آنزیم توپوایزومراز در باکتری‌ها عمل می‌کند. بنابراین می‌توان این احتمال را مطرح کرد که NP_64065.1 نوعی توپوایزومراز در زانتوموناس می‌باشد. در پروتئین NP_640912.1 دو جایگاه اتصال به DNA شناسایی

منابع

- Benning MM, Wesenberg G, Liu R, Taylor KL, Dunaway-Mariano D, Holden HM. 1998. The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. Strain CBS-3 Journal of Biological Chemistry 273: 33572–33579.
- Brissette JL, Russel M, Weiner L, Model P. 1990. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. PNAS 87(3):862-6.
- Bylsma N, Drakenberg T, Andersson I, Leadlay PF, Forsén S. 1992. Prokaryotic calcium-binding protein of the calmodulin superfamily Calcium binding to a *Saccharopolyspora erythraea* 20 kDa protein. FEBS letters 299(1): 44-47.
- Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. 2013. Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. International Journal of Molecular Science 14(9): 17477–17500.
- Collinge DB, Jørgensen HJ, Lund OS, Lyngkjaer MF. 2010. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. Annual Review of Phytopathology 48:269-91.
- da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417 (6887): 459-463
- Denessiouk K, Permyakov S, Denesyuk A, Permyakov E, Johnson MS. 2014. Two structural motifs within canonical EF-hand calcium-binding domains identify five different classes of calcium buffers and sensors. PLoS ONE 9(10): e109287. doi:10.1371/journal.pone.0109287
- Duan YP, Castañeda A, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. Molecular Plant–Microbe Interactions 12: 556–60.
- Dunger G, Arabolaza A. L, Gottigb N, Orellano EG Ottado J. 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. Plant Pathology 54: 781–788.
- Fallahzadeh-Mamaghani V. 2012. Interaction of *Xanthomonas axonopodis* elicitor with the receptor like protein from *Arabidopsis thaliana* and its role in the induction of plant resistance. Doctorial thesis, University of Tehran. (In persian)
- Fallahzadeh-Mamaghani V. 2016. Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*. Genetic Engineering and Biosafety Journal 4(2) 113-123.
- Fibriansah G, Kovács ÁT, Pool TJ, Boonstra M, Kuipers OP, Thunnissen A-MWH. 2012. Crystal Structures of Two Transcriptional Regulators from *Bacillus cereus* Define the Conserved Structural Features of a PadR Subfamily. PLoS ONE 7(11): e48015. doi:10.1371/journal.pone.0048015
- Gill SC, von Hippel PH. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical Biochemistry 182: 319-326.
- Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering 4: 155-161.
- Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering 4:155-161.
- Hu K, Zhao M, Zhang T, Zha M, Zhong C, Jiang Y, Ding J. 2013. Structures of trans-2-enoyl-CoA reductases from *Clostridium acetobutylicum* and *Treponema denticola*: insights into the substrate specificity and the catalytic mechanism. Biochemistry Journal 449: 79–89
- Ikai A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. Journal of Biochemistry 88: 1895-1898.

- Jefferys BR, Kelley LA and Sternberg MJE. 2010. Protein Folding Requires Crowd Control in a Simulated Cell. *Journal of Molecular Biology* 397(5): 1329-1338.
- Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G. 2013. The receptor-like protein ReMAX of *Arabidopsis thaliana* detects the novel MAMP emax from *Xanthomonas*. 25: 2330-2340.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydro pathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Lenz LL1, Dere B, Bevan MJ. 1996. Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 5(1): 63-72.
- Montakhabi M, Rahimian H, Jafarpour B. 1389. Investigation of possible biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, by epiphytic antagonistic bacteria in vitro condition. *Plant protection Journal*. 24(4): 368-376. (In Farsi with English Abstract).
- Moreira LM, Almeida JNF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* 11: 238.
- Söding J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21: 951-960. doi:10.1093/bioinformatics/bti125.
- Song F, Thoden JB, Zhuang Z, Latham J, Trujillo M, Holden HM, Dunaway-Mariano D. 2012. The catalytic mechanism of the hotdog-fold enzyme superfamily 4-Hydroxybenzoyl CoA-Thioesterase from *Arthrobacter* sp. Strain SU+. *Biochemistry* 51(35): 7000-7016.
- Stall R.E. Seymour CP. 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. *Plant Disease* 67: 581-585.
- Zhao X1, Pang H, Wang S, Zhou W, Yang K, Bartlam M. 2010. Structural basis for prokaryotic calcium-mediated regulation by a *Streptomyces coelicolor* calcium binding protein. *Protein Cell*. 1(8):771-9.

تأثیر ژن *rolC* در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*)

امین سهندی خلیفه‌کندی^۱، مقصود پزوهنده^{۲*} و هانیه محجل شجاء^۳

The effect of *rolC* gene the medicinal plant *Catharanthus roseus*

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*}
and Hanieh Mohajjel-Shoja³

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

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

1. Master of Science in Biotechnology and 2. Associate Prof.
Biotechnology Dept. Azarbaijan Shahid Madani University,

3. Assistant Prof. Plant Biology Dept. Faculty of Natural Science, University of
Tabriz, IRAN

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده و دارای آلکالوئیدهای بسیار مهم از جمله وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشد که در درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارد. با توجه به اهمیت و نقش ژنهای پلاستیستی مثل *rolC* در بیوسنتز آلکالوئیدها، در این پژوهش به بررسی بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاه دارویی پروانش به کمک این ژن پرداخته شد. برای این منظور بذرهای این گیاه، استریل شده و در شرایط درون شیشه‌ای کشت شدند. ریزنمونه‌های برگ‌ی حاصل از گیاهچه‌های استریل توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حامل وکتور *pBI121-rolC* (تحت پشیر CaMV35S) تلقیح شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده در پنج نوع محیط مختلف با هورمن و بدون هورمن برای بررسی ریشه‌زایی کشت شدند. ۹ روز بعد در محیط MS فاقد هورمن و دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم اولین ریشه‌ها در ریزنمونه‌های برگ‌ی ظاهر شدند. دو لاین دارای رشد بسیار سریع ریشه بوده و در آنها ریشه‌ها به سرعت منشعب شدند. تراریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ‌ی پروانش از طریق PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تایید شدند. نتیجه این تحقیق علاوه بر اینکه نشان داد می‌توان از ژن *rolC* برای بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاهان دارویی استفاده کرد همچنین نشان داد که ژن *rolC* نسبت به ترکیب‌های مختلف هورمونی در القای ریشه موثرتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

پروانش

ریشه

انتقال ژن

rolC

مقدمه

آن‌ها به ترتیب مربوط به ژن‌های *rolC* *rolB* *rolA* و *rolD* می‌باشد. این آنالیز همچنین نشان داد که ژن‌های *rolB* *rolA* و *rolC* نقش مهمی را در القای ریشه‌های موپین بازی می‌کنند (Palazon et al. 1997). بررسی دیگری نشان داد که اگر چه ناحیه TR-DNA برای القای ریشه موپین ضروری نیست اما با توجه به داشتن ژن اکسین امکان تغییر شکل سلول‌ها را فراهم می‌کند. Moyanoa و همکاران نشان دادند که ژن‌های *aux* نقش معنی‌داری را در تغییر شکل ریشه‌های تراریخت *Datura metel* و *Duboisia hybrid* بازی می‌کنند (Moyanoa et al. 1999). ژن‌های کد کننده اکسین (*tms1* and *tms2*) و ژن‌های سنتز آگروپین (*ags*) هم بر روی TR-DNA قرار دارند (White et al. 1985).

هر چند هر سه ژن *rolA* و *rolB* و *rolC* به صورت مستقل از هم تشکیل ریشه در توتون را افزایش می‌دهند ولی رشد ریشه هنگامی که هر سه ژن با هم فعالیت کنند بهتر انجام می‌گیرد (Schmulling et al. 1993). بیان ژن *rolC* در گیاهان مختلف تراریخته الگوی پیچیده‌ای از خود نشان می‌دهد، بیان این ژن به تنهایی و در عدم حضور سایر ژن‌های T-DNA در ریشه به میزان زیاد، در برگ کم و در ساقه اصلا بیان نمی‌شود (Estruch et al. 1991). طبق گزارش‌های اخیر بیان ژن *rolC* با تولید آلکالوئیدهای تروپانی همبستگی داشته و باعث افزایش تولید آلکالوئیدها از ریشه‌های موپین می‌شود (Moyanoa et al. 1999). میزان بالای بیان ژن *rolC* باعث القای ژن‌های دفاعی (β -۱،۳-گلکاناز) در گیاه می‌شود و این مسئله نشان می‌دهد که بیان *rolC* می‌تواند پاسخ‌های دفاعی گیاه را فعال کند (Kiselev et al. 2006). گیاهان توتون تراریخته با *rolC* خصوصیات فنوتیپی متفاوتی نسبت به گونه وحشی از خود نشان دادند، از جمله کاهش اندازه گل، کوتاه شدن قد گیاه، کوچکتر شدن دانه‌های کپسول و افزایش انشعابات جانبی گیاه (Schmulling et al. 1988). در گیاهان دیگری هم که با *rolC* تراریخته شده‌اند، کاهش اندازه گیاه، کاهش غالبیت راسی، گلدهی زود هنگام و گاهی نیز فنوتیپ پرپشتی مشاهده شده است. علاوه بر این نشان داده شده است که ساکارز موجب بیان بیشتر ژن *rolC* در گیاهان می‌شود (Yokoyama et al. 1994).

بیماری ریشه موپین به وسیله *Agrobacterium rhizogenes* ایجاد می‌شود (Ricker et al. 1930). این باکتری رشد نئوپلاستیک را در سلول‌های گیاهی القا می‌کند که در نتیجه آن ریشه‌های موپین القا می‌شوند (Costantino et al. 1994). ریشه‌های موپین به صورت نابجا در محل آلودگی و یا در نزدیکی آن ایجاد می‌شوند (Chilton 2001). از لحاظ مورفولوژی، ریشه‌های موپین القا شده توسط این باکتری بسیار مشابه با ریشه‌های وحشی می‌باشد، با این حال ریشه‌های موپین دارای ویژگی‌های اختصاصی می‌باشند، رشد سریع و منشعب، رشد در محیط بدون هورمون، رشد ریشه‌ها به صورت Ageotropic (عدم تمایل به سمت جاذبه زمین)، پایداری از لحاظ ژنتیکی، تولید بیشتر متابولیت نسبت به ریشه‌های معمولی، پایداری متابولیت‌های تولید شده از این ریشه‌ها و توانایی بیشتر این متابولیت‌ها در اتصال به سلول‌های هدف از ویژگی‌های ریشه‌های موپین القا شده توسط *A. rhizogenes* می‌باشد (Sevon et al. 1998). به همین دلیل از ریشه‌های موپین به طور وسیعی به عنوان ابزاری در جهت تولید متابولیت‌ها و همچنین برای مطالعه عملکرد ژن در گیاه استفاده می‌شود. محققان از این ابزار جهت مطالعه رشد و واکنش‌های زیستی ریشه، بیان بیشتر پروتئین‌ها و تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه، سم زدایی آلودگی‌های محیطی و افزایش مقاومت به خشکی استفاده می‌کنند. ریشه‌های موپین به وسیله یک قطعه DNA جدا شده (T-DNA) از پلاسمید Ri این آگروباکتریوم و ورود آن به درون کروموزم‌های سلول گیاهی القا می‌شود (Chilton et al. 1982).

ژن‌هایی که از T-DNA پلاسمید Ri طی بیماری‌زایی به سلول‌های گیاه میزبان منتقل می‌شود، معمولاً ژن‌های *rol* (*root*) و *oncogenic loci* و ژن‌های مربوط به سنتز اکسین می‌باشند. این ژن‌ها به ترتیب در ناحیه TL-DNA و TR-DNA پلاسمید Ri نوع آگروپین قرار دارند (Christey 2001). آنالیز جهش ناحیه TL-DNA منجر به شناسایی چهار ناحیه ژنی *rolA* *rolB* *rolC* و *rolD* شد (جدول ۱) که در القای ریشه موپین موثر می‌باشند. در توالی کامل نوکلئوتیدی ناحیه TL-DNA ۱۸ عدد چارچوب ترجمه (open reading frame) شناسایی شده است که چهارتای

انسان با شناخت گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به شفا بخشی و اثرات درمانی این گیاهان پی برد و به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها از آن‌ها استفاده کرد. بر اساس تخمین سازمان جهانی بهداشت امروزه ۸۰ درصد مردم جهان از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌کنند و تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی بدست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Tripathi and Tripathi 2003). در ایران نیز هزاران گونه گیاهی می‌روید که بیشتر آنها دارای اثرات دارویی می‌باشند و در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما با توجه به محدود بودن زیستگاه طبیعی گیاهان و پایین بودن مواد موثره مورد نظر

در گیاهان، استفاده از گیاهان دارویی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. بر این اساس محققین جهت بهره‌وری بیشتر از گیاهان دارویی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از آنها به استفاده از فن‌آوری زیستی روی آورده‌اند (Mulabagal and Tsay 2004). اخیراً نیز کشت ریشه‌های موئین از طریق کشت بافت گیاهی به عنوان یک منبع پایدار برای تولید متابولیت‌ها پیشنهاد شده است. رشد سریع، پایداری ژنتیکی و توانایی بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه از مهم‌ترین مزیت‌های کشت ریشه‌های موئین محسوب می‌شود (Giri and Narasu 2000).

جدول ۱- توصیف و مشخصات ژنهای *rol* باکتری *A. rhizogenes* که بر روی T-DNA پلاسمید Ri آن قرار دارند.

Table1. Description of *A. rhizogenes* *rol* genes

ژن	اندازه (جفت باز)	نقش و اثر در گیاه
<i>rolA</i>	۲۷۹-۴۲۳	در توتون تراریخت: برگ‌های کوچکتر و چروکیده، میان‌گره‌های بلندتر، پیری دیر هنگام، گل-آذین متراکم و غیر طبیعی، اندازه گل و خامه بزرگتر، ضخیم شدن ساقه‌ها و ضعیف بودن برگ‌ها و ریشه‌ها، تداخل با هورمون ژبیرلین
<i>rolB</i>	۷۶۲-۸۳۷	دو ژن (<i>rolB_{TL}</i> و <i>rolB_{TR}</i>) از نظر توالی تا حدی مشابه هم هستند. β -Glucosidase را کد می‌کنند. غیر فعال کردن <i>rolB</i> منجر به عدم بیماری‌زایی آگروباکتریوم می‌شود. ژن <i>rolB_{TR}</i> قادر به القای ریشه‌های موئین در دیسک‌های برگ‌ی توتون نمی‌باشد. <i>rolB_{TL}</i> در ریشه زایی و تغییر استیل کلها نقش دارد. نقش مهم در تشکیل ریشه‌های نابجا و جانبی گیاه توتون تراریخته شده با ژن <i>rolB</i> خصوصیتی از قبیل افزایش اندازه خامه و گل، تشکیل ریشه‌های نابجا بر روی ساقه، چین خوردگی برگ‌ها، تشکیل ریشه‌های فراوان و سطحی و توانایی قطعات برگ‌ی برای تشکیل ریشه در یک محیط بدون هورمون را از خود نشان دادند. بیان بیشتر این ژن باعث نکروز زودرس در گیاه می‌شود
<i>rolC</i>	۵۴۰	<i>rolC</i> بر روی TL-DNA پلاسمید Ri قرار گرفته و به ژن <i>rolB</i> متصل است و بصورت ترانسژن در القای ریشه موئین با <i>rolB</i> اثر همکاری دارند. گیاهان توتونی که ژن <i>rolC</i> در آن‌ها بیان می‌شود، فنوتیپ پرپشت و قد کوتاهی دارند. طول میان‌گره‌ها کم شده و تعداد ساقه‌ها و برگ‌ها (برگ‌های نوک تیز و کوتاه) افزایش می‌یابد. گیاهان تراریخته با <i>rolC</i> به دلیل فتوسنتز کمتر برگ‌ها به رنگ سبز متمایل به زرد و کلروزه دیده می‌شوند. ریشه‌های القا شده با ژن <i>rolC</i> به‌صورت مستقیم رشد می‌کنند فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاه
<i>rolD</i>	۱۰۲۳	جهش در ژن <i>rolD</i> باعث القای طبیعی ریشه‌های موئین فعالیت پروموتور این ژن در بافت‌های در حال تمایز بیشتر است و با افزایش سن گیاه بیان آن کاهش یافته و در نهایت قطع می‌شود

تولید ریشه موین در گیاه پروانش است. این ژن علاوه بر القای ریشه موین همبستگی مستقیمی با بیوسنتز آلکالوئیدها دارد (Moyano et al. 1999).

مواد و روشها

بذرهای گیاه پروانش مورد نیاز در این تحقیق از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی تهیه گردید. بذرهای استریل شده (۳ دقیقه الکل ۷۰٪، ۱۵ دقیقه هیپوکلریت ۱٪ و ۵ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل) در محیط کشت جامد MS بدون هورمون و در داخل شیشه مربا کشت شدند، سپس به فیتوترون با دمای ۲۵°C، رطوبت ۲۲٪ و میزان نور ۲۵۰۰ لوکس منتقل شدند.

ناقل و باکتری مورد استفاده:

ناقل بیانی استفاده شده در این تحقیق ناقل PBI121 می‌باشد. این ناقل دارای ۱۴۰۰۰ جفت نوکلئوتید و دارای ژن گزینشگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای باکتری می‌باشد. CaMV35S پیشبر ژن در این ناقل است که از ویروس موزایک گل کلم گرفته شده‌است. ترمیناتور به‌کار رفته در آن هم (Nopaline synthase) می‌باشد. این ناقل به روش الکتروپوراسیون به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شده و باکتری‌ها جهت تایید تراریزش در محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت و در انکوباتور ۲۸°C به مدت دو شب نگهداری شدند.

آماده‌سازی آگروباکتریوم:

به منظور آماده‌سازی باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 جهت تراریزش ریزنمونه‌ها، ابتدا ناقل نوترکیب pBI121-*rolC* از طریق روش الکتروپوراسیون به باکتری مستعد این روش منتقل و باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین کشت و در انکوباتور ۲۸°C به مدت ۲ شب نگهداری شد. با توجه به اینکه ناقل pBI121 دارای ژن مقاومت به کانامایسین است باکتری‌هایی که این ناقل را دریافت کردند در

پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* گیاهی علفی و همیشه سبز متعلق به تیره خرزهره (Apocynaceae) است. این گیاه ارتفاعی معادل ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر داشته، دارای ساقه‌های استوانه‌ای، مستقیم و چوبی به رنگ‌های سبز یا قرمز کم‌رنگ است. برگ‌های گیاه به صورت براق، سبز تیره و گل‌های آن معطر و در رنگ‌های سفید تا بنفش متمایل به صورتی در انتهای ساقه قرار دارد. ارقامی که دارای گل‌های صورتی هستند به علت مقدار بالای آلکالوئیدهای آن بیشتر مورد توجه است، همچنین این گیاه به صورت معمول به عنوان گیاه زینتی نیز کشت می‌شود (Aslam et al. 2010). این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و طبی است که دارای بیش از ۴۰۰ نوع آلکالوئید از نوع ترپنوئید ایندول آلکالوئید است (Faheem et al. 2011). ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید آجمالینو و سرپتین است. این آلکالوئیدها ترکیبات مهم دارویی برای درمان انواع بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون بالا می‌باشد (Shabani et al. 2014). همچنین این گیاه دارای آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین است که در شیمی درمانی انواع سرطان‌های خون، غده‌های لنفاوی، پستان، ریه و تخمدان به کار برده می‌شود (Van der Heijden et al. 2004). این دو ماده دارای ارزش اقتصادی بالا هستند. قیمت هر کیلوگرم وین‌بلاستین یک میلیون دلار و تولید سالانه آن ۱۲ کیلوگرم و قیمت هر کیلوگرم وین‌کریستین ۳/۵ میلیون دلار و تولید سالانه آن یک کیلوگرم می‌باشد (Loyola-Vargas et al. 2007) که اهمیت اقتصادی این گیاه را روشن می‌کند. در حال حاضر مواد وین‌بلاستین و وین‌کریستین به طور عمده توسط استخراج از این گیاه بدست می‌آیند. دلیل این امر آن است که روش‌های سنتز و نیمه سنتز و روش‌های دیگر برای تولید این مواد در مقیاس صنعتی مناسب نیستند همچنین تلاش زیادی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع به وسیله کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه موین انجام شده است (Shabani et al. 2014). با توجه به غلظت بسیار پایین آلکالوئیدهای ضد سرطان گیاه پروانش و قیمت بسیار بالای این آلکالوئیدها و با توجه به اینکه تنها راه تولید این داروها استخراج از گیاه می‌باشد. افزایش مقدار این آلکالوئیدها به هر نحوی می‌تواند از نظر اقتصادی ارزش زیادی داشته باشد. هدف این تحقیق استفاده از ژن *rolC* جهت

از آنها توسط باکتری *A. tumefaciens* حامل ناقل pBI121 همکشت شدند و تعدادی نیز بدون همکشتی با آگروباکتریوم ابتدا در محیط MS معمولی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و در نهایت به محیط‌های مختلف MS (جدول ۲) حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند.

بررسی حضور تراژن در ریشه‌های القا شده با PCR: به منظور تایید تراریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ‌ی پروانش، استخراج DNA از آنها به روش CTAB (Dellaporta et al., 1983) صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از محصول استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد ران شدند، برای حضور ژن *rolC* در آنها (تائید تراریختی ریشه‌ها القا شده) از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *rolC* (GenBank: X64255.1) استفاده شد. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، تکثیر در طول ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگرها به DNA الگو به مدت ۳۵ ثانیه در ۵۲ درجه سانتیگراد و بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول استخراج شده و ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری باهم مخلوط شده و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد.

محیط LB حاوی کانامایسین رشد کرده و کلنی‌هایی را تشکیل می‌دهند. برای هم‌کشتی آگروباکتریوم با ریزنمونه‌ها، باید دو روز قبل از هم‌کشتی، آگروباکتریوم پیش‌کشت شود، برای این منظور به محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک (ریفامپیسین و کانامایسین) و سولفات منیزیم (۱۰ میلی‌مولار) به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر، به اندازه نوک خلال دندان از یک کلنی باکتری که حاوی ناقل حامل ژن *rolC* می‌باشد تلقیح شد و در انکوباتور شیکر نگهداری شد، در روز دوم به محیط LB (کشت اصلی) که در فلاسک ۲۵۰ میلی-لیتری به مقدار ۶۰ میلی‌لیتر ریخته شده بود، حدود ۴۰۰ میکرولیتر از باکتری روز قبل اضافه شد تا چگالی نوری آن (OD_{600nm}) برای هم‌کشتی با گیاه خیلی افزایش نیابد. بعد از رسیدن غلظت باکتری به ۰/۶ محتویات فلاسک در زیر هود به فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و رسوب باکتری از طریق سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) صورت گرفت، محیط رویی باکتری در زیر هود حذف شده و تا نصف حجم محیط حذف شده به آن محیط ۱/۲MS جهت معلق کرن سلولهای باکتری اضافه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون باکتری به میزان ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون به سوسپانسیون باکتری جهت تحریک بیان ژن‌های *Vir* اضافه شد. سوسپانسیون مورد نظر بعد از قرار گرفتن در شیکر انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه (۱۱۰rpm و ۲۵ °C) جهت تلقیح و تراریزش به روی ریزنمونه‌ها اضافه شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و بررسی القای ریشه موین در ریزنمونه‌های مختلف:

به منظور القای ریشه در ریزنمونه‌های گیاه پروانش از گیاهچه‌های استریل این گیاه بعد از ۵ هفته ریزنمونه‌های برگ‌ی تهیه و تعدادی

جدول ۲- ترکیبات هورمونی مختلف برای بررسی ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه پروانش

Table1. The culture media with different hormones for rooting in *Catharanthus roseus* explants

نام هورمون	غلظت هورمون‌های مختلف در محیط‌های کشت (g/l)				
محیط	MS	MS1	MS2	MS3	MS4
2,4-D	-	۱	۲	-	-
NAA	-	-	-	۰/۵	۱
BAP	-	۱	۱	۱	۱
Cefotaxime	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰

نتایج و بحث

در این تحقیق، با هدف بررسی اثر ژن *rolC* در گیاه پروانش و تولید لاین‌های تراریخت با ریشه دهی سریع و زیاد، بذره‌های تهیه شده گیاه پروانش (شکل ۱- الف) ضدغفونی شدند. اکثر بذره‌های استریل شده گیاه پروانش بعد از ۱۵ روز جوانه زدند. سرعت رشد گیاهچه‌ها پایین بوده و آن‌ها بعد از چهار هفته حدود پنج سانتی-متر رشد کردند (شکل ۱- ب).

القای ریشه موین در ریزنمونه‌های برگ گیاه پروانش: حدود ۶ هفته بعد از جوانه‌زنی بذره‌های این گیاه، ریزنمونه‌های برگ گیاه آن تحت شرایط استریل تهیه شدند. بررسی القای ریشه از این ریزنمونه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای این منظور بخشی از این ریزنمونه‌ها تراریخت شدند. این ریزنمونه‌ها بعد از همکشتی با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* ابتدا در محیط MS معمولی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (شکل ۱- ج). سپس این ریزنمونه‌ها در محیط MS حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم قرار گرفتند. تعدادی از ریزنمونه‌ها بعنوان کنترل منفی (بدون تراریخت) در این محیط قرار گرفت و بخشی نیز جهت بررسی اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف در ریشه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ گیاه این گیاه در مقایسه با ژن *rolC* در محیط‌های هورمون‌دار کشت شدند. بازکشت ریزنمونه‌ها هر هفت روز صورت گرفت. با توجه به وجود مقادیر بالایی از مواد فنلی در این گیاه، از ریزنمونه‌های برگ گیاه برش یافته آن مقدار زیادی مواد فنلی ترشح شده و بعد از ۷ روز اکثر ریزنمونه‌های موجود در محیط MS معمولی و در محیط حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون NAA از لبه‌های برش یافته شروع به سیاه شدن کرده و در نهایت بعد از ۲ هفته از بین رفتند (شکل ۱- د، ه). تنها تعداد کمی از ریزنمونه‌های موجود در محیط‌هایی با تیمارهای هورمونی حاوی هورمون 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) در این مرحله شروع به تولید کالوس کرده بنابراین

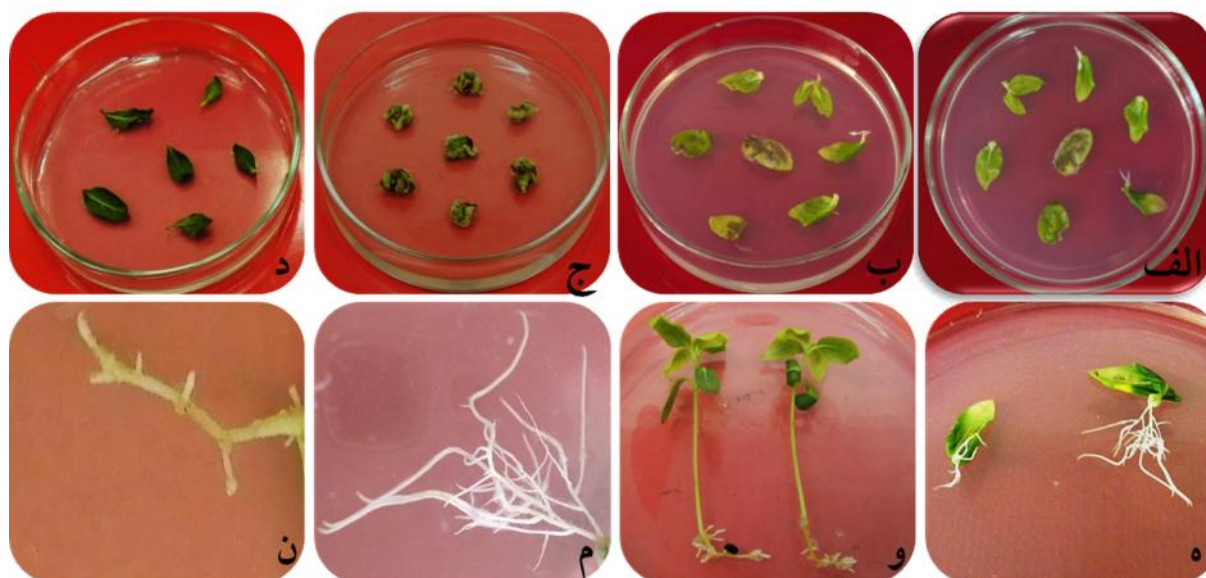
این ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه‌شدگی شدند (شکل ۱- و)، این ریزنمونه‌ها ماندگاری خود را تا ۵ هفته بعد از تراریخت حفظ کرده و بطور کامل به کالوس تبدیل شدند. این امر بیانگر این موضوع است که هورمون 2,4-D در برابر فعالیت بیش از حد مواد فنلی ممانعت کرده و از طرفی با توجه به تشکیل کالوس و ترمیم سریع ریزنمونه‌های برش یافته در محیط حاوی هورمون 2,4-D میزان سنتز مواد فنلی نیز کمتر شده در نتیجه ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه‌شدگی و نکروز شدند. این امر در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون مشهودتر بود.

با توجه به نتایج بدست آمده که بافت‌های آسیب دیده و ریزنمونه‌های برش یافته از نظر تولید مواد فنلی مستعد بودند، در ادامه این پژوهش بجای ریزنمونه‌های برش یافته، از برگ‌های کامل جهت تراریخت استفاده شد. لازم به ذکر است که کشت ریزنمونه‌های برش یافته در محیط‌های کشت حاوی تیمارهای فوق بعلاوه ۲ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال نیز ممانعتی در برابر سیاه‌شدگی ریزنمونه‌ها ایجاد نکرد و بعد از گذشت ۱۴ روز اکثر ریزنمونه‌ها دچار نکروز شده و از بین رفتند. ریزنمونه‌های برگ کامل تلقیح شده با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* نیز جهت رشد بهتر ریزنمونه‌ها و جلوگیری از رشد باکتری آگروباکتریوم، هر ۷ روز واکشت شده و به محیط جدید منتقل شدند. بعد از گذشت ۹ روز از همکشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، در حدود ۲۰ درصد این ریزنمونه‌ها که در محیط MS معمولی کشت شده بودند ریشه‌هایی مشاهده شد (شکل ۲- الف، ب). این ریشه‌ها در ابتدا رشد کمی داشته و با گذشت زمان به سرعت رشد کرده و منشعب شدند. بیشترین رشد این ریشه‌ها در چهارمین بازکشت ریزنمونه-ها و ۱۶ روز بعد از ظهور ریشه‌ها مشاهده شد. میزان رشد ریشه-های القا شده به تدریج چهار هفته بعد از تلقیح کاهش یافت. ریزنمونه‌های موجود در محیط‌های حاوی هورمون 2,4-D با توجه به اینکه تبدیل به کالوس شدند ریشه‌هایی از آن‌ها ظاهر نشد، قسمت بیشتر این ریزنمونه‌ها در انتهای هفته چهارم به کالوس تبدیل شدند (شکل ۲- ج). در تیمارهای حاوی هورمون اکسین NAA نیز هیچ ریشه‌ای مشاهده نشد و ریزنمونه‌های موجود در این محیط به تدریج سیاه شده و از بین رفتند (شکل ۲- د).



شکل ۱- بذر گیاه پروانش (الف)، گیاهچه‌های استریل پروانش ۴ هفته بعد از کشت در محیط MS معمولی (ب)، ریزنمونه‌های برگ‌ی تلقیح شده در محیط همکشتی (ج)، سیاه شدن ریزنمونه‌های تلقیح شده پروانش در محیط MS معمولی (د)، نکروز شدید ریزنمونه‌های پروانش در محیط حاوی هورمون NAA (ه)، تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های پروانش موجود در محیط حاوی 2,4-D (و).

Fig1. *Catharanthus roseus* seed and explants and callus

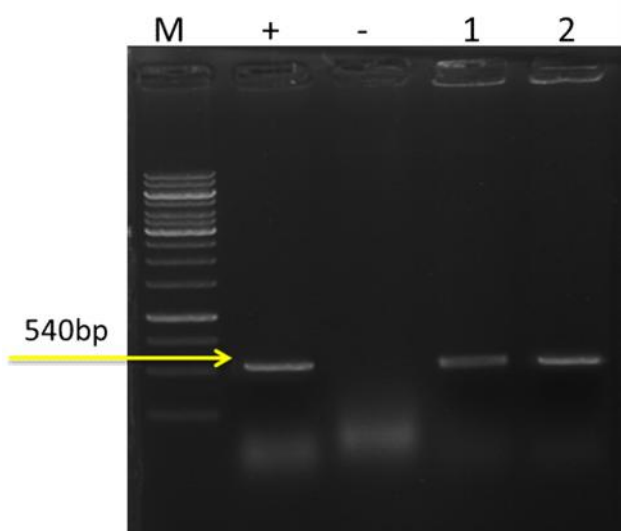


شکل ۲- ریزنمونه‌های برگ کامل گیاه پروانش، القای ریشه در ریزنمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* ۹ روز بعد از تلقیح (الف، ب)، القای کالوس در ریزنمونه‌های موجود در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (ج)، سیاه‌شدگی ریزنمونه‌های موجود در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (د). ریشه‌های موین القا شده از ریزنمونه‌های برگ کامل پروانش ۱۶ روز بعد از ظهور ریشه‌ها (ه)، ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر گیاه پروانش از گیاهچه‌های ۳۰ روزه (و)، وجود فنوتیپ ریشه‌های موین در ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم (م)، ریشه‌های معمولی گیاه (ن).

Fig2. Root inducing in *Catharanthus roseus* explants by *rolC* gene

rolC استفاده شد. بدین منظور PCR طبق برنامه ذکر شده در مواد و روش‌ها انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول استخراج شده و ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری باهم مخلوط شده و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بیانگر تراریختی لاین‌های انتخاب شده ریشه‌های موبین است (شکل ۳).

در یکی از تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است ریز نمونه‌های هیپوکوتیل گیاه پروانش بعد از قرار گرفتن به مدت ۸ هفته در محیط MS حاوی ۳۱/۱ میکرومولار BA و ۵/۴ میکرومولار NAA تشکیل کالوس دادند. این کالوس‌ها توسط *A. rhizogenes* آلوده شده و بعد از ۱۰ روز ریشه‌های موبین از آنها خارج شد. بعد از رشد ۸ هفته‌ای ریشه‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق HPLC از این ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. متابولیت‌های ثانویه وین‌بلاستین و وین‌کریستین که در تحقیقات ضد میکروبی و ضد سرطان استفاده می‌شوند از این ریشه‌ها جداسازی شدند (Zargar et al. 2010).



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* پلاسمید pBI121-*rolC* (+)، DNA استخراج شده از ریشه‌های موبین (۱)، و DNA استخراج شده از ریشه معمولی (-).

Fig3. PCR results of *rolC* gene on roots' DNA

بررسی میزان رشد ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم (شکل ۲- ه) در مقایسه با ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه (شکل ۲- و) نیز حاکی از رشد بیشتر و سریعتر ریشه‌های موبین نسبت به ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه بود، اندازه‌گیری وزن این ریشه‌ها نشان داد که میزان رشد ریشه‌های موبین ۱۵ روز بعد القا که بطور میانگین ۷۹ میلی-گرم بود که نسبت به میزان رشد ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه که بطور میانگین ۱۲ میلی‌گرم اندازه‌گیری شد، ۶/۵۸ برابر بیشتر است. بررسی فنوتیپی این ریشه‌ها نیز نشان داد که ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم فنوتیپ ریشه‌های موبین (رشد سریع، رشد بصورت مستقیم، رنگ سفید و فراوانی تارهای کشنده) را دارد (شکل ۲- م) در حالیکه ریشه‌های معمولی گیاه (شکل ۲- ن) این خصوصیات را از خود نشان ندادند. نتایج این مرحله از تراریزش نشان داد که القای ریشه از ریزنمونه‌های برگ‌ی تلقیح شده گیاه پروانش با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* و میزان رشد آن‌ها در محیط MS معمولی نسبت به محیط‌های هورمون‌دار با کارایی بالایی انجام می‌گیرد همچنین این ریشه‌ها با سرعت بیشتری نسبت به ریشه‌های معمولی گیاه رشد می‌کنند. بنابراین از این ریشه‌ها با توجه به بیوماس بالایی که نسبت به ریشه‌های معمولی تولید می‌کنند و کارایی بالایی در سنتز آلکالوئیدهای مهم دارویی نسبت به بافت‌های دیگر گیاه دارند و از همه مهم‌تر از نظر ژنتیکی نیز پایدار هستند، می‌توان به‌عنوان منبعی غنی برای تولید متابولیت‌های ثانویه به‌صورت انبوه، از طریق کشت در راکتورهای زیستی استفاده کرد.

آنالیز مولکولی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ‌ی پروانش: به منظور تایید تراریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ‌ی گیاه پروانش، دو لاین از ریشه‌های القا شده در محیط MS معمولی که بعد از ۲۵ روز بیشترین رشد را داشتند انتخاب شده و استخراج DNA از آنها صورت گرفت. برای تایید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم ریشه‌های القا شده و حضور ژن *rolC* در آنها (تایید تراریختی ریشه‌ها القا شده) از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن

دو لاین تراریخت با ژن *rolC* باکتری بدست آمد که دارای رشد بسیار سریع ریشه بوده و در آنها ریشه‌ها به سرعت منشعب شدند. تراریختی ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ‌ی پروانش از طریق PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تایید شدند. نتیجه این تحقیق علاوه بر اینکه نشان داد می‌توان از ژن *rolC* برای بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاهان دارویی استفاده کرد همچنین نشان داد که ژن *rolC* نسبت به ترکیب‌های مختلف هورمونی در القای ریشه موثرتر می‌باشد.

در مطالعه دیگری به منظور القای ریشه موثر در گیاه پروانش ریزنمونه‌های برگ‌ی از گیاهچه‌های ۲۰ روزه این گیاه تهیه و بعد از ۱۰ دقیقه همکشتی با استرین *A. rhizogenes* A4 در محیط B5 ۱/۲ کشت داده شدند. این ریزنمونه‌ها بعد از دو روز به محیط B5 جامد منتقل شدند. ۲ تا ۳ هفته بعد از تلقیح اولین ریشه‌های موثر از این ریزنمونه‌ها خارج شده و پنج هفته بعد لاین‌های تراریخت از آنها بدست آمد (Zhou et al. 2012). در این تحقیق علاوه بر بررسی و بهینه سازی روش تراریخت پروانش و بدست آوردن ترکیب هورمونی مناسب برای کالزایی و باززایی این گیاه،

منابع

- Aslam J, Haque Khan S, H. SZ. 2010.** Catharanthus roseus (L.) G. Don. an important drug: its applications and production. *Pharmacie global* 4: 1-16.
- Bouchez D, Camilleri C. 1990.** Identification of a putative rol B gene on the TR-DNA of the Agrobacterium rhizogenes A4 Ri plasmid. *Plant Mol Biol* 14: 617-619.
- Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P. 1987.** Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol Gen Genet* 209: 475-480.
- Dehio C, Grossmann K, Schell J, Schmulling T. 1993.** Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the rolA gene of Agrobacterium rhizogenes T-DNA. *Plant Mol Biol* 23: 1199-1210.
- Dellaporta S, Hicks JW, Hicks JB, 1983.** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Estruch JJ, Schell J, Spena A. 1991.** The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO J* 10: 3125-3128.
- Faheem M, Singh S, Tanwer BS, Khan M, Shahzad A. 2011.** In vitro regeneration of multiplication shoots in Catharanthus roseus - an important medicinal plant. *Advances in Applied Science Research* 2: 208-213.
- Giri A, Narasu ML. 2000.** Transgenic hairy roots. recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18: 1-22.
- Kiselev KV, Kusaykin MI, Dubrovina AS, Bezverbnny DA, Zvyagintseva TN, Bulgakov VP. 2006.** The rolC gene induces expression of a pathogenesis-related beta-1,3-glucanase in transformed ginseng cells. *Phytochemistry* 67: 2225-2231.
- Lemcke K, Schmulling T. 1998.** A putative rolB gene homologue of the Agrobacterium rhizogenes TR-DNA has different morphogenetic activity in tobacco than rolB. *Plant Mol Biol* 36: 803-808.
- Loyola-Vargas VML, Rosa M, Avalos G, KuCauich R. 2007.** Catharanthus biosynthetic enzymes: the road ahead. *Phytochemistry Reviews* 6: 307-339.
- Maurel C, Brevet J, Barbier-Brygoo H, Guern J, Tempe J. 1990.** Auxin regulates the promoter of the root-inducing rolB gene of Agrobacterium rhizogenes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 223: 58-64.
- Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita I, Machida Y, Tanaka N. 2004.** Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene rolB. *Plant J* 38: 260-275.
- Moyanoa E, Fornaléb S, Palazóna J, Cusidóa RM, Bonfilla M, Moralesa C, Piñola MT. 1999.** Effect of Agrobacterium rhizogenes T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry* 52: 1287-1292.
- Mulabagal V, Tsay H. 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.
- Shabani M, Farsi M, Mirshamsi Kakhaki A. 2014.** The effect of ethylene on the expression of genes T16H, G10H, DAT and AVLBS the plant periwinkle (Catharanthus roseus). *Modern genetic journal* 9: 151-160. (In Farsi with English abstract).

- Schmullig T, Fladung M, Grossmann K, Schel J. 1993.** Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *The Plant Journal* 3: 371-382.
- Schmullig T, Schell J, Spena A. 1988.** Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* 7: 2621-2629.
- Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D. 1986.** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *J Biol Chem* 261: 108-121.
- Spena A, Schmullig T, Koncz C, Schell JS. 1987.** Independent and synergistic activity of *rol* A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J* 6: 3891-3899.
- Tripathi L, Tripathi J. 2003.** Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2: 243-253.
- Trovato M, Mauro ML, Costantino P, Altamura M, M. 1997.** The *rolD* gene *Agrobacterium rhizogenes* is developmentary regulated in transgenic tobacco. *Protoplasma* 197: 111-120.
- Van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W. 2004.** The *Catharanthus* alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1241-1253.
- Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, Aspuria ET, Kato A, Uchimiya H. 1994.** The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* 244: 15-22.
- Zargar M, Farahani F, Nabavi T. 2010.** Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under in vitro conditions *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 2199-2203.
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Wu YM, Tang YX. 2012.** An protocol for genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1674-1684.

ارزیابی تاثیر شوری بر میزان جوانه زنی و بیان ژن های آنتی اکسیدان در دو رقم گیاه گوجه فرنگی

Evaluation of the effect of salinity on the germination and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant

پروانه محمودی جراغیلی^۱، هانیه محجل شجاء^{۲*}، الهام محجل کاظمی^۲

Parvaneh Mahmoodi Jaraghili¹, Hanieh Mohajjel Shoja^{2*}, Elham Mohajjel Kazemi²

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد سلولی- تکوین گیاهی،

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

1. MSc. in Plant Cell and Development,

2. Assistance Prof. in Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences,
University of Tabriz, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۱)

چکیده

شوری خاک به عنوان یکی از مهمترین تنش های محیطی گیاهان محسوب می شود که در تمام مراحل رشد بخصوص در مرحله جوانه زنی تاثیر گذار بوده و از عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی به شمار می رود. این تنش فرایندهای فیزیولوژیکی مختلفی را در گیاه تحت تاثیر قرار می دهد که از مهمترین آنها آسیب های اکسیداتیو به اجزای سلولی است که توسط گونه های فعال اکسیژن ایجاد می شوند. در مقابل، گیاهان نیز با تولید آنزیم های آنتی اکسیدان همچون کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) آثار مخرب چنین آسیب هایی را به حداقل می رسانند. این پژوهش به منظور بررسی تاثیر تنش شوری بر میزان جوانه زنی و بیان ژن های آنتی اکسیدان *CAT1* و *APX1* در دو رقم گیاه گوجه فرنگی موسوم به *CaljN₃* و *SuperstrainB* صورت گرفت. به منظور بررسی درصد و سرعت جوانه زنی، بذور در قالب یک طرح کاملا تصادفی در سه تکرار بر روی کاغذ صافی کشت شدند و پس از ۱۵ روز سرعت و درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه مورد سنجش قرار گرفت. جهت مطالعات مولکولی نیز RNA از برگ گیاهان بالغ کاشته شده در خاک استخراج و بعد از سنتز cDNA واکنش qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن های *CAT1* و *APX1* بر روی آنها انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش تنش شوری، درصد و سرعت جوانه زنی و طول ریشه چه و ساقه چه در هر دو رقم *CaljN₃* و *SuperstrainB* کاهش پیدا کرد و رقم *CaljN₃* کمترین مقدار کاهش را از خود نشان داد. با افزایش سطح تنش میزان بیان ژن های *CAT1* و *APX1* در رقم *CaljN₃* به ترتیب حدود دو و ده برابر رقم حساس *SuperstrainB* بود. این نتایج می توانند یکی از دلایل رشد بهتر رقم *CaljN₃* نسبت به رقم *SuperstrainB* و متحمل بودن آن به شرایط تحت تنش شوری باشند.

واژه های کلیدی

تنش شوری
جوانه زنی
ژن *APX1*
ژن *CAT1*
qRT-PCR

مقدمه

محصولات زراعی تحت تأثیر انواع تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده قرار می‌گیرند (Hameed et al. 2008). در میان تنش‌های غیر زنده، شوری یکی از عوامل کاهش تولید محصولات کشاورزی می‌باشد که در مناطق خشک و نیمه خشک مشکل عمده محسوب می‌شود. (Sangam et al. 2005). ایران نیز دارای اقلیم گرم و خشک است که از ویژگی‌های آن تبخیر زیاد و نزولات جوی اندک و پراکنده می‌باشد که این امر باعث تجمع انواع نمک‌ها در لایه سطحی خاک می‌گردد؛ به طوری که بیش از ۵۰٪ اراضی ایران تحت اثرات منفی شوری قرار دارند (Kafi, 2008). یکی از راه‌های اصلاح خاک‌های شور آبشویی خاک‌ها جهت خروج نمک‌های آن است که به دلیل کمبود آب در مناطق خشک این روش عملی نیست. شناسایی و انتخاب ارقام متحمل به شوری همراه با توان تولید زیاد، رویکرد مهم اصلاحی دیگر است (Rashid, 1986). نمک سدیم کلرید متشکل از دو یون سدیم و کلر می‌باشد که به عنوان آلوده‌کنندگان خاک شور هستند. وجود بیش از حد این ترکیب در خاک سبب بروز تنش‌های یونی و اسمزی در گیاهان می‌شود (Munns, 2002). تنش یونی جذب عناصر ضروری مورد نیاز گیاه را کاهش می‌دهد (Mansour et al. 2005; Murillo-Amador et al. 2006) و تنش اسمزی نیز سبب کاهش جذب آب و تبادلات گازی در گیاهان می‌شود (Munns, 2002). تنش شوری از طریق ایجاد تنش اسمزی موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد، عدم تعادل بین فرایند جذب انرژی و مصرف آن توسط اندام فتوسنتزی و تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که ناتوانی گیاه در مهار آن منجر به بروز صدمات اکسیداتیو می‌شود (Blokhina et al. 2003). ROS ها دارای نقش دوگانه‌ای هستند به طوری که در غلظت پایین به عنوان سیگنال‌های مولکولی فعالیت می‌کنند و می‌توانند در تحریک بیان برخی ژن‌ها و در متابولیسم سلولی مفید باشند. در حالی که در غلظت بالا با بیومولکول‌های زیستی واکنش می‌دهند و باعث تخریب پروتئین‌ها، اکسیداسیون لیپیدها، جهش در DNA و افزایش میزان نفوذپذیری غشا می‌شوند که تمامی موارد فوق منجر به بروز اختلالات در متابولیسم طبیعی گیاه شده و نهایتاً باعث مرگ

سلول‌ها می‌شود (Esfandiari et al. 2008; Kar, 2011). در همین راستا گیاهان نیز مکانیسم‌های حفاظتی مختلفی برای حذف یا کاهش ROS بکار می‌برند. سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و دهیدروآسکوربات پراکسیداز (Esfandiari et al. 2011; Gao et al. 2008) و نیز آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند کارتنوئید، گلوتاتیون، توکوفرول و آسکوربات از این مکانیسم‌های حفاظتی می‌باشند (Mittler et al. 2010; Ahmed et al. 2004). در گیاهان H_2O_2 نقش مهمی در تحریک پاسخ‌های دفاعی و مرگ سلولی بازی می‌کند. آنزیم کاتالاز (CAT) با حذف بخش عمده‌ای از H_2O_2 سلولی تغییراتی را در سطح و غلظت پراکسید هیدروژن ایجاد می‌کند (Vandenabeele et al. 2004) و آسکوربات پراکسیداز (APX) نیز یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو کلیدی در سیستم دفاعی گیاهان و به عنوان یک احیا کننده برای رادیکال‌های آزاد و از جمله H_2O_2 محسوب شده و لذا خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به حداقل می‌رساند (Arora et al. 2002). واکنش گیاهان نسبت به شوری مختلف و پیچیده بوده و تعیین یک معیار مناسب برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای مقابله با این تنش بسیار مشکل است (Ashraf and Haris, 2004). توسعه ارقام گیاهی متحمل به نمک، کشت محصولات زراعی را در مناطق وسیعی امکان پذیر ساخته و گامی در رسیدن به محصول هر چه بیشتر را میسر می‌سازد. اگرچه تنش شوری در تمام مراحل رشد گیاه می‌تواند اتفاق بیافتد ولی با توجه به اهمیت استقرار اولیه گیاه در خاک این تنش در مرحله جوانه‌زنی برای گیاه بسیار مضر است (Rauf et al. 2007). بررسی تأثیر شوری بر پارامترهای مختلف جوانه‌زنی بسیاری از گیاهان زراعی نشان داده است که اعمال این تنش در مرحله جوانه‌زنی آزمون قابل اطمینانی در ارزیابی تحمل بسیاری از گونه‌ها است چرا که شوری باعث کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و همچنین باعث کاهش رشد ساقچه‌چه و ریشه‌چه می‌شود. در بررسی‌هایی که بر روی ارقام مختلف گلرنگ و آفتابگردان با اعمال تنش شوری به عمل آمده مشاهده شد که

GP درصد جوانه‌زنی و Ni تعداد بذور جوانه زده در روز I و S تعداد کل بذور کشت شده است (Bajji et al. 2002).

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{GR} = \sum \text{Ni/Ti}$$

GR سرعت جوانه‌زنی (بر حسب تعداد بذور جوانه زده در روز) و Ni تعداد بذور جوانه زده در روز I و Ti تعداد روز تا شمارش I ام است (Bajji et al. 2002).

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS بررسی و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد.

به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر بیان ژن‌های *CAT1* و *APX1* در مرحله گیاه کامل ابتدا بذور جهت جوانه‌زنی به محیط ماسه مرطوب منتقل شدند. آبیاری بذور کشت شده با آب مقطر به مدت ۲۰ روز انجام شد. پس از ظهور برگ‌های اولیه انتقال دانه‌رست‌های جوان به محیط پرلیت/ کوکوپیت با نسبت ۳ به ۱ به عنوان بستر کشت انجام گرفت. به منظور آبیاری گیاهان از محلول غذایی هوگلند (PH=۶-۷) به مدت دو هفته استفاده شد (Hoagland and Arnon, 1950). سپس تنش شوری در سطوح صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید اعمال شد. بعد از گذشت ۴ هفته اعمال تنش، استخراج RNA از برگ‌های جوان گیاهان با استفاده از بافر تریزول به منظور مطالعات مولکولی انجام شد. جهت حذف مولکول‌های DNA از RNA استخراج شده واکنش DNase توسط کیت Qiagen انجام گرفت و بررسی کمی RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر صورت پذیرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت Superscript III (ساخت شرکت Invitrogen) و واکنش qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن‌های *CAT1* و *APX1* و ژن خانه‌دار اکتین که توالی آن‌ها در جدول (۱) آورده شده است انجام پذیرفت. رسم نمودارهای مربوط به داده‌های qRT-PCR در محیط EXCEL صورت گرفت.

درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و نیز وزن خشک آن‌ها با افزایش سطح شوری کاهش یافت (Demir and Ozturk, 2003; Mohammed et al. 2002). با توجه به اهمیت مرحله جوانه‌زنی بذور در گیاهان و نقش آن در تعیین تراکم نهایی بوته در واحد سطح و ارتباط مستقیم این مرحله در سطح مولکولی با افزایش یا کاهش بیان برخی از ژن‌ها در شرایط اعمال تنش و همچنین با توجه به اهمیت ویژه اقتصادی گیاه گوجه‌فرنگی و بحران شوری خاک و کمبود آب در ایران، این تحقیق به منظور ارزیابی پتانسیل جوانه‌زنی و بررسی نحوه بیان ژن‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تحت تنش شوری در دو رقم این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر ژنوتیپ‌های CaljN₃ و SuperstrainB گیاه گوجه‌فرنگی از موسسه نهال و بذور کرج تهیه شدند. این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای و در قالب طرحی کاملاً تصادفی با سه تکرار در سطوح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید انجام شد. بذور ابتدا در محلول ۱۰٪ آب ژاول به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به هر ظرف پتری-دیش ۵ میلی‌لیتر از محلول آب نمک (آب مقطر استریل برای تیمار شاهد) با غلظت مورد نظر اضافه شد و تعداد ۴۰ بذور در هر ظرف بر روی کاغذ صافی مستقر شده و در دمای ۲۰°C در داخل ژرمیناتور قرار داده شدند (ISTA, 2008). بذوری جوانه‌زده تلقی شدند که طول ریشه‌چه آن‌ها حداقل ۲ میلی‌متر بود. پس از ۱۵ روز صفاتی نظیر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری و درصد و سرعت جوانه‌زنی نیز با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{GP} = (\text{Ni/S}) \times 100$$

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در بررسی بیان ژن‌های APX_1 , CAT_1 و ACT جهت qRT-PCR

Table 1- Primer sequences used to examine the gene expression of APX_1 , CAT_1 and ACT for qRT-PCR

Primer Name	Primer sequences
CAT F	GCGACCAAGGATCTTTACGA
CAT R	CAACACCAATCGACCAACTG
APX F	CATTAGGGAGCAGTTTCCC
APX R	CTCTGGCTTGTCTCTCTG
ACT F	ATGCCTATGTTGGTGACGAG
ACT R	CTCTGGAGCCACACGAAGT

نتایج و بحث

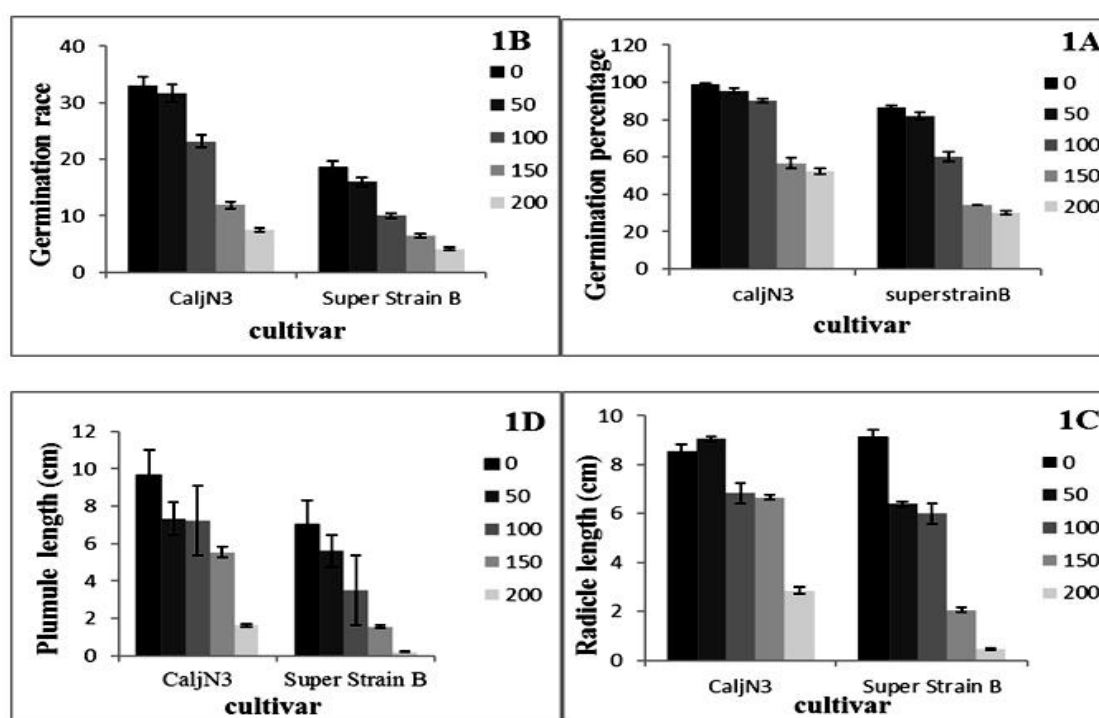
درصد و سرعت جوانه‌زنی: نتایج بدست آمده نشان دادند که با افزایش سطح تنش شوری جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی به طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار گرفته و در هر دو نوع ژنوتیپ یک روند کاهشی هم از لحاظ درصد و هم از لحاظ سرعت جوانه زنی مشاهده می‌شود که در این میان رقم SuperstrainB حساسیت بیشتری را نسبت به رقم CaljN₃ از خود نشان داد (شکل ۱A, B). در شرایط شاهد هر دو رقم درصد جوانه‌زنی نسبتاً مشابهی داشته‌اند (CaljN₃ ۹۸/۸۹ درصد و SuperstrainB ۸۶/۶۷ درصد) در حالی که در شرایط تحت تنش و در غلظت شوری ۲۰۰ میلی‌مولار رقم CaljN₃ با درصد جوانه‌زنی ۵۲/۲۲ تحمل بیشتری را به شرایط تنش در مقایسه با رقم SuperstrainB با درصد جوانه زنی ۳۰/۱ نشان داد (شکل ۱A). همان‌گونه که از شکل ۱A, B بر می‌آید غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تأثیر مهاری کمتری را نسبت به غلظت‌های بالاتر بر درصد و سرعت جوانه زنی گذاشته‌اند. در شرایط شاهد سرعت جوانه‌زنی رقم SuperstrainB از سرعت جوانه‌زنی رقم CaljN₃ کمتر بود. بطور کلی سرعت جوانه‌زنی ارتباط معکوسی با غلظت نمک دارد و با افزایش غلظت نمک سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا می‌کند. رقم CaljN₃ بطور معنی داری سرعت جوانه‌زنی بالایی در تمام سطوح شوری نسبت به رقم SuperstrainB داشت (شکل ۱B). نتایج بدست آمده تفاوت آشکار بین هر دو نوع ژنوتیپ را مشخص

می‌سازند. از آنجا که مرحله جوانه‌زنی به عنوان یکی از دوره‌های حساس چرخه زندگی گیاهان محسوب می‌شود در گیاهانی که جوانه‌زنی بهتر و بیشتری داشته باشند شانس بیشتری برای زنده ماندن و بقا خواهند داشت. سرعت جوانه‌زنی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی ارقام در تحمل به تنش می‌باشد به گونه‌ای که ارقام با سرعت جوانه‌زنی بالا در شرایط تنش شوری امکان سبز شدن سریعی را نسبت به دیگر ارقام دارند (Kafi et al. 2005). نتایج حاصل از تحقیق حاضر، رقم CaljN₃ را به دلیل سرعت جوانه‌زنی بالا نسبت به رقم SuperstrainB به عنوان رقم متحمل به شوری تایید می‌کند. طبق نتایج حاصل بالاترین درصد و سرعت جوانه‌زنی در هر دو رقم در شرایط غیر تنش بوده و کاربرد نمک باعث کاهش جوانه‌زنی شده است. نتایج مشابهی نیز در گیاهان مختلف هم‌چون کلم، چغندر قند و لوبیا گزارش شده است که در آنها زمان لازم برای جوانه‌زنی با افزایش غلظت نمک بیشتر شده است (Jamil and Rha, 2002; Jeannette et al. 2004). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی با کاهش جذب آب توسط بذر در مرحله‌ی آبگیری و تورژسانس ارتباط مستقیم دارد (Bybordi and Tabatabaei, 2009). تنش شوری به دلیل کاهش آب مورد نیاز برای آبگیری و نیز تأثیر سمیت یون‌های سدیم و کلر باعث القای خواب اجباری و کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها می‌شود (Ghars et al. 2009; Sosa et al. 2005).

نسبت به شرایط تحت تنش از خود نشان داد و در هر دو نوع ژنوتیپ مورد بررسی از یک روند کاهشی بارزتری برخوردار بود (شکل ۱D).

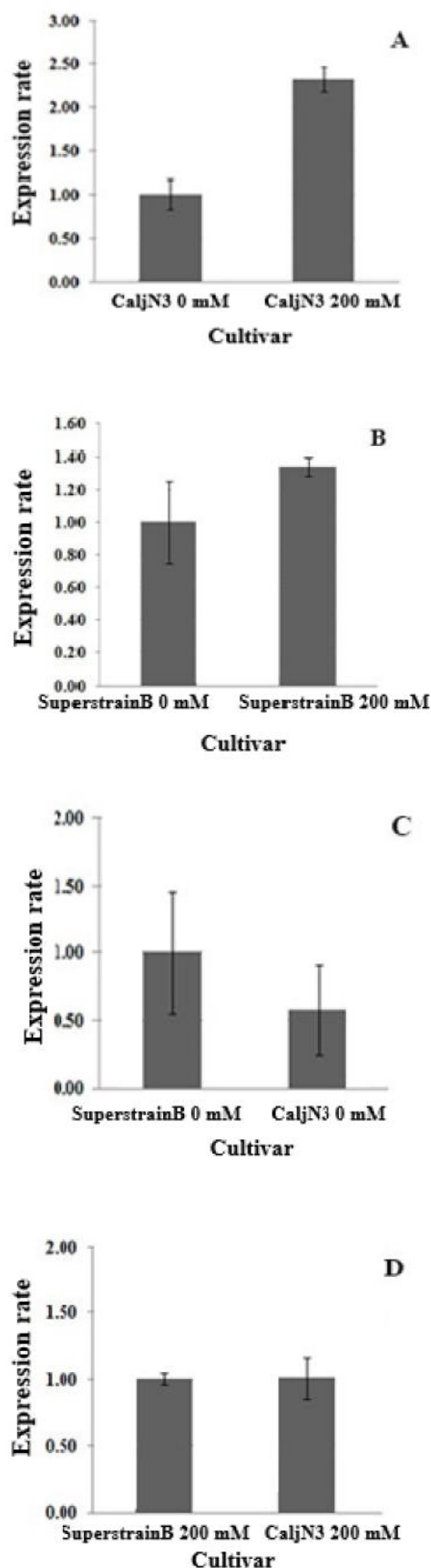
ژنوتیپ SuperstrainB با کاهش ۹۷ درصدی طول ساقچه نسبت به رقم CaljN₃ با کاهش ۸۳/۱۳ درصدی حساسیت بیشتری را به افزایش غلظت نمک نشان داد. در بررسی‌هایی که روی گیاه نخود، فلفل و نخود فرنگی نیز انجام شده است مشاهده شده است که طول ریشه‌چه و ساقچه‌چه با افزایش شوری در این گیاهان کاهش می‌یابد (Yildirim and Guvenc, 2006; Oksu et al. 2012 Tsegazeabe et al. 2005). از عوامل کاهش طول ساقچه‌چه و ریشه‌چه در شرایط تحت تنش، می‌توان به کاهش جذب آب توسط بذر، کاهش انتقال مواد غذایی از لپه‌ها به جنین، کاهش ترشح هورمون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه اختلال در رشد ساقچه‌چه و ریشه‌چه اشاره کرد (Kafi et al. 2005; Bagheri et al. 1988).

طول ریشه‌چه و ساقچه‌چه: از شاخصه‌های مهمی هستند که در بررسی‌های مربوط به تنش شوری مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. ریشه‌چه به سبب آن‌که گیاه را در ارتباط مستقیم با خاک قرار می‌دهد و جذب آب و املاح را در ابتدای زندگی گیاه میسر می‌سازد و ساقچه‌چه به دلیل فراهم نمودن مواد مورد نیاز گیاه از ریشه‌چه و انجام فرایند فتوسنتز از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش سطح تنش شوری یک روند کاهشی در طول ریشه‌چه و ساقچه‌چه در هر دو رقم CaljN₃ و SuperstrainB مشاهده می‌شود (شکل ۱C، ۱D). بیشترین طول ریشه‌چه در شرایط تحت تنش شوری مربوط به ژنوتیپ CaljN₃ بود که تنها ۶۶/۵۸ درصد کاهش طول ریشه را در مقایسه با شرایط شاهد داشت و بنابراین متحمل به شوری محسوب شد (شکل ۱C). در حالی‌که رقم SuperstrainB با کاهش ۹۴/۸۵ درصدی طول ریشه در شرایط تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شرایط شاهد به عنوان ژنوتیپ حساس معرفی شد. طول ساقچه‌چه نسبت به ریشه‌چه حساسیت بیشتری را



شکل ۱- اثر سطوح مختلف شوری در درصد جوانه‌زنی (A)، سرعت جوانه‌زنی (B)، طول ریشه‌چه (C) و طول ساقچه‌چه (D) در دو رقم گوجه‌فرنگی.

Figure 1- Effects of different salinity levels on germination percentage (A), germination rate (B), radicle length (C) and plumule length (D) of two tomato cultivars.

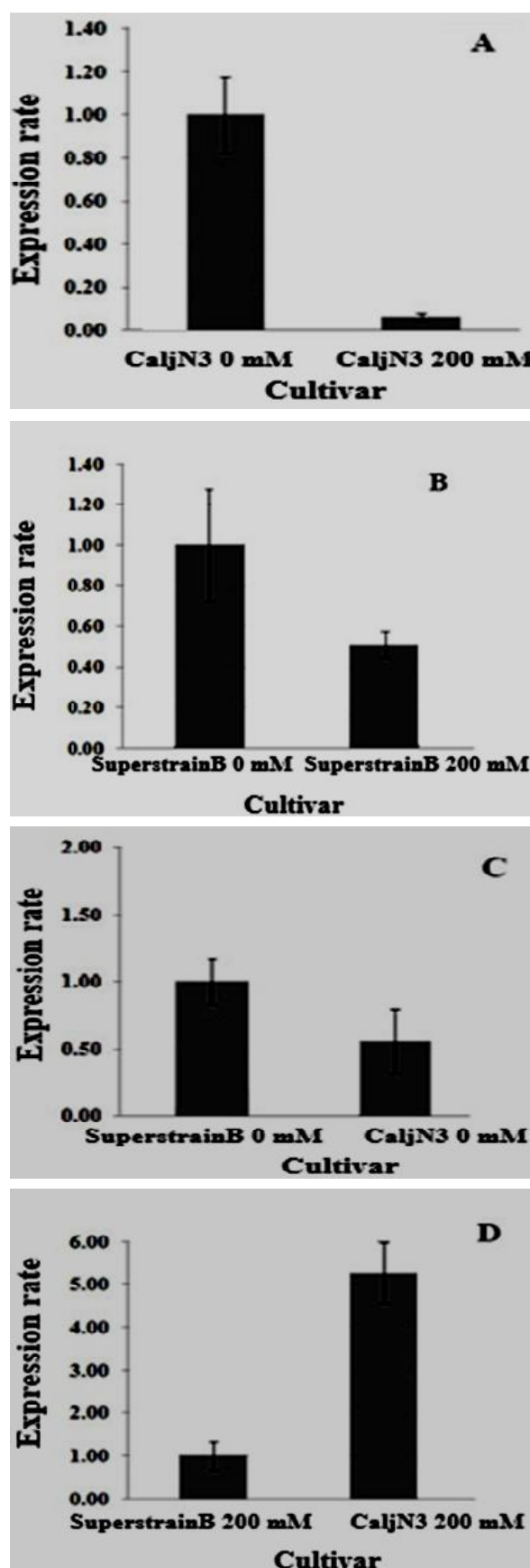


بررسی بیان ژنهای CAT_1 و APX_1 : بذرهایی هر دو رقم گوجه‌فرنگی طبق آنچه در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد در یک طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کاشته شدند و سپس تنش شوری در دو سطح ۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید اعمال شد. بعد از گذشت ۴ هفته از اعمال تنش استخراج RNA از برگ‌های جوان گیاهان صورت گرفت و پس از سنتز cDNA واکنش qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای ژنهای APX_1 و CAT_1 و ژن خانه-دار اکتین انجام گرفت. نتایج حاصل از سنجش بیان ژنهای CAT_1 و APX_1 نشان داد که میزان بیان ژن CAT_1 در هر دو رقم SuperstrainB و CaljN3 در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید نسبت به شرایط کنترل افزایش می‌یابد و این افزایش در رقم CaljN3 بیشتر از رقم SuperstrainB بود (شکل ۲A, B). مقایسه‌ی بیان این ژن در رقم‌های مذکور نسبت به یکدیگر نشان داد که در شرایط کنترل در رقم CaljN3 میزان بیان تقریباً نصف رقم SuperstrainB بوده و در شرایط تیمار بیان این ژن در هر دو رقم مساوی بود (شکل ۲C, D). می‌توان این چنین نتیجه‌گیری کرد که در شرایط تنش رقم CaljN3 با افزایش بیان ژن CAT_1 به میزان تقریبی دو برابر نسبت به رقم SuperstrainB باعث تحمل بیشتر خود در مقابل شوری خاک می‌شود.

در بررسی‌هایی نیز که روی بیان ژن کاتالاز در گیاه مرغ انجام شده است نشان داده شده که میزان بیان این ژن در برگ‌های جوان رقم متحمل تحت تنش شوری ۴۰۰ میلی‌مولار، نسبت به رقم حساس بیشتر بود (Hu et al. 2012). به گونه‌ای مشابه نشان داده شده که افزایش بیان ژن CAT_2 و APX در گیاه کلزا تحت تنش خشکی در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بود (Hosseini et al. 2015). با توجه به این که افزایش بیان ژن CAT_1 منجر به افزایش تحمل تحت تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود، انتقال این ژن می‌تواند در راستای افزایش تحمل به شوری در گیاهان زراعی موثر باشد.

شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن CAT_1 در دو رقم CaljN3 و SuperstrainB

Figure 2- Relative expression of CAT_1 in CaljN3 and SuperstrainB plants



در مورد ژن APX_1 نتایج بدست آمده نشان داد که در هر دو رقم $CaljN_3$ و $SuperstrainB$ میزان بیان این ژن در شرایط تحت تنش نسبت به شرایط شاهد کاهش می‌یابد و این کاهش برای رقم $CaljN_3$ بسیار بیشتر از رقم $SuperstrainB$ بود (شکل ۳A, B). مقایسه بیان این ژن در رقم‌های مذکور نسبت به یکدیگر نشان داد که در شرایط کنترل میزان بیان این ژن در گیاهان $CaljN_3$ بطور تقریبی نصف گیاهان $SuperstrainB$ است (شکل ۳C)، در حالی که در شرایط تنش میزان بیان آن تا ۵ برابر گیاهان $SuperstrainB$ می‌رسد (شکل ۳D). به عبارت دیگر در شرایط تحت تنش رقم $CaljN_3$ با افزایش بیان ژن APX_1 به میزان تقریبی ده برابر نسبت به رقم $SuperstrainB$ باعث تحمل بیشتر خود در مقابل شوری خاک شده است. کاهش بیان ژن‌های APX_1 و CAT_1 در رقم حساس $SuperstrainB$ در شرایط تحت تنش می‌تواند عاملی برای غیر فعال شدن یا تخریب این آنزیم‌ها باشد که منجر به بروز تنش اکسیداتیو شده و در نتیجه حساسیت این رقم به شوری با درجات بالا را باعث گردد (Shim et al., 2003). گزارشات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهند در گیاهان کلزا و چمن که به ترتیب تحت تنش سرما و خشکی قرار داشتند میزان بیان ژن APX در ارقام متحمل بسیار بیشتر از ارقام حساس می‌باشد (Xu et al., 2011; Zahri and Maleki, 2014). در پژوهش حاضر در گیاه متحمل میزان بیان ژن CAT_1 در شرایط تحت تنش بیشتر از بیان ژن APX نسبت به گیاه حساس بود. این نتایج هم‌راستا با نتایج پژوهشی است که بر روی گیاه بادمجان صورت گرفته و نشان می‌دهد که تأثیر شرایط تنشی (غلظت‌های بالای Zn^{2+} و Cu^{2+}) بر بیان ژن‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به گونه‌ای است که ژن CAT در نمونه‌های در معرض آلودگی این فلزات بیشتر از ژن APX بیان می‌گردد (Soydam et al., 2015). امید که با انجام پژوهش‌های آتی گامی فراتر در نیل به درک مکانیسم عمل گیاهان در تحمل به تنش شوری و یا سایر تنش‌های محیطی برداشته شود.

شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن APX_1 در رقم $CaljN_3$ و $SuperstrainB$

Figure 3- Relative expression of APX_1 in $CaljN_3$ and $SuperstrainB$ plants

منابع

- Ahmed P, Jaleel C, Azooz M, Gowher N. 2010. Generation of ROS and nonenzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International* 2(3):11-20.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in Plants. *Current Science-Bangalore* 82(10):1227-1238.
- Ashraf M, Haris PJC. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166:3-16.
- Bagheri Kazemabad A, Sarmadnia G, Haj Rasouliha S. 1988. Study of sainfoin masses reaction to salinity and drought stresses in germination stage. *Journal Agriculture Science Technology* 2:41-55.
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 2002. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany* 80: 297-304.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagestedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* 91(2):179-194.
- Demir M, Ozturk A. 2003. Effect of different soil salinity levels on germination and seedling growth of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal of Agriculture* 27:224-227.
- Esfandiari E, Enayati V, Abbasi A. 2011. Biochemical and physiological changes in response to salinity in two durum wheat (*Triticum turgidum* L.) Genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39(1):165-170.
- Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari M. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 35(1):48-56.
- Gao S, Ouyang C, Wang S, Xu Y, Tang L, Chen F. 2008. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant, Soil and Environment* 54(9):374-381.
- Ghars MA, Debez A, Abdelly C. 2009. Interaction between salinity and original habitat during germination of the annual seashore halophyte *Cakile maritima*. *Communications in soil science and plant analysis* 40(19-20):3170-3180.
- Haileselassie TH, Teferii G. 2012. The effect of salinity stress on germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.) land race of Tigray. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(5):578-583.
- Hameed A, Naseer S, Iqbal T, Syed H, Haq MA. 2008. Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Botany* 40(3):1043-1051.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347:1-32.
- Hosseini SM, Hasanloo T, Mohammadi S. 2015. Physiological characteristics, antioxidant enzyme activities, and gene expression in 2 spring canola (*Brassica napus* L.) cultivars under drought stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39:413-420.
- Hu L, Huang Z, Liu S, Fu J. 2012. Growth response and gene expression in antioxidant-related enzymes in two bermudagrass genotypes differing in salt tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137(3):134-143.
- ISTA. 2008. International Seed Testing Association. Handbook of Vigor test method, 2nd Edition. Zurich, Switzerland.
- Jamil M, Rha ES. 2004. The effect of salinity (NaCl) on the germination and seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Plant resources* 7(3):226-232.
- Jeannette S, Jimenez B, Craig R, Lynch JP. 2002. Salinity tolerance of *phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Science* 42(5):1584-1594.
- Kafi M, Nezami A, Hosseini H, Masoumi A. 2005. Physiological effects of drought stress by polyethylene glycol on germination of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes. *Iranian Journal of Field Crops Research* 3(1):69-80. (In Farsi with English abstract).
- Kafi M. 2008. Bio-saline agriculture and conducting necessary in Iran. Key papers of tenth Iranian congress of agronomy and plant breeding 137 pp. (In Farsi with English abstract).
- Kar RK. 2011. Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 6(11):1741-1745.
- Mansour MMF, Salama KHA, Ali FZM, Abou Hadid AF. 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. *General and Applied Plant Physiology* 31(1-2):29-41.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9(10): 490-498.

- Mohammed EM, Mohamed B, Talouizete A. 2002.** Effect of sodium chloride on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination. *Helia* 25(37):51-58.
- Munns R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25(3): 239-250.
- Murillo-Amador B, Jones HG, Kaya C, Aguilar RL, García-Hernández JL, Troyo-Diéguez E, Ávila-Serrano NY, Rueda-Puente E. 2006.** Effects of foliar application of calcium nitrate on growth and physiological attributes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 58(1):188-196.
- Noor E, Azhar FM, Khan AL. 2001.** Differences in responses of *Gossypium hirsutum* L. varieties to NaCl salinity at seedling stage. *International Journal of Agriculture and Biological* 3(4):345-347.
- Rashid A. 1986.** Mechanism of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). PhD Thesis, Department of Soil Science, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- Rauf M, Munir M, Hassan MU, Ahmad M, Afzal M. 2007.** Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *African Journal of Biotechnology* 6(8):971-975.
- Sangam S, Jayasree D, Reddy KJ, Chari PVB, Sreenivasulu N, Kavi Kishor PB. 2005.** Salt tolerance in plants-transgenic approaches. *Journal of Plant Biotechnology* 7:1-15.
- Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K. 2003.** Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 39(3):285-292.
- Sosa L, Llanes A, Reinoso H, Reginato M, Luna V. 2005.** Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany* 96(2):261-267.
- Soydam-Aydın S, Büyük İ, Cansaran-Duman D, Aras S. 2015.** Roles of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) genes in stress response of eggplant (*Solanum melongena* L.) against Cu²⁺ and Zn²⁺ heavy metal stresses. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(12):1-6.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2004.** Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39(1):45-58.
- Xu L, Han L, Huang B. 2011.** Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves of *Kentucky bluegrass* in response to drought and post-drought recovery. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136(4): 247-255.
- Yildirim E, Guvenc I. 2006.** Salt tolerance of pepper cultivars during germination and seedling growth. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30:347-353.
- Zahri S, Maleki F. 2014.** Increment of Ascorbate peroxidase and metallothionin gene expressions by the cold stress in varieties of rape (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Plant Biology* 6(20):47-54. (In Farsi with English abstract).

بررسی ارتباط چندشکلی ژن کاپاکازئین با میزان تولید و ترکیبات شیر در شترهای استان گلستان

رقیه طعنه گنبدی^{۱*}، مجتبی آهنی آذری^۲، سعید زره داران^۳،
علیرضا خان احمدی^۴ و عبدالحکیم توغدوری^۵

Study of kappa-casein gene polymorphism association with milk production and composition in Golestan province camels

Tane Gonbadi R.^{1*}, Ahani Azari M.², Zerehdaran S.³, Khan Ahmadi AR.⁴ and
Toghdory A.⁵

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، ^۲دانشیار و ^۳استادیار دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی
گرگان، ^۴استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ^۵گروه علوم دامی، دانشکده
کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران

¹M.Sc. Graduated, ²Associate Prof., ⁵Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences,
Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

³Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University
of Mashhad,

⁴Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Gonbad-kavous University, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۶)

چکیده

واژه‌های کلیدی

این تحقیق با هدف تعیین چندشکلی ژن کاپاکازئین و ارتباط آن با بعضی از صفات شیر در جمعیت
شترهای استان گلستان انجام گرفت. برای این کار ۱۰۰ نمونه خون از شترهای تک کوهانه بندر
ترکمن، آق قلا و گنبد جمع آوری شد. DNA به روش نمکی بهینه شده استخراج و سپس با
استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه‌ای با طول ۴۸۸ جفت باز تکثیر شد. به منظور تعیین
ژنوتیپ‌های مختلف، روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی ALU1 بکار گرفته شد. برای
بررسی ارتباط چند شکلی این ژن با صفات عملکردی شامل تولید و ترکیبات شیر (چربی، پروتئین،
لاکتوز و مواد جامد بدون چربی شیر) از رویه GLM نرم افزار SAS استفاده شد. سه الگوی
ژنوتیپی AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی ۰/۱۸، ۰/۲۷ و ۰/۵۵ در این جمعیت مشاهده شد. اثر
چندشکلی این ژن روی میزان تولید و هیچ یک از ترکیبات شیر معنی‌دار نبود. براساس نتایج این
تحقیق انتخاب براساس چند شکلی ژن کاپاکازئین نمی‌تواند در بهبود ژنتیکی صفات تولید و
ترکیبات شیر در شترهای نژاد ترکمن مؤثر باشد.

چندشکلی

ژن کاپاکازئین

شتر

تولید شیر

مقدمه

با توسعه و رشد علم ژنتیک مولکولی در سال‌های اخیر امکان بررسی دقیق ساختار ژنتیکی دام‌های اهلی در برنامه‌ریزی فعالیت-های اصلاح نژادی بسیار گسترش یافته است. شتر از جمله دام-هایی است که کمتر در این بررسی‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. یکی از اهداف ژنتیک مولکولی، بررسی چندشکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی مهم می‌باشد.

کل جمعیت شتر در سراسر جهان ۲۴/۱ میلیون نفر تخمین زده می‌شود (Fao, 2015). تولید شیر شتر سالانه بطور مداوم در حال افزایش است، همچنین بزرگترین جمعیت شتر شیری در سراسر جهان در کشورهای شمال شرق آفریقا از جمله سومالی، اتیوپی و سودان است (Fao, 2015). همچنین افزایش تقاضای بازار برای محصولات متنوع از جمله شیر شتر وجود دارد. شیر شتر در سطح جهانی بیشتر بعنوان غذایی سالم به رسمیت شناخته شده است (Nikkah, 2011a). علاوه بر این در سال‌های اخیر علاقه به افزایش مصرف شیر غیر گاوی بعنوان پروتئین جایگزین برای انسان وجود داشته است (Hinz et al, 2012). ترکیب شیمیایی شیر شتر در کشورهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (Al Haj and Al Kanhal, 2010). براساس آمار منتشر شده توسط خواربار جهانی، از جمعیت ۲۴۶۶۴۲۲۸ نفری شتر در جهان تنها ۱۶۲۰۰۰ نفر به ایران اختصاص دارد (Fao, 2015). میزان پروتئین شیر در این حیوان حدود ۲/۴ تا ۵/۳ درصد است (Nikkah, 2009; Konuspayeva, 2011b) و به انواع کازئین‌ها و پروتئین-های آب پنیر تقسیم می‌شود (Kappeler et al, 2003). کازئین‌ها ۵۲ تا ۸۹ درصد شیر شتر را تشکیل می‌دهند (Al haj and Al Kanhal, 2010) که شامل چهار بخش آلفاکازئین ۱، آلفاکازئین ۲، بتاکازئین و کاپاکازئین می‌باشد (Ochirkhuyag et al, 1997; El Agamy, 2006). در شتر تنوع ژنتیکی برای پروتئین $\alpha s1$ مشاهده شده است (Kappeler et al, 1998). در میان کازئین‌ها، کاپاکازئین نقش ضروری در ثبات میسل کازئین را بر عهده دارد (Alexander et al, 1988). کاپاکازئین از لحاظ اندازه از بقیه کازئین‌ها کوچکتر بوده اما مهم‌ترین نقش را در ثبات میسل‌ها بر عهده دارد. پروتئین کاپاکازئین نقش محافظتی میسل‌های کازئین را در شیر برعهده

دارد. همچنین در کیفیت پنیر تولید شده و سرعت دلمه بستن و راندمان تبدیل شیر به پنیر اهمیت به سزایی دارد (Fox, 1992). تجزیه و تحلیل کمی انجام شده بر روی پروتئین‌های شیر شتر نشان داده است مقادیر کاپاکازئین شتر نسبت به کاپا کازئین گاو پایین‌تر است (Kappeler et al, 2003) و اخیراً پنج شکل مختلف از کاپاکازئین در شیر شتر پیدا شده است که منجر به گلیکوزیله شدن قوی پروتئین می‌شود (Hinz et al, 2012). با توجه به مطالعات اندک انجام شده بر روی شیر شتر در ایران، این مطالعه به منظور ارزیابی ارتباط چندشکلی این ژن کاپاکازئین با ترکیبات شیر در شترهای استان گلستان انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از صد نفر از شترهای آق‌قلا، بندرترکمن و گنبد خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون از ورید و داج گرفته شد و در لوله‌های حاوی EDTA 0.5 مولار جمع‌آوری و در دمای 20°C - ذخیره شد. DNA به روش نمکی بهینه شده استخراج گردید (Miller et al, 1988). برای نمونه‌برداری از شیر از نمونه-های شیر دوشیده شده دستی استفاده شد. برای تعیین ترکیبات شیر از قبیل پروتئین، چربی، لاکتوز و کل مواد جامد شیر از دستگاه اکومیلک استفاده گردید. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی غلظت ژل آگارز برای الکتروفورز DNA استخراجی 0.8 درصد بوده و DNA استخراجی بدون شکستگی آلودگی مشاهده شد. پس از مرحله استخراج، DNA با استفاده از یک جفت آغازگر با توالی

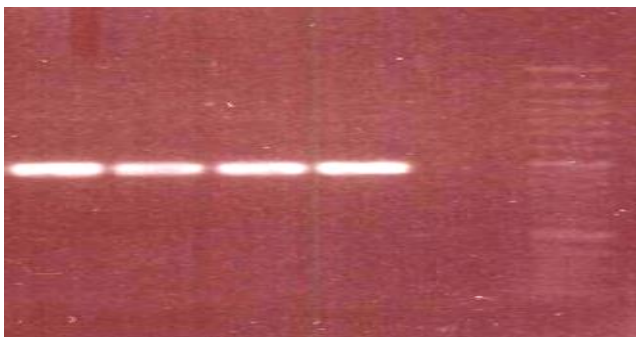
F: 5' CACAAAGATGACTCTGCTATCG 3'

R: 5' GCCCTCCACATATGTCTG 3'

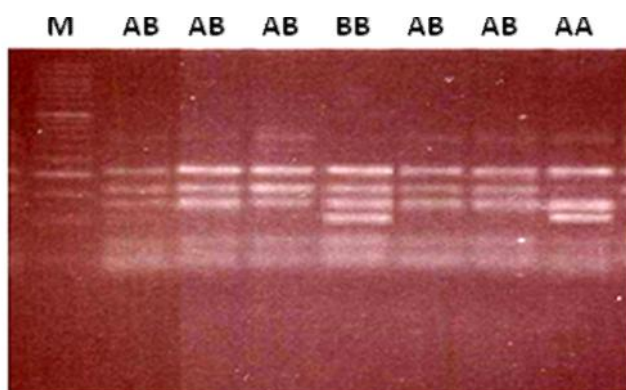
(Pauccio et al, 2013)، تکثیر گردید و قطعه‌ای ۴۸۸ جفت بازی از جفت باز ۱۳۷- تا جفت باز ۳۵۱ از طرف انتهای 5' ژن کاپا-کازئین تکثیر شد. برنامه حرارتی استفاده شده برای تکثیر نواحی موردنظر در ژن کاپاکازئین، شامل دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشته سازی ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه

نتایج و بحث

این تحقیق با هدف تعیین چندشکلی ژن کاپاکازئین و ارتباط آن با بعضی از صفات شیر در جمعیت شترهای استان گلستان انجام گرفت. به منظور تعیین ژنوتیپ‌های مختلف، روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی ALU1 بکار گرفته شد. برای بررسی ارتباط چند شکلی این ژن با صفات عملکردی شامل تولید و ترکیبات شیر (چربی، پروتئین، لاکتوز و مواد جامد بدون چربی شیر) از رویه GLM نرم‌افزار SAS استفاده شد.



شکل ۱- محصولات PCR (قطعات ۴۸۸ جفت بازی) تکثیر شده برای ژن کاپاکازئین روی DNA استخراج شده از شترها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
Figure 1- PCR products (488 bp) of kappa-casein gene.



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعه ۴۸۸ جفت بازی با آنزیم ALU1 بر روی ژل آگارز 3.5 درصد

Figure 2- Digested products of 488 bp fragments by ALU1 enzyme on 3.5 percent agarose gel

سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز 1.5 درصد مشخص شد.

روش PCR-RFLP: آنزیم برشی برای هضم محصولات PCR، ALU1 با جایگاه برشی 3' AGCT 5' مورد استفاده قرار گرفت. پروتکل هضم آنزیمی شامل استفاده از ۱ واحد آنزیم (0.1 میکرولیتر) برای هر نمونه از محصولات PCR، ۲ میکرولیتر بافر 10x، 2.9 میکرولیتر آب مقطر و ۵ میکرولیتر از محصولات PCR برای هر واکنش آنزیمی در نظر گرفته شد. سپس تمامی نمونه‌های حاوی آنزیم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷° C نگهداری شدند و پس از اتمام زمان هضم آنزیمی برای بررسی قطعات برشی از ژل آگارز 3.5 درصد استفاده شد.

برای تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی از روی تعداد ژنوتیپ‌های بدست آمده در جمعیت مورد بررسی فایل اطلاعات ژنوتیپ‌های مشاهده شده در نرم‌افزار POPGENE 1.31 (Yeh et al, 1997) فراخوانده شده و پس از تعاریف اولیه در این نرم‌افزار شامل دیپلوئید بودن موجود، تعداد جایگاه، جمعیت‌ها، تعداد ژنوتیپ‌های مشاهده شده و نامگذاری آنها، محاسبات در این نرم‌افزار انجام گردید. مطالعه برقراری تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در این تحقیق نیز با استفاده از نرم‌افزار POPGENE و با آزمون کای‌مربع انجام شد. پس از تشخیص ژنوتیپ‌های مربوط به ژن کاپاکازئین، تجزیه آماری به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مذکور با صفات عملکردی انجام گردید. تجزیه آماری کلیه داده‌های این تحقیق با رویه مدل‌های خطی عمومی نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات عملکردی از رابطه ۱ استفاده شد. رابطه ۱:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + A_j + DIM_k + e_{ijk}$$
 در این مدل: μ : صفت کل، G_i : اثر ژنوتیپ‌های مربوط به ژن مورد بررسی؛ A_j : اثر ثابت سن، DIM_k : تعداد روزهای شیردهی (اختلاف بین روز زایش و روز رکوردگیری)، e_{ijk} : اثر باقیمانده. برای مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات صفات عملکردی در ژنوتیپ‌های مختلف از روش توکی استفاده شد.

جدول ۱- فراوانی و تعداد ژنوتیپ‌ها و نتایج تعادل هاردی واینبرگ در شترهای استان گلستان

Table 1- Number and frequency of genotypes and Hardy-Weinberg equation results in Golestan Province Camels

ژنوتیپ	فراوانی	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	آماره χ^2	فراوانی آلی
AA	0.18	18	9.81	0.0073	0.31 (A)
AB	0.27	27	43.37	0.0606	0.69 (B)
BB	0.55	55	46.82	0.1472	
جمع	1	100	100	0.2151*	

*معنی دار در سطح احتمال 5 درصد ($p < 0.05$)جدول ۲- مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات مربوط به رکوردهای تولید و اجزای شیر (میانگین $\pm$ خطا) در ژنوتیپ‌های ژن کاپاکازئینTable 2- Last square means of milk production and its composition (Mean $\pm$ SE) in genotypes of kappa-casein

ژنوتیپ	تولید شیر (کیلوگرم)	چربی (درصد)	پروتئین (درصد)	لاکتوز (درصد)	SNF (درصد)
AA	9.69 $\pm$ 0.72	4.44 $\pm$ 0.46	3.14 $\pm$ 0.21	4.26 $\pm$ 0.16	7.17 $\pm$ 0.44
AB	10.38 $\pm$ 0.52	4.48 $\pm$ 0.32	2.99 $\pm$ 0.22	4.56 $\pm$ 0.33	8.15 $\pm$ 0.61
BB	9.27 $\pm$ 0.33	4.15 $\pm$ 0.24	2.93 $\pm$ 0.12	4.28 $\pm$ 0.16	7.52 $\pm$ 0.12
سطح معنی داری	0.18	0.47	0.77	0.66	0.39

نتایج هضم با آنزیم برشی نشان داد که برای قطعات تکثیر شده (شکل ۱)، سه جایگاه برشی برای آنزیم *ALU1* وجود داشت و این آنزیم محصولات را به قطعات ۲۰۳، ۱۵۸، ۱۲۷ و ۱۲۰ جفت باز برش داد (شکل ۲)، قطعات با طول ۱۲۰، ۱۲۷ و ۲۰۳ جفت باز آل A و قطعات با طول ۱۵۸، ۱۲۷ و ۱۲۰ جفت باز، آل B نامگذاری شده و قطعات با طول ۲۰۳ جفت باز و ۱۵۸ جفت باز و ۱۲۷ جفت باز و ۱۲۰ جفت باز، ژنوتیپ AB نامگذاری شد. ژنوتیپ‌های بدست آمده به شرح جدول ۱ می‌باشد.

با توجه به شکل ۱ و ۲ الگوی بانندی متفاوت AA، AB و BB در بین نمونه‌ها مشاهده شد که این تفاوت نشان‌دهنده وجود سه ژنوتیپ متفاوت در جمعیت مورد بررسی در این تحقیق بود. میزان هتروزیگوتی مشاهده شده در جمعیت مورد بررسی ۲۷٪ بود.

میزان کل χ^2 محاسبه شده برابر با 0.2151 بود که نشانگر تفاوت معنی دار (در سطح احتمال 0.05) جمعیت مورد بررسی از تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشد (جدول ۱). این عدم تعادل، تلاقی‌های

غیر تصادفی بر فراوانی ژنی و ژنوتیپی ژن کاپاکازئین را در جمعیت شترهای استان گلستان نشان می‌دهد. میزان هتروزیگوتی مشاهده شده در جمعیت مورد بررسی ۲۷٪ بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی نسبتاً کم در این جمعیت برای این ژن می‌باشد. میزان هتروزیگوتی مورد انتظار در این جمعیت، 43.37٪ محاسبه شد. کم بودن میزان هتروزیگوتی مشاهده شده در جمعیت موردنظر می‌تواند ناشی از تلاقی‌های جور شده مثبت در جمعیت مورد بررسی باشد. برای مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات صفات عملکردی در ژنوتیپ‌های مختلف از روش توکی استفاده شد.

علی‌رغم نقش کلیدی ژن کاپاکازئین در ساختار میسل‌ها و تولید پنیر و با توجه به اهمیتی که در کنترل رونویسی ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین دارد ارتباط این ژن با صفات تولیدی چندان مورد مطالعه قرار نگرفته است. نتایج مربوط به چندشکلی ژن کاپاکازئین در این تحقیق با نتایج مطالعات صورت گرفته توسط (Barracosa, 1996) و (Ceriotti et al, 2004) در بررسی سه نژاد گوسفند ایتالیایی که هرکدام یک الگوی دو بانندی را در اگزون ۴

با صفات تولید شیر مطالعات کمتری صورت گرفته و یا بررسی چندشکلی این ژن‌ها توسط سایر روش‌های مولکولی انجام گرفته است، امکان مقایسه آنها با نتایج حاصل از این تحقیق به اندازه کافی وجود نداشته است. همچنین در بررسی حاضر عوامل مختلفی مانند نوع نژاد، اندازه جمعیت، حجم نمونه برداری، شرایط محیطی، همخونی، نحوه توزیع فراوانی‌های ژنی و... می‌تواند باعث ایجاد تناقض بین نتایج بدست آمده و بررسی‌های انجام شده باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بخاطر اینکه عمده هزینه‌های این پایان نامه را تامین نموده‌اند کمال تشکر را داریم و همچنین از خانم مامی زاده بخاطر مساعدت‌هایی که در انجام این تحقیق داشتند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Al haj OA and Al Kanhal H A. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20: 811-821.
- Alexander LJ, Stewart AF, Mackinlay AG, Kapelinskaya TV, Tkach TM, Gorodetsky SI. 1988. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur. J. Biochem.* 178: 395-401.
- Barracosa H. 1996. Estudo de polimorfismos genéticos e sua associação com capacidades de produção leiteira em caprinos de raça Algarvia e ovinos de raça Serra da Estrela. *Dissertação de Mestrado, Univ. do Algarve, Faro.*
- Cerioti G, Chessa S, Bolla P, Budelli E, Bianchi L, Duranti E and Caroli A. 2004. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Journal Dairy Science*. 87: 2606-2613.
- El Agamy EI. 2006. Camel milk. In Y.W. Park, & F.W. Haenlein (Eds.), *Handbook of non-bovine mammals* (pp. 297-344). Iowa, NJ, USA: Blackwell Publisher Professional.
- FAO (2015). Food and agricultural commodities production FAO Statistic Division. Available on <http://www.fao.org/>.

کاپاکازئین مشاهده کرده‌اند مطابقت ندارد. علاوه بر این محققین دیگری توسط دیگر روش‌های مولکولی بررسی‌های مختلفی نیز انجام داده‌اند (Staiger et al, 2010). دو آلل C و T را به ترتیب با فراوانی 0.51 و 0.49 برآورد کردند، اما هیچ ارتباط معنی‌داری را بین چندشکلی ژن کاپاکازئین با تولید شیر در گوسفندان فریزین شرقی پیدا نکردند.

براساس نتایج تحقیق حاضر اثر چندشکلی این ژن روی تولید و هیچ یک از ترکیبات شیر (چربی، پروتئین، لاکتوز و مواد جامد بدون چربی شیر) معنی‌دار نبود. بنابراین انتخاب براساس چند شکلی ژن کاپاکازئین نمی‌تواند در بهبود ژنتیکی صفات تولید و ترکیبات شیر در شترهای استان گلستان مؤثر باشد. در شتر به دلیل مشکلاتی که در جمع‌آوری اطلاعات شجره و رکوردهای فنوتیپی وجود دارد بررسی ارتباط بین ژن‌های کاندید و صفات تولید شیر و همچنین بهبود پیشرفت ژنتیکی مربوط به این صفات با محدودیت‌هایی همراه است. در این تحقیق تلاش شده است تا اطلاعات جدیدی را در این راستا و زمینه لازم را برای مطالعات هرچه بیشتر بر روی شتر فراهم گردد. در بررسی حاضر به دلیل اینکه بر روی ژن کاپاکازئین به روش PCR-RFLP و بررسی آنها

- Feligni M, Vlaco S, Cubric Curik V, Parma P, Greppi GF and Enne G. 2005. A single nucleotide polymorphism in the sheep k-casein coding region. *International Dairy Journal*, 72: 1-5.
- Fox PF. 1992. *Advanced dairy chemistry proteins*. Elsevier. Applied. Science. publ. London.
- Hinz K, O'Connor P M, Huppertz T, Ross P M and Kelly AL. 2012. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. *Journal of Dairy Research*. 9: 185-191.
- Kappeler S, Farah Z, Puhani Z. 1998. Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*. 65: 209-222.
- Kappeler SR, Farah Z, Puhani Z. 2003. 5'-Flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal Dairy Science*. 86: 498-508.
- Konuspaveva G, Faye B and Loiseau G. 2009. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 95-101.
- Mandal A, Kumar D, Rout PK, Yadav NK and Roy D. 2008. Genetic polymorphism of milk protein and its

- effects on milk composition traits in Muzaffarnagari-sheep. Indian Journal Animal Science. 78 (10).
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16(3): 1215.
- Nikkah A. 2011a.** Equidae, camel, and yak milks as functional foods: a review. Journal of Food and Nutrition Sciences. 1: 100-116.
- Nikkah A. 2011b.** Science of camel and yak milks: human nutrition and health perspectives. Food and Nutrition Sciences. 2: 667-673.
- Ochirkhuyag B, Chobert JM, Dalgarrondo M, Choiset Y and Haertlé T. 1997.** Characterization of caseins from Mongolian yak, Khainak, and Bactrian camel. Lait, 77:601-613.
- Paucillo A, Shuiep E, Cosenza G, Ramunno L and Erhardt G. 2013.** Molecular characterization and genetic variability at k-casein gene (CSN3) in camels. Journal Animal Science. 513:22-30
- Staiger EA, Thonney ML, Buchanan, JW, Rogers ER, Oltenacu -PA and Mateescu RG. 2010.** Effect of prolactin, β -lactoglobulin, and κ -casein genotype on milk yield in East Friesian sheep Journal Dairy Science. 93: 1736-1742.
- Yeh F C, Yang RC and Boyle T. 1999.** Pop Gene Version 1.31. Microsoft Windows based freeware for population genetics analysis. Available on <http://ftp.microsoft.com/Softlib/HPGL.EXE>.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol5, Number1

Spring and Summer 2016

Bi-seasonal

English Abstracts

7 Articles

Production of Potato Resistant Plant to PVX using an RNA Silencing Mechanism

ShahlaSadat Fateri Rezvani, Maghsoud Pazhouhandeh*, Akbar Shirzad, and Sakineh Lotfi

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

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@azaruniv.edu , pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Viruses are the main causes of potato yield loss. Potato X Potexvirus (PVX) is one of the most important potato viruses and the use of resistant varieties is the principal way to control it. In this study, we tried to produce potato plants resistant to this virus using an RNA silencing technique. To this end, a hairpin construct of P25 of PVX was made in pFGC5941 under control of the CaMV 35S promoter with two consecutive cloning steps. The P25 protein is a suppressor of RNA Silencing in viral host plants. The recombinant vector was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain. Leaf and internode pieces of potato (Agria variety) were transformed by *Agrobacterium*. Following induction of callus, shoot and root, regenerated transgenic plants were selected and micro-propagated. Molecular analysis by PCR on DNA of plants and by RT-PCR on their RNA confirmed the presence and the expression of the transgene. Transgenic plants were propagated and then inoculated mechanically by PVX in the greenhouse. ELISA results using PVX-coat protein antibody showed resistance of two transgenic lines to PVX. Molecular confirmation of these potato lines was performed using PVX coat protein primers by RT-PCR on plant RNAs. The results of this research have led to the production of two independent lines of potato that are resistant to PVX and future work will involve analysis of resistance in field conditions and the production of their mini-tuber.

Key Words

Potato, PVX, Resistance, Transgenic Plant, RNA Silencing

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

Nafiseh Tousi¹ and Omid Eini^{2*}

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

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

ABSTRACT

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

Key Words

Bioinformatics, ToLCV, miRNA, RNA hybrid, Tomato

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

Majedeh Neisi¹, Badraddin Ebrahim Sayed Tabatabaei^{2*}, Cyrus Ghobadi³, Hamid Rajabi Memari⁴,
Ghazaleh Khaksar⁵

¹ MSc in Biotechnology, ² Prof, Department of Biotechnology, ³ Assistance Prof, Department of Horticulture,
Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴ Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University,
Ahvaz, Iran

⁵ Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

*Corresponding Author, Email: sayedt@cc.iut.ac.ir

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most widespread viral infections of humans. An effective way to treat and prevent the disease is vaccination. Since production of conventional HBV vaccines is very expensive, use of transgenic plants as an alternative bioreactor has recently become of interest to many researchers. In this study, the *HBsAg* gene has been transferred to pepper plants (*Nicotiana tabacum*) through the leaf disk technique. The recombinant plant expression vector, pCambia containing *HBsAg* was cloned into *E. coli* strain JM107 and was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Young tobacco leaves were used as explants and co-cultivated with *A. tumefaciens*. The transformants were regenerated on selection medium containing 1mg.l⁻¹ BAP, 0/1mg.l⁻¹ NAA, 500 mg.l⁻¹ cephotaxim and 15 mg.l⁻¹ hygromycin. After the growth of plantlets (about 15 cm), genomic DNA was extracted from putatively regenerated plants by the CTAB method. The presence of *HBsAg* gene in transgenic plants was detected using PCR analysis. Finally expression of *HBsAg* gene was tested via RT-PCR analysis.

Key Words

Agrobacterium, Edible Vaccine, Gene Transformation, *HBsAg* Gene, Transgenic Tobacco

Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from Proteome of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, with Ethylene Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

Assistant Prof. of Plant Protection Dept. Agriculture Fac. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: fallahzadeh@azaruniv.edu

ABSTRACT

In previous work we showed that a purified extract of the proteome of bacterium *Xcc* that was able to induce ethylene production on *Arabidopsis*. Among the approximately 60 different putative proteins in the extract, eight were identified as conserved hypothetical proteins. The aim of this study is to use different bioinformatics tools to characterize these proteins. All of the investigated proteins ranged in size between 17.11 and 43.84 kilo Daltons with Protein NP_640497.1 being the largest. Calculated isoelectric points (pI) for proteins varied between 5.34 and 9.5. The type of protein families and domains of proteins was determined by conserved domain database (CDD-Blast) and Interpro. Among the investigated proteins, proteins NP_640912.1 had a HTH domain (Helix-turn-Helix); the central part of protein NP_640497 contained an Enoyl reductase domain; protein NP_641576.1 contained two calcium binding motifs (EF-hand, calcium binding motif); and protein NP_643454.1 contained a 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase motif from the Hot dog superfamily. COACH server was used for predication of ligand binding sites of proteins and their three dimensional structure was modeled by Phyre 2 server. Results from this research can be used for better understanding of *Xcc* and also identification of proteins with elicitor activity from this bacterium.

Key Words

Xanthomonas, Bioinformatics, Citrus canker, Elicitor, Protein

The effect of *rolC* gene on the medicinal plant *Catharanthus roseus*

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*} and Hanieh Mohajjel-Shoja³

1. Master of Science in Biotechnology,
2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz,
3. Assistant Prof. Plant Biology Dept. Faculty of Natural Science, University of Tabriz, IRAN

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

C*atharanthus roseus* is a medicinal plant containing very important alkaloids such as Vincristine and Vinblastin that are used to treat a variety of cancers. Due to the importance of the plasticity genes such as *rolC* in the biosynthesis of alkaloids, this study we investigated possible improvement of rooting and root induction in *C. roseus* using the *rolC* gene. To this end, the seeds of this plant were superficially sterilized and cultured in *in vitro* conditions. The leaf explants of these *in vitro* plants were inoculated by *Agrobacterium tumefaciens* carrying pBI121-*rolC* plasmid (*rolC* under control of the CaMV 35S promoter). The inoculated explants were cultured in five different media with or without hormones for rooting. After nine days, the first roots appeared in leaf explants on the MS medium without hormones and containing cefotaxime antibiotic. Two lines had very rapid rooting and the roots branched quickly. Molecular analysis by PCR using *rolC* specific primers confirmed the presence of the *rolC* gene in the transgenic plants. Results showed that the *rolC* gene could be used to induce rooting in the medicinal plants and that the *rolC* gene is also more successful in induction of hairy roots than various different combinations of plant hormones.

Key Words

Catharanthus, Root, Transformation, *rolC*

Evaluation of the effect of salinity on the germination and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant

Parvaneh Mahmoodi Jaraghili¹, Hanieh Mohajjel Shoja^{2*}, Elham Mohajjel Kazemi²

1. MSc. in Plant Cell and Development,

2. Assistance Prof. in Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Iran

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

ABSTRACT

Environmental stresses are considered among the most important factors limiting agricultural production. Tomato, an important agricultural product, is sensitive to high salinity levels in soil. During salinity stress, several physiological phenomena occur in plants, including oxidative damage to cellular components due to "reactive oxygen species" or ROS production. Plants produce antioxidant enzymes such as catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase to counter the destructive effects of ROS. This study was carried out to evaluate the rate of germination and the expression of *CAT1* and *APX1* genes in two tomato cultivars, caljN3 and superstrain B. To evaluate the rate and the percentage of the germination, the seeds were cultured on filter paper in a completely randomized design with three replications and the rate and percentage of germination, radicle length and plumule length were measured after 15 days. To perform the molecular study, total RNA was extracted from plants grown in control conditions and under salinity stress. The results demonstrated that by increasing the salinity, reductions in germination percentage, germination rate, radicle length and plumule length were observed in both CaljN3 and Superstrain B cultivars, although the CaljN3 cultivar showed the lowest decrease. Interestingly, upon increasing the stress level, the rates of expression of the *CAT1* and *APX1* genes in the caljN3 cultivar were nearly twice and 10 times, respectively, higher than for the Superstrain B cultivar. These results could be one of the reasons for the superior growth and salt stress tolerance of caljN3 cultivar compared to SuperstrainB cultivar.

Key Words

APX1 gene, *CAT1* gene, Germination, qRT-PCR, Salt stress

Study of kappa-casein gene polymorphism association with milk production and composition in Golestan province camels

Tane Gonbadi R. ^{*1}, Ahani Azari M. ², Zerehdaran S. ³, Khan Ahmadi AR. ⁴ and Toghdory A. ⁵

¹M.Sc. Graduated, ²Associate Prof., ⁵Assistant Prof.,

Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

³Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,

⁴Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Gonbad-kavous University, Iran

* Corresponding Author, Email: tanegonbadyroghaye@yahoo.com

A B S T R A C T

This study was aimed to determine the kappa-casein gene polymorphism and its relationship with some milk traits in a population of camels in the Golestan province. Blood samples were collected from 100 camel dromedaries in Bandar Turkman, AqQala and Gonbad cities. DNA was extracted using the optimized salt method and then a pair of specific primers was used to produce a 488 bp fragment. Genotypes were determined by PCR-RFLP method followed by treatment with ALU1 restriction enzyme. To investigate the association of Kappa casein gene polymorphism with milk production and composition (fat, protein, lactose and solids non-fat milk), the GLM procedure of SAS software was used. Three genotype patterns including AA, AB and BB were observed with the frequencies of 0.18, 0.27 and 0.55, respectively. The effect of kappa-casein gene polymorphism on milk production and composition was not significant. Based on current results, the analysis of kappa casein gene polymorphism cannot be used for improving milk yield and composition of camels in Turkman population.

Key Words

Kappa-casein gene, Polymorphism, Camel, Milk