مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره پنجم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سردبیر: دکتر مقصود پژوهنده

دبیر هیات تحریریه و **اجرایی**: دکتر الهام باقری

هیات تحریریه

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

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

ویرایش خلاصه های انگلیسی: Prof. Kenneth E. Richards

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

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

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

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

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

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

پست الکترونیک:gebs.j.bs @gmail.com ، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۳۱

پایگاه اینترنتی: www.gebsj.ir

امور چاپ : مرکز نشر دانشگاهی

تیراژ: ۵۰۰

بسم الله الرحمن الرحیم

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره پنجم، شماره ۲، شماره پیاپی ۱۰، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی	صفحات
۱ - **همسانه سازی و انتقال آنزیمT7RNA پلیمراز باکتریوفاژ T7 به توتون** کبری نعلبندی، اصغر میرزائی اصل*، لیلا خدائی، غلام خداکرمیان	۶۷-۷۵
۲ - **ارزیابی کارآیی قارچ *Beauveria bassiana* برای مهار زیستی گیاهچه میری رایزوکتونیایی گیاه پنبه** نرگس آزادی، اکبر شیرزاد*، حمید محمدی	۷۷-۸۹
۳ - **بذور آلوده وارداتی کدوئیان عامل استقرار و انتشار جدایه های اروپای مرکزی ویروس موزاییک زرد کدو در منطقه ورامین** سمیه قلی زاده روشنق، شاهین نوری نژاد زرقانی*، حشمت اله امینیان، مجید جعفری، حسین رامشینی	۹۱-۹۹
۴ - **کالوس‌زایی و باززایی لاینهای گندم نان از ریزنمونه های کولئوپتیلی** علی اکبر غلامی، علیرضا تاری نژاد*	۱۰۱-۱۱۲
۵ - **شناسایی و توالی یابی ژن مربوط به آنتی پورتر هیدروژن/ سدیم غشای پلاسمایی گیاه *Kochia scoparia*** ناهید نیکخواه، لیلا فهمیده*، زیبا فولادوند	۱۱۳-۱۲۲
۶ - **ارزیابی سه ژن مرجع جهت نرمال سازی داده های Real-time PCR در ریشه گندم تحت تنش شوری** فاطمه ملکی، رضا فتوت* ، محمدرضا عظیمی، فرید شکاری، زهرا سادات شبر	۱۲۳-۱۳۰
۷- **بهینه سازی انتقال ژن به جو و تولید گیاهان تراریخته بارور با استفاده از آگروباکتریوم** ابراهیم دورانی علیایی* ، وحید مهری زاده	۱۳۱-۱۴۲
۸ - **تاثیر حشره کش های پریمیکارب و تیامتوکسام بر فعالیت آنزیم های سم زدای شته سیاه باقلا** شیما رحمانی* ، علیرضا بندانی، سولماز عظیمی	۱۴۳-۱۵۳
۹ - **تاثیر الیسیتورهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین روی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد** فاطمه دهقان نیری* ، شهره امان‌الهی، میترا محمدی بازرگانی	۱۵۵-۱۶۶
۱۰- **باززایی درون شیشه‌ای گیاه تاجریزی قرمز از ریزنمونه‌های مختلف و بررسی پتانسیل انتقال ژن به روش ریزپرتابی** نرگس پشم فروش، محمد احمدآبادی*	۱۶۷-۱۷۷
۱۱- **تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ خزک سیستان** احمد ابراهیم زاده اله آباد، امین شهابی، زهرا پزشکیان*	۱۷۹-۱۸۶
۱۲ - **شناسایی، جداسازی و آنالیز توالی پیشبر اختصاصی بذر β کانگلایسینین** الهام صبوری رباط، علی اکبر حبشی* ، محمود سلوکی، مطهره محسن پور، عباسعلی امام جمعه	۱۸۷-۱۹۶
مقاله‌های مروری	
۱۳ - **کاربرد ناقل های ویروسی گیاهی در بیوتکنولوژی** مسعود شمس بخش* و عبدالباسط عزیزی	۱۹۷-۲۰۹
۱۴ - **کاربرد ویروس‌های گیاهی در بیونانوتکنولوژی** امید عینی* و سعیده ابراهیمی	۲۱۱-۲۲۴
۱۵ - **پیشرفت همزمان اصلاح سنتی و بیوتکنولوژی در جهت بهبود محصول چغندرقند** پرویز فصاحت* و پیمان نوروزی	۲۲۴-۲۳۴

English Abstracts

راهنمای نگارش مقاله برای چاپ در

مجله علمی پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

و مجله علمی ترویجی ایمنی زیستی

متن مقاله: مقاله می‌تواند به زبان فارسی یا انگلیسی باشد.

یک ستونی فاقد پاورقی حداکثر۲۰ صفحه

کاغذ (A4) با ۲/۵ سانتی‌متر حاشیه از هر طرف و ۱/۵ سانتیمتر فاصله بین سطرها با نرم افزار Word 2003 (پسوند فایل : doc) و در محیط ویندوز XP با قلم B Lotus، با اندازه ۱۲، برای متن فارسی و با قلم New Times Roman با اندازه ۱۰ برای متن انگلیسی به صورت معمولی و برای زیرنویس جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها با قلم اندازه ۱۰ برای متن فارسی و قلم اندازه ۸ برای متن انگلیسی و معمولی نوشته شود . عنوان جداول در بالای آن‌ها و اشکال در پایین آن‌ها ذکر شود.

مقاله بصورت دو فایل word زیر فقط از طریق پورتال مجله ارسال شود

آدرس: **http://www.gebsj.ir/**

http://www.journalofbiosafety.ir/

۱- فایل مشخصات نویسندگان مقاله (Authors)

یک صفحه جداگانه شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، رتبه علمی، آدرس دانشگاه یا موسسه و پست الکترونیک.

آدرس کامل نویسنده مسئول مقاله همراه با شماره تلفن ثابت، تلفن همراه و دورنگار **همه به دو زبان فارسی و انگلیسی.**

۲-فایل اصلی مقاله (Main Text) شامل:

عنوان: عنوان کوتاه و روان و حداکثر ۲۰ کلمه

چکیده مقاله: یک پاراگراف حداکثر ۲۵۰ کلمه و پنج واژه کلیدی

مقدمه: مقدمه بررسی پژوهشهای گذشته و هدف این پژوهش

مواد و روشها

نتایج: شامل جداول و شکلها در جای اصلی خودشان

بحث یا **نتایج و بحث** باهم

مقالات غیر پژوهشی، مروری یا ترویجی فاقد مواد و روشها و نتایج هستند

منابع مورد استفاده: در متن ارجاع به منابع با ذکر نام نویسنده (نویسندگان) در انتهای جمله و در پرانتز ارائه شوند مانند:

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

منابع مورد استفاده در پایان متن مقاله، همگی بصورت انگلیسی به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده اول **بدون ذکر شماره** آورده شود . در انتهای منابع فارسی عبارت (In Farsi with English abstract) قید شود. برای مثال به موارد ذیل اشاره می‌شود.

مقاله علمی پژوهشی

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

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

کتاب

Ducke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, USA, 199-265.

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

کنفرانس

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

گزارش نهایی طرح پژوهشی

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

منابع بر خط (On-line)

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

چکیده به زبان انگلیسی: چکیده مقاله به زبان انگلیسی (Abstract)، باید ترجمه چکیده فارسی بوده در ۲۵۰ کلمه با پنج واژه مهم به عنوان Key words نوشته شود.

تاریخ بروزرسانی ۲۶ خرداد ۹۵

کلمه عربی و یا جمع مکسر و یا کلمه انگلیسی با حروف فارسی نباید در متن مقاله باشد به عنوان مثال:

نبایدها (ننویسیم)	بایدها (بنویسیم)
تحقیقات	پژوهش ها
عمده	اصلی
سنوات سال ها	سال ها
حیوانات	حیوان ها
پروتکل	دستورالعمل
کلیات	کلیه
پروسه	فرآیند
اخیر	گذشته
آنالیز	تجزیه و تحلیل
اطلاعات	آگاهی / دانسته ها
تکنیک ها	روش ها
مثلا	به عنوان مثال
محققین یا محققان	پژوهشگران
معایب	عیب ها
لذا	بنابراین
٪	درصد
اکثر	بیشتر
کاملا	به طور کامل
ازدیاد	افزایش
علی رغم	با وجود
نموده/ نمودن	کرده/ کردن
مختصرا	به طور مختصر
نهایتا	در نهایت
اعم از	شامل
فی الواقع	در حقیقت
می‌گردد، می‌گردند	می‌شود، می‌شوند
می‌باشد، می‌باشند	است، هستند
گردید، گردد، گردیدند	شد، شود، شوند
می‌نماید، می‌نمایند	می‌کند، می‌کنند
تغییر ژنتیک یافته، تغییر یافته ژنتیکی	تراریخته
ترانس ژنیک، تراریخت	
دستکاری شده ژنتیکی	
Transgenic	

نبایدها (ننویسیم)	بایدها (بنویسیم)
خصوصا	در خصوص
اراضی	زمین ها
اثرات	اثرها
مکانیسم	سازوکار/واکنش
نسبتا	به طور نسبی
بالاخص	به ویژه
ارگانیسم ها	موجودات زنده
مزایا	مزیت ها
حدودا	در حدود
بعضا	در برخی موارد
مستقیما	به طور مستقیم
معمولا	به طور معمول
می بایست	باید
خطرات	ملاحظات
اپراتور	کاربر
غالبا	در بیشتر موارد
احتمالا	احتمال دارد
مجددا	دوباره
آنان	آن ها
بیولوژی	زیست شناسی
پاتولوژی	بیماری شناسی
ارجحیت	برتری
متابولیسم	سوخت و ساز
آلرژی	حساسیت
منوط	وابسته
Transformation	تراریزش، تراریختی
Transgene	تراژن
To transform	برای تراریختی/ برای تراریزش
Probe	کاوشگر
Marker	نشانگر
Primer یا راه‌انداز	آغازگر
Promoter	پیشبر

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۵
صفحه ۷۵-۶۷

همسانه‌سازی و انتقال آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاژ T7 به توتون

Cloning and Transformation of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Tobacco

کبری نعلبندی[۱]، اصغر میرزایی اصل[۲*]، لیلا خدایی[۳]، غلام خداکرمیان[۴]
Kobra Nalbandi[1], Asghar Mirzaie Asl[2*], Leila Khodaei[3], Gholam Khodakaramian[4]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی و ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه پیام نور همدان،
۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[1,2]Department of Biotechnology, [4] Plant Protection Dept.
College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
[3]Department of Agriculture, Payam Noor University, Hamedan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۴)

چکیده

کشاورزی مولکولی به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی توسط گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یکی از مهمترین آنزیم‌هاست که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، از قبیل سنتز و مطالعه ساختار و عملکرد RNA ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. RNAهای سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی در هیبریداسیون، ریزآرایه، آزمایشات RNAi و RNA آنتی‌سنس کاربرد دارد. این آنزیم همچنین در سیستم‌های بیانی وابسته به پیشبر و خاتمه دهنده T7 کاربرد فراوان دارد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یک آنزیم باکتریوفاژی بوده و فعالیت اصلی آن در سیتوپلاسم می‌باشد. تحقیق حاضر جهت همسانه‌سازی، انتقال ژن آنزیم *T7RNA* پلیمراز به هسته سلولهای یوکاریوتی و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت. آغازگرهای مناسب از روی توالی ژن *T7RNA* پلیمراز به همراه توالی‌های مناسب برای آنزیم‌های برشی، طراحی و ژن *T7RNA* پلیمراز مورد نظر پس از جداسازی در ناقل بیانیpCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. به منظور اطمینان از همسانه‌سازی، سازه تهیه شده با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بررسی شده و همردیفی آن در بانک اطلاعاتی اسیدهای نوکلئیک تأیید گردید. سپس، سازه نوترکیب به کمک سویه LB4404 آگروباکتریوم به گیاهان توتون منتقل و گیاهان تراریخته بر روی محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم، باززا شدند. حضور و بیان ژن *T7RNA* پلیمراز در گیاهان تراریخته با روشهای PCR و RT- PCR تأیید شد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم *T7RNA* پلیمراز،
همسانه‌سازی،
انتقال ژن،
توتون،
کشاورزی مولکولی

مقدمه

تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی گویند. تولید پروتئین‌های نوترکیب و آنزیم‌ها در سیستم بیانی گیاهی دارای مزیت‌های بیشماری از جمله: اقتصادی‌تر بودن تولید نسبت به سیستم‌های صنعتی، بیان بالای ژن و تولید در مقیاس زیاد پروتئین‌های نوترکیب، پایداری بیشتر، حفظ ساختار اصلی پروتئین و عدم آلودگی می‌باشد (Shinmyo and Kato. 2010; Tekoah et al. 2015). بنابراین گیاهان تراریخته برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و آنزیم‌های صنعتی جایگزین مناسبی می‌باشند. گونه‌های گیاهی زیادی در کشاورزی مولکولی استفاده شده است. محصولات برگی، بذر خشک، دانه‌های روغنی، میوه و سبزیجات، گیاهان مدل غیر زراعی مانند آرابیدوپسیس و زراعی از قبیل توتون از جمله آنها می‌باشد. توتون زراعی (*Nicotiana tabacum*) به عنوان یک محصول غیر غذایی و غیر علوفه‌ای، محصول برگی است که تاکنون برای تولید پروتئین‌های نوترکیب بیشتر استفاده گردیده است و محصول بیشتری بعلت چند بار برداشت در سال تولید می‌کند. توتون دارای انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به دستورزی ژنتیکی می‌باشد و همچنین تولید کننده وزن تر عالی (۵۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار در عملکرد برگ تازه در یک فصل کاشت)، تولید کننده بذر زیاد (بیش از یک میلیون بذر در یک گیاه) می‌باشد(Daniell et al. 2003; Ganaphathi et al. 2004; Dhingra et al. 2008; Leslie et al. 2004; Twyman et al. 2013). بدلیل خود گرده افشان بودن گیاه توتون و کم بودن خویشاوندان زراعی و وحشی برای آن، فرار ژنها از این گیاه بسیار کم می‌باشد. علاوه بر این هر دو روش نر عقیمی و عقیمی بذر قبلاً در توتون ایجاد شده‌اند و تکنولوژی پیشرفته‌ای برای جلوگیری از انتقال و فرار ژن از طریق گرده یا بذر به گیاهان دیگر به آسانی در دسترس است (Ma et al. 2003). بنابراین بر خلاف بسیاری از بیوراکتورهای گیاهی، توتون از نظر مسائل ایمنی زیستی و اخلاق زیستی و کمترین احتمال آلودگی زنجیره‌های گیاهی و جانوری بهترین شرایط را دارد.

آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاژ T7 یک آنزیم تک زیرواحدی می‌باشد. رونویسی توسط این آنزیم به سرعت و بسیار اختصاصی بوده و فقط به راه‌انداز T7 اتصال پیدا می‌کند و ۵ برابر سریعتر از RNA پلیمراز باکتری انجام می‌گیرد. رونویسی با اتصال اختصاصی آنزیم به راه‌انداز شروع شده و خاتمه نسخه‌برداری نیاز به سیگنالهای بخصوصی دارد که باعث می‌شود این آنزیم قادر به رونویسی از هر DNA ای نباشد. این آنزیم رونویسی را در T7 DNA و ژن‌های دارای راه‌انداز T7 و خاتمه دهنده T7 انجام می‌دهد (Studier and Moffatt., 1986; Carter et al., 1981; Borkotoky et al. 2016). زنجیره پلی‌پپتیدی این آنزیم دارای ۸۸۳ آمینواسید با وزن مولکولی ۹۸۰۹۲ دالتون می‌باشد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز اولین بار از باکتریوفاژ T7 آلوده‌کننده باکتری ای کولای در سال ۱۹۶۹ جداسازی گردیده است (Chamberlin et al., 1970). ساختار اولیه این آنزیم در سال ۱۹۸۰ تعیین گردید و ساختار کریستالی آن بوسیله اشعه ایکس تجزیه و تحلیل گردید(Sousa et al., 1993; Cheetham and Steitz., 1999; Basu et al. 2014). غلظت mRNA تولیدی توسط آنزیم *T7RNA* پلیمراز با غلظت RNA های ریبوزمی قابل مقایسه هست و بنابراین تولید پروتئین توسط این آنزیم ۵۰٪ کل پروتئینها در عرض چند ساعت خواهد بود (Studier and Moffatt, 1986). آنزیم *T7RNA* پلیمراز برای سنتز RNA نه تنها در محیط *In vivo* بلکه برای سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) نیز مناسب می‌باشد. سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی بوسیله *T7RNA* پلیمراز به طور گسترده‌ای در انواع دستورالعمل‌های تکثیر از جمله روش ابروین (Eberwine) و دستورالعمل اسمارت (SMART)، استفاده می‌شود (Pamela et al. Liang. 2007; 2004).

پیش از این سنتز RNA و cDNA بر اساس روش PCR و فعالیت ترانس کریپتاز معکوس انجام می‌گرفت ولی به دلیل تکثیر متغیر cDNA و خطای Tag پلیمرازها، یک روش جدیدی برای سنتز RNA و cDNA ابداع گردید که روش ابروین نامیده می‌شود که اساس آن رونویسی در شرایط آزمایشگاهی بر اساس راه‌انداز T7 و *T7RNA* پلیمراز می‌باشد. اساس بسیاری از کیت‌های سنتز RNA استفاده از این روش و آنزیم *T7RNA* پلیمراز می‌باشد (Russel et al. 2008).

RNAهای سنتز شده توسط آنزیم *T7RNA* پلیمراز در مطالعه ساختار و عملکرد RNA در شرایط آزمایشگاهی در آزمایشات هیبریداسیون از جمله سادرن بلات، ریزآرایه، RNA مداخله‌گر (RNA interference)، آزمایشات آنتی سنس و... استفاده می‌شوند. برای سنتز RNA بوسیله آنزیم *T7RNA* پلیمراز ژن‌های مورد نظر در ناقلهایی که دارای راه‌انداز T7 می‌باشد، همسانه سازی می‌شود (Pamela et al. 2004; Novak et al. 2004 ; Yang et al. 2007). خالص‌سازی و جداسازی این آنزیم از سلول‌های تحت تاثیر باکتریوفاژ مناسب نیست چون آنزیم به میزان کم، بلافاصله بعد از عفونت تولید می‌شود. همچنین بلافاصله پس از تولید این آنزیم، لیز شدن سلول در مدت کوتاهی انجام می‌شود. بنابراین با همسانه سازی ژن این آنزیم در یک ناقل مناسب و انتقال آن به داخل سلول میزبان می‌توان مقادیر زیادی از این آنزیم را تولید نمود (Nilson et al . 2013; Davanloo et al. 1984). در دهه‌های گذشته تولید تجاری و در مقیاس وسیع این آنزیم به منظور توسعه تکنولوژهای مبتنی بر آنزیم *T7RNA* پلیمراز بوجود آمده است و بیشتر این آنزیم‌ها در باکتریها تولید گردیده است (Davanloo et al. 1984). به طور معمول تولید آنزیم *T7RNA* پلیمراز نوترکیب عمدتاً به سیستم‌های میکروبی وابسته است. همچنین فرمهای تجاری این آنزیم گران می‌باشد. با توجه به اهمیت روزافزون این آنزیم در پژوهش‌های بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، تولید انبوه و کم هزینه آن در قالب کشاورزی مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به نیاز روزافزون تولید تجاری این آنزیم در شکل صحیح و مقیاس گسترده، در این تحقیق از گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید این آنزیم استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ژن *T7RNA* پلیمراز پس از تکثیر از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pCAMBIA1304 بین راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *Bst*EII همسانه سازی گردید و به باکتری *E .coli* منتقل و تکثیر شد. سازه ژنی تهیه شده با استفاده از آزمون‌های PCR، واکنش هضم آنزیمی و در نهایت توالی‌یابی و همردیف‌سازی آن در بانک‌های اطلاعاتی مورد تأیید قرار گرفت. این سازه سپس به آگروباکتریوم منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم جهت تلقیح گیاهان توتون استفاده شد. گیاهان توتون حاوی ژن *T7RNA* پلیمراز با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی باززایی شدند. جهت اثبات انتقال ژن از روش PCR و RT-PCR استفاده گردید.

باکتریها

در این پژوهش از دو باکتری *E. coli* سویه DH5α و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان نگهداری و تکثیر سازه تهیه شده استفاده شد و از *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها

برای تکثیر ژن *T7RNA* پلیمراز طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد که حاوی جایگاه‌های برشی *Bgl*II و *Bst*EII برای درج در ناقل pCAMBIA1304 باشند. به منظور افزایش کارایی هضم توسط آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم، به دو طرف آغازگر افزوده شد (جدول ۱).

جدول۱- آغازگرها برای همسانه‌سازی در ناقل pCAMBIA1304

Table1. Primers for cloning in pCAMBIA1304

نام آغازگر	توالی آغازگر
آغازگر پیشرو	**GGAAGATCTGATCCGGATTTACTAACTGGAGAG**
آغازگر معکوس	**CCGGTCACCTCCGGAGTCGTATTGATTTGG**

ناقل‌ها

در مطالعه حاضر ژن *T7RNA* پلیمراز، از ناقل pAR3283 (تهیه شده از دکتر ویلیام استودیر، آزمایشگاه ملی بروکهیون، ایالات متحده، آمریکا) به ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 منتقل شد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش باکتریایی، ژن مقاومت به هیگرومایسین جهت گزینش در گیاه، راه‌انداز

CaMV35S و توالی خاتمه دهنده NOS است.

گیاهان توتون

در این تحقیق گیاه توتون *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi استفاده شد (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری). بذور استریل شده و در محیط ۱/۲MS، بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. ساقه گیاه توتون به قطعاتی به طول۲-۳ سانتیمتر حاوی یک جوانه و یک برگ بریده شده و به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از دو هفته گیاهان رشد کرده و جهت تلقیح آماده شدند.

تکثیر با PCR و تخلیص محصول PCR

تکثیر قطعه DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مواد واکنش دهنده PCR (در حجم ۲۵µl) عبارت بودند از : ۰/۲ mM از dNTP، mM ۱/۵ MgCl2، ۰/۵ mM از هر یک از آغازگرها، ۱۰۰-۳۰۰ نانوگرم از DNA به عنوان الگو و نیم واحد از آنزیم *pfu* پلیمراز. شرایط PCR برای تکثیر آنزیم *T7RNA* پلیمراز شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ °C به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۲°C برای ۴۰ ثانیه و دمای طویل شدن ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه می‌باشد. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص *Vivantis* استفاده گردید. سپس محصول تخلیص شده و همچنین ناقل pCAMBIA1304 با آنزیم‌های *Bgl*II و *Bst*EII هضم گردیده و دوباره خالص‌سازی گردیدند. در نهایت ژن *T7RNA* پلیمراز در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. سازه بدست آمده pACT7 نامیده شد.

تراژن نمودن *E. coli* با سازه تهیه شده

برای تراژن نمودن باکتری از روش شوک حرارتی استفاده شد. بدین صورت که باکتری‌های مستعد شده *E. coli* ذوب گردیده همراه با محصول همسانه‌سازی به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتریها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲°C و دوباره در یخ به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به میکروتیوب‌ها اضافه شده به مدت ۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. در نهایت محلول باکتری حاصل روی پتری دیش حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توزیع شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت نگهداری گردید.

تراریختی توتون با استفاه از آگروباکتریوم

گیاهان توتون بر روی محیط MS کشت داده شدند و جوانترین برگها (طول ۴ سانتیمتر) برای تلقیح انتخاب شدند. سوسپانسیون آگروباکتریوم (OD_{600}=0.8) حاوی سازه مورد نظر تهیه گردید. برگهای آماده شده به ۱۰ قطعه تقسیم شدند و در داخل پتری دیش‌های حاوی۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود نگهداری شدند. در این مدت هر چند دقیقه یکبار شیک آرامی به پتری‌ها داده شد. قطعات برگی بر روی محیط هم کشتی (محیط MS+۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA+ 2 میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل و در دمای ۲۶°C در تاریکی به مدت ۲ روز نگهداری شدند. در مرحله بعدی این قطعات برگی بر روی محیط MSIII (شامل محیط هم کشتی + ۱۵و ۲۵ میلی-گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) در دمای°C ۲۶ با یک دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۴ هفته منتقل شدند. بعد از ساقه زایی، گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط ریشه زایی (محیط پایه MS+ ۲۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) انتقال و در دمای ۲۶°C با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا ریشه زایی صورت گرفت. در نهایت بعد از ریشه زایی، گیاهان توتون به گلدانهای حاوی ورمیکولات منتقل و سپس به خاک انتقال داده شدند.

استخراج DNA و بررسی PCR

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. بررسی PCR با استفاده از

آغازگرهای اختصاصی انجام و گیاهان حاوی ژن *T7RNA* پلیمراز شناسایی و انتخاب شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. RNA استخراج شده برای بررسی کمیت و کیفیت روی ژل آگارز بررسی گردید. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA استخراجی، تیمار با آنزیم *DNase* I انجام شد و جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA، از RNA های استخراج شده واکنش PCR صورت گرفت. برای استخراج RNA از محلول استخراج RNA، RNX Plus (سیناکلون) استفاده شد. **سپس** برای سنتز cDNA از کیت (SuperscriptII شرکت Invitrogene) استفاده گردید. قبل از افزودن مخلوط PCR برای حذف ساختارهای ثانویه RNA، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. رونویسی معکوس از روی RNA ها به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای تصادفی، dT و همچنین آغازگر معکوس اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز انجام گرفت. سپس cDNAی سنتز شده توسط آب استریل رقیق سازی شد و در دمای ۲۰°c- نگهداری گردید. برای رقیق‌سازی به مخلوط حاصل واکنش RT- PCR میزان ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. واکنش‌های PCR به شرح قبل انجام شدند. برای تأیید صحت سنتز cDNA (Jain et al., 2006; Xiao et al. 2012; Lee et al. 2010)، از ژنهای دایم بیان شونده استفاده می‌شود. در این تحقیق آغازگرهای ژن گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز *GAPDH* (با توالی F: TATGTTTGTTGTTGGTGTCAACGAGCACGAATACAAG و R: ATGTTAAATGATGCAGCCCTTCCACCTCTC) به عنوان ژن دایم بیان شونده و کنترل مثبت استفاده گردید.

تکثیر ژن *T7RNA* پلیمراز بوسیله PCR با آغازگرهای اختصاصی

ژن *T7RNA* پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و محل-های برشی *Bgl*II (درآغازگر پیشرو) و *BstE*II (در آغازگر معکوس) طراحی شده بود، از طریق PCR تکثیر گردید. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بیانگر تکثیر مناسب می‌باشد (شکل۱).

شکل۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR، تکثیر *T7RNA* پلیمراز، M: مارکر Kb ۱، ۱: محصول PCR، تکثیر قطعه ۲۷۵۲bp ژن *T7RNA* پلیمراز ۲: واکنش شاهد (آب به عنوان الگو)

Figure 1. Electrophoresis of the PCR product, amplification of T7RNA polymerase 1: PCR product 2: control (water as template) M: 1 kb DNA Ladder.

نتایج

همسانه‌سازی ژن *T7RNA* پلیمراز در ناقل بیانی گیاهی (pCAMBIA1304)

محصول PCR و همچنین ناقل با آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *BstE*II برش داده شدند. پس از صحت برش‌ها، واکنش اتصال صورت گرفت و در نهایت محصول هضم آنزیمی در وکتور pCAMBIA1304 همسانه سازی گردید. سازه ایجاد شده (شکل

۲) به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد DH5α منتقل گردید. جهت تأیید همسانه‌سازی از واکنش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bgl*II و *BstE*II (شکل ۳)، و تعیین توالی استفاده شد. اندازه ناقل نوترکیب خطی شده در اثر هضم با یک آنزیم *Bgl*II و *BstE*II به طول ۱۵۱۱۴ نوکلئوتیدی صحت همسانه سازی را نشان می‌دهد و همچنین هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II خروج قطعه همسانه سازی شده به اندازه ۲۷۵۲ نوکلئوتیدی را تأیید کرد (شکل ۳). آنالیز همردیفی این ژن شباهت ۹۷-۹۸ درصدی را با توالی پایگاه NCBI به شماره دسترسی JQ436739.1 نشان می‌دهد که آنزیم *T7RNA* پلیمراز است. انتقال سازه بیانیpACT7 به آگروباکتریوم با استفاده از الکتروپوراسیون انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی ژن مورد نظر روی محیط کشت LB دارای آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین رشد داده شد. بررسی کلونی ها با روش PCR با آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را در آگروباکتریوم تأیید کرد.

انتقال ژن *T7RNA* به توتون

عمل تراریخته نمودن گیاهان توتون با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد LB4404 صورت گرفت. برگهای توتون که با اگروباکتریوم (حاوی سازه pACT7) تلقیح شدند بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (۱۵ و ۲۵ میلی-گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند.

شکل ۲- سازه pACT7. این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسین، محل برشی *Bgl*II و *Bst*EII، راه‌انداز CaMV35S، توالی خاتمه دهنده NOS، توالی-های مرزی چپ و مرز راست و ژن *T7RNA* پلیمراز می‌باشد.

Figure 2. T-DNA region of pACT7. LB and RB: Left and Right Borders, HYG(R): Hygromycin selectable marker, CaMV35S: Cauliflower Mosaic Virus promoter and NOS: Nopaline Synthase terminator.

شکل ۳- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pACT7، ۱ و ۲: پلاسمید نوترکیب ۳: هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم *Bgl*II و خطی شدن پلاسمید ۴: هضم با آنزیم *BstE*II و خطی شدن پلاسمید ۵: هضم با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II پلاسمید۱ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده ۶: هضم با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II پلاسمید۲ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده، M: مارکر ۱Kb

Figure 3. Proof of the presence of *T7RNAP* gene by digestion reaction. 1 and 2: recombinant vector, 3: recombinant vector after digestion by *BglII* enzyme, 4: recombinant vector after digestion by *BstElII* enzyme, 5: recombinant vector 1 after digestion by *BglII* and *BstEII* enzymes, 6: recombinant vector 2 after digestion by *BglII* and *BstEII* enzymes. M: 1 kb DNA Ladder.

شکل ۴- الف: پیدایش و رشد جوانه‌های اولیه از ریزنمونه‌ها بر سطح محیط انتخابی اولیه حاوی ۱۵mg.L^{-1} هیگرومایسین. ۳ الی ۴ هفته بعد از تلقیح، ریزنمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه نمودند، ب: هیچ گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم بدون ناقل) مشاهده نشد.ج: گسترش ریشه‌ها در محیط ریشه‌زایی، د: رشد گیاهچه‌ها در گلدان.

Figure 4 A: Regeneration of plants on selection medium containing hygromycin (15 mg/l), B: negative Control C: plants on selection medium, D: Transgenic tobacco plants in pots.

پس از چند هفته ریز نمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند (شکل ۴- الف) در حالی که که هیچگونه باززایی بر روی برگهای توتون گیاهان شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه) مشاهده نگردید (شکل۴- ب).

استخراج DNA ژنومی و آنالیز PCR

استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام گرفت. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل۵).

شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی *T7RNAP* بر روی گیاه تراریخته لاین ۱ تا ۴ حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد S: توتون شاهد هیچ گونه باندی را نشان نمی‌دهد M : مارکر ۱Kb

Figure 5 Electrophoresis of the PCR product in transgenic plant by PCR, M: 1 kb DNA Ladder, 1-4 : transgenic plant, S: wild type plant.

استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

استخراج RNA از برگهای جوان گیاهان باززایی شده (لاین ۱الی۵) انجام گرفت. RNA های استخراجی دارای کیفیت مناسب و زیر واحد ۲۸S و ۱۸S بود (شکل ۶). تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. RNA تیمار شده با آنزیم *DNase* در واکنش PCR، به عنوان الگو استفاده شد و با حذف کامل DNA هیچ تکثیری انجام نشد. در این مرحله سنتز cDNA برای RNA استخراج شده انجام شد برای رقیق سازی به مخلوط حاصل واکنش RT-PCR، ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. صحت ساخت cDNA با آغازگر ژن دایم بیان شونده *GAPDH* (گلیسیرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز) و تکثیر باند مربوط به ژن *GAPDH*، تأیید شد (شکل ۷- الف). آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز بر روی cDNA ساخته شده، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل۷- ب).

شکل ۶- الکتروفورز RNA استخراج شده از گیاهان تراریخته لاین ۱ الی ۴، ۵: RNA استخراجی از توتون شاهد (غیر تراریخته) M: مارکر ۱Kb

Figure 6. Electrophoresis of RNA extracted from transgenic plants Line 1 to 4, 5: RNA extracted from non-transgenic plant M: 1 kb DNA Ladder.

شکل ۷- الف: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای ژن *GAPDH* بر روی cDNA های سنتز شده (لاین ۱ -۴) ب: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز بر روی cDNAهای سنتز شده ۱: گیاه شاهد (عدم تکثیر) ۲-۵: گیاه تراریخته، باند ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد M : مارکر ۱Kb

Figure 7. A: Electrophoresis of PCR product with GAPDH primers on the cDNA synthesized (lane 1 -4) B: Electrophoresis of PCR product with T7RNA-specific primers on the cDNA synthesized 1: control plant 2 -5: Transgenic plants. M: 1 kb DNA Ladder

بحث

آنزیم *T7RNA* پلیمراز در سیستم‌های مختلف باکتریایی همسانه سازی و تولید شده است ولی همسانه سازی و تولید آن در گیاه کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش از ناقل بیانی pCAMBIA1304 جهت همسانه‌سازی و انتقال ژن *T7RNAP* به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری از ویژگیها به میزان زیادی درانتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسن (جهت انتخاب باکتری حاوی ناقل) و ژن مقاومت به هیگرومایسین (جهت انتخاب گیاه تراریخته) به عنوان ژن‌های گزینشگر، راه‌انداز CaMV35S، خاتمه دهنده NOS می‌باشد (Pratheesh et al. 2013). اندازه کوچک این ناقل، تعدد نسخه‌ها و پایداری در آگروباکتریوم از سایر ویژگیهای این ناقل می‌باشد. در دولپه‌ای هایی مثل توتون راه‌انداز CaMV35S یک انتخاب مناسب و عمومی می‌باشد که باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر می‌شود (Raha et al. 2008). جهت انتقال ژن به گیاه توتون از آگروباکتریوم استفاده شد که به طور گسترده‌ای جهت تراریختی گیاهان بخصوص دو لپه‌ایها استفاده می‌شود. گیاه توتون به تلقیح با نژاد آگروباکتریوم حساس است، گیاهچه‌ها به طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس، باززا می‌گردند و از محل لبه‌های بریده شده ریزنمونه برگی تلقیح شده با آگروباکتریوم حاوی ناقل رشد می‌کنند (Gubis et al. 2007). بررسی‌های مولکولی با روش PCR بر روی گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد، انتقال ژن *T7RNA* پلیمراز به گیاهان باززا شده را نشان داد. در این تحقیق تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. در صورت عدم حذف DNA ژنومی از RNA های استخراجی cDNA سنتز شده خالص نخواهد بود و نتایج RT-PCR برای تأیید تراریختی فاقد اعتبار لازم خواهد بود (Bustina and Tania. 2004). پس از ارزیابی ملکولی گیاهان تراریخته از طریق PCR و RT- PCR این گیاهان به گلخانه منتقل شدند، تا در نسل‌های بعدی مورد آنالیز قرار گیرند.

آنزیم *T7RNA* پلیمراز یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی، علوم پایه، پزشکی و صنعت، کاربردهای فراوانی دارد. در سالهای گذشته همچنین از این آنزیم در سیستم‌های مختلف بیانی برای افزایش بیان و پایداری بیان ژن استفاده شده است. آنزیم T7RNA پلیمراز دارای خصوصیاتی است که برای استفاده در سیستم‌های بیانی مناسب می‌باشد از جمله عدم نیاز به فاکتور اضافی برای شناسایی راه‌انداز، بسیار اختصاصی عمل می‌کند و فقط ژنهای تحت کنترل راه‌انداز اختصاصی را بیان می کند (Tunitskaya et al. 2002). با توجه به کاربرد وسیع این آنزیم در پژوهش‌ها، تولید انبوه و کم هزینه این آنزیم از طریق کشاورزی مولکولی ارزشمند خواهد بود.

منابع

Basu RS, Warner BA, Molodtsov V, Pupov D, Esyunina D, Fernández-Tornero C, Kulbachinskiy A, Murakami KS. 2014. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *The Journal of Biology Chemistry*. 289 (35): 24549–24559.

Borkotoky S, Meena CK, Murali A. 2016. Interaction Analysis of T7 RNA Polymerase with Heparin and Its Low Molecular Weight Derivatives - An In Silico Approach. *Bioinformatics and Biology Insights*. 29 (10):155-66.

Bustin S.A, Tania N. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*.15:155–166.

Carter A. D, Morris C. E, and McAllister W. T. 1981. Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA. *Journal of Virology*. 37: 636-642.

Chamberlin M, and Ring J. 1970. Characterization of T7-specific Ribonucleic Acid Polymerase. *The Journal of Biology Chemistry*. 248: 2235-2244.

Cheetham G. M, Jeruzalmi D, and Steitz T. A. 1999. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature*. 399: 80-83.

Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. Ed.). *Kluwer Academic Publishers. Netherlands*, pp: 371-376.

Davanloo P, Alan H,R, John J.D, and Studier F.W. 1984. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81: 2035-2039.

Dhingra A, James V.A, Koop H.U,3, Mok M.C, Paepe R. D, Gallo M, Folta K.M. 2008. Tobacco. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0.

Ganapath R, Suprasanna P, Rao P, Bapat V.A. 2004. Tobacco *(Nicotiana tabacum* L.) A model system for tissue culture interventions and genetic engineering**.** *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 171-184.

Gubis J, Vankova R, Cervena V, Dragunova M, Lichtnerova H, Dokupil T, Jurekova Z. 2007. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany*. 73: 505–511.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK,Khurana JP .2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345:646-651.

Lee J.M, Roche J.R, Donaghy D,Thrush A, Sathish P. 2010. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Molecular Biology*.11:8.

Leslie M, Shama Robert K, Peterson D. 2004. Agricultural and Biological Risk Assessment. Montana State University, Bozeman, MT 59717.

Liang K. 2007.Transcriptomics & Functional Genomics. http://www.ipc.nxgenomics.org/newsletter/no7.htm.

Ma J.K.C, Drake P.M.W, and Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4: 794-805.

Nilsen T. W, Rio D, Manuel M. 2013. High-Yield Synthesis of RNA Using T7 RNA Polymerase and Plasmid DNA or Oligonucleotide Templates. *Cold Spring Harbor*, NY, USA.

Novak P.K, Lee J.S, Mikaelyan A, Patel V, andThorgeirsson S.S. 2004. Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *BioTechniques*. 37: 580-588.

Pamela R, Duschl J, Klaus R. 2004. Optimized RNA ampliffication using T7-RNA-polymerase based in vitro transcription. *Analytical Biochemistry*. 334: 164–174.

Pratheesh P T, Kurup G.M. 2013. Molecular cloning and expression of Tb antigene protein in Microalga *Chlamydomonas reinhardtii. Indian gournal of Biotechnology*. 12: 350-355.

Raha S, Pattanaik S, Maiti I.B. 2008. KTRDC-developed genetic promoters for use in plant genetic engineering**.** Kentucky Tobacco Research and Development Center. 8-17-108**.**

Russell S, Meadows L.A, Roslin R. R. 2008. Microarray Technology in Practice. pp.464.

Shinha P, Saxena R.k, Singh V.K, Krishnamurthy L, Varshney R.K. 2015. Selection and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) under Heat and Salt Stress Conditions. *Front Plant Sci*. 6: 1071.

Shinmyo A, Kato K. 2010. Molecular farming: production of drugs and vaccinesin higher plants. *The Journal of Antibiotics*. 63: 431–433.

Sousa R, Chung Y. T, Rose J. P, and Wang B.C. 1993.Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 A resolution. *Nature*. 364: 593-599.

Studier F. W, and Moffatt B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to directselective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology.* 189: 113-130.

Tekoah Y, Shulman A, KizhnerT, Ruderfer l, Fux L, Nataf Y, Bartfeld D, Ariel T, Gingis–Velitski S, Hanania U, Shaaltiel Y. 2015. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience. *Plant Biotechnology Journal*. 13: 1199–1208.

Tunitskaya V.L, and Kochetkov S.N. 2002. Structural–Functional Analysis of Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Biochemistry (Moscow*). 67(10): 1124-1135.

Twyman R. M, Schillberg S, Fischer R. 2013. Optimizing the Yield of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. Current Pharmaceutical Design. 19: 5486-5494. University of London.

Xiao D, Zhang N.W, Zhao J.J, Bonnema G, Hou X.L. 2012. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalisation in non-heading Chinese cabbage. *Functional Plant Biology.* 39 (4): 342-350.

Yang M , Tsoi P.Y, Wing Li C, Zhao J. 2007. Analysis of interactions of template/primer duplexes with T7 DNA polymerase by oligonucleotide microarray. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 115: 428–433.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۸۹-۷۷

ارزیابی کارآیی قارچ *Beauveria bassiana* برای مهار زیستی گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی گیاه پنبه

نرگس آزادی[۱]، اکبر شیرزاد[۲*]، حمید محمدی[۳]

Evaluation of the *Beauveria bassiana* fungus efficiency on biological control of Rhizoctonia damping-off disease in cotton plants

Narges Azadi [1], Akbar Shirzad [2*] and Hamid Mohammadi [3]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، ۲-دانشیار گروه گیاهپزشکی،
۳- استادیار گروه زراعت واصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز. ایران

1. MSc of Plant Pathology, Department of Plant Protection,
2. Associated Prof. Department of Plant Protection,
3. Assistant Prof. Department of agronomy and plant breeding,
College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۴- تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۶)

چکیده

گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که به‌وسیله‌ی *Rhizoctonia solani* در سراسر جهان ایجاد می‌شود. با وجود تاثیر نسبی برخی از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، به نظر می‌رسد که کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های مناسب برای حفاظت گیاهان در برابر این بیمارگر باشد. قارچ اندوفیت *Beauveria bassiana*، علاوه بر پارازیته کردن حشرات، می‌تواند به‌صورت سیستمیک دامنه وسیعی از گیاهان را کلنیزه کرده و مقاومت آن‌ها را افزایش دهد. در این پژوهش، توانایی سه جدایه از قارچ *B. bassiana* جهت کنترل گیاهچه‌میری پنبه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که جدایه‌های به‌کار رفته، ضمن فعالیت اندوفیتی در گیاه، می‌توانند به طور قابل توجهی از شدت بیماری بکاهند. با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاه، جدایه KJ24 با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر، به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار در کنترل این بیماری شناخته شد. به نظر می‌رسد این امر ناشی از خاصیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه باشد. غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر دو جدایه TS7 و TS12 نیز توانستند در حد قابل توجهی از شدت بیماری بکاهند. با توجه به افزایش پروتئین کل در گیاهان تیمار شده با این استرین‌ها، این کاهش بیماری می‌تواند ناشی از تحریک مقاومت گیاه توسط جدایه‌های مورد نظر باشد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم پراکسیداز
اندوفیت
بیوکنترل
B. bassiana
Rhizoctonia solani

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای قارچی خاکزاد *Rhizoctonia solani* در سراسر جهان است که باعث ایجاد بیماری‌های مهم اقتصادی، در انواع محصولات کشاورزی از جمله پنبه می‌شود (Muriungi *et al*. 2014). با وجود تاثیر نسبی برخی از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، استفاده از این روش کنترل شیمیایی نتیجه رضایت-بخشی نداشته و آلودگی‌های زیست‌محیطی نیز در پی دارد. از طرفی، امروزه در سراسر جهان، مصرف‌کنندگان بر این باورند که استفاده از سموم شیمیایی در تولید محصولات کشاورزی، باید به-طور قابل توجهی کاهش یابد (Butt *et al*. 2001). طبق بررسی-های دانشمندان، کنترل بیولوژیک می‌تواند یک راه‌حل سازگار با محیط‌زیست، برای حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای خاکزاد باشد (Weller *et al*. 2002). امروزه بهره‌برداری از میکروارگانیسم‌های طبیعی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها، جهت کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز بسیار قابل توجه بوده و در میان آن‌ها استفاده از قارچ‌های بیوکنترل در حال توسعه است (Butt *et al*. 2001). تاثیر بیوکنترلی قارچ‌های آنتاگونیست، نتیجه‌ی مجموعه‌ای از سازوکارهای مختلفی است. در برخی از این سازوکارها از جمله آنتی‌بیوز، رقابت و پارازیتیسم، نقش قارچ بیوکنترل مستقیم بوده و در برخی دیگر از جمله القای مقاومت گیاه، کلنیزه کردن اندوفیتی گیاه و تحریک رشد گیاه، نقش غیرمستقیمی دارند (Ownley *et al*. 2010). برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله *B. bassiana*، به عنوان اندوفیت، از طریق کلنیزه کردن سیستمیکی گیاه، می‌توانند موجب حفاظت آن در برابر بیمارگرهای گیاهی شوند (Ownley *et al*. 2010). فعالیت اندوفیتی جدایه‌هایی از *B. bassiana* در تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله گوجه‌فرنگی، پنبه، لوبیاسبز، سویا، ذرت، تاتوره، سیب‌زمینی و گیاهچه کاکائو گزارش شده است (Ownley *et al* 2008 and 2010). هم‌چنین توانایی آنتاگونیستی *B. bassiana* علیه بیمارگرهای مختلفی از قبیل *Fusarium oxysporum*، *Armillaria mellea*، *Rosellinia necatrix*، *R. solani* و *Pythium myriotylum* به اثبات رسیده است (Griffin 2007). کاربرد جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana* در بذور گوجه‌فرنگی نشان داده است که *B. bassiana* می‌تواند گیاهچه‌ها را به‌صورت اندوفیتی و اپی‌فیتی کلنیزه کند و باعث حفاظت آن‌ها در برابر گیاهچه‌میری شود (Ownley *et al*. 2008). استفاده از همین جدایه در بذور پنبه، علاوه بر کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی، توانسته است مقاومت سیستمیک القایی را فعال کند (Griffin 2007). در بررسی‌های آزادی و همکاران، سه جدایه از قارچ *B. bassiana*، از طریق تحریک رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیکی، به طور چشمگیری بیماری گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی را در گیاهان گوجه‌فرنگی کاهش دادند. هم‌چنین این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، با تولید ترکیبات فرار و غیر فرار به‌طور معنی‌داری باعث کاهش رشد بیمارگر شدند (Azadi *et al*. 2015b). بنابراین به نظر می‌رسد که قارچ اندوفیت *B. bassiana* بتواند به‌عنوان یک عامل بیوکنترل، با استفاده از سازوکارهای مختلفی موجب کاهش بیماری‌های گیاهی شود. به همین منظور در پژوهش حاضر، کارایی و تاثیر سه جدایه از قارچ *B. bassiana* در کنترل بیماری رایزوکتونیایی پنبه و کاهش شدت بیماری، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه بیمارگر *R. solani* و جدایه‌های قارچ آنتاگونیست

جدایه‌های TS7، KJ24 و TS12 قارچ آنتاگونیست *B. bassiana* از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و بیمارگر *R. solani* با گروه آناستوموزی AG-4 از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در محیط Sabouraud Dextrose Agar (Senthamizhlselvan *et al*. 2010) و *R. solani* در محیط Potato Dextrose Agar کشت داده شدند.

بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر آنتاگونیست برروی *R. solani*

به‌منظور مشاهده نحوه ارتباط بین هیف‌های جدایه‌های *B. bassiana* و قارچ بیمارگر، بررسی‌های میکروسکوپی با استفاده از

روش سو و همکاران انجام شد (Su *et al*.2012) و اسلایدهای تهیه شده با بزرگ‌نمایی ×۴۰، مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های آنتاگونیست

جهت انجام این آزمایش، از روش تغییر یافته‌ی پارون و بگوم استفاده شد (Parveen and Begum 2010). به این ترتیب که قطعات ۵ میلی متری از جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تهیه و در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط متیل بلو آگار (Methylene Blue Agar) با (pH ۴/۷) کشت شد. پس از ده روز، تشتک‌های پتری از نظر وجود هاله‌ی شفاف اطراف پرگنه‌ی قارچی بررسی شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز آنتاگونیست

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana*، ابتدا با استفاده از روش چان و تیان، دیواره‌ی سلولی رایزوکتونیا تهیه شد (Chan and Tian 2005) و به‌عنوان تنها منبع کربن به محیط لیلی بارنت اضافه شد. سپس با استفاده از این محیط آنزیم کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana* استخراج و با کاغذ واتمن صاف شده و در نهایت عصاره آنزیمی کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana* به دست آمد (Chan and Tian 2005). پس از تهیه عصاره آنزیمی، مخلوط واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی، ۳۰۰ میکرولیتر کیتین (شرکت Titrachem) ۰/۵ درصد و ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH=4) تهیه شد. این محلول به مدت ۲ ساعت در دمای ۲ ± ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالسیلیک (DNS) به آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. میزان آنزیم کیتیناز در طول موج ۵۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Kang *et al*. 1999). با استفاده از داده‌های حاصل در طی ۸ روز، منحنی فعالیت آنزیم کیتیناز برای هر جدایه از آنتاگونیست رسم شد.

بررسی تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌های *B. bassiana* در جلوگیری از مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای

ابتدا سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در غلظت‌های $۱۰^{۵}$،$۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و سپس بذور استریل شده پنبه (رقم ورامین)، به‌طور جداگانه با هر غلظت تیمار شدند. جهت تهیه‌ی مایه تلقیح بیمارگر، از بذور گندم استفاده شد (Tseng *et al*. 2008) و با نسبت ۳ درصد حجمی با خاک گلدانی مخلوط شد. سپس بذور تلقیح شده با سوسپانسیون-های آنتاگونیست، در گلدان‌ها کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت تناوب نوری ۱۶ساعت روشنائی و دمای ۲ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳۰ درصد نگهداری شدند. این آزمایش در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۰تکرار (گلدان) و ۱۱ تیمار انجام شد. تیمارها شامل شاهد آلوده، شاهد غیر آلوده و نه تیمار شامل بذور پنبه آغشته شده با غلظت‌های $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌های TS7، KJ24 و TS12 آنتاگونیست بودند. در پایان هفته دوم پس از کاشت، با ظهور علایم گیاهچه‌میری، گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند و میزان ضایعه حاصل از بیمارگر روی آن‌ها، مطابق روش کارلینگ و همکاران در پنج شاخص متفاوت شامل صفر (هیچ گونه آلودگی)، یک (آلودگی جزیی با ایجاد یک شانکر در طوقه)، دو (آلودگی متوسط با تیره شدن کامل بافت ریشه قبل از پوسیدگی)، سه (آلودگی بالا با پوسیدگی کامل ریشه)، چهار (آلودگی بالا با پوسیدگی کامل ریشه به‌همراه ایجاد لکه‌های برگی) و پنج (از بین رفتن کل گیاه) اندازه‌گیری شد (Carling and Leiner 1990). هم‌چنین فاکتورهای رشدی شامل وزن تر و خشک و طول گیاهان اندازه‌گیری شدند. درصد گیاهچه‌میری بوته‌ها نیز طبق رابطه‌ی (۱) محاسبه شد.

$$1)\ D = A1 - A2 / A1 \times 100$$

D :درصد گیاهچه‌میری، A1: تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده و A2: تعداد بوته‌های سالم موجود در هر تیمار.

بررسی اندوفیت بودن *B. bassiana* در گیاه پنبه

جهت اثبات فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* در بافت-های برگی و ساقه‌ی گیاهان پنبه، نمونه‌هایی از اندام‌های هوائی

گیاهان تیمار شده در گلخانه به‌طور تصادفی انتخاب شدند و قطعات ۱–۲ سانتی‌متری از آن‌ها تهیه شد و پس از استریل سطحی در محیط SDA کشت داده شدند. ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های جداسازی شده با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین برای بررسی دقیق‌تر قارچ‌های جداسازی شده، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. بدین منظور از آغازگرهای Bbchit1-1 CGGAATTCATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAG و Bbchit1-2 CGCCCGGGTTACGCAGTCCCCAAAGTCCC که اختصاصی ژن کیتیناز (*Chit1*) *B. bassiana* می‌باشند استفاده شد (Fang *et al*. 2005). جهت استخراج DNA از روش ژئو و همکاران استفاده شد (Zhu *et al*. 1993). برنامه حرارتی مطابق برنامه پیشنهادی فانگ و همکاران تنظیم شد (Fang *et al*.2005). محصول PCR در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شد و نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل Bio Doc Analyze بررسی و برای تخمین اندازه‌ی فرآورده‌ی تکثیر شده از نشانگر ژنومی یک کیلو جفت‌بازی Vivantis استفاده شد.

تهیه عصاره آنزیمی گیاهان جهت بررسی تاثیر *B. bassiana* در القای مقاومت سیستمیکی گیاهان

جهت اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین گیاهی، از ساقه و برگ گیاهان تیمار شده استفاده شد. بدین منظور، عصاره‌ی آنزیمی گیاهان با استفاده از روش تغییر یافته‌ی ابوالیوسر و همکاران استخراج و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰– نگهداری شد (Abo-Elyosr *et al*. 1976).

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز

برای سنجش میزان این آنزیم، از روش اوربانک و همکاران استفاده شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۳۵۰ میکرولیتر پیروگالول ۱۰ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیترH_2O_2 ۷۰ میلی‌مولار بود. میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومترساخت شرکت pg instrument مدل T80 ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت میکرومول H_2O_2 تجزیه‌شده در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (Urbanek *et al*. 1991).

اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین عصاره استخراج شده

به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش و تهیه منحنی پروتئین استاندارد، از روش برادفورد استفاده شد (Bradford 1976). میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد، و با استفاده از منحنی استاندارد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، مقدار کل پروتئین محلول در هر نمونه‌ی گیاهی به‌صورت میکروگرم پروتئین درهر گرم بافت تازه گیاه محاسبه شد.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS (ویرایش ۹/۲) و مقایسه میانگین به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار MSTATC (ویرایش ۲/۱۰) انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

بررسی نحوه ارتباط بین هیف‌های آنتاگونیست و *R. solani*

پس از بررسی اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از نحوه ارتباط بین هیف‌های جدایه‌های *B. bassiana* و قارچ عامل بیماری، مشاهده شد که جدایه‌های *B. bassiana*، قادر به پارازیته کردن و یا ایجاد بدشکلی و تجزیه‌ی دیواره‌ی قارچ رایزوکتونیا نمی‌باشند (شکل ۱).

بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های آنتاگونیست

ده روز پس از رشد جدایه‌های آنتاگونیست در محیط کشت متیل-بلوآگار، ناحیه‌ی شفافی در اطراف پرگنه‌ی جدایه‌های TS12 و TS7 مشاهده شد (شکل۲). اگرچه قطر این هاله‌ها اندک بود، ولی تولید توکسین‌های ضدقارچی را توسط این دو جدایه اثبات کرد. در جدایهKJ24، تغییری در محیط مشاهده نشد (شکل ۲).

شکل ۱- بررسی میکروسکوپی ارتباط هیفی بین آنتاگونیست و بیمارگر. فلش‌ها نشان‌دهنده‌ی کنیدی‌های *B. bassiana* می‌باشند که با وجود احاطه میسلیوم‌های *R. solani* سبب بدشکلی یا تغییر در آن نشده‌اند.

Figure 1. Microscopic examination of the relationship between the antagonist and the pathogen hyphae. The arrows indicate that despite surrounded the *R. solani* mycelia by conidia of *B. bassiana*, not cause deformity or change it.

شکل ۲- بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های قارچ *B. bassiana* در محیط متیل‌بلوآگار. A) عدم وجود منطقه شفاف در اطراف پرگنه‌ی KJ24، B) وجود هاله شفاف در اطراف پرگنه‌های TS12 (راست) و TS7 (چپ).

Figure 2. Study Toxin production by isolates of *B. bassiana* in the methylene blue agar medium. A) absence a clear zone around the colony of KJ24, B) existence a clear zone around the colonies TS12 (right) and TS7 (left).

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز قارچ *B. bassiana*

پس از تهیه عصاره آنزیمی جدایه‌های آنتاگونیست و سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید، منحنی تغییرات آنزیمی در طی هشت روز برای هر جدایه از آنتاگونیست رسم شد؛ نتایج نشان داد که با گذشت زمان میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در هر سه جدایه افزایش یافته است به‌طوری‌که در روز چهارم بیشترین مقدار آنزیمی توسط هر سه جدایه تولید شده است ولی پس از آن میزان تولید این آنزیم کاهش یافته است. بیشترین و کمترین میزان آنزیم تولید شده به ترتیب در جدایه‌ی KJ 24 و TS7 مشاهده شد (شکل ۳).

شکل ۳- فعالیت آنزیم کیتیناز تولید شده توسط جدایه‌های TS12 (خط)، TS7 (خط تیره و نقطه) و KJ24 (خط تیره) قارچ *B. bassiana* در طول هشت روز رشد در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سانتی‌گراد. هر عدد میانگین سه تکرار بوده و میله خطا (Error bar) نشان‌دهنده‌ی انحراف معیار استاندارد می‌باشد.

Figure 3. Chitinase enzyme activity produced by isolates of TS12 (line), TS7 (Dots and dashes) and KJ24 (Dash line) of *B. bassiana* during the eight days of growth at a temperature of 26 ± 1°C .Vertical bars represent ± S.E. of means (n=3).

بررسی تاثیر جدایه‌های *B. bassiana* در جلوگیری از گیاهچه‌میری پنبه در شرایط گلخانه‌ای : در پایان هفته دوم پس از کاشت بذور تیمار شده، با ظهور علائم گیاهچه‌میری، درصد گیاهچه‌میری، شاخص شدت بیماری و فاکتورهای رشدی محاسبه شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که تیمارها از نظر درصد گیاهچه‌میری و شاخص شدت بیماری در سطح احتمال ۱درصد و از نظر طول گیاه در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز نشان داد که غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی KJ24 با ۵۷/۱۴۳ درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری ۰/۴ دارای بیشترین اثر کنترل‌کنندگی است. هم‌چنین بیشترین طول گیاه در بین تیمارها برابر با ۲۸/۶۶۷ سانتی‌متر بود که در این تیمار مشاهده شد. در حالیکه گیاهان شاهد آلوده دارای ۸۵/۷۱۴ درصد گیاهچه‌میری و ۳/۵ شاخص شدت بیماری بودند. کم‌ترین اثر کنترل‌کنندگی در غلظت $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی TS7 با ۸۵/۷۱۴ درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری ۱/۰۰ مشاهده شد. هم‌چنین این تیمار دارای کم‌ترین طول ساقه نیز بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌ها، غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی KJ24 با نشان دادن کمترین درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری و هم‌چنین بهترین اثر روی طول گیاه، به عنوان بهترین غلظت و جدایه برای کنترل گیاهچه‌میری پنبه تعیین شد. سایر فاکتورهای رشدی شامل وزن تر و خشک گیاه دارای اختلاف معنی‌داری نبودند (جدول ۱).

جدول ۱– مقایسه میانگین درصد گیاهچه‌میری، شاخص شدت بیماری و طول گیاه، در بررسی‌های گلخانه‌ای.

Table 1. Mean comparison of percentage damping-off, disease severity and plant length in the greenhouse experiment.

Treatment	Percentage damping-off		disease severity		Plant length (cm)	
TS7 (10^5 cell/ml)	85.714	d	1	f	12.167	d*
TS7 (10^7 cell/ml)	71.429	c	1	f	23	abcd
TS7 (10^9 cell/ml)	71.429	c	1.1	g	18.833	bcd
TS12 (10^5 cell/ml	85.714	d	0.5	c	23.333	abcd
TS12 (10^7 cell/ml)	71.429	c	0.5	c	24.833	abcd
TS12 (10^9 cell/ml)	85.714	d	0.8	e	21.333	abcd
KJ24 (10^5 cell/ml)	71.429	c	1.2	h	26	abc
KJ24 (10^7 cell/ml)	57.143	b	0.4	b	28.667	ab
KJ24 (10^9 cell/ml)	71.429	c	0.6	d	15.667	cd
Non-infected	0	a	0	a	33.333	a
infected	85.714	d	3.5	i	23.667	abcd

هر عدد میانگین سه تکرار بوده و حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۱درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند. *حروف متفاوت، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Values followed by the same letter were not significantly different at 1%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.
*Values followed by the same letter were not significantly different at 5%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.

بررسی اندوفیت بودن *B. bassiana* در گیاه پنبه

با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های جداسازی شده از گیاهان تیمار شده در گلخانه، مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به وجود دیواره عرضی هیف‌ها، اسپورهای تک‌سلولی کروی یا بیضی شکل، رشد سیمپودیال هیف‌ها و سلولهای کنیدی‌زای فیالیدی شکل (شکل۴)، قارچ‌های جداسازی شده *B. bassiana* تشخیص داده شدند (Griffin 2007) و مشخص شد که تمام تیمارها قادر به کلنیزه کردن گیاهان و فعالیت اندوفیتی هستند.

هم‌چنین تکثیر قطعه‌ی DNA به طول ۱۰۰۰ جفت‌باز از دسته ژن‌های کیتیناز با استفاده از تکنیک PCR و با کمک دو آغازگر Bbchit1-1 و Bbchit1-2 نشان داد که قارچ جداسازی شده از

تیمار KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر که دارای بیشترین درصد کنترل‌کنندگی بود، *B. bassiana* است (شکل ۵).

تهیه عصاره آنزیمی گیاهان جهت بررسی تاثیر *B. bassiana* در القای مقاومت سیستمیک در گیاه

با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای سه جدایه‌ی KJ24، TS7 و TS12، با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر که دارای کمترین درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری بودند، برای اندازه‌گیری‌های آنزیمی و بررسی سازوکار االقای مقاومت گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین کل گیاه

آنالیز داده‌های حاصل نشان داد که تیمارها از نظر میزان تولید آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین گیاهی در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند. با توجه به مقایسه میانگین داده-های حاصل از اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز، جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر با ۱/۶۵۲واحد، در مقایسه با شاهد آلوده با ۰/۳۳۹ واحد، به عنوان بیشترین تولیدکننده‌ی آنزیمی مشخص شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل گیاهی نیز نشان داد که جدایه‌های TS7 و TS12با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر، به ترتیب با ۱۳/۰۴۶ و ۸/۵۴۶ واحد نسبت به جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر با۴/۰۵۰ واحد و شاهد آلوده با۳/۷۸۰ واحد، دارای بیشترین مقدار پروتئین هستند (جدول ۲).

شکل ۴- ویژگی‌های مورفولوژیکی *B. bassiana*. A) دیواره عرضی هیف‌ها، B) رشد سیمپودیال هیف‌ها، C) اسپورهای تک‌سلولی کروی یا بیضی شکل، و سلولهای کنیدی‌زای فیالیدی.

Figure 4. Morphological characteristics of *B. bassiana*. A) septate hyphae, B) sympodial conidiogenesis, C) conidia globose to oval and single celled, and phialidic conidiogenesis cells.

شکل ۵- ردیابی DNA قارچ استخراج شده از گیاه پنبه تیمار شده با جدایه KJ24 با استفاده از پرایمرهای Bbchit1-1 و Bbchit1-2. ۱) جدایه KJ24، ۲) مارکر Vivantis، ۳) قارچ استخراج شده از گیاه پنبه تیمار شده با جدایه KJ24، و ۴) کنترل منفی PCR.

Figure 5. Detection of DNA extracted from cotton plants treatment with KJ24, using Bbchit1-2 and Bbchit1-1 primers. Lane 1: KJ24 isolate, Lane 2: ladder, Lane 3: fungal extracted from cotton plants treatment with KJ24 isolate, and Lane 4: no DNA control.

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاه.

Table 2. Mean comparison of peroxidase enzyme activity and total protein in plants

Treatment	peroxidase enzyme µMol H_2O_2 decomposed per mg protein per minute		Total protein µg protein per g fresh tissue weight	
TS7 (107cell/ml)	0.4995	c	13.0465	a
TS12 (107 cell/ml)	0.7715	bc	8.5465	b
KJ24 (107cell/ml)	1.6525	b	4.0500	c
Non-infected	4.9035	a	3.7100	c
Infected	0.33975	c	3.7800	c

هر عدد میانگین سه تکرار بوده و حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۱درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Values followed by the same letter were not significantly different at 1%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.

بحث

تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی ضدقارچی و ضدباکتریایی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سازوکارهای بیوکنترلی *B. bassiana* گزارش شده است (Ownley *et al.* 2010). با توجه به توانایی تولید آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و لیپاز توسط *B. bassiana* جهت تجزیه کوتیکول حشرات و نفوذ به درون آن‌ها (Griffing 2007) و از طرفی شباهت ژن کیتیناز *B. bassiana* به ژن کیتیناز *Trichoderma harzianum* (Carolina Sánchez-Pérez *et al.* 2014)، به نظر می‌رسد که تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده از جمله کیتیناز نیز از دیگر سازوکارهای بیوکنترلی *B. bassiana* باشد. آنزیم‌های تجزیه‌کننده و متابولیت‌های ثانویه سمی می‌توانند باعث از بین رفتن عوامل بیماری‌زا قبل از نفوذ به میزبان شوند (Agrios 2005). در جدایه‌ای از *B. bassiana* که از ریزوسفر گیاه گندم جداسازی شده است، خاصیت بازدارندگی از رشد و تولید آنزیم-های کیتیناز و بتاگلوکاناز علیه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* گزارش شده است (Renwick *et al.* 1991). نتایج این بررسی نشان داد که با وجود تولید آنزیم کیتیناز توسط هرسه جدایه KJ24، TS7 و TS12 قارچ *B. bassiana*، در محیط لیلی-بارنت، در بررسی میکروسکوپی قادر به پارازیته کردن و تجزیه دیواره سلولی *R. solani* نیستند. گریفین و اونلی ثابت کردند که جدایه‌ی ۱۱-۹۸ قارچ *B. bassiana* اگرچه می‌تواند هیف‌های *Pythium myriotylum* را پارازیته کند ولی قادر به پارازیته کردن میسلیوم‌های *R. solani* نیست (Griffin 2007, Ownley 2008).

در بررسی‌های آزادی و همکاران نیز مشخص شد که جدایه‌های TS7، TS12 و KJ24 قارچ *B. bassiana* در آزمون کشت متقابل قادر به بازداری از رشد *R. solani* نیستند (Azadi *et al.* 2015b). پارازیته نشدن میسلیوم‌های *R. solani* شاید به این‌دلیل است که قسمت بیشتر دیواره‌ی سلولی *R. solani* از گلوکان تشکیل شده است (Hadar 1979) و میزان کیتین قابل دسترس برای قارچ *B. bassiana* کم بوده و در نتیجه منجر به کاهش تولید این آنزیم در حضور هیف‌های *R. solani* گشته است. در حالی که در محیط لیلی- بارنت، به دلیل وجود دیواره سلولی *R. solani* به‌عنوان تنها منبع کربن و از طرفی به‌دلیل هوادهی مناسب، ترشح این آنزیم توسط جدایه‌های *B. bassiana* فعال شده و در روز چهارم به بیشترین مقدار خود رسیده است. این نتایج با گزارش‌های موجود مبنی بر موثر بودن نقش هوادهی در میزان تولید آنزیم کیتیناز، مطابقت دارد (De Marco 2000). نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز در این پژوهش نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم با گذشت زمان افزایش یافته بطوری‌که در روز چهارم به بیشترین میزان رسیده است. مصطفی و کائور نیز در بررسی‌های خود نشان دادند که میزان تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختف *B. bassiana* در روزهای چهارم و ششم بعد از تلقیح افزایش می‌یابد (Mustafa and Kaur 2010). در بررسی‌های دیگری نیز افزایش تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختف *B. bassiana* در روزسوم بعد از تلقیح ثابت شده است (Petlamul1 and Prasertsan 2012). با توجه به فعالیت اندوفیتی قارچ *B. bassiana*، به نظر می‌رسد که علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه Azadi *et al.* (2015a) و تولید آنزیم کیتیناز، سازوکارهای دیگری نیز در کاهش بیماری گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی پنبه نقش داشته باشند.

بررسی‌های گلخانه‌ای نشان دادند که تمام تیمارهای به‌کار رفته توانسته‌اند شدت بیماری را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. در بین تیمارها، تیمار مربوط به جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر با شاخص بیماری ۰/۴ وهمین جدایه با غلظت $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر با شاخص ۱/۲ به‌ترتیب دارای کمترین و بیشترین شاخص شدت بیماری بود. در حالی که شاخص شدت بیماری در گیاهان آلوده برابر با ۳/۵ محاسبه شد. هم‌چنین مشاهده شد که جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر، دارای بیشترین طول ساقه و کمترین درصد گیاهچه‌میری در بین سایر تیمارها است. در بررسی‌های اونلی و همکاران مشخص شد که تیمار گیاهان با جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana*، علاوه بر کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی، باعث افزایش رشد گیاهان نیز می‌شود (Ownley *et al.* 2004). گریفین نیز نشان داد که کاربرد جدایه‌ی فوق می‌تواند گیاهچه‌میری گوجه‌فرنگی را کاهش دهد (Griffin 2007). هم‌چنین باتسون و همکاران طی بررسی‌هایی ثابت کردند که تیمار بذور پنبه با *B. bassiana* می‌تواند باعث بهبود حفاظت گیاه در برابر *R. solani* شود (Batson *et al.* 2000). در بررسی‌های آزادی و همکاران نیز توانایی جدایه‌هایی از *B. bassiana* در کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی گوجه‌فرنگی به اثبات رسید (Azadi *et al.* 2015b). این درحالی است که در بررسی تولید توکسین، جدایه‌های TS7 و TS12، که در مقایسه با جدایهKJ24 قدرت کنترل‌کنندگی کمتری داشتند، قادر به تولید توکسین بودند، در حالی‌که جدایه KJ24 نتوانست توکسین تولید کند. با توجه به نتایج آزمایشگاهی مشخص شد که جدایه‌های *B. bassiana* به صورت مستقیم قادر به کنترل بیمارگر نیستند بنابراین با توجه به نتایج مثبت بررسی‌های گلخانه‌ای، و نیز اندوفیت بودن این جدایه‌ها، احتمال دارد که کاهش بیماری در گیاهان پنبه ناشی از فعالیت اندوفیتی *B. bassiana*، و القای مقاومت در گیاهان باشد. چرا که قارچ‌های اندوفیت موجب تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه شده و باعث مقاومت گیاه نسبت به طیف وسیعی از حشرات و بیماری‌ها می‌شوند(Zabalgogeazcoa 2008). هم‌چنین آن‌ها می‌توانند تاثیر مثبتی روی رشد گیاه داشته باشند (Ownley *et al.*, 2010). فعالیت اندوفیتی تیمارهای به‌کار رفته، با جداسازی قارچ از گیاهان تیمار و نیز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ثابت شد و مشخص شد که آن‌ها قادر به کلنیزه کردن گیاه به‌صورت اندوفیت می‌باشند. گریفین نیز با استفاده از PCR فعالیت اندوفیتی جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana* را در گیاه پنبه ثابت کرد. وی هم‌چنین بیان کرد که این جدایه قادر به فعال کردن مقاومت القایی سیستمیک در گیاه است (Griffin 2007). کنرات و همکاران نیز با اثبات فعالیت اندوفیتی *B. bassiana*، بیان کردند که اندوفیت‌ها، نقش مهمی در تحریک سیستم مقاومتی گیاه دارند

(Conrath *et al.* 2006). آزادی و همکاران نیز علاوه بر اثبات فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* در گیاه گوجه‌فرنگی، نشان دادند که کنترل گیاهچه‌میری توسط این جدایه‌ها احتمالا ناشی از تحریک رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیکی در آن‌ها بوده است (Azadi *et al.* 2015a).

طی بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران، مشخص شده است که آنزیم‌های زیادی با القای مقاومت گیاهان در ارتباط هستند؛ از جمله آنزیم پراکسیداز (Alves Silva *et al.* 2004). طبق بررسی‌های مختلف، پژوهشگران فعالیت آنزیم پراکسیداز را به‌عنوان مارکر بیوشیمیایی جهت پیش‌بینی مقاومت معرفی کرده‌اند، که ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در سازوکارهای دفاعی نقش داشته باشد. به‌عنوان مثال، نقش مستقیم آن در واکنش‌های دفاعی واریته‌های مقاوم گیاهان به اثبات رسیده است (Lehrer 1969). هم‌چنین طی بررسی‌هایی نشان داده شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز با فعال شدن مقاومت القایی سیستمیک در ارتباط است (Hammerschmidt and Kuc 1982). پراکسیداز ها اثر مستقیم در مقاومت دارند و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن، که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند (Liu and Ekramoddoullah 2006). این آنزیم علاوه بر سازوکارهای دفاعی، در تنظیم هورمونی، بیوسنتز لیگنین، تجزیه اکسین و برخی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی دیگر گیاهان نیز نقش دارد. برخی از پروتئین‌ها مرتبط با بیماری‌زایی بوده و پس از حمله میزبان در گیاه فعال شده و یا افزایش می‌یابند (Tsai 2011). در بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش نیز مشخص شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با جدایه KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر که بیشترین تاثیر کنترل‌کنندگی را داشت، بیش از شاهد آلوده و سایر تیمارها بود. از طرفی طول گیاه نیز در این تیمار دارای افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها و شاهد منفی بود. با توجه به نقش پراکسیداز در مراحل مختلف رشدی گیاه و بیوسنتز لیگنین و با توجه به نتایج حاصل و همچنین عدم افزایش پروتئین کل گیاهی، چنین به نظر می‌رسد که این تیمار با تحریک رشد گیاه و لیگنینی شدن دیواره سلول‌ها و احتمالا افزایش رشد ریشه‌ها و طول گیاه باعث عبور گیاه از مرحله حساس رشدی شده و در نتیجه بیماری کاهش یافته است. لیگنینی شدن دیواره و تقویت آن در مراحل اولیه رشد، توسط H_2O_2 انجام می‌شود (Yang *et al.* 2014). با توجه به نقش آنزیم پراکسیداز در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله H_2O_2، افزایش تولید H_2O_2 با افزایش آنزیم پراکسیداز همراه است. پس از طی مرحله بلوغ و کاهش H_2O_2، میزان آنزیم پراکسیداز نیز کاهش می‌یابد. بنابراین در گیاهان شاهد غیرآلوده نیز میزان آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد.

وجود خاصیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه توسط آنتاگونیست‌ها، نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه دارد. با تحریک رشد گیاه ریشه‌های آلوده به سرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین می‌شوند و باعث عبور گیاهچه از مرحله‌ی حساس شده و در نتیجه خسارت بیماری را کاهش می‌دهند. هارمون و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که وجود چنین فعالیتی توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات، مشابه فعالیت ریزوباکترهای محرک رشد گیاه است.

دو تیمار TS7 و TS12 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور که از نظر کنترل‌کنندگی تاثیر کمتری در مقایسه با جدایه KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور داشتند، از لحاظ تولید آنزیم پراکسیداز برخلاف جدایه KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور، با شاهد آلوده تفاوتی نداشتند. نتایج این پژوهش با مطالعات هاول و همکاران مطابقت دارد (Howell et al. 2000). آن‌ها بیان داشتند که یکی ازعوامل مهم کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه در اثر *R.solani*، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های پنبه تیمار شده با *T. virens*، است. مرتضی نیا و همکاران نیز نشان دادند که مقاومت در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با *Trichoderma harzianum* Bi علیه *Pythium aphanidermatum* با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارتباط است .(Mortezaia et al. 2010)

میزان پروتئین کل گیاه در این دو تیمار(TS7 و TS12 با غلظت $۱۰^{۷}$) نسبت به شاهد آلوده دارای افزایش قابل توجهی است. با توجه به نقش پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در القای مقاومت گیاه و کاهش بیماری‌ها، احتمال دارد که دو تیمار فوق نیز با القای مقاومت گیاه و فعال شدن سازوکارهای بیوکنترلی باعث کاهش

بیماری شده‌اند. به‌طوری‌که اشری و موهامد نشان دادند که در رقم‌های مقاوم گیاه کتان به کپک پودری، میزان پروتئین کل گیاه افزایش می‌یابد (Ashry and Mohamed 2011). هم‌چنین در مطالعات چان و تیان در میوه‌های گیلاس که با مخمر و اسید سالسیلیک مصنوعی علیه کپک آبی تیمار شده بودند، پروتئین‌های خاصی افزایش می‌یابند که احتمال داارد با مقاومت آن‌ها در ارتباط باشند (Chan and Tian 2006). در مطالعه‌ای دیگر نیز ثابت شد که حضور و افزایش پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در بافت‌های آلوده به بیمارگر، با مقاومت گیاهان ارتباط مثبتی دارد (Agnieszka and Iwona 2003). با توجه به اینکه آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی مختلفی در القای مقاومت گیاه نقش دارند بنابراین آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاهی به تنهایی نمی‌توانند بیانگر فعال شدن سیستم مقاومتی گیاه باشند، ولی با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات آزادی و همکاران مبنی بر تحریک رشد و القای مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های *B. bassiana* و کاهش بیماری (Azadi *et al*. 2015a)، احتمال وجود چنین پدیده‌ای در قارچ اندوفیت *B. bassiana*، بسیار زیاد بوده و نیازمند بررسی‌های بیشتری است. با توجه به درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری، به نظر می‌رسد که غلظت و تراکم کنیدی‌ها نیز درکلنیزه کردن گیاه و فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* و در نتیجه کنترل بیماری نقش داشته باشد، به طوری که در بین غلظت‌های به کار رفته غلظت 10^{7} اسپور در میلی‌لیتر در هر سه جدایه توان کنترلی بالایی را داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که در غلظت 10^{5} اسپور در میلی‌لیتر به دلیل کاهش کنیدی‌های موجود در واحد سطح و در غلظت 10^{9} اسپور در میلی‌لیتر به دلیل ازدحام کنیدی‌ها و کاهش سطح تماس، احتمال نفوذ قارچ به درون گیاه کاهش یافته‌است. ولی غلظت 10^{7} اسپور در میلی‌لیتر برای نفوذ کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* مناسب بوده است. نتایج حاصل با بررسی‌های اونلی (۲۰۰۸) مطابقت دارد. وی نیز نشان داد که غلظت‌های 10^{7} تا 10^{6} اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی ۹۸-۱۱ *B.bassiana*، در بذور گوجه‌فرنگی و غلظت‌های 10^{7} تا 10^{9} اسپور در میلی‌لیتر بذور پنبه، بهترین تاثیر محافظت‌کنندگی را علیه بیمارگرها دارند. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که تولید آنزیم کیتیناز ومتابولیت‌های ثانویه از یک سو مانع نفوذ بیمارگر به بافت گیاهی میزبان شده و از سوی دیگر القای مقاومت و تحریک رشد گیاه، موجب کاهش شدت بیماری و در نتیجه کنترل گیاهچه‌میری پنبه شده است.

منابع

Abo-Elyosr K AM, Hussein M AM, Allam A DA, Hassan M H. 2009. Salicylic acid induced systemic resistance on onion plants against *Stemphylium vesicarium*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42 (11): 1042-1050.

Agnieszka P, Iwona Z. 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science 164: 1019-1028.

Agrios GN. 2005. Plant pathology. Dana Dreibelbis, Fifth Edition. 922pp.

Alves Silva HS, Silva Romeiro R, Macagnan D, Halfeld-Vieira BA, Baracat Pereira MC, Mounteer A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biological Control 29: 288–295.

Ashry NA, Mohamed HI. 2011. Impact of Secondary Metabolites and Related Enzymes in Flax Resistance and or Susceptibility to Powdery Mildew. World Journal of Agricultural Sciences 7 (1): 78-85.

Azadi N, Shirzad A, Mohammadi H. 2015a. Study some of biocontrol mechanisms *Beauveria bassiana* against Rhizoctonia disease in tomato. MSc Thesis. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. (In Persian with English abstract).

Azadi N, Shirzad A, Mohammadi H. 2015b. Study of biological control of tomato Damping-off disease by some isolates of *Beauveria bassiana*. In: First National Conference on Agriculture, Environment and Food Security. Iran, University of Jiroft. http://www.civilica.com/Paper-AEFSJ01-AEFSJ01_262.html. (In Persian with English abstract).

Bradfor, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Fungal as biocontrol agents Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, UK.

Carling DE, Leiner RH. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on Potato. Phytopathology 80: 930-934.

Carolina Sánchez-Pérez LD, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Cervantes Mayagoitia JF, Ramos-López MA. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi,

Advances and Insights. Advances in Enzyme Research 2: 65-76.

Chan Z, Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Post harvest Biology and Technology 36: 215–223.

Conrath U, Beckers GJM, Flors B, Garcı´a-Agustı´n P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B. 2006. Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 19: 1062–1071.

De Marco JL, Lima LHC, De Sousa MV, Felix CR. 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathoge *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World journal of Microbiology and Biotechnology 16: 383-386.

Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1*, Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. Applied Environmental Microbiology 71(1): 363–370.

Griffin MR. 2007. *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. PhD Thesis.University of Tennessee, Knoxville.

Hadar Y, Chet I, Henis Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64–68.

Haggag WM. 2010. Role of Entophytic Microorganisms in Biocontrol of Plant Diseases. Life Science Journal 7(2): 57-62.

Hammerschmidt R, Kuc J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiological and Molecular Plant Pathology 20: 61–71.

Harmon GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. Trichoderma species–opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Rev Microbiol 2: 43–56.

Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS. 2000. Induction of terpenoid synthesisin cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens.* Phytopathology 90: 284-252.

Kang SC, Park S, Lee DG. 1999. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 73: 276–281.

Lehrer RI. 1969. Antifungal Effects of Peroxidase Systems. Bacteriology 99 (2): 361–365.

Liu J, Ekramoddoullah AKM. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology 68: 3–13.

Magasanik B. 1961. Catabolite Repression. Cild spring harbob symposia on quantithtive biology 26: 249-256.

Mortezaia H, Rouhani H, Sahebani N. 2010. Study of peroxidase enzyme activity induced by *Trichoderma harzianum* Bi in cucumber seedling and its effect in the control of root and foot rot. Journal of Plant Protection 24 (3): 258-268.

Mostafa M, Sharifnabi B, Esmaeili A, Safaie N. 2010. Study of role of *AbreAtr1* gene in protective mechanism and pathogenicity of *Alternaria brassicae*, the causal agent of leaf spot in canola, using real time PCR. Iranian iournal of plant pathology 46(4):283-292. (In Persian with English abstract)

Muriungi SJ, Mutitu EW, Muthomi JW. 2014. Efficacy of culture methods in the control of *Rhizoctonia solani* strains causing tomato damping off in Kenya. african journal of food agriculture nutrition and development 14(2): 8776-8790.

Mustafa U, Kaur G .2010. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. International Journal of Biotechnology & Biochemistry 6 (5): 701-713.

Ownley BH, Griffin M R, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology 98:267–270.

Ownley BH, Gwinng KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. BioControl 55: 113–128.

Pancher M, Ceol M, Corneo PE, Oliveira Longa CM, Yousaf S, Pertot L, Campisano C. 2014. Crop Management Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. Applied Environmental Microbiology 78(12): 4308–4317.

Parveen RM, Begum JA. 2010. Production and effect of killer toxin by Saccharomyces cerevisiae on sensitive yeast and fungal pathogens. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 3(1): 127-129.

Petlamul W, Prasertsan P. 2012. Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against Spodoptera litura on the Basis of Their Virulence, Germination Rate, Conidia Production, Radial Growth and Enzyme Activity. Mycobiology 40(2): 111-116.

Renwick A, Campbell R, Coe S . 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. Plant Pathology 40:5 24–532.

Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ . 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 29:319–343.

Senthamizhlselvan P, Sujeetha JARP, Jeyalakshmi C. 2010. Growth, sporulation and biomass production of native entomopathogenic fungal isolates on a suitable medium. Journal of Biopesticides 3(2): 466 – 469.

Su YY, Qi YL, Cai L. 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. Mycology 3 (3): 195–200.

Tsai YH. 2011. Involvment of salicylic acid in the resistance responses of different wheat cultivars to two Russian wheat aphid biotypes. MSC Thesis. University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.

Tseng SC, Liu SY, Yang HH, Lo CT, Peng KC. 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* T323 in response to *Rhizoctonia solani*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 6914-6922.

Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka H. 1991. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis*

cinerea Polygalacturonase. Acta Physiologiae Plantarum 13:43–50.

Vesely D, Koubova D. 1994. In vitro effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *B. brongniartii* (Sacc.) Petch on phytopathogenic fungi. Ochr Rostl 30: 113–120.

Walters D, Newton A, Lyon G. 2007. Induced resistance for plant defence, Blackwell Publishing, UK.

Yang Y, Shah J,. Klessig DF. 2014. Signal perception , transduction in plant defense responses. Genes & Development 11: 1621-163.

Zabalgogeazcoa I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. Spanish Journal of Agricultural Research 6: 138-146.

Zhu H, Qu F, Zhu LH. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Research 21(22): 5279-5280.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۹۹-۹۱

بذور آلوده وارداتی کدوئیان عامل استقرار و انتشار جدایه‌های اروپای مرکزی ویروس موزائیک زرد کدو در منطقه ورامین

سمیه قلی‌زاده روشنق[۱]، شاهین نوری نژاد زرقانی[۲]*، حشمت اله امینیان[۳]، مجید جعفری[۴] و حسین رامشینی[۵]

Imported infected cucurbit seeds cause of establishment and distribution of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin

Somayeh Gholizadeh-Roshanagh[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2*], Heshmatolah Aminian[3], Majid Jafari[4] and Hossein Ramshini[5]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، ۲- استادیار ۳- دانشیار
گروه حشره‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان
۵- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[1] M.Sc., [2] Assistant Professor [3] Associated Professor
Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran
[4] Assistant Professor of Department of Plant Protection, College of Agriculture, Higher Educational Complex of Saravan
[5] Assistant Professor of Department of Agronomy, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۳- تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۴)

چکیده

ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) از ویروس‌های مهم کدوئیان است. پروتیین پوششی (Coat Protein, CP) پوتی‌ویروس‌ها به لحاظ تبارزایی حائز اهمیت است و از سوی دیگر منطقه ورامین نیز از مناطق مهم تولید کدوئیان بشمار می‌آید، اما تاکنون ناحیه ZYMV-CP در جدایه‌های این منطقه تعیین‌توالی نشده است. بنابراین، هدف این پژوهش، تعیین‌توالی ZYMV-CP در جدایه‌های ورامین و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن با دیگر جدایه‌های ZYMV است. از این‌رو، نمونه‌برداری از مزارع طالبی ورامین، پاکدشت و پیشوا طی بهار و تابستان ۹۴-۱۳۹۳ انجام و ۳۴ درصد نمونه‌ها آلوده به ZYMV در تست الایزا مثبت نشان دادند. نتایج نشان داد که ناحیه ZYMV-CP در جدایهٔ ورامین (ZYMV-Varamin) ۸۴۰ نوکلئوتید بود. در درخت تبارزایی مبتنی بر ZYMV-CP، تمامی جدایه‌های ZYMV در سه گروه A، B و C قرار گرفتند که گروه A خود به هشت زیرگروه A1-A8 تقسیم شد. جدایه‌های ایرانی در زیرگروه‌های A1، A6 (شامل جدایه ورامین) و A8 قرار گرفتند. زیرگروه‌های A7 و A8 برای اولین بار در این پژوهش معرفی شدند. هرچند انتهای‌آمینی ZYMV-CP بیشترین تنوع را نسبت به سایر بخش‌های CP دارد، موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ از ویژگی‌های منحصربفرد جدایه‌های اروپای‌مرکزی است که توسط بذر نیز منتقل می‌شوند، در جدایه ورامین هم ردیابی شد که نشان‌دهنده ورود این جدایه‌ها به ورامین توسط بذور آلوده کدوئیان است.

واژه‌های کلیدی

طالبی،
تبارزایی،
الایزا،
تاکسونومی،
انتقال با شته

مقدمه

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) یکی از سه ویروس مهم و محدودکننده کشت کدوئیان و سبزیجات است. با اینکه دامنهٔ میزبانی این ویروس محدود به گیاهان جالیزی و چند گیاه زینتی است، از پراکنش زیادی برخوردار بوده و از ۵۰ کشور دنیاگزارش‌شده است (Desbiez and Lecoq 1997). حدود ۲۶ گونهٔ شته نظیر *Aphis gossypii*، *A. craccivora*، *Macrosiphum euphorbiae* و *Myzus persicae* به‌روش ناپایا، ناقل ZYMV هستند (Katis *et al*. 2006; Lisa and Lecoq 1984; Yuan and Ullman 1996). علایم ZYMV در طالبی شامل روشن شدن رگبرگ‌ها، موزائیک زرد، بدشکلی برگ و تاولی شدن برگ‌هاست (Loebenstein and Lecoq 2012). ژنوم ZYMV همانند سایر گونه‌های جنس *Potyvirus* از یک رشته RNAی تک‌لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است که در انتهای '۵ خود دارای VPg و در انتهای '۳ خود به دم پلیA ختم می‌شود. این مولکول یک پلی پروتیین بزرگ و یک پروتیین کوچک بنام PIPO را رمز می‌کند. پلی پروتیین بزرگ به پروتیین‌های کوچک‌تر عملکردی هضم می‌شود که مشخصات آنها در شکل ۱ آورده شده است. ژنوم این ویروس نیز همانند سایر ویروس‌ها دارای تنوع است. برای بررسی این تنوع بین جدایه‌های ویروس از بخش‌های مختلف ژنوم ZYMV استفاده شده است (Wisler *et al*. 1995; Desbiez *et al*. 1996). ناحیه پروتیین پوششی (Coat Protein, CP) از مهمترین این نواحی است که طول کامل آن نه تنها برای بررسی تنوع جدایه‌های ZYMV (Rybicki and Schukla 1992; Desbiez *et al*. 2002; Massoumi *et al*. 2011; Bananej *et al*. 2008) بلکه در بیشتر پژوهش‌های انجام یافته برای تعیین رابطه تبارزایی بین جدایه‌های پوتی‌ویروس‌ها نیز استفاده می‌شود (Tobias and Palkovics 2003). جدایه‌های ZYMV بر اساس طول کامل ناحیه CP در سه گروه A، B و C قرار می‌گیرند. گروه A خود به سه زیرگروه تقسیم شده بود که امروزه با افزایش تعداد جدایه‌های مورد بررسی، زیرگروه‌های ۴، ۵ و ۶ نیز به این تقسیم بندی اضافه شدند (Loebenstein and Lecoq 2012.; Massumi *et al*. 2011; De Almeida Spadotti *et al*. 2015; Glasa and Pittnerová 2006; Romay *et al*. 2014; Bananej *et al*. 2008; Özer *et al*. 2012; Vučurović *et al*. 2012; Coutts *et al*. 2011).

این پوتی‌ویروس از مناطق مختلف ایران از گیاهان مختلف خانواده کدوئیان گزارش شده است (Azarfar *et al*. 2012; Salehi and Bananej 2014; Ghorbani 1988; Massoumi *et al*. 2011; Bananej *et al*. 2008; Safaeizadeh 2008; Bananej and Vahdat 2008). با معرفی آغازگرهای عمومی برای پوتی‌ویروس‌ها بویژه برای ناحیه NIb-CP (Zheng *et al*. 2010)، از این ناحیه نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی ZYMV استفاده شده است (Ghasemzadeh *et al*. 2012a,b). بر اساس ناحیه NIb-CP جدایه‌های ZYMV گزارش شده از مزارع کدوی استان‌های خراسان، مازندران، تهران (ورامین و کرج)، یزد، کرمان، همدان و مرکزی و نیز مزارع طالبی استان‌های اصفهان، خوزستان، گلستان و گیلان ۱۰۰-۹۵/۶ درصد تشابه داشتند (Bananej *et al*. 2008). بعلاوه بررسی الگوی برشی محصولات RT-PCR در ناحیه NIb-CP با آنزیم‌های برشی *Pvu*II و *Eco*RV نشان داد که جدایه‌های ZYMV مناطق مختلف کشور، تفاوتی جود ندارد (Safaeizadeh 2008). در پژوهش دیگری ناحیه CP بطور کامل در ۲۱ جدایه ZYMV از کدوی زمستانه (استان‌های کرمان، تهران، هرمزگان، بوشهر، کرمان، خراسان)، خیار (اصفهان، گیلان، یزد، سیستان و بلوچستان، همدان، آذربایجان شرقی)، هندوانه ابوجهل (کرمان)، کدوی تنبل (آذربایجان شرقی)، هندوانه (همدان، آذربایجان غربی، هرمزگان، سیستان و بلوچستان)، طالبی (بوشهر و فارس) تعیین توالی شد و براساس درخت‌های ترسیم شده مبتنی بر این ناحیه، جدایه‌ها در گروه A و در دو زیرگروه قرار گرفتند (Massoumi *et al*. 2011). جدایه فارس (ZYMV-F, JN183062) تنها جدایه ویروس موزائیک زرد کدوی گزارش شده از ایران است که بطور کامل تعیین توالی شده است. این جدایه بیشترین شباهت را به جدایه‌های اروپایی دارد (Azarfar *et al*. 2012).

خربزه و طالبی بطور وسیع در شهرستان ورامین و نیز شهرستان‌های اطراف آن کشت می‌شود و ویروس‌های مهم کدوئیان از جمله ZYMV از روی این گیاه و منطقه گزارش شده‌اند. تنها داده‌های مولکولی موجود در زمینه ژنوم جدایه‌های منطقه ورامین محدود به یک توالی از ناحیه عمومی NIb-CP است اما تاکنون فقط ناحیه NIb-CP یک جدایه از ورامین تعیین توالی شده است (Bananej *et al*. 2008) و هیچ داده‌ای در مورد ناحیه ZYMV-CP جدایه‌های این منطقه وجود ندارد.

شکل ۱- ژنوم یک پوتی ویروس. ژنوم پوتی ویروس‌ها از یک رشته مولکول RNA با قطبیت مثبت تشکیل شده است که ابتدای ژنوم حاوی VPgو انتهای ژنوم بهPoly-A ختم می‌شود. مستطیل بزرگ چارچوب خواندنی بزرگ را در پوتی ویروس‌ها نشان می‌دهد که یک پلی‌پروتیین را رمز می‌کند. این پروتیین هضم شده و به ده پروتیین کوچک‌تر تقسیم می‌شود که با خط عمودی محل‌های برش آن و با رنگ‌های مختلف پروتیین‌های حاصل از هضم پلی پروتیین در شکل نشان داده شده‌اند و از انتهای آمینی به ترتیب عبارتند از P1 (پروتئاز)، HC-Pro (پروتئاز است و در تعامل با شته‌ها، تکثیر، حرکت ویروس و مهارخاموشی ژن نقش دارد)، P3 (در تکثیر و حرکت ویروس نقش دارد)، 6K1 (نامعلوم)، CI (هلیکاز وحرکت ویروس)، 6K2 (احتمال دارد در اتصال کمپلکس تکثیر به شبکه اندوپلاسمی نقش دارد)، NIa (پروتئاز)، NIb (رپلیکاز) و CP (پروتیین پوششی). چارچوب خواندنی دوم در پوتی ویروسها، "PIPO" است که با رنگ قرمز تیره نشان داده شده است (جهت حرکت بین سلولی ویروس ضروری است) برای جزئیات بیشتر به King *et al*., 2012 رجوع شود.

Figure 1. The genome organization of a potyvirus. The genome of potyviruses consists of a positive sense single stranded RNA which is attached to a VPg at 5’ end (small yellow circle) and is polyadenylation at 3’ end. The largest rectangle denotes the large ORF encoding for a large polyprotein proteolytically processed to 10 functional proteins indicated by different colors. The functional proteins from *N*-terminus of the polyprotein are as follows: P1 (protease), HC-Pro (protease, aphid transmission helper component, suppressor of RNA silencing, involves in movement of the virus), P3 (involves in movement of the virus), 6K1 (unknown function), CI (helicase and involves in virus movement, cylindrical-shaped inclusion body found in the cytoplasm), 6K2 (involves in attachment of replication complex to endoplasmic reticulum), NIb (replicase) and CP (coat protein). The second ORF of potyviruses, PIPO, is shown by a small dark red color rectangle (essential for virus intercellular movement). For more details please refer to King *et al*, 2012).

جدول ۱- تعداد و محل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع طالبی جنوب استان تهران.

Table 1. Number and location of collected samples from melon fields in Sothern Tehran, Iran.

سال	محل	زمان نمونه برداری	تعداد نمونه جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های مثبت
۹۳	پیشوا	اردیبهشت ماه	۱۹	۴
	پاکدشت	اردیبهشت	۳۵	۴
	پاکدشت	خرداد ماه	۸	۱
	ورامین	خرداد ماه	۱۸	۷
۹۴	پاکدشت	اردیبهشت	۹	۲
	پیشوا	خرداد ماه	۱۸	۱۳
	ورامین	خرداد ماه	۸	-
	پیشوا	خرداد ماه	۱۷	۱۴

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و انجام آزمون الایزا

مزارع خربزه و طالبی شهرستان‌های ورامین، پاکدشت و پیشوا (استان تهران) طی اردیبهشت‌ماه و خردادماه سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ مورد بازدید قرار گرفته و بصورت تصادفی و حرکت در راستای قطر مزارع به فاصله ۵۰-۳۰ متری از زمان گلدهی و میوه دهی تا برداشت نمونه‌برداری انجام شد. محل و تعداد نمونه‌های جمع-آوری شده در جدول ۱ نمایش داده شده اند. شایان ذکر است علایم مشاهده شده در نمونه‌های جمع آوری شده کمابیش مشابه و شامل کاهش رشد، موزاییک، بدشکلی، زردی، چین و چروک، رگ برگ روشنی و سبز روشنی در برگ‌ها بود. به منظور ردیابی ZYMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده از آزمون الایزا (DAS-ELISA) به روش کلارک و آدامز استفاده شد (Clark and

(Adams 1977). آنتی‌بادی‌های مورد استفاده از شرکت DSMZ آلمان تهیه شدند.

استخراج RNA و RT-PCR

استخراج RNAی کل از تمامی نمونه‌هایی که آلودگی آنها به ZYMV در آزمون الایزا قطعی شده بود بر اساس دستورالعمل ارایه شده توسط Nagy به نقل از سخندان و همکاران (Sokhandan-Bashir *et al.* 2006) انجام شد. مقدار ۲µl از RNAی کل استخراج شده با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (ترموساینتیفیک، لیتوانی) برای ساخت cDNA در حجم نهایی ۱۰میکرولیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت PCR mix شرکت سیناکلون (ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت و بکارگیری دو میکرولیتر از cDNA به عنوان الگو انجام شد. جفت آغازگر ZYMV-8407-s (5'-GCACCATACATAGCTGAGACAGC-3') (طراحی شده دراین پژوهش) و ZY3 (5'-TAGGCTTGCAAACGGAGTCTAATC-3') (Thomson *et al.* 1995) برای تکثیر طول کامل ناحیه CP به همراه ناحیه ترجمه نشونده انتهای'۳ استفاده شد. برنامه دمایی و مدت‌زمان شامل یک چرخه‌ی دمایی۹۴°C به مدت۲دقیقه، ۳۵ چرخه شامل یک مرحله از دمای ۹۴°C به مدت۳۰ ثانیه، دمای ۶۴°C به‌عنوان دمای اتصال آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه، یک مرحله از دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه جهت سنتز و در آخر یک مرحلهٔ ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

همسانه‌سازی محصول RT-PCR

محصولات RT-PCR با استفاده از Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (شرکت ترموساینتیفیک، آلمان) از ژل آگارز خالص‌سازی شده و الگوی برشی محصولات RT-PCR با آنزیم-های *Bam*HI و *Hind*III مورد بررسی قرار گرفت و نمونه منتخب برای همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت و به حامل خطی pTG19-T طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده (Vivantis, Malaysia) الحاق شد. محصول واکنش اتصال (ligation) به سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5 انتقال داده شده (Sambrook and Russell 2001) و بر روی محیط کشت LB حاوی X-Gal وIPTG کشت داده شدند. پرگنه‌های سفید رشد یافته در پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (۵۰mg/ml) و در لوله‌ی آزمایش کشت داده شدند. این لوله‌ها به مدت یک شب در انکوباتور لرزان در دمای ۳۷°C و ۲۰۰rpm قرار داده شدند و پس از تکثیر باکتری‌های نوترکیب، از آن‌ها پلاسمید به روش لیز قلیایی استخراج شد (Sambrook and Russell 2001). جهت بررسی اندازه قطعه DNAی اتصال یافته به حامل همسانه‌سازی از آنزیم *Bam*HI و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (سیناکلون) استفاده شد. برای بررسی نتایج واکنش RT-PCR و برش با آنزیم، از الکترفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد استفاده شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه وتحلیل داده‌ها

برای تأیید درستی همسانه‌سازی ناحیه ZYMV-CP در جدایه ورامین، همسانه‌های نوترکیب به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند. داده‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از واکنش تعیین توالی، توسط نرم‌افزار BioEdit مونتاژ، زیر هم چیده شده (alingment) و میزان تشابه توالی‌ها محاسبه شد. برای رسم درخت‌های تبارزاییکی از نرم‌افزار Phylogeny Inference package (Phylip) version 3.65 استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی نمونه‌های آلوده توسط آزمون الایزا و RT-PCR

از ۱۳۲ نمونه برگی بررسی شده آلودگی ۴۵ نمونه (۳۴ درصد) به ZYMV محرز شد. در الکتروفورز محصولات RT-PCR قطعه‌ی مورد انتظار به طول ۱۲۵۷ bp (شامل طول کامل ناحیه CP به همراه انتهای ′۳ ترجمه نشده) در نمونه‌های الایزا مثبت تکثیر شد که شکل ۲ نمونه‌ای از این واکنش‌ها را نشان می‌دهد.

همسانه‌سازی ناحیهZYMV-CP در حامل pTG19-T

در برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم *Bam*HI، دو قطعه به اندازه تقریبی ۲۸۰۰ bp (حامل همسانه‌سازی) و ۱۲۵۰bp (قطعه DNAی مورد انتظار) مشاهده شد (شکل ۲). هیچ گونه الگوی متفاوتی در اثر برش با آنزیم *Bam*HI مشاهده نشد.

تعیین توالی و تبارزایی

نتایج تعیین توالی نشان داد که اندازه‌ی ناحیه ژنومی پوشش پروتیینی در جدایه ورامین (ZYMV-Varamin) ۸۴۰ نوکلئوتید (معادل ۲۷۹ آمینو اسید بدون در نظر گرفتن کدون خاتمه) بود و در این جدایه هیچ گونه جهش حذف و اضافه مشاهده نشد.

شکل ۲– الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از آغازگرهای ZYMV-8407-s وZY3 (راهک‌های ۱ تا ۶) و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ZYMV-CP ناحیه (راهک ۸ تا ۱۵) در ژل آگارز یک درصد. راهک ۷: مارکر GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Figure 2. Electrophoresis of RT-PCR products using ZYMV-8407-s and ZY3 primers (Lanes 1-6) and *Bam*HI digestion of recombinant plasmids harboring ZYMV-CP gene (lanes 8-15) in 1% agarose gel. Lane 7: GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

جدایه ZYMV-Varamin بیشترین تشابه را در سطح اسیدهای آمینه با جدایه‌های ZYMV-Kuchyna (اسلواکی) و ZYMV-10 (مجارستان) با ۱۰۰–۹۹/۶ درصد داشت، درحالیکه با سایر جدایه-های ZYMV گزارش شده از ایران (ZYMV-Bd, KP965804) ۹۷/۱ – ۹۲/۸ درصد تشابه داشت. در سطح اسیدهای نوکلئیک، ZYMV-Varamin بیشترین تشابه را با جدایه‌های ZYMV-SE04T و ZYMV-Kuchyna (هردو از اسلواکی) و نیز ZYMV-H از جمهوری چک با ۹۹/۸ درصد و با جدایه‌های ایرانی از قبل تعیین توالی شده ۹۳/۲–۹۸/۹ درصد تشابه داشت. در درخت‌های ترسیم شده مبتنی بر طول کامل ناحیه پروتیین پوششی به روش-های ماکسیمم پارسیمونی و نزدیکترین همسایه در دو سطح اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک تنها درخت ترسم شده براساس توالی اسیدهای نوکلئیک و به روش نزدیکترین همسایه توانست جدایه‌ها را بخوبی تفکیک کند. براساس این درخت جدایه‌های ZYMV به سه گروه A، B و C تقسیم شدند (شکل ۳) که این نتایج تائید کننده نتایج لکوک و دسبیز (Lecoq and Desbiez 2012) بود. جدایه‌های ایرانی در گروه A قرار گرفتند. گروه A تا سال ۲۰۱۲ در منابع به سه زیر گروه و در سال ۲۰۱۲ به شش زیرگروه تقسیم بندی شد که در آن گروهبندی جدایه‌های ایرانی در زیرگروه A1 قرار گرفتند (Lecoq and Desbiez 2012). در پژوهش‌های بعدی جدایه‌های ایرانی در دو زیرگروه درون گروه A قرار گرفتند (Massumi *et al.* 2011) اما از آنجا که تمامی زیرگروه‌های گروه A در تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی بکاربرده نشده بودند جایگاه دقیق جدایه‌های ایرانی مشخص نبود.

در پژوهش حاضر، تمامی جدایه‌های گزارش شده از ZYMV تا تاریخ اول سپتامبر ۲۰۱۶ که ناحیه CP بطور کامل درآنها تعیین توالی شده بود به همراه جدایه تعیین توالی شده در این پژوهش در تجزیه و تحلیل‌ها بکار برده شدند. الگوی مشاهده شده در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس ZYMV-CP جدایه‌های ایرانی و نیز سایر جدایه‌های گزارش شده از کشورهای مختلف بر اساس منطقه جغرافیایی گروه‌بندی نشدند (شکل ۳). براساس این درخت ترسیم شده، گروه A به هشت زیرگروه تقسیم شد (شکل ۳) که جدایه‌های ایرانی در زیر گروه‌های A1، A6 و A8 قرار گرفتند و یک جدایه ZYMV-Cu (رس شماره KP965804) در هیچ زیرگروهی از گروه A قرار نگرفت. همان طوری که پیش‌تر گفته شد گروه A در ابتدا به سه و درنهایت به شش زیرگروه تقسیم شد (Lecoq and Desbiez 2012). در این پژوهش زیرگروه‌های A7 (شامل ZYMV-99/246 از چین و ZYMV-KR-PS از کرهٔ جنوبی) و A8 (دو جدایه مهاباد و کرمان) نیز برای اولین‌بار معرفی شدند. زیرگروه A1 فقط شامل جدایه‌های ایرانی (۱۱ جدایه از شهرهای ملایر، یزد، مشهد، زابل، جیرفت، تبریز، اسدآباد و بوشهر)، دو جدایه از آمریکا و یک جدایه از آفریقای جنوبی بود. جدایه‌های زیرگروه A6 که بیشترین جدایه‌ها را در بر دارد شامل جدایه‌های آسیای دور، خاورمیانه، اروپا و آفریقای

جنوبی و ایران (۱۰ جدایه میناب، اصفهان، کرج، رشت، زاهدان، ماکو، بوشهر، مرودشت، بافت و جدایه ZYMV-Varamin) بود.

شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس توالی کامل ناحیه CP جدایه‌های ZYMV به روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) در سطح اسیدنوکلئیک. شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۷۰% ادغام شداند. منشاء جدایه‌ها و نیز زیرگروه‌های ZYMV در سمت راست شکل نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Neighbor joining tree drawn based on full-length ZYMV-CP gene at the nucleotide level. Branches with less than 70 % bootstrap supports were collapsed. The origin of the isolates and subgroups were shown in the right.

BCMNV-U051
AB127936 ZYMV Pak Pakistan
JF797206 ZYMV APCU India
AB004641 ZYMV M Japan
91.0
EF062583 ZYMV AG Israel
AY188994 ZYMV B France
84.0
FJ705263 ZYMV Hor Min S Iran
84.0
FJ705255 ZYMV Bos Bor S Iran
FJ705270 ZYMV Teh Kar S Iran
JQ026020 ZYMV Iraq Iraq
80.0
FJ705253 ZYMV Far Mar M Iran
FJ705264 ZYMV Ker Baf S Iran
KJ789916 ZYMV ND1 South Africa
DQ124239 ZYMV Kuchyna Slovakia
KF976712 ZYMV H Czechen Republic
AJ251527 ZYMV 10 Hungarian
100.0
ZYMV Varamin Iran
KF976713 ZYMV SE04T Slovakia
100.0
KJ614229 ZYMV India India
KJ620410 ZYMV ZYMV Ldh India
100.0
GQ482976 ZYMV Bd India
KT778297 ZYMV AP Gherkin India
84.0
71.0
FJ705269 ZYMV Sis Zah C Iran
FJ705257 ZYMV Esf Esf C Iran
81.0
84.0
FJ705272 ZYMV Azr Mak W Iran
FJ705259 ZYMV Gil Ras C Iran
EU561043 ZYMV Cu Poland
subgroup 6
KP965804 ZYMV ZYMV Bd Iran
HM005307 ZYMV 9spno2 Mali
100.0
AY611024 ZYMV 99 246 China
AY279000 ZYMV KR PS South Korea
subgroup 7
AB369279 ZYMV RDA South Korea
100.0
FJ705252 ZYMV Aza Mah W Iran
FJ705266 ZYMV Ker Ker S Iran
subgroup 8
100.0
AB188115 ZYMV Z5 1 Japan
DD056806 ZYMV 0 Japan
subgroup 4
76.0
AY611026 ZYMV HN 01 China
AY995216 ZYMV New Zealand New Zealand
NC 003224 ZYMV TW TN3 Taiwan
100.0
100.0
DI159774 ZYMV 0 00
DJ418432 ZYMV A South Korea
99.0
AJ316227 Z ZYMV p China
AM422386 ZYMV begonia Taiwan
subgroup 5
100.0
EU561044 ZYMV Zuy Poland
EF122498 ZYMV Liaocheng China
subgroup 3
L31350 ZYMV California USA
KP748228 ZYMV Dezful Iran
KJ789920 ZYMV TV3 South Africa
D00692 ZYMV Conneticut 00
FJ705261 ZYMV Ham Mal W Iran
FJ705271 ZYMV Yaz Yaz C Iran
FJ705267 ZYMV Kho Mash S Iran
89.0
FJ705268 ZYMV Sis Zab W Iran
100.0
FJ705262 ZYMV Sis Zab W Iran
FJ705265 ZYMV Ker Jir W Iran
FJ705254 ZYMV Azr Tab S Iran
FJ705256 ZYMV Bos Bos M Iran
96.0
FJ705258 ZYMV Far Mar M Iran
FJ705260 ZYMV Ham Aas C Iran
subgroup 1
89.0
100.0
DQ645729 ZYMV ZYMV C 16 Spain
87.0
D13914 ZYMV Florida USA
100.0
AJ316229 ZYMV WG China
KT598222 ZYMV 10itSDE Argentina
subgroup 2
100.0
AF014811 ZYMV Singapore Singapore
X62662 ZYMV Singapore Singapore
99.0
L29569 ZYMV Reunion Island
DQ925447 ZYMV VN Cm3 Viet Nam
Group B
100.0
EU561045 ZYMV Zug Poland
DQ925451 ZYMV VN Bh1 Viet Nam
100.0
AJ889243 ZYMV LG1 China
100.0
AJ515908 ZYMV MM China
100.0
78.0
AJ889244 ZYMV TY Ghina
100.0
DQ925450 ZYMV VN Cm2 Viet Nam
DQ925449 ZYMV VN Cs1 Viet Nam
Group C
Group A

با وجود اینکه ورامین یکی از مناطق مهم کشت کدوئیان است ولی تاکنون هیچ جدایه‌ای از این منطقه تعیین توالی نشده و موقعیت جدایه‌های آن تعیین نشده بود. در این پژوهش معلوم شد جدایه‌ی ورامین هم در مقایسات دوبدوی و هم در درخت ترسیم شده مبتنی بر طول کامل ناحیه CP، بیشترین شباهت را به جدایه-های اسلواکی، جمهوری چک و مجارستان داشت و به همراه آن-ها در زیرگروه A6 قرار گرفت.

در مقایسات توالی آمینواسیدی ناحیه CP در جدایه‌های ZYMV، جدایه ورامین نیز، دارای موتیف DAG (Harrison and Robinson 1988) در انتهای آمینی CP بود (شکل ۲). بیشترین تفاوت جدایه‌های ایرانی در انتهای آمینی CP مشاهده شد که در جدایهٔ ZYMV-Varamin، جدایه‌های اسلوکی، جمهوری چک و مجارستان موتیف TKKNNEDDK در موقعیت‌های ۲۱-۱۳ وجود داشت، درحالیکه این موتیف در سایر جدایه‌های ایرانی TKKDKEDDK بود. در اعضای زیرگروه A6 در موقعیت‌های ۴۲-۳۵ موتیف KTVAAATK مشاهده شد در حالیکه این موتیف در اعضای زیر گروه A1 بصورت KTVAAVTK بود. با توجه به اینکه ساختار سه بعدی پروتیین پوششی ZYMV تعیین نشده است نمی‌توان تأثیر این تغییرها را در ساختار و عملکرد CP را مشخص کرد، اما نشان داده شده است که انتهای آمینی CP در پوتی‌ویروس‌ها حاوی اپی‌توپ‌های اختصاصی پوتی‌ویروس و گونه‌های آن است و بیشترین تغییرها در جدایه‌های ZYMV در اطراف موتیف DAG مشاهده شده است (شکل ۴) (Atreya *et al.* 1995). از این‌رو، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که توالی‌های اطراف موتیف DAG تحمل بیشتری نسبت به جهش‌ها در مقایسه با سایر بخش‌های ناحیه CP دارد. از آنجا که این موتیف در انتقال با شته نقش دارد، احتمال دارد این تغییرها باعث اثرهای متقابل کشنده برای ویروس نبوده است. بنابراین نیاز به بررسی اثر یا اثرهای این تغییرها در امینواسیدهای اطراف موتیف DAG در کارایی این موتیف در انتقال با شته بشدت احساس می‌شود. بعلاوه موتیف DAG به واسطه HC-Pro (موتیف PTK) با گیرنده‌های موجود در استایلت ناقل تعامل دارد که این تنوع در انتهای آمینی پروتیین CP ممکن است آنرا تحت تاثیر قرار خواهد داد (Pirone 1991, Peng *et al.* 1998). بطوریکه نشان داده شده است در پوتی‌ویروس‌ها توالی‌های اطراف DAG تعیین خواهند کرد که موتیف DAG در انتقال با شته کارایی داشته باشد یا نداشته باشد (López-Moya *et al.* 1999). با توجه به اینکه جدایه‌ی ورامین به همراه جدایه‌های جمهوری چک، اسلواکی (SE04T و Kuchyna) و مجارستان در یک خوشه قرار گرفتند و موتیف‌های یکسانی (Glasa and Pittnerova 2006) را در مقایسه با سایر جدایه‌ها به اشتراک داشتند، می‌توان استنباط کرد که ZYMV-Varamin با این جدایه-ها از یک جد مشترک منشاء گرفته‌اند.

از سوی دیگر موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ تنها در انتهای آمینی CP جدایه‌های مجارستان، اسلواکی و اتریش (جدایه‌های اروپای مرکزی) مشاهده شده است و به عنوان ویژگی منحصر بفرد و بی-همتای این جدایه‌ها معرفی شده است (Tóbiás and Palkovics 2003). این موتیف در جدایه ZYMV-Varamin نیز مشاهده شد. نشان داده شده است که این جدایه‌ها، هرچند به میزان کم، توسط بذر انتقال می‌یابند و تنها راه گسترش یا پراکنش این جدایه‌ها در سه کشور اشاره شده انتقال با بذر است (Tóbiás and Palkovics 2003). از آنجا که رقم سمسوری (رقم بومی) در ورامین کاشت می‌شود و بذور این گیاه واردتی نیست، احتمال دارد این ویروس از طریق بذور وارداتی سایر کدوئیان نظیر خیار و کدوی آلوده به این نژاد وارد منطقه ورامین شده است. این امر تاکیدی دیگر بر اجرای سخت‌گیرانه اصول قرنطینه برای جلوگیری از ورود جدایه‌های جدید به ایران است. احتمال ضعیف‌تر این است که موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ فقط در جدایه‌های اروپای مرکزی وجود ندارد که تنها با ادامه پژوهش‌ها بویژه با تعیین توالی بخش‌های دیگر جدایه‌های اروپای مرکزی و بطور همزمان جدایهٔ ورامین مشخص خواهد شد. متفاوت بودن توالی انتهای آمینی پروتیین پوششی در جدایه ورامین نسبت به سایر جدایه‌های این ویروس در ایران و حتی مابین برخی جدایه‌های ایرانی این پیام را در بردارد که جدایه‌های موجود در ایران از تنوع بالاتری برخوردار بوده و منشاء متفاوتی دارند. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها همراه با بذور کدوئیان وارد ایران شده‌اند و در صورت تجمع این جدایه‌ها در یک منطقه، احتمال بروز جدایه‌های نوترکیب افزایش می‌یابد. با توجه به خاصیت انتقال با بذر جدایه‌های اروپای مرکزی و شاید ZYMV-Varamin پیشنهاد می‌شود در انتخاب توده یا ارقام مقاوم به این ویروس میزان انتقال ZYMV با بذور آن توده نیز بررسی شود. بعلاوه بهتر است جدایه ای از هرگروه فیلوژنتیکی و موتیف های موجود در انتهای آمینی به عنوان مورد نماینده انتخاب و مقاومت ارقام یا توده‌ها نسبت به این جدایه‌ها و الگوی پراکنش آنها مورد توجه قرارگیرد. در غیر این‌صورت مبارزه با شته‌ها به منظور جلوگیری از ورود ویروس به مزارع به دلیل استقرار کانون‌های اولیه آلودگی در اثر کاشت بذور آلوده جز

```
                                   DAG
                                   Motif   N16N17          A27          M37
                                     *          20          *          40          *          60
ZYMV-Varamin  : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
KF976712      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
KF976713      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
DQ124239      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNRDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AJ251527      : SGTQPTVADAGTTKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705252      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVAGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGRIVPRLSK :  60
FJ705253      : SGTQPTMADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705254      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705255      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705259      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDGTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705262      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705263      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705264      : SGTQPTMADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705265      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705266      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDATGSGSGEKTVAAITKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705267      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705271      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGERTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705272      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDGTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
DQ925447      : SDTQTREADAGATKKDRDEDKEKKKDVASSSTNDKTVTAATKDKDVNAGSHGKIVPCLSK :  60
L29569        : SDTQTKEADAGAAKRDKDEEKEKKKDVASSSANEKTMTATAKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
X62662        : SDTQTREAGAGASKKDKDEDKDKKKDVASSSASEKAVATATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AF014811      : SDTQTREAGAGASKKDKDEDKDKKKDVASSSASEKAVATATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
NC_003224     : SGTQPTAADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
EU561043      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AJ889243      : SGTQGTVADAGATKKEKEEDKGKTKDVTSTSSGDKTVIPTVKEKDVNAGSHGKIVPRLTK :  60
AJ515908      : SGTQQTVADAGATKKDKEDDKAKNKDVTSTSSGNKTVAPIAKEKDVNAGSHGKIVPRLAK :  60
```

Central Europe isolates

افزایش آلودگی محیط زیست و ایجاد ناقلین مقاوم به سموم نتیجه‌ای در بر نخواهد داشت.

شکل ۴- زیرهم‌چینی ترادف آمینو اسیدی ناحیه پروتیین پوششی در سطح اسیدهای آمینه که نشان دهنده حضور موتیف‌های DAG، DK و NN است.

Figure 4. Alignment of ZYMV-CP sequences at the amino acid level showing DAG, DK and NN motifs.

منابع

Atreya PL, Lopez-Moya J, Chu M, Atreya CD, Pirone TP. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *Potyvirus* transmission by aphids. Journal of General Virology 76, 265-270.

Azarfar A, Izadpanah K, Afsharifar A, Masumi M. 2012. Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus*- Fars isolate. Iranian Journal of Plant Pathology 48, 403-409. (In Farsi with English abstract).

Bananej K, Keshavarz T, Vahdat A, Hosseini Salekdeh G, Glasa M. 2008. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. Journal of Phytopathology 156, 654-659.

Bananej K, Vahdat A. 2008. Identification, distribution, and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. Phytopathologia Mediterranea 47, 247-257.

Clark MF, Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linkedimmunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34, 475-483.

Coutts R H, Livieratos I. 2003. Nucleotide sequence and genome organization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* RNA1. Archives of Virology 148, 2055-2062.

De Almeida Spadotti DM, Wassano DT, Rezende JAM, Aranha LE, Camargo AKIN. 2015. Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Science Agriculture 72, 187-191.

Desbiez C, Lecoq H. 1997. *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology 46, 809-829.

Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Granier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H. 1996. Biological and molecular

variability of *Zucchini yellow mosaic virus* on the island of Martinique. Plant Disease 80, 203-207.

Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. Virus Research 85, 5-16.

Ghasemzadeh A, Sokhandan Bashir N, Khakvar R. 2012a. Molecular detection of *Potato virus Y* using universal primers from Ardabil province. Journal of Sustainable Agriculture and Production Science 22, 67-80. (In Farsi with English abstract).

Ghasemzadeh, A., Sokhandan Bashir, N. and Masoudi, N .2012b. Sequencing part of *Watermelon mosaic virus* genome and phylogenetical comparison of 5 isolates with other isolates from world. Journal of Agriculture and Food Technology 2, 93-101. (In Farsi with English abstract).

Ghorbani S. 1988. Isolation of *Zucchini yellow mosaic virus* in the Tehran province. Iranian Journal of Plant Pathology 24, 13-15. (In Farsi with English abstract).

Glasa M, Pittnerová S. 2006. Complete genome sequence of a Slovak isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among central European ZYMV isolates. Journal of Phytopathology 154, 436-440.

Harrison B, Robinson D, Tyrrell D, 1988. Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological [and discussion] significance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 321, 447-62.

Katis N, Tsitsipis J, Lykouressis D, Papapanayotou A, Margaritopoulos J, Kokinis G, Perdikis DC, Manoussopoulos I. 2006. Transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* by colonizing and non-colonizing aphids in Greece and new aphid species vectors of the virus. Journal of Phytopathology 154, 293-302.

Lecoq H, Desbiez. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. 67-126. In: Loebenstein G, Lecoq H. (Ed.). Advances in Virus Research (Vol.84): Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin. Academic Press.

Lisa V, Lecoq H. 1984. *Zucchini yellow mosaic virus*. Description of plant viruses. No. 282.

Loebenstein G, Lecoq H. 2012. (Ed.). Advances in Virus Research (Vol.84): Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin. Academic Press. 570 p.

Lopez-Moya J, Wang R, Pirone T. 1999. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. Journal of General Virology 80, 3281-8.

Massumi H, Shaabanian M, Heydarnejad J, Pour AH, Rahimian H. 2011. Host range and phylogenetic analysis of Iranian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Journal of Plant Pathology 93, 187-93.

Özer M, Sipahioğlu HM, Usta M, Fidan H. 2012. Cloning and sequencing of coat protein gene of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from squash and muskmelon in Turkey. Turkish Journal of Biology 36, 423-429.

Peng Y, Kadoury D, Gal-On A, Huet H, Wang Y, Raccah B, 1998. Mutations in the HC-Pro gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. Journal of General Virology 79, 897-904.

Pirone TP. 1991. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. Seminars in Virology 2, 81-87.

Romay G, Lecoq H, Geraud-Pouey F, Chirinos D., Desbiez C. 2014. Current status of cucurbit viruses in Venezuela and characterization of Venezuelan isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology 63, 78-87.

Rybicki E, Shukla DD. 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In: Barnett OW (Ed). *Potyvirus taxonomy*. Archives Virology Supplementum 5, 139-70.

Safaeizadeh M. 2008. Comparative biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. Asian Journal of Plant Pathology 2, 30-39.

Salehi S, Bananej K. 2014. Detection and geographical distribution of viral infections in cucumber greenhouses in Tehran and Alborz provinces. Entomology and Phytopathology 81, 153-166. (In Farsi with English abstract).

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 1.1-1.131.

Sokhandan Bashir N, Kalhor MR, Nourinejhad Zarghani S. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. Virus Genes 32, 277-288.

Thomson KG, Dietzgen RG, Gibbs AJ, Tang YC, Liesack W, Teakle DS, Stackebrandt E. 1995. Identification of Zucchini yellow mosaic potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. Journal of Virological Methods 55, 83-96.

Tobias I, Palkovics L. 2003. Characterization of Hungarian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var *styriaca*. Pest Management Science 59, 493-497.

Vučurović A, Bulajić A, Stanković I, Ristić D, Berenji J, Jović J, Krstić B. 2012. Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. Euroupean Journal of Plant Pathology 133, 935-947.

Wisler G, Purcifull D, Hiebert E. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the *Zucchini yellow mosaic virus*. Journal of General Virology 76, 37-45.

Yuan C, Ullman DE. 1996. Comparison of efficiency and propensity as measures of vector importance in *Zucchini yellow mosaic Potyvirus* transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivorab*. Phytopathology 86, 698-703.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۱۲-۱۰۱

کالوس‌زایی و باززایی لاین‌های گندم نان از ریزنمونه‌های کولئوپتیلی

Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants

علی اکبر غلامی[۱]، علیرضا تاری نژاد*[۲]

Gholami Ali Akbar [1] and Tarinejad Alireza*[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی
دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کیلومتر ۳۵ جاده تبریز-مراغه

1. MSc. in Biotechnology, 2. Associate Prof.
Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan
Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵)

چکیده

بهینه‌سازی کشت بافت در گندم برای فرآیند انتقال ژن یا کشت سوسپانسیون سلولی امری ضروری است. به منظور بهینه‌سازی کشت بافت، چهار لاین گندم به نام‌های C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9، استفاده شد. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. قابلیت کالوس‌زایی و باززایی لاین‌های تحت تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای کالوس‌زایی از محیط کشت ML1G1 حاوی سه سطح اکسین از نوع توفوردی (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و برای باززایی از محیط کشت MS و N6 حاوی سطوحی از هورمون‌های NAA، BAP و Kin استفاده شد. با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل لاین در تیمارهای مختلف هورمونی، نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۸۲٪) و سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با میانگین (۶۰٪) بود. از نظر القاء کالوس جنین‌زا، محیط کشت ML1C2 که حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره بود، بیشترین درصد جنین‌زایی را در لاین‌های C-D-9 و C-D-8 تولید نمود. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲٪ برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱mg/l BA + ۱mg/l IAA به دست آمد.

واژه‌های کلیدی

توفوردی،
قطعات کولئوپتیل،
کشت بافت،
گندم

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار و در ایران حدود ۵/۶ میلیون هکتار است که از سایر غلات بیشتر و برابر ۲۲ درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (Kazemi Arbat 2005). به همین علت، غذای عمده بیش از ۴۰ کشور جهان است که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (Bushuk 1998). کشت بافت، نوعی تکثیر غیرجنسی است که مزیت آن نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه در محیط درون شیشه‌ای با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمانی کوتاه‌تر و فضایی محدودتر می‌باشد (Tripathi and Tripathi 2003). منظور از بهینه‌سازی کشت بافت در گندم، فراهم نمودن بستر مناسب برای انتقال ژن به این گیاه یا بررسی‌های مراحل مختلف تکوین گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است (Tarinejad et al. 2007).

در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است و تا به حال کشت جنین نارس گندم به عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (Carman et al. 1988; Chowdhury et al. 1991; Ozgen et al. 1996; NouriDelavar and Arzani 2000). اما استفاده از قطعات برگی حاصل از جوانه‌زنی بذرهای خشک دارای مزایای متعددی است که از جمله می‌توان به سهولت کار و قابل دسترس بودن آن در تمام طول سال اشاره کرد (Yu et al. 2008). غالباً برای تولید بافت کالوس از محیط کشت MS استفاده می‌شود و ساکارز یا گلوکز به عنوان منبع قند به کار می‌رود (Farsi and Zolali 2008). تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای معمولاً مشکل‌تر از گیاهان دولپه‌ای صورت می‌گیرد، به همین دلیل برای القاء و تشکیل کالوس، نیاز به اضافه کردن تنظیم کننده های رشد مصنوعی می‌باشد (Ichihashi and Kato 1986). باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مرفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی و فیزیولوژیک گیاه نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (Hagio et al. 2002). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه دارد. به‌طور کلی قسمت‌های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در این خصوص در تمام ارقام وجود دارد (Bhaskaran and Smith 1990). علاوه بر عوامل فیزیولوژیکی، بسیاری از ژن‌های کنترل‌کننده صفت باززایی در گندم، برنج، جو و سایر گونه‌های گیاهی بررسی شده است که بیانگر کنترل ژنتیکی صفات پاسخگو به کشت بافت می‌باشد (Ben Amer et al. 1999). به‌طور کلی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به توانایی باززایی از کالوس متفاوت می‌باشد. بسیاری از محققان وجود این امر ناشی از تفاوت ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های داخلی گیاه و تفاوت‌های حساسیت به تنظیم کننده های رشد مصنوعی مورد استفاده و شرایط محیطی گیاه اعلام نموده‌اند (Luica et al. 1997; Tarinejad et al. 2007; Mendoza and Kaeppler et al. 2002). تعدادی ژن در کنترل باززایی ژنوتیپ‌های گندم، مؤثر است (Ben Amer et al. 1999). بررسی‌ها نشان می‌دهد پاسخ ارقام بومی گندم نسبت به ارقام اصلاح‌شده به القای کالوس و باززایی بیشتر است (Hunsinger and Schauz 1987). در تحقیقی ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲-۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین به عنوان بهترین ترکیب هورمونی برای القای کالوس معرفی شده است (Liu et al. 1990). در تحقیق دیگر، قابلیت القاء و باززایی از کالوس در ۸۴ لاین گندم سیمیت مورد بررسی و تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود (Fennell et al. 1996). در آزمایشی از کشت جنین رسیده برای کالوس‌زایی در گندم استفاده شده و نشان داده شده که بیشترین میزان کالوس‌زایی ۸۸/۳۳٪ در محیط کشت MS دارای 2,4-D ۴mg/l و NAA ۱mg/l به دست می‌آید (Turhan and Baser 2003). در پژوهشی دیگر کالوس‌زایی و باززایی ۴۷ ژنوتیپ گندم از ریزنمونه جنین‌رسیده مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی، کارایی کشت و ظرفیت باززایی بین ارقام وجود داشت (Zale et al. 2004). تعداد ۱۰۷ واریته گندم نان از نظر فراوانی القای کالوس و توانایی باززایی بررسی و مشاهده شد که ژنوتیپ‌های دارای واکنش بهتر به محیط کشت

کالوس‌زایی، برای باززایی و انتقال ژن بهتر است (Machii et al. 1998). این پژوهش‌ها نشان می‌دهد اکثر محققین از جنین بالغ به عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده نموده‌اند ولی باززایی ارقام با استفاده از ریزنمونه جنین بالغ همیشه پایین بوده است. بنابراین، در تحقیق حاضر واکنش چهار رقم گندم نان بـه کشـت قطعات برگی (کولئوپتیل) ازنظر القای کالوس و باززایی در سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکینین مورد بررسی قرار گرفت. هدف دیگر انجام این آزمایش، ارائه پروتکل کارآمد برای کشت بافت و ریز ازدیادی چهار رقم گندم و فراهم کردن ابزار کارآمد برای مطالعه انتقال ژن و دست‌ورزی ژنتیکی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت، در دورنمای آینده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. بذور چهار لاین گندم به نام-های (C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. پس از ضدعفونی بذور با الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۲۵٪ همراه با ۱ قطره توین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه، در مرحله‌ی آخر این بذور سه بار متوالی به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه با آب مقطر دو بار استریل زیر هود لامینار شستشو داده شدند. سپس روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا آب سطحی آن‌ها کاملاً خشک شوند. سپس برای جوانه‌زنی به محیط MS ½ در شیشه مربا منتقل شدند. وقتی‌که اندازه گیاهچه به ۱۰-۵ سانتی‌متر رسید (شکل ۱)، کلئوپتیل به‌اندازه ۲-۱ سانتی‌متر از بخش ساقه جدا و به قطعات ۲-۱ میلی‌متری برش داده شدند. سپس این قطعات در محیط ML1G1 (Ahmadabadi et al. 2007)، (حاوی ویتامین‌ها و نمک‌های N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز با اسیدیته ۵/۸) برای القا کالوس قرار گرفتند. در هر پتری دیش که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، تعداد ۹ ریزنمونه کشت گردید. سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته قرار داده شدند. بعد از شکل‌گیری کالوس‌ها، تعداد کالوس‌های تولید شده در هر پتری‌دیش شمارش و درصد کالوس‌زایی برای هر لاین و هر تیمار به‌طور جداگانه محاسبه گردید. در مرحله بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد ، تکثیر و تولید کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت مشابه ML1C2 (Ahmadabadi et al. 2007)، با این تفاوت که حاوی دو سطح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره بود واکشت شدند (شکل ۱). نیترات نقره، به عنوان ممانعت کننده اثر اتیلن، بر تقسیم و تمایز سلولی مؤثر است. دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه به محیط باززایی ML1R3 (Ahmadabadi et al. 2007)، انتقال داده شدند. محیط کشت‌های استفاده شده برای باززایی، محیط کشت MS و N6 بودند. که هرکدام شامل شش محیط کشت متفاوت بودند (جدول ۱).

بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمارگردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آغاز باززایی، کالوس‌های تغییر رنگ داده به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاهچه وجود داشته باشد. شاخه‌های باززا شده به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر، جهت تولید و توسعه‌ی ریشه‌ها، به محیط کشت MS فاقد هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگار سازی انتقال داده شدند (شکل ۱).

جدول ۱- انواع محیط کشت باززایی مورد استفاده برای ریزنمونه قطعات برگی گندم
Table1-Type of regeneration media used for wheat coleoptile segment explants

محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد
MS(1)	بدون هورمون	MS(4)	2 mg/l KIN + 0.5 mg/l NAA	N6(1)	0.5 mg/l BAP	N6(4)	0.5 mg/l KIN
MS(2)	1 mg/l IAA + 1 mg/l BA	MS(5)	2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA	N6(2)	2 mg/l BAP	N6(5)	2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
MS(3)	1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	MS(6)	2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA	N6(3)	2 mg/l KIN + 0.5 mg/l NAA	N6(6)	1 mg/l IAA + 1 mg/l BA

درصد کالوس‌زایی با استفاده از رابطه ۱ و درصد باززایی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوسهای تولید شده}}{\text{تعداد قطعات کلوپتیل کشت شده}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوسهای باززا شده}}{\text{تعداد کالوسهای انتقال داده شده}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

نتایج و بحث

شکل ۱ مراحل مختلف کشت بافت، القاء کالوس و باززایی را در گندم نشان می‌دهد. چند روز بعد از اینکه ریزنمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی (ML1G1) قرار گرفتند شروع به کالوس‌زایی کردند (شکل ۱). در دو هفته اول رشد کالوس‌ها خیلی کم بود و بعد از دو هفته کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. به طوری که بیشترین رشد کالوس بین هفته‌های پنجم و ششم رخ داد. کالوس‌های حاصله از نظر ساختار متراکم، ترد و دارای سطح ناصاف بودند و از لحاظ رنگ کرم تا کرم مایل به زرد (به دلیل قرارگیری در شرایط تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند. در آزمایش (Mendoza and Kaeppler 2002)، جنین‌های بالغ بعد سه روز و در آزمایش (Chen et al. 2006)، بعد از دو یا سه روز و در آزمایش (Yu et al. 2008)، بعد از سه روز شروع به کالوس-زایی کردند.

تأثیر غلظت توفوردی بر القای کالوس‌زایی قطعات برگی

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد توفوردی نشان داد که بین چهار لاین گندم، سطوح مختلف هورمون توفوردی، اثر متقابل لاین × سطوح مختلف هورمون از نظر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل، بالاترین میزان کالوس‌زایی را لاین C-D-9 و لاین C-D-8 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی داشتند و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به لاین C-D-4 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود. در لاین C-D-9 با تغییر سطوح هورمون توفوردی از ۲ به ۳ میلی‌گرم در لیتر، تغییر معنی‌داری در کالوس‌زایی ایجاد نشد. در حالی که در لاین C-D-4 با افزایش غلظت هورمون توفوردی از ۲/۴ به ۳ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی حاصل شد. در ژنوتیپ C-D-8 برعکس لاین C-D-4، افزایش غلظت هورمون توفوردی از ۲/۴ به ۳ منجر به کاهش معنی‌داری در میزان کالوس-زایی شد. بطور کلی، لاین C-D-9 از توان کالوس‌زایی بالاتری نسبت به سایر لاین‌ها برخوردار بود و در بین تیمارهای مختلف هورمونی، سطح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی نسبت به سایر سطوح در اکثر لاین‌ها به کشت بافت بهتر پاسخ نشان‌داده است (شکل ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف توفوردی و لاین‌های گندم بر روی درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه قطعات کولئوپتیل
Table 2- Variance analysis of 2, 4-D different levels and cultivar on callus induction from coleoptile segment explants

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد کالوس‌زایی
توفوردی	۲	۲/۷۷**
لاین	۳	۴۹/۵۶**
لاین× توفوردی	۶	۳/۸۳**
خطا	۲۴	۰/۳۷۵
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۲/۴۵

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.
ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

شکل ۱- مراحل کشت و القا کالوس و باززایی گیاه گندم از ریزنمونه قطعات برگی.A: گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط استریل روی محیط MS B.۱/۲: برگ‌های زیر کلئوپتیل برای القا کالوس به قطعات ۲-۱ میلی‌متری تقسیم و کشت شدند. C: القا کالوس از قطعات برگ روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. D: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از قطعات برگ روی محیط ML1C2. E: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. F: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از قطعات برگ در محیط ML1R3. H و I: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. J: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. K: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

Figure 1- Different stage of culture, callus induction and regeneration from wheat coleoptile explants.
a) Growth of seedling under sterile condition on ½ MS media b) Leaves under coleoptile divided into 1-2 mm segments for culture c) callus induction from coleoptile segments on ML1G1 media after 5 weeks from culture. d) proliferation of embryogenic callus obtained from coleoptile segments on ML1G2 media e) Magnification view from embryogenic callus f) Magnification view from non embryogenic callus g) Shoot induction from embryogenic callus on ML1R3 media h&i) Magnification view of shoot resulted from embryogenic callus j) plantlet transfer to shoot induction media k) seedling transfer to sterile soil for accumulation to the environment.

شکل ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام گندم در سطوح مختلف غلظت هورمون توفوردی

Figure 2 –Mean comparisons of cultivar*2,4-D on callus induction percent

در پژوهشی درگیاه گندم از جنین بالغ، میانگره و بخش‌های محور سنبله به عنوان ریزنمونه و از محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی استفاده نمودند و نتایج نشان داده که کالوس‌زایی به ژنوتیپ ارقام مورد استفاده بستگی دارد. همچنین این محققین نشان دادند حضور اکسین در محیط القاء کالوس ضروری است (O'Hara and Street 1978). در مطالعه‌ای که بر روی کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ گندم صورت گرفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۸۶/۶۷٪ و در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی،۸۷/۸۶٪ و در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۸۵٪ به دست آمد (Bi et al. 2007). در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی درصد کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ بین ۹۶/۲۰–۶۸/۷۵٪ متغیر بود (Bi and Wanh 2008). در آزمایش دیگری از ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی برای القای کالوس استفاده کردند و مشاهده شد که درصد کالوس‌زایی در گندم زراعی بین ۸۵–۸۲٪ و در گندم دوروم بین ۷۹–۷۷٪ می‌باشد (Chauhan et al. 2007). در پژوهشی دیگر مشخص شد که نوع ترکیبات محیط کشت MS و برش طولی (نصف کردن) جنین گندم رسیده در باززایی مؤثر است. ۷۰٪ القای کالوس اولیه در تمام ارقام مورد آزمایش در محیط کشت حاوی ۲mg/l توفوردی به دست آمد (Yu and Wei 2007).

اثر نیترات نقره (AgNO3) بر القاء کالوس جنین‌زا

تجزیه واریانس فاکتوریل داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی دو سطح نیترات نقره و چهار رقم گندم نشان داد که بین لاین‌های گندم از نظر کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر سطوح مختلف نیترات نقره (AgNO3) و ارقام گندم بر روی کالوس‌زایی بر روی ریزنمونه قطعات کولئوپتیل

Table 3- Factorial variance analysis of AgNO3 and cultivar different levels on callus induction from coleoptile segment explants

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی
نیترات نقره (AgNO3)	۱	۰/۴۲۲۷ns
لاین	۳	۲۸/۳۸**
لاین× نیترات نقره (AgNO3)	۳	۱/۳۶*
خطا	۱۶	۰/۳۴۷
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۱/۲۴

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.

ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

نیترات نقره، به عنوان ممانعت کننده‌ی اثر اتیلن، بر تقسیم و تمایز سلولی مؤثر است. در این بررسی حضور مؤثر نیترات نقره بر کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل لاین در نیترات نقره تائید شد. با این حال، به نظر می‌رسد این اثر نیز به ژنوتیپ گیاه وابسته است. در حالی که افزایش نیترات نقره در محیط کشت کالوس‌زایی بر لاین C-D-9 بی‌تأثیر و در لاین‌های C-D-8 و C-D-6 تأثیر منفی داشته ولی باعث افزایش کالوس‌زایی در لاین C-D-4 شده است. بیشترین میزان کالوس‌زایی در سطح ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره از لاین C-D-9 به دست آمد. بطورکلی در اکثر لاین‌ها، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره با میانگین (۵۹/۷۱٪) بود (شکل ۳). نیترات نقره از طریق رقابت در ایجاد پیوند با جایگاه اتصال اتیلن از عمل آن جلوگیری می‌کند. بنابراین باعث تحریک تشکیل کالوس، کالوس‌های جنین‌زا و افزایش باززایی می‌شود (Songstad et al. 1991). همچنین آثار مثبت نیترات نقره روی ژنوتیپ‌های مختلف ذرت (Vain and Dunl 1989) و گندم (Fernandez et al. 1999) نیز گزارش شده است.

شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف گندم در سطوح مختلف غلظت نیترات نقره (AgNO3)

Figure 3 – Mean comparison of cultivar*$AgNO_3$ media on callus induction percent

تاثیر انواع محیط کشت بر توان باززایی کالوس‌های حاصل از قطعات برگی

برای بررسی اثر انواع محیط کشت در توانایی باززایی لاین‌ها، ابتدا ریزنمونه‌های قطعات برگی آن در محیط کشت حاوی ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی کشت شدند و بعد از تولید کالوس، کالوس‌ها به دو نوع محیط کشت پایه مطابق جدول ۱ (MS و N6) که هرکدام شامل شش محیط کشت باززایی متفاوت بودند منتقل گردیدند. بعد از شش هفته درصد شاخه‌زایی در محیط کشت ثبت گردید. با بررسی داده‌های به‌دست‌آمده از این دو نوع محیط کشت پایه مشخص شد که بین محیط‌های کشت و لاین و اثرمتقابل لاین و محیط کشت از نظر درصد باززایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۴).

تأثیر محیط کشت MS بر باززایی کالوس‌های جنین‌زا لاین‌های مختلف گندم

باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۴). بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BA به میزان (۲۲/۲۲٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l IAA+ 1 mg/l BA و mg/l BAP 0.5 mg/l IAA+2 به میزان (۳/۷٪) بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌های مختلف گندم بر روی باززایی بر روی ریزنمونه قطعات برگی
Table 4- Factorial variance analysis of media and lines different levels on regeneration from coleoptile segment explants

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۱۱	۵/۳۳ **
لاین	۳	۳/۵۴ *
لاین× محیط کشت	۳۳	۰/۴۳۱ ns
خطا	۹۶	۱/۰۶۲
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۷/۶۵

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.
ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BA به میزان (۱۸/۵۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l IAA+ 1 mg/l BA و 0.5 mg/l IAA+2 mg/l BAP بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم کننده رشد و محیط کشت پایه MS حاوی mg/l 1mg/l NAA+2 BAP به میزان (۱۴/۸۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l IAA+ 1 mg/l BA و mg/l 0.5 mg/l IAA+2 mg/l BAP و 0.5 mg/l NAA+2 KIN به میزان (۳/۷٪) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BA به میزان (۲۵/۹۵٪) و کمترین باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد و محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l IAA+ 1 mg/l BA به میزان (۷/۴٪) بود. بطورکلی، بیشترین میزان باززایی دراکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-4 و کمترین میزان باززایی در اکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-6 بود (شکل ۴).

شکل ۴- مقایسه میانگین درصد باززایی ارقام مختلف گندم در محیط کشت‌های مختلف MS

Figure 4 – Mean comparison of cultivar*MS media on regeneration percent

تأثیر محیط کشت N6 بر باززایی لاین‌های گندم

باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۴)که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (Sears and Decard 1982; Mathias and Simpson 1986; Przetakiewicz et al. 2003; Tarinejad et al. 2007). مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاوی 1mg/l BA+1 mg/l IAA به میزان (۲۹/۶۲٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l KIN بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l NAA+2 mg/l BAP و 0.5 mg/l NAA+2 به میزان (۱۸/۵۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l BAP و 0.5 mg/l KIN بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l NAA+2 mg/l KIN به میزان (۱۴/۸۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l BAP و 0.5 mg/l KIN بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l NAA+2 mg/l KIN به میزان (۲۵/۹۵٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l KIN بود. در نهایت، بیشترین میزان باززایی در محیط کشت N6 مربوط به لاین C-D-9 و کمترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 می‌باشد. همچنین برای اکثر لاین‌ها بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l NAA+2 mg/l KIN با میانگین (۲۰/۰۴٪) و کمترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاوی0.5 mg/l KIN بود (شکل ۵).

شکل۵– مقایسه میانگین اثرمتقابل ارقام مختلف گندم در محیط کشت مختلف N6 روی درصد باززایی

Figure 5 – Mean comparison of cultivar*N6 media on callus induction percent

مقایسه دو به دو محیط کشت‌های مشابه MS با N6 در باززایی ارقام گندم

محیط کشت‌های MS(2) و N6(6) حاوی mg/l IAA ۱+ mg/l ۱BA و محیط کشت‌های MS(4) و N6(3) حاوی mg/l NAA ۰/۵+ mg/l Kin ۲ و محیط کشت‌های MS(6) و N6(5) حاوی mg/l BAP۱ +mg/l NAA۱ از نظر درصد باززایی مورد مقایسه قرار گرفتند.

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت‌ها با لاین‌ها نشان داد که محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS از توان باززایی بهتری برخوردار است. در نتیجه محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS پاسخ بهتری به القای باززایی از خود نشان داده است (شکل ۶).

شکل ۶- مقایسه میانگین دو به دو درصد باززایی ارقام مختلف گندم در محیط کشت مختلف N6 و MS

Figure 6 – Mean comparison of regeneration percent on wheat cultivar in MS and N6 media

در آزمایشی جنین‌زایی و باززایی گیاهچه‌های سبز گندم را بر اساس قطعات برگی از گیاهچه‌های ۳-۳ روزه در بین ژنوتیپ‌های مختلف بررسی و نتیجه گرفتند در بین محیط کشت‌ها، محیط کشت MS نسبت به محیط N6 و L3 از نظر القاء کالوس و تولید گیاهچه بهتر عمل نمودند. همچنین این محققین نتیجه گرفتند فراوانی تشکیل کالوس بعلاوه فراوانی باززایی گیاهی وابسته به ترکیب محیط کشت و غلظت توفوردی است. محیط کشت MS با ۴/۵۹ میکرو مول بر لیتر توفوردی برای کشت قطعات برگی گندم مطلوب بود. افزودن غلظت توفوردی از ۴/۵۹ به ۳۶ میکرو مول روی القاء کالوس اثر مثبت داشت ولی مانع باززایی گیاه می‌شد (Wang and Wei 2004). با وجود این، در این آزمایش محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS از توان باززایی بهتری برخوردار بود. در مطالعه‌ای، اثرات ژنوتیپ، نوع محیط کشت پایه، غلظت هورمون‌های توفوردی و BAP، همچنین غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) را در القای کالوس و باززایی آن در کشت درون‌شیشه‌ای جنین بالغ ۵ رقم گندم را بررسی کردند، این محققین مشاهده کردند که محیط کشت پایه MS در تمامی رقم‌ها نسبت به محیط کشت LS پاسخ بهتری به القای کالوس و باززایی نشان می‌دهد و در غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، تمامی رقم‌ها در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر آگار، پاسخ بهتری به باززایی نشان دادند و در غلظت مختلف توفوردی بیشترین درصد القای کالوس برای رقم‌ها متفاوت بوده و بین ژنوتیپ‌ها و غلظت هورمون اثرات متقابل وجود داشت. در مطالعه‌ای از دو نوع محیط کشت پایه‌ی MS (موراشگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) و LS (چو و همکاران، ۱۹۷۵) در کشت بافت گندم استفاده شد که محیط کشت پایه‌ی MS بهتر از LS به کشت بافت پاسخ داد (Mehmood et al. 2013). بنابراین با توجه به بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت محیط کشت مناسب و هورمون مورد استفاده بسته به ژنوتیپ و شرایط محیط کشت می‌تواند متفاوت باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش، با در نظر گرفتن تعدادی از فاکتورهای مهم از قبیل اهمیت غذایی و بومی بودن واریته‌های گندم، ریزازدیادی تعدادی از لاین‌های گندم در دست معرفی کشور از قبیل C-D-8، C-D-6، C-D-4 و C-D-9 بررسی و کالوس‌زایی و باززایی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. باتوجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل لاین‌ها و سطوح مختلف هورمون توفوردی نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در لاین C-D-9 در تمام سطوح مختلف هورمون توفوردی رخ داده و در لاین C-D-8 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی رخ

داده که در این دو لاین باهم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و باتوجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سطوح مختلف نیترات نقره با لاین‌های مورد استفاده نشان داد که بیشترین میزان کالوس جنین‌زا در لاین‌های C-D-9 وC-D-8 مشاهده شد. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲٪ برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱mg/l IAA به همراه ۱mg/l BA به دست آمد.

منابع

Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (Zea mays L). Transgenic Research 16(4): 437-448**.**

Ben Amer LM, Korzum V, Worland AJ, Borber A .1999. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. Theoretical Applied Genetic 94: 1047-1052.

Bhaskaran S, Smith RH. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review, Crop Science 30: 1328-1336.

Bi R, Wanh H. 2008. Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. Front. Agric. China 2(3): 262-265.

Bi RM, Kou M, Chen LG, Mao SR, Wang HG. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding 126: 9-12.

Bushuk W. 1998. Wheat breeding for end product use. Euphytica 100(1): 137-145

Carman JG, Jefferson NE, Campbell WF. 1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 101-106.

Chauhan H, Desai SA, Khurana P. 2007. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 191-199.

Chen J, Yue R, Xu H, Chen X. 2006. Study on Plant Regeneration of Wheat Mature Embryos Under Endosperm- Supported Culture. Agricultural Sciences in China 5(8): 572-578.

Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y, Hayashi K. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars. Jpn. J. Breed 41: 443-450.

Farsi M and Zolali J. 2008. Introduction to Plant Biotechnology. Translate. 4th Edition. Ferdowsi University of Mashhad. 495 pp.

Fennel S, Bohorova N, Ginkel M, Crossa J, Hoisington DA. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theoretical Applied Genetic 92: 163–169.

Fernandez S, Michaux-Ferriere N MC. 1999. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Dsef): histology and improvement by AgNO3. Plant Growth Regulation 28: 147-155.

Hagio T, Ichiri SS, Yamada T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat, In Vitro Cell Developmemt Biology 38: 1394-1396.

Hunsinger H, Schauz K. 1987. The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 98: 119-123.

Ichihashi S, Kato S. 1986. Clonal Propagation of Iris kaempferi by means of flower organ culture. Bulltein Aichi University Edu 35: 135-143.

Kazemi Arbath H. 2005. Cereal morphology and physiology. Tabriz University Publication: 104

Liu HJ, Misso SH, Kamijima O, Sawano M. 1990. Effects of plant growth regulators on the response of immature wheat embryo culture. Plant Tissue Culture Letters 7: 170-176.

Luica A, Felix FI, Federizzi LC, Lange CE, Handel L. 1997. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Brazilian Journal of Genetics 15: 473-479.

Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H, Hagio T. 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures" Plant cell, Tissue and Organ Culture 53: 67-74.

Mathias R J, Simpson ES. 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7(1): 31-37.

Mehmood K, Arsshad M, Muhammad Ali G, Razzaq A. 2013. Tissue culture responses of some wheat

(*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Pakistan. Pakistan Journal Botany 45: 545-549.

Mendoza M G, Kaeppler H F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38: 39-45.

NouriDelavar MZ, Arzani A. 2000. Analysis of callus induction and plant regeneration from immature embryo of rice cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 4(4): 57-71.

O'Hara JF, Street HE. 1978. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. Annals of Botany 42: 1029-1038.

Ozgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding 115: 4555-458.

Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 245-256.

Sears RG, Decard EL. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Science 22: 546-550.

Songstad DD, Armstrong CL, Petersen WL. 1991. AgNO3 increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Report 9(12): 699-702.

Tarinejad A, Toorchi M, Habashi A, Pellegrineschi A. 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food Agriculture and Environment, 5(3&4): 237-241.

Tripathi L, Tripathi J. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal ofPharmaceutical Research, 2: 243-253.

Turhan H, Baser I. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences 73: 399-401.

Vain P, Dunl V. 1989. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO3. Plant cell Tissue and Organ Culture 18: 143-151.

Wang CT, Wei ZM. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 149-156.

Yu Y, Wang J, Zhu ML, Wei ZM. 2008. Optimization of mature embryobased high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding 127: 249-255.

Yu Y, Wei ZM. 2007. Factors affecting efficient plant regeneration from wheat mature embryos. Journal of Molecular Cell Biology 40(6): 443-450.

Zale MJ, Harmony BW, Kimberlee KK, Camille MS. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 277-281.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۲۲-۱۱۳

شناسایی و تعیین توالی ژن مربوط به آنتی پورتر هیدروژن/ سدیم از غشای پلاسمایی گیاه *Kochia scoparia L.*

Characterization and sequence of a hydrogen/sodium anti-porter gene in the plasma membrane of the plant *Kochia scoparia*

ناهید نیکخواه[۱]، لیلا فهمیده*[۲]، زیبا فولادوند[۳]

Nahid Nikkhah[1], Leila Fahmideh[2*] and Ziba Fooladvand [3]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و [۲]استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
[۳]مربی پژوهشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل

1, M.Sc. 2, Assistant Professor of Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol,
3, Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Leila.fahmideh@yahoo.com و l.fahmideh@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۸)

چکیده

یکی از راهکارهای گیاهان برای کاهش مقدار سدیم سیتوزولی، دفع سدیم به خارج سلول است. این دفع خارج سلولی، مانع از اثرهای سمی سدیم در فرآیندهای سلولی سیتوزول می‌شود. ناقل‌های سدیم/هیدروژن غشای پلاسمایی (SOS_1) یکی از بهترین پروتئین‌های درگیر در این فرآیند هستند. در این پژوهش از گیاه دولپه و شورزی *Kochia scoparia* به عنوان منبع برای جداسازی ژن استفاده شد. بر همین اساس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در مناطق حفاظت شده در گیاهان دیگر، طول تقریبی ۳۶۰۰ نوکلئوتیدی و به تبعیت از آن توالی ۱۲۰۰ اسیدآمینه‌ای از توالی کدکنندهٔ این ژن شناسایی و تعیین توالی شد. میزان شباهت این توالی در سطح نوکلئوتیدی با حداکثر ۸۴ درصد همولوژی و در سطح اسیدآمینه‌ای ۹۲ درصد با استفاده از بررسی BLAST تأیید شد. تجزیه و تحلیل‌های بعدی برای تعیین خصوصیات پروتئینی و ارتباط آن با پروتئین‌های دیگر با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک انجام شد و نتایج نشان داد که منطقه حاوی مارپیچ‌های آلفای آبگریز به عنوان قطعهٔ گذرنده از غشای پلاسمایی است و در مقابل آن دنبالهٔ با تعداد کمتر مارپیچ‌های آلفای و خاصیت آبدوستی به عنوان قطعهٔ داخل سلولی پروتئین می‌باشد. این نتایج نقش دفع سدیم توسط ناقل‌های غشای پلاسمایی را برای وجود واکنش مقاومت به شوری در گیاه کوشیا تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن،
شوری،
کوشیا،
ناقل‌های غشای پلاسمایی

مقدمه

شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولید محصولات کشاورزی است (Amjad *et al.*, 2008). براساس نتایج بررسی‌های به عمل آمده ۲۰ الی ۳۰ درصد زمین‌های تحت آبیاری جهان به طور نامطلوبی تحت تأثیر شوری قرار دارند (Mott and Wang, 2007) شوری زیاد صدمات جبران ناپذیر فیزیولوژیکی از جمله کاهش پتانسیل اسمزی، کاهش گسترش برگ، کاهش فتوسنتز، بسته‌شدن روزنه‌ها، اختلال در جذب یون‌های ضروری مانند پتاسیم و کلسیم و اثرها سمی بر روی غشاها و سیستم‌های آنزیمی گیاهان عالی ایجاد می‌کند (Sangam *et al.*, 2005; Munns, 2000). یک سری مطالعات سیستماتیک برای ژن‌های مقاوم به شوری، ناشی از غربالگری ژنتیکی در مؤسسهٔ ژئو انجام شد (Wu *et al.*, 1996; Liu and Zhu, 1997; Zhu *et al.*, 1998). پژوهش‌ها نشان داد، بعد از شبیه‌سازی توالی بر اساس نقشه و همچنین تجزیه و تحلیل عملکردها، در میان پنج پروتئین SOS، ژن‌های SOS_1, SOS_2, SOS_3 در مسیر سیگنالی کاهش میزان ورود سدیم که از راهکارهای حفظ پتاسیم نسبت به سدیم در گیاهان تحت تنش شوری است، دخالت دارند (Zhu, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005). در مسیر SOS، پروتئین متصل‌شونده به کلسیم یا SOS_3، سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. SOS_3 پروتئین SOS_2 را فعال کرده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌کند تا فسفریلاسیون ترانسپورتر سدیمی SOS_1 توسط کمپلکس SOS_2/SOS_3 فراهم شود (Qiu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1998). SOS_1، از پروتئین‌های بزرگ غشای سلولی با وزنی به اندازه‌ی ۱۲۷ کیلو دالتون است که در آرابیدوپسیس گزارش شده است (Wu *et al.*, 1996). در انتهای C- ترمینال، SOS_1 (درناحیهٔ ۸۴۹-۷۴۶) یک نوکلئوتید حلقوی و در ناحیهٔ ۱۱۴۶-۹۹۸ یک دمین خود تنظیم‌کننده وجود دارد. در حالت استراحت دمین خود تنظیمی با توالی بالادست که شامل محل اتصال نوکلئوتید حلقوی است تعامل برقرار می‌کند. دمین خود تنظیمی مکان هدفی برای فسفوریلاسیون توسط SOS2 است. پس از فسفوریلاسیون SOS1 دمین خود تنظیمی از مکان بالادست رها شده و فعالیت حمل و نقل آن زیاد می‌شود (Shi *et al.*, 2000; Brett *et al.*, 2005; Quan *et al.*, 2007; Quintero *et al.*, 2002). بر اساس مقایسهٔ توالی SOS_1 با پروتئین‌های دیگر و دمین‌های کروی پیش‌بینی شده سه ناحیه در این پروتئین وجود دارد. انتهای N- ترمینال که از ۴۴۰ اسیدآمینه تشکیل شده است و به صورت ۱۲ مارپیچ آلفای محافظت شدهٔ گذرنده از غشای هیدروفوب، حفرهٔ غشایی را تشکیل می‌دهد. اسید-آمینه‌های منطقهٔ ۱۹۰-۱۵۵ که در گروه‌های مختلف شامل مارپیچ‌های آلفای ششم و هفتم است به عنوان محل اتصال برای یون سدیم می‌باشد (Guo *et al.*, 2004; Masser, 2001). دم بلند سیتوپلاسمی هیدروفیل در منطقهٔ C- ترمینال از ۷۰۰ اسیدآمینه تشکیل شده است، که در این انتها یک ناحیهٔ ۳۰۰ اسیدآمینه‌ای از ۷۴۰-۴۴۰ وجود دارد که بصورت کروی شکل است و این ناحیه شباهت یا همولوژی زیادی با NHX8 نشان می‌دهد (Guo *et al.*, 2004). در ادامه از اسیدآمینهٔ ۱۱۴۶-۷۴۰ یک توالی منحصر به فرد است و همسانی قابل توجهی به هر پروتئین دیگری به جز SOS_1 نشان نمی‌دهد. پیش‌بینی می‌شود که ناحیهٔ ۱۱۴۶-۴۴۱ بعنوان ناحیه‌ای برای فسفریلاسیون توسط SOS_2 کیناز محسوب می‌شود (Guo *et al.*, 2004). علاوه بر این SOS_1 نیز در تحمل به تنش اکسیداتیو ایفای نقش می‌کند. دخالت SOS_1 در پاسخ به تنش اکسیداتیو از طریق تعامل با RCD_1، که یک پروتئین مهم برای پاسخ به گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS است، امکان پذیر است. طبق گزارشات در انتهای C- ترمینال SOS_1 دو ناحیه موجود در اسیدآمینه‌های ۸۰۶-۴۴۰ و ۱۱۰۳-۹۳۶ برای تعامل با RCD_1 مهم هستند (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). از آنجایی که گیاهان هالوفیت قادر به رشد و تحمل شرایط شوری بالا هستند، می‌توانند به عنوان بهترین ابزار جهت درک اساس مولکولی

آنتی‌پورترها به شمار آمده و نقش احتمالی آنها را در مقاومت به شوری آشکار سازند (Chinnusamy *et al.*, 2005). کوشیا (*Kochia scoparia* L. Schard) گیاهی دو لپه، علفی و با متابولیسم C_4 از گیاهان خانواده چغندریان (Fischer *et al.*, 2000) وگونه‌ای بسیار متحمل به شوری (Lamsal *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 1996) و از هالوفیت‌های دفع‌کنندهٔ نمک است که در برخی طبقه-بندی‌ها جزء هالوفیت‌های اختیاری قلمداد شده و منبع خوبی از علوفه را در شرایط آبیاری با آب شور فراهم می‌کند (Sherrod, *et al.*, 1971). قابل ذکر است که این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی در مجامع بین المللی از جمله در کشور کره جنوبی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات از میوه‌های این گیاه در فرآیندهای مربوط به سیستم ایمنی و تأثیرگذاری آن از طریق غیر فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF_KB استفاده شده است (Kafi, *et al.*, 2010؛Soleimani *et al.*, 2008). اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین هدف مبتنی بر ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. بنابراین گیاهان شورزیست می‌توانند به عنوان مدل‌های طبیعی بخش اصلاح مولکولی در سایر گیاهان استراتژیک باشند. لذا گیاه کوشیا می‌تواند به عنوان یکی از منابع جدید برای ژن‌های مقاومت به شوری مطرح شود تا بتوان با بدست آوردن توالی ژن‌های آنتی‌پورتر غشای پلاسمایی موجود در این گیاه، راه را برای استفاده هر چه بیشتر از توانایی این گیاه فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: بذرهای گیاه *Kochia scoparia* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و به گلخانه پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، منتقل و پس از انجام ضد عفونی سطحی، بذرها در ماسه شسته کشت شدند. ۴۵ روز پس از کشت به منظور افزایش سطح ترانسکریپتوم پاسخ دهنده به شوری در گیاه، تیمار شوری ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم اعمال شد و سپس گیاهان تیمار شده جهت استخراج RNA برداشت شدند.

طراحی آغازگرها: توالی‌های ژن SOS در سایر گیاهان در پایگاه داده‌های بین المللی NCBI جمع‌آوری شد. توالی آغازگرها، با استفاده از بسته‌های نرم افزاری DNA STAR (EditSeq, Meg- Align, MapDraw; Version 5.00) و GENE DOC (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility Version 2.5.000)، طراحی شدند (جدول ۱)، محل طراحی این آغازگرها به صورتی در نظر گرفته شده است که ژن مورد نظر به صورت دو قطعه جدا از هم و دارای مناطق همپوشان جداسازی شود.

استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن K.S. SOS۱: طبق دستورالعمل کیت شرکت دنازیست آسیا انجام شد. ابتدا صد میلی‌گرم بافت گیاه در یک هاون چینی در داخل ازت مایع به خوبی خرد و با یک میلی‌لیتر بافرG1 یا بافر اسیدی (حاوی گوانیدین تیوسیانات، سدیم استات)، به خوبی مخلوط شد. میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میلی‌لیتر بافر G1 حاوی بافت اضافه و بعد از مخلوط شدن در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ، فاز بالایی که حاوی RNA بود به لولهٔ اپندورف جدیدی منتقل شد. ایزوپروپانول سرد به بافر G2 (کلرید لیتیم و اتانول ۹۶٪ است)، اضافه شد و بعد از مخلوط کردن و انکوباسیون در دمای اتاق، سانتریفوژ به منظور رسوب RNA در ته لوله انجام شد. بعد از شستشوی رسوب مورد نظر با اتانول ۷۵ درصد، و خشک شدن آن به میزان ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. جهت تعیین کیفیت و کمیت RNA از روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر استفاده شد. در مرحله بعد سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت Gene All، جدول (۲) و آغازگرهای برگشتی مربوط به هرقطعه انجام شد.

جدول ۱- اسامی ، توالی آغازگرهای طراحی شده برای جداسازی ژن SOS1 از *K.scoparia*.

Table1- Name and sequences of primer designed for SOS1 gene isolation from *K.scoparia* .

Name primer	Sequences primer
P.SOS.S.FWD1	5'-ATGGCAGCATCTCGAA-3'
P.SOS.S.REV1	5'-AGAAAACAAACAATGTT-3
P.SOS.S.FWD2	5-ACTGGAACACTGTTT-3
P.SOS.S.REV2	5-CCGTTTGATATAAGCCA-3
P.SOS.S.FWD3	5-CAAATGGGATCTGGCT-3
P.SOS.S.REV3	5-GAGATTACTTGGTGAATC-3

جدول ۲- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشتی طراحی شده.

Table 2: Reagents and volume for cDNA synthesis using by reverse primer designed.

حجم مواد Volume	اجزاء واکنش Reagents
۳ میکرولیتر	Total RNA (۱۰۰نانوگرم)
۰/۵ میکرولیتر	Specific Primer (۱۰میکرومولار)
۰/۵ میکرولیتر	dNTP (۱۰ میلی‌مولار)
۱ میکرولیتر	10X RTase reaction buffer
۱ میکرولیتر	DTT (۰/۱ میلی‌مولار)
۰/۵ میکرولیتر	HYPER Script TM Reverse Trans criptase 200u/ µl
۰/۵ میکرولیتر	Zym ALL^{TM} RNase inhibitor
۳ میکرولیتر	Nuclease free water

جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژن SOS1 در گیاه *K.scoparia*.

Table3: Reagents PCR for amplification of SOS1 gene in *K.scoparia*.

حجم مواد Volume	اجزاء واکنش Reagents
۰/۵ میکرولیتر	Forward primer
۰/۵ میکرولیتر	Revers primer
۱ میکرولیتر	cDNA Template
۱۲/۵ میکرو لیتر	Master Mix (Red BioRun)
تاحجم ۲۵ میکرولیتر	Nuclease free water

cDNA سنتز شده، به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای مورد نظر برای هر رشته در نظر گرفته شد، جدول(۳). شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و طویل سازی ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲درجه و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. قطعات بدست آمده با طول مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت دنا زیست جداسازی و تعیین توالی به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های *In silico*: بعد از اعلام توالی، سرهم بندی قطعات مورد نظر با استفاده از نقاط همپوشان و توسط نرم افزار SEQman موجود در بسته نرم افزاری DNA STAR انجام شد. این توالی‌ها با شماره‌های مربوط در پایگاه NCBI ثبت شده‌اند و در زمان مقرر قابل دسترسی می‌باشند.

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی درخت فیلوژنتیکی به روش ClustalW، توسط نرم افزار meg align موجود در بسته نرم افزاری DNA STAR انجام شد. تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه به روش SOPMA و برای ساختار سوم به روشSWISS model به صورت آنلاین توسط سرور http:// www.expasy.org صورت پذیرفت.

بررسی نمودار راماچاندران مرتبط با توالی اسیدآمینه‌ی ژن K.S.SOS با استفاده از سرویس آنلاین با آدرس http:cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/DIHED2 صورت گرفت. ساختار هیدروپاتی، جهت سنجش میزان هیدروفیل و هیدروفوب بودن قسمت‌های مختلف ساختار پروتئین پیش‌بینی شده برای ژن K.S.SOS با استفاده از Pepwindow موجود در سرور http://www.ebi.ac.uk به دست آمد. پیش بینی شبکه پروتئینی نیز با استفاده از مدل‌سازی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با آدرس اینترنتی http://www.stringdb.org انجام شد.

نتایج و بحث

اهداف ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. یکی از این نمونه‌های بارز گیاهان شورزیست هستند که می‌توانند به عنوان مدل‌های طبیعی مقاومت به شوری مورد مطالعه قرار بگیرند، از آنجایی که یکی از عوامل مقاومت به شوری در گیاهان شورزیست مکانیسم‌هایی است که در آن، سدیم اضافی به خارج از سلول رانده می‌شود و عامل موثر در این روند آنتی‌پورترهای غشای پلاسمایی است، لذا با شناسایی این ژن در این گیاه و توالی‌یابی آن می‌توان در جهت بهره برداری هرچه بیشتر از آن در مسیرهای مقاومت به شوری استفاده کرد.

واکنش تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از آغازگرهای دژنره و نمونه cDNA برگ به عنوان الگو منجر به تکثیر قطعه‌های با اندازه‌های مورد انتظار شد (شکل ۱). قطعه DNA بدست آمده پس از استخراج از روی ژل، تعیین توالی شد. تجزیه و تحلیل هم ردیفی با استفاده از امکانات برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) موجود در پایگاه داده‌ای NCBI در سطح نوکلئوتیدی انجام شد (جدول ۲) این نتایج نشان می‌دهد، ژن مورد بررسی، همولوژی بالایی در سطح DNA و اسید آمینه با ژن‌های همتای خود در گونه‌های گیاهی دیگر دارد. بر این اساس در سطح نوکلئوتیدی دارای حداکثر ۸۴ درصد همولوژی با گونه‌های مورد نظر است و در سطح پروتئینی دارای حداکثر ۹۲ درصد تشابه با گونه‌های مورد نظر است (نتایج نشان داده نشده است).

به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، تجزیه و تحلیل کلاستر توالی آمینواسیدی (شکل۲)، با سایر گونه‌ها انجام شد. بر این اساس مشخص شد، ژن مورد بررسی ارتباط نزدیکی با ژن‌های همتای خود در گونه‌های دولپه و موجود در خانواده Chenpodiaceae دارد و از گونه‌های حساس به شوری جدا می‌باشد.

شکل ۱- تکثیر cDNA با طول مورد انتظارbp ۱۲۰۰، مربوط به ناحیه کد کننده آنتی پورتر غشای پلاسمایی با استفاده از آغازگرهای ویژه و نمونه برگ در گیاه *K. scoparia*، نشانگر مولکولی مورد استفاده، DNA Ladder 100bp شرکت BIORON است. الف: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD1 /P.SOS.S.REV1 ب: ترکیب آغازگر / P.SOS.S.FWD2 P.SOS.S.REV2 ج: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD3/P.SOS.S.REV3 د : ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD4/P.SOS.S.REV4.

Figure1- cDNA amplification with expected length 1200bp, for coding sequences of plasma membrane antiporter with specific primer and leaf tissue from *K. scoparia*.DNA ladder100bp BIORON Company. a: P.SOS.S.FWD1/P.SOS.S.REV1, b: P.SOS.S.FWD2/P.SOS.S.REV2, c: P.SOS.S.FWD3/P.SOS.S.REV3,d: P.SOS.S.FWD4/P.SOS.S.REV4.

جدول ۴- نتایج تجزیه و تحلیل هم ردیفی ژن SOS1 جداسازی شده از *K. scoparia* با استفاده از برنامه BLAST.

Table 4- Results aligment using by BLAST program for SOS1 gene isolated from *K.scoparia*.

Number	Plants sp.	Identity
۱	*Salicornia dolichostachya*	%۸٤
۲	*Salicornia brachiata*	%۸٤
۳	*Suaeda japonica*	%۸۳
٤	*Suaeda salsa*	%۸۲
٥	*Beta vulgaris*	%۸۰
٦	*Spinica oleraceae*	%۸۱
۷	*Sesuvium portulacastum*	%۷۹
۸	*Mesemebryanthemum*	%۷۷
۹	*Vitis vinifera*	%۷۷
۱۰	*Populus trichocarpa*	%۷٦
۱۱	*Populus eupharatica*	%۷٦

شکل۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده توالی پروتئینی ژن آنتی‌پورتر غشای پلاسمایی(SOS1) جداسازی شده از *K.scoparia* با گونه‌های گیاهی مختلف با استفاده از نرم افزار Meg Align به روش Cluster W. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰در نظر گرفته شد.

Figure 2- Phylogenic tree based on amino acid sequences of plasma membrane antiporter (SOS1) isolated from *K.scoparia* used of me align (Cluster W). nucleotide sub situation*100.

با بررسی نمودار راماچاندران برای توالی پروتئینی مورد بررسی آشکار شد که بیشتر زوایای پیوندی در ربع پایین سمت چپ و ربع بالا سمت چپ دیده شده است که به ترتیب مربوط به ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحات بتا می‌باشد. که با توجه به ساختارهای دوم پیش‌بینی شده این زوایا تایید شده‌اند. با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینواسیدی مشخص شد که در پلی‌پپتید مورد بررسی، ۴۳ درصد مارپیچ آلفا، ۲۹درصد ساختار پیچ کوچک و ۱۷درصد ساختار صفحات بتا و۸ درصد پیچ بتا در کل پلی پپتید مورد نظر وجود دارد. از طرفی برای تعیین نواحی گذرنده از غشا که به صورت مارپیچ‌های آلفا در پروتئین‌های مشابه به این پروتئین هستند، تجزیه و تحلیل هیدروپاتی انجام شد و در شکل (۳) به نمایش در آمد. در این شکل همان‌طور که مشاهده می‌شود، نواحی گذرنده از غشا بصورت نواحی مارپیچی و با هیدروفوبیسیتی بالاتر دیده می‌شوند و دم C- ترمینال که دارای هیدروفوبیسیتی پایین‌تری است و دارای چندین مارپیچ کوچک هستند، میزان هیدروفوبیسیتی آنها پایین‌تر از مارپیچ‌های موجود در غشای پلاسمایی است. در انتهای N- ترمینال این پروتئین ۱۲ مارپیچ آلفا وجود دارد که در ناحیه مارپیچ‌های ششم و هفتم به سدیم باند می‌شود. و در انتهای C- ترمینال نواحی فسفریلاسیون توسط SOS_2 و تعامل با RCD_1 وجود دارد.

مدل‌سازی شبکه پروتئینی برای ژن شناسایی شده با استفاده از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا انجام شد، شکل (۴) برای این شبکه پروتئینی پیشنهاد شد. در این شبکه پروتئینی چندین گروه پروتئینی مهم به چشم می‌خورد، اولین گروه از این پروتئین که در مجاورت پروتئین مورد نظر ما هستند، (K^+ efflux antiporter) (KEA) هستند که در بیرون راندن K^+ نقش ایفا می‌کنند، این همکاری به این دلیل وجود دارد که در سلول‌ها همواره تنظیم میزان سدیم درون سلول همراه با تنظیم میزان پتاسیم درون سلولی است (Chanroj *et al.*, 2012). گروه دوم پروتئینی موجود در این شبکه پروتئینی گروه (CAX (Cation /proton exchanger هستند، که در روندهای مربوط به انتقال کاتیون/پروتون نقش دارند، چون تنظیم تعادل سدیم سلولی به همراه تنظیم تعادل سایر کاتیون‌ها به عنوان یک تعادل پایدار عمل خواهد کرد (Shigaki *et al.*, 2006)

شکل ۳- نمودار هیدروپاتی پروتئین پیشگویی شده مربوط به ژن K.S.SOS۱ جداسازی شده از *K. scopari*

Figure3- Hydropathy plot of predicted plasma membrane antiporter protein in *K. Scoparia*

مدل‌سازی شبکه پروتئینی برای ژن شناسایی شده با استفاده از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا انجام شد، شکل (۴) برای این شبکه پروتئینی پیشنهاد شد. در این شبکه پروتئینی چندین گروه پروتئینی مهم به چشم می‌خورد، اولین گروه از این پروتئین که در مجاورت پروتئین مورد نظر ما هستند، (K^+ efflux antiporter) (KEA) هستند که در بیرون راندن K^+ نقش ایفا می‌کنند، این همکاری به این دلیل وجود دارد که در سلول‌ها همواره تنظیم میزان سدیم درون سلول همراه با تنظیم میزان پتاسیم درون سلولی است (Chanroj *et al.*, 2012). گروه دوم پروتئینی موجود در این شبکه پروتئینی گروه (Cation /proton exchanger) CAX هستند، که در روندهای مربوط به انتقال کاتیون/پروتون نقش دارند، چون تنظیم تعادل سدیم سلولی به همراه تنظیم تعادل سایر کاتیون‌ها به عنوان یک تعادل پایدار عمل خواهد کرد (Shigaki *et al.*, 2006). پروتئین مهم دیگر در این شبکه پروتئینی ارائه شده، SOS_2 (Salt overly sensitive) می‌باشد که دومین پروتئین در آبشار SOS برای تنظیم انتقال سدیم در غشای سلولی است و به عنوان یک پروتئین کینازی برای تغییر فسفریلاسیون پروتئین SOS_1 در سلول مطرح است (Jiping *et al.*, 2000)، دخالت SOS_1 در پاسخ به تنش اکسیداتیو از طریق تعامل با RCD_1، که یک پروتئین مهم برای پاسخ به گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS است امکان‌پذیر است.

شکل ۴- شبکه پروتئینی پیشنهاد شده برای ژن K.S.SOS جداسازی شده از *K. scoparia* با استفاده از مدلسازی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا.

Figure4- Protein network proposed for K.S.SOS gene isolated from *K.scoparia* using by modeling in *Arabidopsis thaliana*

طبق گزارشات در انتهای C-ترمینال SOS_1 دو ناحیه موجود در اسیدآمینه‌های ۸۰۶-۴۴۰ و ۱۱۰۳-۹۳۶ برای تعامل با پروتئین RCD_1 مهم هستند، که در این شبکه پروتئینی به نمایش در آمده‌اند Hiltscher (*et al.*, 2014).

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش لازم به ذکر است، که کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی نیاز به منابع پایه ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد دارد. بنابراین اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین این هدف نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. با توجه به این که تحمل گیاهان شورزی نسبت به تنش شوری از گلیکوفیت‌ها و گیاهان خویشاوند زراعی بیشتر است، این گیاهان می‌توانند به عنوان منابع طبیعی به نژادی مولکولی جهت انتقال ژن‌های تحمل به شوری به گیاهان زراعی به کار روند.

منابع

Amjad H, Shazia N, Tahira I, Hina S, Ahsanul M. 2008. Effect of NaCL salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Journal Of Botany Pakestan* 40(3): 1043-105.

Brett CL, Donowitz M, Rao R. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal Physiology Cell*, 288, C223–C239.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sciences* 45: 437-448.

Chanroj S, Wang G, Venema K, Zhang MW, Delwiche CF, Sze H. 2012. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/h (+) antiporters from algae to flowering plants. Frontiers Plant Science.14; 3:25.

Fischer AJ, Messersmith CG, Nalewaja JD, Duysen ME. 2000. Interference between spring cereals and Kochia scoparia related to environment and photosynthetic pathway. *Agronomy Journal* 92: 137-181.

Guo Y, Qiu QS, Quintero FJ, Pardo JM, Ohta M, Zhang C, Schumaker KS, Zhu JK. 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16:435–449.

Hiltscher H, Rudnik R, Shaikhali J, Heiber I, Mellenthin M, Meirelles Duarte I, Schuster G, Kahmann U, Baier M. 2014. The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes. Frontiers Plant Science 23; 5:475.

JK Z . 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion Plant Biology* 4:401–406.

Jiping Liu, Manabu Ishitani, Ursula Halfter, Cheol-Soo Kim, and Jian-Kang Zhu. 2000. The Arabidopsis thaliana SOS_2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. PNAS, 97 (7):3730–3734.

Kafi M, Asadi H, Ganjeali A. 2010. Possible utilization of high salinity waters and application of low amounts of water for production of the halophyte *Kochia scoparia* as alternative fodder in saline agro ecosystems. *Agriculture Water Manage* 97: 139-147.

Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, Agarwal M, Fu X, Huang A, Zhu JK. 2006. The plasma membrane Na?/H? antiporter SOS_1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. . *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18816–18821.

Lamsal K, GN Paudyal, Saeed M. 1999. Model for assessing impact of salinity on soil water availability and crop yield. *Agriculture Water Manager* 41:57-70.

Liu J, Zhu JK. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* 114:591–596.

Madrid J, Hernandez F, Pulgar MA, Cid JM. 1996. Nutritive value of Kochia scoparia L. and ammoniated barley straw for goats. *Small Ruminant Research* 19: 213-218 .

Mott IW, Wang RRC. 2007. Comparative transcriptome analysis of salt tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Science*, 173: 327-339.

Munns R . 2000. Comparative p hysiology of salt and water stress: *Plant Cell Environment*, 25: 239-250.

Qiu Q S, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Regulationof SOS_1,aplasma membrane Na+/H+ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proceedings National Academy Science USA*, 99: 8436–8441.

Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y. 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS_2 to protect

Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell* , 19: 1415–1431.

Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM. 2002. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na? homeostasis. *Proceedings National Academy Science USA* , 99:9061–9066.

Sangam S, Jayasree D, Janardhan K. 2005. Salt tolerance in plant transgenic approaches: *Plant Biotechnology*, 7:1-15.

Sherrod L B. 1971. Nutritive value of Kochia scoparia. I. yield and chemical compostion at three stages of maturity. *Agronomy Journal* 63: 343-344.

Shigaki T, Rees I, Nakhleh L, Hirschi KD. 2006. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. Journal Molecular Evolution 63(6):815-25.

Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS_1 encodes a putative Na+/H+ antiporter . *Proceedings National Academy Science USA*, 97: 6896–6901.

Soleimani MR, Kafi M, Ziaee M, Shabahang J. 2008. Effect of limited irrigation with saline water on forage of two local populations of *Kochia scoparia* L. Schrad. *Journal Agriculture Science Technol* 22: 307-317.

Wu SJ, Lei D, Zhu JK. 1996. SOS_1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8:617–627.

Zhu JK, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis. evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181–1191.

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

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۳۰-۱۲۳

ارزیابی سه ژن مرجع جهت نرمال سازی داده های Real-time PCR در ریشه گندم تحت تنش شوری

Evaluation of three reference genes for Real-time PCR normalization in wheat root under salt stress

فاطمه ملکی[۱]، رضا فتوت[۲*]، محمدرضا عظیمی[۲]، فرید شکاری[۲] و زهرا السادات شبر[۳]

Fatemeh Maleki[1], Reza Fotovat[2*], Mohamad Reza Azimi[2], Farid Shekari[2] and Zahra Sadat Shobbar[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات،

۲- عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

1. M.Sc, 2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan,. Iran.
3. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), karaj, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۴ - تاریخ پذیرش:۹۵/۶/۲۶)

چکیده

پژوهش‌های بیان ژن با استفاده از Real-time PCR ابزار قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل سازوکارهای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان بشمار می‌رود. یکی از مراحل مهم استفاده از این روش انتخاب و اعتبارسنجی ژن‌های مرجع بمنظور نرمال کردن بیان ژن‌های هدف تحت شرایط مختلف تنش می‌باشد. بمنظور انتخاب ژن مرجع مناسب در پژوهش‌های ریشه گندم تحت تنش شوری، پایداری بیان سه ژن معروف *GAPD*، *Actin* و*Ta.22845* با استفاده از نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper و مقایسه مقادیر ΔCT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن *Actin* مناسب‌ترین ژن مرجع برای نرمال سازی بیان ژن‌های ریشه گندم تحت تنش شوری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

گندم،
تنش شوری،
ژن‌های خانه‌دار،
ژن کنترل داخلی،
بیان ژن

مقدمه

بمنظور تأمین غذای انسان در دو دهه آینده افزایش تولیدی بین ۷۰ الی ۱۱۰درصد در محصولات کشاورزی لازم است (Tilman *et al.*, 2011). در کنار روش‌های به‌زراعی، اصلاح برای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی از مهمترین راه‌های افزایش عملکرد بشمار می‌رود (Fita *et al.*, 2015). رشد و تولید محصول در گندم نیز همانند سایر گیاهان تحت تأثیر تنش‌های غیر زیستی بخصوص شوری و خشکی می‌باشد (Munns *et al.*, 2012). متأسفانه با وجود تمامی تلاش‌های پژوهشگران موفقیت چندانی در زمینه افزایش عملکرد گندم تحت تنش‌های غیر زیستی حاصل نشده است که ناشی از کمی بودن این صفت و وجود اثر متقابل ژنوتیپ در محیط است (Araus *et al.*, 2002).

تغییر در بیان ژن‌ها از مهمترین اتفاقاتی است که در سلول های گیاهی تحت تنش روی می‌دهد و منجر به پاسخ‌های بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی در برابر تنش می‌شود. در سال‌های گذشته بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها بعنوان یکی از ابزارهای مهم در جهت اصلاح برای مقاومت به تنش در گیاهان بکار رفته است (Yousfi *et al.*, 2016). روش‌های مختلفی به‌منظور بررسی بیان ژن وجود دارد با این حال ابداع Real-time PCR انقلابی را در حوزه بررسی بیان ژن در موجودات زنده بوجود آورد. مهمترین مزیت این روش اختصاصی بودن و حساسیت بالای آن است (Pabinger *et al.*, 2014). در روش کمیت سنجی نسبی Real-timePCR کاهش یا افزایش بیان ژن، نسبت به ژن مرجع که به‌طور معمول یک ژن خانه‌دار (housekeeping gene) است مورد بررسی قرار می‌گیرد و لزومی به دانستن تعداد کپی‌های دقیق ژن در نمونه‌ها نیست (Brunner *et al.*, 2004).

تاکنون ژن‌های خانه‌دار زیادی مثل *ACT*، *GAPDH*، *18SrRNA*، *25SrRNA*، *UBQ*، *UBC*، *EF1A* و *TUB* معرفی شده است که در بررسی بیان ژن‌ها در شرایط گوناگون از جمله در تنش‌های زیستی و غیر زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sinha *et al.*, 2015). ژن مرجعی که برای نرمال کردن نتایج Real-time PCR استفاده می‌شود بایستی دارای بیان پایدار در سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط متفاوت آزمایشگاهی باشد. بنابراین موفقیت در بررسی بیان ژن، به انتخاب ژن‌های کنترل داخلی مناسب وابسته است.

پژوهش‌ها نشان داده است که سطوح رونوشت ژن‌های خانه‌دار نیز به طور قابل ملاحظه‌ای تحت برخی شرایط مختلف آزمایشی مانند تنش‌های غیرزیستی یا حتی مراحل مختلف نموی گیاه تغییر می‌کند (Paolacci *et al.*, 2009). اثر تنش‌های مختلف غیرزیستی در عدم پایداری ژن‌های خانه‌دار *TUBULIN1* و *18S rRNA* در چای (Ma *et al.*, 2016)، *GAPDH* در هویج (Tian *et al.*, 2015)، *ELF1a* در نخود (Reddy *et al.*, 2016)، *b-tubulin*، *18S rRNA* و *Actin* درسیب زمینی (Nicot *et al.*, 2005) نشان داده شده است. بررسی منابع نشان می‌دهد که بیان برخی ژن-های خانه‌دار در گندم نیز در مرحله پرشدن دانه (Wu *et al.*, 2015)، بیماری (Li *et al.*, 2014; Scholtz and Visser, 2013) و تنش دمائی در مراحل نمو گندم (Paolacci *et al.*, 2009) تغییر می‌کند.

در این پژوهش پایداری بیان دو ژن خانه‌دار معروف *GAPDH* ، *Actin* و نیز ژن جدید *Ta.22845* (Paolacci *et al.*, 2009) در ریشه گیاه گندم تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. اکتین (Actin) پروتئینی محافظت شده با فراوانی بالا در سلولهای یوکاریوتی است. پلیمریزه شدن و دِپلیمریزه شدن رشته‌های اکتینی فرآیندی بسیار تخصصی، قابل تنظیم، فضائی و آنی بوده و این توانایی را به سلول‌ها می‌دهد که در مقابل محرک‌ها و یا پیام‌های خارجی سریع تغییر شکل داده و ساختار اسکلت سلولی خود را تغییر دهند (Huang *et al.*, 2012). تارهای اکتینی در سلولهای جانوری بیشتر به منظور حرکت و تغییر شکل سلول‌ها به کار می‌رود در حالی که در سلول¬های گیاهی

این تارها نقش مهمی را در جریانات سیتوپلاسمی تقسیم، توسعه و نمو سلول به عهده دارد (Tang *et al.*, 2015). گلیسر آلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) آنزیم کلیدی در چرخه گلیکولیز بوده و کار آن تبدیل گلیسر آلدئید ۳ فسفات (G3P) به ۳،۱ بی‌فسفات گلیسرات می‌باشد (Zeng *et al.*, 2016). ژن *Ta.22845* رمز کننده زیر واحد پروتئوزومی ۲۶ اس می‌باشد. پروتئوزوم ۲۶ اس یک مجموعه پیچیده چند زیر واحدی است که بعنوان مهمترین پروتئاز غیر لیزوزیمی در سلولهای یوکاریوتی شناخته می‌شود و نقش مهمی در تجزیه پروتئین‌ها دارد (Ferrell *et al.*, 2000). نظر به فعالیت‌های حیاتی این سه ژن انتظار بر این است که بیان پایداری در سلولهای گیاهی داشته باشند

مواد و روش‌ها

بذر گندم رقم بم (متحمل به شوری) از بخش غلات (موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر) تهیه شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار زیستی (و دو تکرار تکنیکی در بخش ملکولی) در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان اجرا شد. تنش شوری دو سطح شامل مقادیر ۰ و ۱/۵ گرم کلریدسدیم در کیلوگرم خاک (با هدایت الکتریکی به ترتیب برابر با ۲/۳ و ۱۰ دسی‌زیمنس) اعمال شد. بافت خاک شامل نسبت ۱:۲ از خاک و ماسه بود. آبیاری با آب معمولی، به صورت وزنی و با توجه به ظرفیت زراعی خاک انجام شد. پس از سبزکردن، تغذیه‌ی گیاهان با کود کامل، به صورت محلول ۰/۲ درصد در آب آبیاری، با فواصل زمانی یک روز انجام گرفت. ریشه‌ها ۲۵ روز پس از کاشت، از گلدان خارج و شسته شدند. پس از جدا کردن بخش هوایی، ریشه‌ی گیاه به نیتروژن مایع منتقل شد.

استخراج RNA کل از بافت ریشه با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، ایران) و سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer (مدل NANODROP 2000 ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام گرفت. به منظور از بین بردن آلودگی DNA، از آنزیم DNaseI، بافر و محلول EDTA (Thermo USA, SCIENTFIC) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد.

ساخت cDNA طی واکنش رونویسی معکوس با کیت 2-steps RT-PCR (Vivantis, Malaysia) انجام شد. جهت تامین دماهای ذکر شده در راهنمای کیت، از دستگاه ترموسایکلر iCycler (مدل ۸۸۳۱-۱۷۰ ساخت شرکت BIORAD) استفاده شد.

توالی ژن‌های مورد نظر از سایت NCBI اخذ و آغازگرهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار OLIGO طراحی شدند (جدول۱). آغازگرهای ژن‌های خانه‌دار به صورت پودر خشک از شرکت تکاپوزیست خریداری شد. با افزودن مقدار آب توصیه شده، غلظت آغازگرها به ۱۰۰ پیکومول رسید، سپس با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از آن، محلول کاری ۱۰ پیکومول با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد.

به منظور بررسی پایداری بیان ژن‌های خانه‌دار، داده‌های به دست آمده از Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper تجزیه شدند. به منظور بررسی پایداری بیان توسط نرم‌افزار Normfinder ابتدا بایستی داده‌های حاصل از میزان بیان یا به عبارتی Ctهای مربوط به هر ژن مرجع (cycle threshold) با استفاده از رابطه‌ی ΔCt و فرمول $2^{-\Delta Ct}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل شوند (Zhu *et al.*, 2013). در نرم‌افزار BestKeeper از مقادیر Ct مربوط به هر ژن استفاده می‌شود و انحراف استاندارد (SD) و ضریب تغییرات (CV) محاسبه می‌شود (Pfaffl *et al.*, 2004).

جدول۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های مرجع مورد استفاده در Real-time PCR

Table 1. Details of reference genes primers used for Real-time PCR analysis

Tm (°C)	Primer sequence		Gene description	Accession number	Gene symbol
59.4	5'-GCTGGCTCGTTCAACTGATG	Forward	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	HG670306.1	*Ta.22845*
60.3	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC	Reverse			
60.3	5'-GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG	Forward	Actin	AB181991.1	*Act*
60.3	5'-GTACCACACAATGTCGCTTAGG	Reverse			
59.8	5'-CTAACTGCCTTGCTCCTCTTG	Forward	Glyseraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)	HG670306.1	*GAPDH*
58.4	5'-CTTGGAATGATGTTGAAGCTGG	Reverse			

نتایج

منحنی‌های ذوب نشان دهنده اختصاصی بودن تکثیر ژن-های مورد بررسی بود (شکل۱). عدم وجود پیک اضافی حاکی از نبود پرایمر دایمر و نیز عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی است و دلیلی بر طراحی صحیح آغازگرهای مورد استفاده نیز می‌باشد. میزان بیان سه ژن مورد بررسی در نمونه‌ها متفاوت بود و دامنه Ct های محاسبه شده از ۲۰/۰۸ تا ۴۰/۰۴ متغیر بود (شکل۲). ژن *Ta.22845* بیشترین تغییرات و ژن *Actin* کمترین تغییرات را در تمامی نمونه‌ها نشان دادند.

نتایج تجزیه با نرم‌افزار BestKeeper

نرم‌افزار BestKeeper انحراف استاندارد (SD) و ضریب تغییرات (CV) را بر مبنای مقادیر Ct برای هر ژن مرجع تعیین می‌کند (Pfaffl et al., 2004). ژن‌های دارای SD بزرگتر از یک، قابل قبول نیستند (Migocka and Papierniak, 2010). در این روش ژن‌های مرجعی که کمترین انحراف استاندارد و ضریب تغییرات (CV±SD) را نشان دهند بیان پایدارتری دارند (Chang et al., 2012). این نرم‌افزار شاخص BestKeeper را بر اساس میانگین هندسی ژن‌های مرجع، محاسبه و پایداری ژن‌ها را بر مبنای ضریب همبستگی با شاخص BestKeeper تعیین می‌کند (Pfaffl et al., 2004). بر اساس نتایج تجزیه با نرم‌افزار BestKeeper بیشترین میزان تغییرات مربوط به *Ta.22845* و کمترین میزان تغییرات مربوط به *Actin* بود (جدول۲).

جدول۲- رتبه بندی ژن‌های خانه‌دار مورد آزمایش در ریشه گندم تحت تنش شوری با استفاده از الگوریتم BestKeeper

Table 2. Ranking of tested housekeeping genes for salt stress conditions in wheat root using BestKeeper algorithms.

CV± SD	Gene	Ranking
0.82 ± 0.32	Actin	1
16.76± 4.84	*GAPDH*	2
21.66± 6.68	*Ta.22845*	3

شکل۱- منحنی ذوب ژن‌های کاندید

Figure 1. Melting curve for the candidate reference genes

شکل۲- مقادیر Ct ژن‌های کاندید در تمام نمونه‌های ریشه گندم

Figure 2. Ct values of candidate reference genes in all wheat root samples.

در نتایج حاصله از این نرم‌افزار فاصله پایداری *Actin* نسبت به دو ژن دیگر تفاوت فاحشی داشت. به طور کلی در نتایج بدست آمده توسط هر دو نرم‌افزار، ژن *Ta.22845* دارای بیشترین تغییرات و ناپایدارترین بیان بود. در حالی که بر اساس نتایج یک آزمایش که در ۲۴ نمونه‌ی مورد مطالعه‌ی گندم صورت گرفت این ژن در تمامی بافت‌ها و تیمار اعمال شده سرما به عنوان پایدارترین ژن معرفی شده است (Paolacci *et al.*, 2009).

نتایج تجزیه با نرم‌افزار Normfinder

نرم‌افزار NormFinder یک برنامه کاربردی نوشته شده با ویژوال بیسیک بر پایه اکسل می‌باشد که بمنظور تعیین پایدارترین ژن‌های خانه‌دار بکار می‌رود (Chang *et al.*,

2012). در این نرم‌افزار واریانس بین و درون گروه‌های ژن‌های مرجع محاسبه و پایداری بیان آن‌ها توسط ارزشی به‌نام M محاسبه می‌شود. ژن‌های با ارزش M کمتر دارای پایداری بیشتر هستند. محاسبات بعمل آمده با این نرم-افزار، ژن *GAPDH* را با ارزش پایداری ۱/۰۷۷ بعنوان پایدارترین ژن معرفی کرد. ژن‌های *Actin* و *Ta.22845* نیز به ترتیب از نظر پایداری در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (جدول۳).

جدول۳– رتبه بندی ژن‌های خانه‌دار مورد آزمایش در ریشه گندم تحت تنش شوری با استفاده از الگوریتم Normfinder

Table 3. Ranking of tested housekeeping genes for salt stress conditions in wheat root using Norm Finder algorithms

Stability value	Gene	Ranking
1.077	*GAPDH*	1
3.175	Actin	2
3.439	*Ta.22845*	3

بحث

گرچه امروزه روش‌های با کارائی بالا مانند تکنولوژی ریزآرایه (Microarray) و تکنیک‌های نسل جدید توالی یابی (NGS) با قابلیت ارزیابی هزاران ژن بطور همزمان در مطالعات بررسی بیان ژن‌های دخیل در ایجاد تحمل به تنش در گیاهان بکار می‌روند (Mwadzingeni *et al.*, 2016)، با اینحال روش Real-time PCR با وجود محدودیت در تعداد ژن مورد بررسی، بعلت تکرارپذیری، حساسیت و اختصاصی بودن، کاربرد زیادی در بررسی بیان ژن‌ها و همچنین اعتبار سنجی سایر روش‌های با کارائی بالا دارد (Reddy *et al.*, 2016). کارائی و اعتبار کاربرد روش کمیت سنجی نسبی Real-time PCR در پایداری ژن‌های خانه‌داری است که برای نرمال‌سازی نتایج بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک بررسی نشان داده است که در مقالات چاپ شده با کاربرد روش کمیت سنجی نسبی توسط Real-time PCR، در بیش از ۹۰درصد موارد تنها از یک ژن خانه‌دار استفاده شده است و انتخاب ژن‌های مرجع موردنظر نیز بدون اعتبارسنجی آن‌ها بوده است (Kozera and Rapacz, 2013). این موضوع نشان می‌دهد که با وجود مزیت‌های ذکر شده برای کاربرد روش کمیت سنجی نسبی در Real-time PCR، استفاده از ژن‌های خانه‌دار ناپایدار ممکن است منجر به بروز اشتباهات زیادی در اندازه‌گیری ژن‌های هدف شود (Kozera and Rapacz, 2013; Nicot *et al.*, 2005). بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش دو ژن *GAPDH* و *Actin* در رده اول و دوم رتبه بندی پایداری ژن‌ها به ترتیب توسط نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper قرار گرفتند. از میان این دو ژن، *Actin* را به دلیل داشتن واریانس کمتر را می‌توان بعنوان ژن مرجع مطلوب جهت نرمال سازی بیان ژن‌های هدف در مطالعات بیان نسبی با استفاده از Real-time PCR در آزمایش‌های ریشه گندم تحت تنش شوری پیشنهاد کرد. پایداری ژن‌های *GAPDH* و *Actin* تحت تنش‌های خشکی و شوری در خرما (V. Patankar *et al.*, 2016)، ریشه و برگ هویج (Tian *et al.*, 2015) و چای (Ma *et al.*, 2016) نیز نشان داده شده است و برای آزمایش‌های مربوط به بیان ژن در تنش شوری در این گیاهان توصیه می‌شود. با اینحال تنش‌های غیر زیستی سرما و شوری در سیب‌زمینی (Nicot *et al.*, 2005) وسرما در گندم (Paolacci *et al.*, 2009) موجب تغییر بیان ژن *Actin* شده است. همچنین نتایج پژوهشگران نشان داده است که بیان ژن‌های *GAPDH* و *Actin* در تنش‌های غیر زیستی در گیاه ارزن وحشی (*Setaria viridis*) تغییر می‌یابد (Martins *et al.*, 2016). میزان پایداری ژن خانه‌دار *GAPDH* حتی در مراحل مختلف نموی جو تغییر کرده است (Rapacz *et al.*, 2012). به احتمال زیاد این امر با این امکان که ژن‌های خانه‌دار در سایر فعالیت‌های سلولی نیز سهیم هستند تا حدودی قابل تفسیر باشد (Hancock *et al.*, 2005; Kamal *et al.*, 2012; Komatsu *et al.*,

2014). این نتایج بخوبی نشان می‌دهد که تنها با بررسی منابع نمی‌توان ژن خانه‌دار مناسب را برای مطالعه مورد نظر انتخاب نمود و میزان پایداری آن‌ها بایستی قبل از استفاده در کمیت سنجی نسبی مورد ارزیابی قرار گیرد. در بعضی موارد که انتخاب یک ژن خانه‌دار بعلت تفاوت در نتایج رتبه‌بندی نرم‌افزارها و یا تفاوت کم در شاخص-های پایداری مشکل است می‌توان بیش از یک ژن مرجع انتخاب نموده و داده‌های بیان ژن هدف را با استفاده از از میانگین هندسی ژن‌های خانه‌دار نرمال کرد (Vandesompele *et al.*, 2002).

منابع

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For? Annals of Botany 89(7):925-940.

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biology 4(14).

Chang EM, Shi SQ, Liu JF, Cheng TL, Xue L, Yang XY, Yang WJ, Lan Q, Jiang ZP. 2012. Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) Using Real-Time PCR. Plos One 7(3).

Ferrell K, Wilkinson CRM, Dubiel W, Gordon C. 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences 25(2):83-88.

Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O. 2015. Breeding and Domesticating Crops Adapted to Drought and Salinity: A New Paradigm for Increasing Food Production. Frontiers in Plant Science 12(6):978.

Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, Hughes J, Neill SJ. 2005. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry 43(9):828-835.

Huang Y-C, Huang W-L, Hong C-Y, Lur H-S, Chang M-C. 2012. Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of *OsADF3* confers *Arabidopsis Thaliana* drought tolerance. Rice 5(1):33.

Kamal AHM, Cho K, Kim D-E, Uozumi N, Chung K-Y, Lee SY, Choi J-S, Cho S-W, Shin C-S, Woo SH. 2012. Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. Molecular biology reports 39(9):9059-9074.

Komatsu S, Kamal AHM, Hossain Z. 2014. Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation. Frontiers in Plant Science 5(684).

Kozera B, Rapacz M. 2013. Reference genes in real-time PCR. Journal of Applied Genetics 54(4):391-406.

Li Y, Chen W, Wang Q, Wang N, Wu YF. 2014. Assessment of reference genes for quantitative real-time PCR gene expression normalization in periwinkle during Wheat Blue Dwarf phytoplasma infection. Australasian Plant Pathology 43(4):477-485.

Ma QP, Hao S, Chen X, Li XH. 2016. Validation of reliability for reference genes under various abiotic stresses in tea plant. Russian Journal of Plant Physiology 63(3):423-432.

Martins PK, Mafra V, de Souza WR, Ribeiro AP, Vinecky F, Basso MF, da Cunha B, Kobayashi AK, Molinari HBC. 2016. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in Setaria viridis. Scientific Reports 6(28348).

Migocka M, Papierniak A. 2010. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Molecular Breeding(28):343–357.

Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M. 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na^+ transporter gene. Nature biotechnology 30(4):360-364.

Mwadzingeni L, Shimelis H, Dube E, Laing MD, Tsilo TJ. 2016. Breeding wheat for drought tolerance: Progress and technologies. Journal of Integrative Agriculture 15(5):935-943.

Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journa of Experimental Botany 56(421):2907–2914.

Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Biomolecular Detection and Quantification 1(1):23-33.

Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M. 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecular Biology 10(11).

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample

Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(50):20260-20264.

V. Patankar H, M. Assaha DV, Al-Yahyai R, Sunkar R, Yaish MW. 2016. Identification of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Subjected to Drought and Salinity. Plos One 11(11).

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3(7).

Wu D, Dong J, Yao YJ, Zhao WC, Gao X. 2015. Identification and evaluation of endogenous control genes for use in quantitative RT-PCR during wheat (*Triticum aestivum* L.) grain filling. Genetics and Molecular Research 14(3):10530-10542.

Yousfi S, Márquez AJ, Betti M, Araus JL, Serret MD. 2016. Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. Journal of Integrative Plant Biology 58(1):48-66.

Zeng L, Deng R, Guo Z, Yang S, Deng X. 2016. Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*). BMC Genomics 17(240).

Zhu J, Zhang L, Li W, Han S, Yang W, Qi L. 2013. Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in Caragana intermedia under Different Abiotic Stress Conditions. PLos One 8(1).

integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26(6):509-515.

Rapacz M, Stepien A, Skorupa K. 2012. Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. Acta Physiologiae Plantarum 34(5):1723-1733.

Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS, Cindhuri KS, Ganesh AS, Sharma KK. 2016. Identification and Validation of Reference Genes and Their Impact on Normalized Gene Expression Studies across Cultivated and Wild Cicer Species. Plos One 11(2).

Scholtz JJ, Visser B. 2013. Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology 81:22-25.

Sinha P, Saxena RK, Singh VK, Krishnamurthy L, Varshney RK. 2015. Selection and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) under Heat and Salt Stress Conditions. Frontiers in Plant Science 6(1071).

Tang C, Deng L, Chang D, Chen S, Wang X, Kang Z. 2015. TaADF3, an Actin-Depolymerizing Factor, Negatively Modulates Wheat Resistance Against Puccinia striiformis. Frontiers in plant science 6(1214).

Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS, Xiong AS. 2015. Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. Plos One 10(2).

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۴۲-۱۳۱

بهینه سازی انتقال ژن به جو و تولید گیاهان تراریخته بارور با استفاده از آگروباکتریوم

Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Barley and Production of Fertile Transgenic Plants

ابراهیم دورانی علیایی[۱*] – وحید مهری زاده[۲]

Ebrahim Doranie Uliaie[*1] – Vahid Mehrizadeh[2]

[۱] دانشیار و [۲] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی،
گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

1. Associate Professor, 2. Ph.D. Student
Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۵)

چکیده

در سال‌های اخیر انتقال ژن به غلات به ابزار مهمی برای بهبود صفات زراعی گیاهان تبدیل شده است. جو یکی از با اهمیت‌ترین غلات دانه‌ای است که اصلاح آن برای افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق انتقال ژن همانند سایر گیاهان زراعی از اهمیت زیادی برخوردار است. بهینه سازی عوامل مختلف موثر در تراریزش و باززایی گیاهان تراریخته اولین قدم در برنامه‌های انتقال ژن به گیاهان محسوب می‌شود. در این پژوهش برخی عوامل موثر در تراریزش جو به وسیله آگروباکتریوم مانند سویه باکتری، غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان هم‌کشتی و محیط تلقیح باکتری مورد بررسی قرار گرفت. برای تاییدحضور ژن‌های انتقالی در گیاهان تراریخته احتمالی از آزمون PCR و برای بررسی بیان ژن‌های انتقالی از آزمون بیان ژن GFP استفاده شد. باززایی ریزنمونه‌های تراریخته با موفقیت انجام و گیاهان تراریخته بارور حاصل گردید. نتایج نشان داد که سویه LBA4404 و AGL1 به عنون موثرترین سویه‌های آگروباکتریوم و غلظت OD_{600}=۱ به عنوان مناسب‌ترین غلظت در تراریزش ریزنمونه‌های جنین نارس جو عمل کرده‌اند. همچنین استفاده از محیط تلقیح LB و مدت زمان هم‌کشتی دو روزه ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، بیشترین میزان تراریزش در جو را بدنبال داشت.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم،
تراریزش،
جو،
هیگرومایسین،
GFP

مقدمه

جو (*Hordeum vulgar* L.) از خانواده گرامینه (Poaceae) و از اولین گیاهان اهلی شده توسط انسان است (Nevo, 2013). جو از لحاظ تولید ماده خشک در جهان رتبه پنجم را بعد از ذرت، گندم، برنج و سویا دارد و از لحاظ اهمیت چهارمین محصول مهم در بین غلات بعد از گندم، ذرت و برنج می‌باشد (Lu *et al*., 2015).

جو علاوه بر اینکه یک غله مهم می‌باشد، به عنوان یک گیاه مدل بسیار عالی برای مطالعه غلات توسط بیوشیمیست‌ها و زیست‌شناسان مولکولی مورد توجه قرار گرفته است (Mrizova *et al*., 2014; Bettina *et al*., 2016). ژنوم جو در مقایسه با ژنوم اکثر گیاهان خانواده Triticeae، از اندازه کوچک و ماهیت دیپلوئیدی واقعی (۲n=۲x=۱۴) برخوردار است که برای مطالعه صفات خاص و افزایش بیان و یا خاموش کردن ژن‌ها در غلات مناسب می‌باشد (Karakas *et al*., 2011; Iehisa *et al*., 2014; Nussbaumer *et al*., 2014).

رشد فزاینده جمعیت جهان و افزایش تقاضا برای غذا در دهه‌های اخیر موجب شده تا تلاش گسترده‌ای در جهت افزایش کمی و کیفی محصولات استراتژیک و کاهش هزینه‌ها انجام گیرد. با توجه به نقش ویژه غلات در رژیم غذایی انسان، امنیت غذایی آینده بدون افزایش قابل توجه در تولید جهانی غلات قابل حصول نیست (Kim *et al*., 2009). برای نیل به این هدف مهندسی ژنتیک و روش‌های مبتنی بر آن به عنوان یک راهکار قوی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Dahleen *et al*., 2007). تراریزش جو با هدف افزایش کارایی زراعی آن، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، افزایش عملکرد و کیفیت آن انجام می‌گیرد (Vyroubalova *et al*., 2011; Bettina *et al*., 2016).

برای انتقال ژن به گیاهان روش‌های مختلفی وجود دارد ولی تراریزش به کمک آگروباکتریوم علی‌رغم محدودیت-هایی که دارد هنوز هم یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تولید گیاهان تراریخته به شمار می‌آید (Ji *et al*., 2013; Mrizova *et al*., 2014). در سال‌های اول توسعه انتقال ژن به گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم تصور می‌شد که گیاهان تک لپه‌ای از جمله غلات در برابر انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم مقاوم هستند، ولی بعدها تلاش‌های صورت گرفته در این زمینه انتقال موفقیت‌آمیز ژن به واسطه آگروباکتریوم در برخی از غلات مثل برنج (Aldemita and Hodges, 1996; Hiei and Komari, 2008; Ozawa, 2009; Soltesz *et al*., 2012)، ذرت (Shou *et al*., 2004; Yu *et al*., 2013)، گندم (Morran *et al*., 2011; Kovalchuk *et al*., 2013; Risk *et al*., 2013; Soltesz *et al*., 2013)، سورگوم (Zhao *et al*., 2000)، ارزن (Liu *et al*., 2007; Jha *et al*., 2011) و یولاف (Gasparis, 2008) را امکان‌پذیر ساخت.

اولین گیاه تراریخت جو در سال ۱۹۹۰ با استفاده از روش بیولیستیک توسط Wan و Lemaux (1994) و اولین تراریزش جو با آگروباکتریوم توسط Tingay و همکاران (1997) از ریزنمونه‌های جنین نارس گزارش شده‌اند. پس از آن چندین گزارش انتقال ژن به جو با آگروباکتریوم منتشر شده است (Hensel *et al*., 2009; Seiler *et al*., 2014; Zhou *et al*., 2014; Bettina *et al*., 2016).

انتقال توسط آگروباکتریوم به گیاهان از جمله جو در مقایسه با روش بیولیستیک از مزایای متعددی برخوردار است از مهمترین آنها می‌توان به انتقال قطعات بزرگ DNA با حداقل بازآرایی، درج دقیق تراژن و تعداد نسخه پایین تراژن در ژنوم گیاه، سادگی و کم هزینه بودن آن و پایداری بیشتر تراژن اشاره کرد (Shim *et al*., 2009; Yadav *et al*., 2013; Manoharan and Dahleen, 2002; Tang *et al*., 2007).

عوامل متعددی در انتقال ژن به گیاهان تک لپه‌ای موثرند که از آن جمله می‌توان به ژنوتیپ گیاه (Cheng *et al*., 2004)، نوع ریزنمونه (Holme *et al*., 2008; Lu *et al*.,

2015)، سویه باکتری (Ji *et al*., 2013)، غلظت باکتری (Kim *et al*., 2009)، مدت زمان هم‌کشتی (Sujatha *et al*., 2012)، سیستم گزینشی و سیستم باززایی (Yadav *et al*., 2013) اشاره کرد. انتقال ژن در جو به شدت وابسته به ژنوتیپ است، به طوریکه بیشترین کارایی تراریزش در ارقام بهاره و کمترین کارایی در ارقام زمستانه گزارش شده است. حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه در موفقیت تراریزش به واسطه آگروباکتریوم موثر است و ریزنمونه جنین نارس بیشترین کارایی را در انتقال ژن به جو داشته است (Wang *et al*.,2001; Lu *et al*., 2015).

قابلیت و توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در آلوده سازی و انتقال ژن به گیاهان متفاوت می‌باشد. انتخاب سویه مناسب آگروباکتریوم می‌تواند نقش مهمی در افزایش کارایی انتقال ژن به گیاهان داشته باشد (Oliveira *et al*., 2009; Guo *et al*., 2012). غلظت مناسب آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است به طوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه نقش بسزایی در کارایی تراریزش گیاهان دارد (Wroblewski *et al*., 2005; Kim *et al*., 2009).

مدت زمان هم کشتی و محیط تلقیح باکتری از دیگر عوامل موثر در تراریزش گیاهان هستند که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه‌ها کارایی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Shrawat and Lorz, 2006; Sujatha *et al*., 2012).

از دیگر عوامل موثر در مطالعه تراریزش گیاهان و همچنین بهینه سازی شرایط انتقال، استفاده از ژن‌های گزارشگر می‌باشد. ردیابی و آشکارسازی سیستم‌های تراریزش گیاه، به منظور اطلاع از انتقال موفق DNA مورد نظر به ژنوم سلول‌های میزبان به کمک مجموعه‌های از ژن‌ها، موسوم به ژن‌های گزارشگر صورت می‌گیرد (Kumlehn *et al*., 2006; Bettina *et al*., 2016). ژن‌های گزارشگر وسیله‌ای مناسبی برای مطالعه اجزای بیان ژن‌ها هستند. Green Fluorescent Protein (GFP) به عنوان یک گزارشگر پروتئینی است که در طول موج خاصی از نور به رنگ سبز روشن مشاهده می‌شود (Boulin *et al*., 2006). از مزایای این پروتئین به عنوان ژن گزارشگر می‌توان به غیر تهاجمی بودن آن، اندازه کوچک، مطالعه بافت‌های زنده بدون تخریب، عدم نیاز به سوبسترای خاص برای مطالعه و غیره اشاره کرد (El Shemy *et al*., 2008). در این مقاله شرایط بهینه عوامل انتقال ژن به جو از طریق آگروباکتریوم، از قبیل سویه و غلظت باکتری، محیط تلقیح باکتری و مدت زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم گزارش می‌گردد و یک روش کارآمد برای انتقال ژن به جو از طریق آگروباکتریوم ارائه می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای رسیده رقم والفجر جو به عنوان مواد گیاهی از جهاد کشاورزی آذربایجان شرقی تهیه و جهت اخذ جنین نارس در شرایط گلخانه کشت گردید. بذور نارس آنها در فاصله زمانی ۱۴ روز پس از گرده افشانی برداشت شد. بذور نارس ابتدا به مدت ۵ دقیقه در الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس آبشویی شده، پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۲/۵ درصد به طور کامل ضدعفونی شدند و پس از آبشویی و خشک شدن بذور، جنین نارس آنها در زیر میکروسکوپ با استفاده از یک لوپ با بزرگنمایی 10X جدا شدند.

سازه‌های ژنی و سویه‌های باکتری: در این پژوهش از ۳ سویه (GV3101، LBA4404 و AGL1) *آگروباکتریوم تومفسینس* که حاوی پلاسمید pLH6000 بودند، جهت تراریزش جنین‌های نارس جو استفاده شد. پلاسمید مذکور حاوی ژن‌های گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین (*hpt*) بود که هر دو تحت کنترل راه انداز CaMV 35S بودند (شکل ۱). به منظور تراریختی، گزینش و باززایی از دستورالعمل ارائه شده توسط Tingay و همکاران (1997) با برخی تغییرات استفاده شد.

شکل ۱- نمای شماتیک پلاسمید pLH6000.

Figure 1- Schematic map of pLH6000 plasmid.

آگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب را ابتدا در محیط کشت YEP (عصاره مخمر ۱۰ gr/l، پپتون ۱۰ gr/l و کلرید سدیم ۵ gr/l) به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین و ۳۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین به مدت یک شب در دمای ۲۸°C با ۱۵۰ دور در دقیقه کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت وقتی که OD باکتری بین ۱-۰/۸ رسید، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (۴۰۰۰-۳۵۰۰ دور در دقیقه) رسوب داده شد و در محیط MS مایع در غلظت‌های ۱/۵ و ۱، ۰/۵=OD_{600nm} رقیق شدند.

تلقیح جنین‌های نارس با آگروباکتریوم: برای تلقیح با *آگروباکتریوم تومفسینس* ریزنمونه‌ها جدا شده بر روی محیط کشت کالوس‌زایی شامل نمکهای محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ویتامین‌های محیط B5 و ۲ میلی گرم در لیتر هورمون دیکامبا قرار گرفتند. پس از آن محلول باکتری با غلظت‌های رقیق شده به وسیله سمپلر بر روی ریزنمونه‌ها قطره گذاری شده و به مدت ۱ تا ۳ روز تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C نگهداری شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی: پس از هم‌کشتی، جنین‌های تلقیح شده به محیط انتخابی القای کالوس تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر تیکارسیلین منتقل شدند. بعد از ۶-۴ هفته کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده به محیط باززایی شامل محیط MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP منتقل و در دمای ۲۴±۲° C با روشنایی ۱۰۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شاخه‌های تشکیل شده به لوله‌های شیشه‌ای حاوی همان محیط منتقل شده تا گیاهان برای انتقال به خاک به اندازه کافی قوی شوند. گیاهان T0 برای بذرگیری به گلخانه منتقل شدند. بذر گیاهان T0 برای بدست آوردن گیاهان T1 در شیشه‌ها کشت شدند.

تایید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته: DNA ژنومی تعدادی از گیاهان تراریخته احتمالی و گیاهان شاهد از برگ گیاه جو به روش CTAB (Pallota *et al.*, 2000) استخراج گردید. به منظور اثبات انتقال و تلفیق ژن GFP به ژنوم گیاه از آغازگرهای اختصاصی GFP استفاده شد (جدول ۱). برای تکثیر ژن GFP، از برنامه دمایی ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه با ۳۰ چرخه تکرار استفاده گردید. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *GFP*

Table 1- specific primers sequence of GFP gene.

آغازگر GFP Primers of GFP	توالی آغازگر Primer sequences
آغازگر روبه جلو Forward primer	5′-GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3′
آغازگر رو به عقب Reverse primer	5′-TAGTGGTTGTCGGGCAGCAGC-3′

بررسی بیان ژن *GFP*: به منظور بررسی صحت انتقال ژن *GFP* و بیان آن در بافت‌های گیاهی تراریخته، آزمون سنجش بیان *GFP* با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۹۵ نانومتر انجام شد. کالوس‌های حاصل از جنین‌های نارس یک ماه پس از هم‌کشتی با آگروباکتریوم برای هر کدام از تیمارها با میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شده و تعداد کالوس‌های با رنگ سبز برای هر کدام از آنها یادداشت گردید. علاوه برآن درصد ریزنمونه‌ها یا کالوس سبز بدست آمد. همچنین برگ‌های تازه نسل T0 و نسل T1 گیاهان تراریخته نیز زیر میکروسکوپ فلورسنس مطالعه شدند.

طرح‌های آماری و آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش تاثیر غلظت آگروباکتریوم با استفاده از سویه LBA4404 و مدت زمان هم‌کشتی دو روز در سه تکرار هر پتری دیش به عنوان یک تکرار حاوی تعداد متفاوت ریزنمونه اعمال گردید و با استفاده از آزمون دانکن مقایسات میانگین انجام گردید. آزمایش دوم برای مطالعه اثر سویه باکتری با استفاده از بهترین OD بدست آمده از آزمایش اول یعنی OD_{600}=۱ در یک آزمایش مجزا با محیط تلقیح MS و مدت هم‌کشتی دو روز در سه پتری دیش به عنوان تکرار انجام گردید. آزمایش سوم نیز با استفاده از غلظت OD_{600}=۱ و سویهLBA4404 طی یک آزمایش فاکتوریل دو عامل شامل دوره هم‌کشتی (یک، دو و سه روز) و محیط تلقیح (MS و LB) بر پایه طرح کاملا تصادفی به سه تکرار اعمال گردید و آنالیز آماری بر اساس نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم روی تراریختی

به منظور تعیین OD مناسب برای تراریزش رقم والفجر گیاه جو، غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (۱/۵ و ۱ ،OD_{600nm}=۰/۵) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که بین غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر میزان تراریختی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش غلظت آگروباکتریوم تا OD_{600}=۱ کارایی انتقال افزایش یافته ولی در غلظت بالاتر (OD_{600}=۱/۵) کارایی انتقال کاهش یافته است (شکل ۲). استفاده از غلظت OD_{600}=۱/۵ باعث رشد زیاد باکتری بر روی ریزنمونه‌ها شد و کنترل آنرا مشکل کرد. در حالی که غلظت پایین‌تر (OD_{600}=۰/۵) از میزان تراریزش کمتری برخوردار بود که به خاطر غلظت پایین باکتری زنده در واحد حجم بود. OD_{600}=۱ با ۲۷ درصد بیان GFP در کالوس‌ها، بیشترین میزان تراریزش را در پی داشت.

شکل ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر میزان تراریزش گیاه جو.

Figure 2. Comparison the effect of different concentrations of Agrobacterium on barley transformation.

شکل ۳- مقایسه میانگین کارآیی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در تراریزش گیاه جو.

Figure 3. Comparison the efficiency means of different strains of Agrobacterium on barley transformation.

غلظت باکتری یکی از اصلی‌ترین عواملی است که کارآیی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تعیین غلظت مناسب باکتری در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم، به عوامل متعددی بستگی دارد (Dita *et al*., 2006; Sujatha *et al*., 2012). در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت باکتری میزان تراریزش تا حدودی افزایش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر میزان تراریزش کاهش پیدا کرد. افزایش یا کاهش تراکم سلول‌های باکتری از حد مطلوب، در گیاهان دیگر نیز باعث کاهش فراوانی گیاهان تراریخته شده است (Wroblewski *et al*., 2005; Kim *et al*., 2009).

هرچند در غلظت OD_{600}=۱/۵ میزان تراریزش جو بسیار پایین آمد اما Wu و همکاران (1998) بیشترین میزان تولید گیاهان تراریخته جو را در غلظت‌های ۲-OD_{600}=۱ و کمترین میزان تراریزش را در OD_{600}=۵ گزارش کرده‌اند. همچنین Ke و همکاران (2002) بیشترین میزان تراریزش جو را در OD_{600}=۱/۵ بدست آورده‌اند. Yadav و همکاران (2013) نیز از OD_{600}=۱ برای تراریزش رقم هندی جو استفاده کرده‌اند.

اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر تراریختی جو

این آزمایش به منظور مقایسه توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در انتقال ژن به جو انجام شد. بدین منظور اثر سه سویه پر کاربرد آگروباکتریوم بر تراریزش جو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر میزان آلوده‌سازی و قدرت انتقال ژن به جو اختلاف معنی‌داری وجود داشت. فراوانی گیاهان جو تراریخت بدست آمده از دو سویه LBA4404 و AGL1 به مراتب بیشتر از سویه GV3101 بود (شکل ۳). جنین‌های نارس آلوده شده با سویه LBA4404 پس از یک ماه تولید کالوس‌های ریزتراریخته کردند.

انتخاب سویه آگروباکتریوم یکی از عوامل موثر در انتقال ژن به جو با استفاده از آگروباکتریوم هست. تعیین سویه برتر آگروباکتریوم نقش به سزایی در کارایی انتقال ژن به گیاهان دارند (Kumlehn *et al*., 2006; Bartlett *et al*., 2008; Ji *et al*., 2013). توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در آلوده‌سازی و انتقال ژن به گونه‌های مختلف گیاهی و حتی ژنوتیپ‌های مختلف درون یک گونه تفاوت معنی‌داری با هم دارند (Wroblewski *et al*., 2005; Oliveira *et al*., 2009; Guo *et al*., 2012). با این حال تنها تعداد اندکی از سویه‌ها روی گیاهان آزمایش شده‌اند. بدین منظور برای دست‌یابی به سویه‌های برتر در تراریزش گیاهان، سویه‌های مختلف آگروباکتریوم مورد

بررسی قرار می‌گیرند (Bartlett *et al*., 2008; Ji *et al*., 2013).

معمولا برای تراریزش غلاتی نظیر گندم، جو، برنج و ذرت از سویه‌های AGL0 و AGL1 استفاده می‌شود ولی استفاده از سویه LBA4404 نیز با موفقیت گزارش شده است (Kumlehn *et al*., 2006; Hensel *et al*., 2009). در مطالعه‌ای بیشترین میزان تراریزش جو از سویه LBA4404 در مقایسه با سویه EHA101 گزارش شده است (Wu *et al*., 1998). همچنین Holme و همکاران (2008) نیز برای تراریزش گیاه جو از سویه AGL1 آگروباکتریوم استفاده کرده‌اند.

سویه LBA4404 یکی از رایج‌ترین سویه‌هایی است که برای تراریزش گیاهان در اکثر آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود به طوریکه به عنوان یکی از کارامدترین سویه های آگروباکتریوم در تراریزش غلاتی مثل برنج (soltesz *et al*., 2012)، گندم (Hensel *et al*., 2009)، ذرت (Ombori *et al*., 2013)، سورگوم (Ji *et al*., 2013) و جو (Holme *et al*., 2006; Shrawat *et al*., 2007; Yadav *et al*., 2013) گزارش شده است.

سویه AGL1 در تراریزش برخی غلات از جمله گندم به عنوان یکی از سویه‌هایی موثر معرفی شده است (Wu *et al*., 2008). سویه GV3101، از گونه C58 مشتق شده است. یکی از مشکلات این سویه رشد بیش از حد آن در طول مرحله هم‌کشتی است که روی ریزنمونه‌ها دیده می‌شوند. رشد بیش از حد باکتری با رشد کالوس در محیط انتخابی تداخل ایجاد کرده و باعث کاهش قدرت بازایی می‌شود (Kim *et al*., 2009).

اثر محیط تلقیح و مدت زمان هم‌کشتی آگروباکتریوم روی تراریختی

تجزیه واریانس اثر دوره هم‌کشتی و نوع محیط تلقیح بر روی تراریزش نشان داد که بین مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲ و ۳ روز) و محیط تلقیح باکتری (MS و LB) اثرات متقابل معنی‌داری در میزان تراریختی وجود داشت. مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد بیشترین میزان تراریزش جو در تیمارهایی که از محیط LB به عنوان محیط تلقیح باکتری و مدت زمان ۲ روز هم‌کشتی با باکتری استفاده شده بود بدست آمده است. همچنین کمترین میزان تراریزش در تیمارهایی که از محیط MS به عنوان محیط تلقیح باکتری و ۳ روز هم‌کشتی با باکتری استفاده شده بود حاصل شده است (شکل ۴).

شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر مدت زمان هم‌کشتی و محیط تلقیح باکتری بر میزان تراریزش.

Figure 4. Comparison the mean of co-cultivation time and agrobacterium infection medium on barley transformation

مدت زمان هم‌کشتی و محیط تلقیح باکتری از دیگر عواملی هستند که کارایی انتقال ژن به گیاهان را تحت تاثیر قرار دارند. هرچند با افزایش دوره هم‌کشتی از یک روز تا سه روز، تعداد جنین‌های با لکه‌های سبز افزایش پیدا می‌کرد، ولی آلودگی ریزنمونه‌ها در دوره هم‌کشتی سه روزه به مراتب افزایش یافته و کالوس‌ها حتی در صورت تراریخته بودن از بین می‌رفتند. محیط تلقیح باکتری از عوامل دیگری است که در باززایی ریزنمونه‌ها موثر می‌باشد (Danilova and Dolgikh, 2005). قدرت آلوده سازی و انتقال ژن به گیاهان در محیط تلقیح مناسب، به مراتب بیشتر از سایر محیط‌های تلقیح می‌باشد (Holme *et al*., 2008). هرچند در اکثر آزمایشات تراریزش گیاهان استفاده از محلول تلقیح باکتری در MS مرسوم است و نتایج بهتری را می‌دهد. اما در این آزمایش میزان تراریزش با استفاده از محلول تلقیح در خود LB افزایش قابل توجهی داشت. همچنین مدت زمان هم‌کشتی دو روزه با استفاده از محیط تلقیح LB با ۲۷ درصد تراریزش بهترین ترکیب تراریزش جو بودند.

در انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم طول مدت هم-کشتی از ۱ تا ۷ روز متفاوت می‌باشد. بیشترین کارآیی تراریخت گیاهان در تیمارهایی با ۲ تا ۵ روز هم‌کشتی گزارش شده است (Han *et al*., 2000; Mondal *et al*., 2001; Somleva *et al*., 2002). در هم‌کشتی بیش از ۵ روز، بسته به سویه آگروباکتریوم، به دلیل رشد بیش از حد باکتری در اطراف ریزنمونه و به دنبال آن از بین رفتن ریزنمونه‌ها و اختلال در رشد و نمو بافت‌های تراریخته، کارآیی تراریزش کاهش می‌یابد (Shrawat *et al*., 2007) و مدت زمان هم‌کشتی ۲ تا ۳ روز منجر به افزایش کارایی تراریزش می‌شوند (Le *et al*., 2001; Chakrabarty *et al*., 2002; Lopez *et al*.,2004). اما در این آزمایش مدت زمان هم‌کشتی ۳ روزه به دلیل افزایش آلودگی جنین‌ها مناسب نبود.

مطالعات Hensel و همکارانش (۲۰۰۹) نشان داد که هم-کشتی بیش از ۵ روز باعث افزایش آلودگی‌ها شده در نتیجه مانع از تشکیل کالوس و باززایی می‌شود بطوریکه مدت زمان هم‌کشتی ۳-۲ روز برای تراریزش و باززایی از جنین‌های نارس جو مناسب بود.

شکل ۵- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR، M: نشانگر مولکولی، ۱: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن GFP)، ۲: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)، ۳: گیاه شاهد (گیاه غیرتراریخت) و ۴ تا ۶: گیاهان تراریخته.

Figure 5. Analysis of transgenic plants by PCR. M: Molecular marker, 1: Positive control (the plasmid harboring GFP gene), 2: Negative control (distilled water without DNA). 3: Control plant (non-transgenic plant), 4-6: transgenic plants.

ژن پروتئین سبز (GFP) به دلیل امکان ردیابی در بافت-های زنده بدون آسیب رساندن به گیاهان تراریخته در تمام مراحل انتقال از ارجحیت بالاتری برخوردار است (Kumlehn *et al*., 2006; Shrawat *et al*., 2007). در این مطالعه از این ژن تحت کنترل راه انداز CaMV 35S استفاده گردید. ۷۲ ساعت پس از تلقیح جنین‌های نارس با آگروباکتریوم، امکان ردیابی فرآیند تراریزش ریزنمونه‌ها در زیر نور فلورسنس وجود داشت (شکل A۶). در برخی موارد علی‌رغم موفقیت اولیه در درج و بیان ژن در بافت جنین‌های نارس، بعد از گذشت چند روز ژن به دلایل نامعلومی خاموش می‌گردید (شکل ۶ D). در این صورت کالوس‌ها نیز به خاطر عدم بیان ژن *htp* نکروزه شده از بین می‌رفتند. در اغلب موارد با رشد و کالوس-زایی از بافت‌های تراریخته در حضور ماده گزینش‌گر هیگرومایسین، بیان ژن GFP در تمام بخش‌ها و حتی گیاهان باززایی شده از کالوس‌ها به خوبی بیان می‌شد (شکل ۶). بیان ژن GFP در بافت‌ها و بخش‌های مریستمی کالوس‌ها خیلی بهتر و بیشتر از بافت‌های مسن بود به طوریکه در برگ گیاهان بالغ بیان آن به مراتب کمتر از بیان آن در کالوس‌ها و بخش‌های جوان‌تر بود (شکل E۶). بیان ژن GFP در گیاهان T0 وT1 در برگ-های گیاهان در حال پنجه زنی نیز به خوبی بیان می‌شود و بیان آن در سلول‌های محافظ روزنه‌ای واضح‌تر بود (شکل ۶ G,H).

شکل ۶- بیان موقت و دائم ژن *GFP* در جو. (A) بیان ژن *GFP* در جنین نارس جو ۳ روز پس از تلقیح تحت تابش نور UV. (B) بیان ژن *GFP* در کالوس جو یک ماه پس از تلقیح تحت تابش نور UV. (C) کالوس جو یک ماه پس از تلقیح بدون حضور نور UV. (D) خاموشی تدریجی ژن در برخی کالوس‌ها. (E) بیان ژن *GFP* در شاخه‌های باززایی شده از کالوس تراریخته جو پس از یک ماه تحت تابش نور UV. (F) شاخه‌های باززایی شده از کالوس تراریخته جو پس از یک ماه بدون حضور نور UV. (G) بیان پایدار ژن *GFP* در برگ‌های جوان گیاهان تراریخته نسل T0 تحت تابش نور UV. (H) بیان پایدار ژن *GFP* در برگ‌های جوان گیاهان تراریخته نسل T1 تحت نور UV.

Figure 6. Transient and stable expression of GFP gene in barley. (A) Expression of GFP gene in barley immature embryos after 3 days inoculation under UV light. (B) Expression of GFP gene in barley callus after 1 month inoculation under UV light. (C) Barley callus after 1 month inoculation without UV light. (D) Gradually gene silencing in some callus. (E) Expression of GFP gene in shoot regenerated from transgenic callus after 1 month inoculation under UV light. (F) Shoot regeneration from transgenic callus after 1 month inoculation without UV light. (G) Stable expression of GFP gene in young leaves of transgenic plants of T0 generation under UV light. (H) Stable expression of GFP gene in young leaves of transgenic plants of T1 generation under UV light.

منابع

Aldemita RA, Hodges TK. 1996. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of japonica and indica rice varieties. Planta 199: 612-617.

Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA. 2008. High throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. Plant Methods 4: 21-22.

Bettina N, Petra M, Robert M, Janos P, Gabor VH. 2016. Stress tolerance of transgenic barley accumulating the alfalfa aldose reductase in the cytoplasm and the chloroplast. Phytochemistry 129: 14-23.

Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. 2006. Reporter gene fusions. WormBook. New York, USA, 1-23.

Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL. 2002. Agrobacterium-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt transgenic cauliflower. Bio Science 27: 495-502.

Cheng M, Lowe BA, Spencer TM, Ye X, Armstrong CL. 2004. Factors influencing Agrobacterium mediated transformation of monocotyledonous species. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 40: 31-45.

Dahleen LS, Manoharan M. 2007. Recent advances in barley transformation. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 43: 493-506.

Danilova SA, Dolgikh YI. 2005. Optimization of Agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) Transformation of Maize Embryogenic Callus. Russian Journal of Plant Physiology 4: 535-541.

Dita MA, Rispail N, Prats E, Rubiales D, Singh KB. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica 147: 1-24.

El Shemy HA, Khalafalla MM, Ishimoto M. 2008. The Role of Green Fluorescent Protein (GFP) in Transgenic Plants to Reduce Gene Silencing Phenomena. Current Issues in Molecular Biology 11: 21-28.

Gasparis S, Bregier C, Orczyk W, Nadolska A. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of oat (*Avena sativa* L.) cultivars via immature embryo and leaf explants. Plant Cell Reports 27: 1721-1729.

Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J. 2012. Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated transient expression of Micro-Tom tomatoes. Genetics and Molecular Research 11:661-671.

Han KH, Meilan R, Ma C, Strauss SH. 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus Populus). Plant Cell Reports 19: 315- 320.

Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J. 2009. Agrobacterium mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. International Journal of Plant Genomics 51: 1-9.

Hiei Y, Komari T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols 3: 824-834.

Holme I, Brinch Pedersen H, Lange M, Holm PB. 2006. Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. Plant Cell Reports 25: 1325-1335.

Holme IB, Brinch Pedersen H, Lange M, Holm PB. 2008. Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. Plant Cell Reports 27:1833-1840.

Iehisa JCM, Ohno R, Kimura T, Enoki H, Nishimura S, Okamoto Y, Nasuda S, Takumi S. 2014. A high-density genetic map with array-based markers facilitates structural and quantitative trait locus analyses of the common wheat genome. DNA Research 21: 555-567.

Jha P, Shash I, Rustagi A, Agnihotri PK, Kulkarni VM, Bhat V. 2011. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. using shoot apices as explant source. Plant Cell Tissue Organ Culture 107: 501-512.

Ji Q, Xu X, Wang K. 2013. Genetic transformation of major cereal crops. The International Journal of Developmental Biology 57: 495-508.

Karakas O, Ucarli C, Gozukirmizi N, Gurel F. 2011. Assessment of barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos for Agrobacterium-mediated transformation. Journal of Applied Biological Sciences 5: 55-58.

Ke XY, Cormac ACM, Harvey A, Lonsdale D, Chen DF, Elliott, MC. 2002. Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by Agrobacterium into cells of immature embryos of barley and wheat. Euphytica 126: 333-343.

Kim MJ, Baek K, Park CM. 2009. Optimization of conditions for transient Agrobacterium-mediated gene expression assays in Arabidopsis. Plant Cell Rep 28:1159-1167.

Kovalchuk N, Jia W, Eini O, Morran S, Pyvovarenko T, Fletcher S, Bazanova N, Harris J, Beck-Oldach K, Shavrukov Y, Langridge P, Lopato S. 2013. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. Plant Biotechnology Journal 11: 659-670.

Kumlehn J, Serazetdinova L, Hansel G, Becker D, Lorz H. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology Journal 4: 251-261.

Liu Y, Yu J, Ao G, Zhao Q. 2007. Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of foxtail millet (*Setaria italic* L.). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology 23: 531.

Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N.

2004. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation in tea (*Camellia sinensis* L.). Plant Molecular Biology Reporter 22: 201-201.

Lu B, Wu J, Fu D. 2015. Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. Journal of Integrative Agriculture 14: 453-468.

Manoharan M, Dahleen L. 2002. Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. Plant Cell Reports 21: 76-80.

Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK. 2001. Transgenic tea (*Camellia sinensis* L.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Reports 20: 712-720.

Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S. 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of *DREB*/*CBF* factors. Plant Biotechnology Journal 9: 230-249.

Mrizova K, Holaskova E, Tufan OM, Jiskrova E, Frebort I, Galuszka P. 2014. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. Biotechnology Advances 32: 137-157.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nevo E. 2013. Evolution of wild barley and barley improvement. In: Zhang G, Li C, Liu X (Ed.) Advance in Barley Sciences. Springer, Netherlands, 1-23.

Nussbaumer T, Spannagl M, Bader K C, Pfeifer M, Mayer K. 2014. A tool to visualize synteny between plant genomes including recently published cereal genomes of *Aegilops tauschii* and *Hordeum vulgare*. In: Proceedings of 22nd Plant and Animal Genome Conference. USA, San Diego, CA, 554-573.

Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. 2009. High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. Plant Cell Reports 28: 387-395.

Ombori O, Muoma JVO, Machuka J. 2013. Agrobacterium-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 113:11-23.

Ozawa K. 2009. Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science 176: 522-527.

Pallota MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker, SJ. 2000. RFLP mapping of manganese efficiency in barley. Theoretical and Applied Genetics 101: 1100-1108.

Risk JM, Selter LL, Chauhan H, Krattinger SG, Kumlehn J, Hensel G, Viccars LA, Richardson TM, Buesing G, Troller A, Lagudah ES, Keller B. 2013. The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. Plant Biotechnology Journal 11: 847-854.

Seiler C, Harshavardhan VT, Reddy PS, Hensel G, Kumlehn J, Eschen-Lippold L, Rajesh K, Korzun V, Wobus U, Lee J, Selvaraj G, Sreenivasulu N. 2014. Abscisic acid flux alterations result in differential abscisic acid signaling responses and impact assimilation efficiency in barley under terminal drought stress. Plant Physiology 164: 1677-1696.

Shim Y S, Pauls K P, Kasha K J. 2009. Transformation of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores: I. The influence of pretreatments and osmotic treatment on the time of DNA synthesis. Genome 52: 166-174.

Shou H, Frame BR, Whitman SA, Wang K. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation. Molecular Breeding 13: 201-208.

Shrawat AK, Becker D, Lorz H. 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 172: 281-290.

Shrawat AK, Lorz H. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers, Plant Biotechnology Journal 4: 575-603.

Soltesz A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W, Vagujfalvi A. 2013. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. Journal of Experimental Botany 64: 1849-1862.

Soltesz A, Vagujfalvi A, Rizza F, Kerepesi I, Galiba G, Cattivelli L, Coraggio I, Crosatti C. 2012. The rice Osmyb4 gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants. Journal of Applied Genetics 53: 133-143.

Somleva MN, Tomaszewski Z, Conger BV. 2002. Agrobacterium mediated transformation of switchgrass. Crop Science 42: 2080-2087.

Sujatha M, Vijay S, Vasavi S, Veera Reddy P, Chander Rao S. 2012. Agrobacterium-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 110: 275-287.

Tang W, Newton RJ, Weidner DA. 2007. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. Journal of Experimental Botany 58: 545-554.

Tingay S, Mcelroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* mediated barley transformation. Plant Journal 11: 1369-1376.

Vyroubalova S, Smehilova M, Galuszka P, Ohnoutkova L. 2011. Genetic transformation of barley: limiting factors. Biologia Plantarum 55: 213-224.

Wan Y, Lemaux PG. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiology 104: 37-48.

Wang MB, Abbott DC, Upadhyaya NM, Jacobsen JV, Waterhouse PM. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. Australain Journal of Plant Physiology 28: 149-156.

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

Wu H, Cormac ACM, Elliott MC, Chen DF. 1998. Agrobacterium-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 161-171.

Wu H, Doherty A, Jones HD. 2008. Efficient and rapid Agrobacterium-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) using additional virulence genes. Transgenic Research 17: 425-436.

Yadav T, Kothari SL, Kachhwaha S. 2013. Optimization of Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation and Regeneration of Transgenic Plants in Indian Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. BL 2). Biological Sciences 83:255-264.

Yu GR, Liu Y, Du WP, Song J, Lin M, Xu LY, Xiao FM and Liu YS. 2013. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Immature Embryo Transformation System and Transformation of Glyphosate-Resistant Gene 2mG2-EPSPS in Maize (*Zea mays* L.). Journal of Integrative Agriculture 12: 2134-2142.

Zhao Z, Cai T, Tagliani L, Miller M, Wang N, Pang H, Rudert M, Schroeder S, Hondred D, Seltzer J, Pierce D. 2000. Agrobacterium mediated sorghum transformation. Plant Molecular Biology Reporter 44: 789-798.

Zhou G, Pereira JF, Delhaize E, Zhou M, Magalhaes JV, Ryan PR. 2014. Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. Journal of Experimental Botany 65: 2381-2390.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۵۳-۱۴۳

تأثیر حشره‌کش‌های پریمیکارب و تیامتوکسام بر فعالیت آنزیم‌های سم-زدای شته سیاه باقلا

Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)

شیما رحمانی*[۱]، علیرضا بندانی[۲]، سولماز عظیمی[۳]

Shima Rahmani[1*], Ali R. Bandani[2], Solmaz Azimi[3]

۱- عضو هیئت علمی گروه حشره شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ، ایران
۲- عضو هیئت علمی گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
۳- عضو هیئت علمی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

1- Department of Entomology, Science and reaserch branch,
Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Plant Protection Dept., College of Agriculture and Natural Resources,
University of Tehran, Karaj, Iran.
3-Department of Plant Protection,
Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shrahmani@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

در بسیاری از موجودات زنده، آنزیم‌های سم‌زدا نقش مهمی در سم‌زدایی ترکیبات ناگوارد ایفا می‌کنند و به عنوان نشانگرهای زیستی قرارگیری در معرض ترکیبات ناگوارد قلمداد می‌شوند. در واقع، درجات مختلف حساسیت به ترکیبات شیمیایی ممکن است به دلیل تفاوت‌های بیوشیمیایی در سم‌زدایی حشره‌کش‌ها باشد. در بررسی پیش‌رو، اثر تیامتوکسام و پیریمیکارب در غلظت‌های زیرکشنده بر میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور تعیین اثرات کشنده در شرایط آزمایشگاهی، غلظت میانه کشنده برای شته در معرض تیامتوکسام و پیریمیکارب به ترتیب (۶۲۵/۱۶-۶۸/۹۴) ۱۱۳/۸۵ و (۷۱/۹۹-۱/۳) ۲/۹۴ $mg(ai)L^{-1}$ محاسبه شد. هم‌چنین فعالیت مونواکسیژنازها به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا اندازه‌گیری شد. تأثیر هر دو حشره‌کش بر شته *A. fabae* باعث افزایشی معنی‌دار در القای آنزیم‌های مونواکسیژناز شد ($P<0/0001$). در این بررسی فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST) به موازات افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب القا می‌شود ($P=0/0001$، $F=18/17$، ۱۲، ۵ $df=$). تیامتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر (۴۸/۰۷، ۷۵/۰۶ و ۱۱۳/۸۵ mg (ai)/L) فعالیت این آنزیم را القا کرد ($P=0/0009$، $F=18/17$، ۱۲، ۵ $df=$). نتایج نشان داد که در غلظت‌های زیرکشنده می‌توان دو شته‌کش مهم تیامتوکسام و پیریمیکارب را توسط آنزیم‌های سم‌زدا به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی

Aphis fabae،
پریمیکارب،
تیامتوکسام،
آنزیم‌های سم‌زدا،
نشانگرهای زیستی.

مقدمه

شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae)، در تمامی مناطق ایران از جمله سواحل شمالی کشور و شهرستان‌های مرکزی و اطراف تهران انتشار دارد (Khanjani, 2004؛ Esmaili *et al*. 1998). این شته از مهم‌ترین آفاتی است که در دنیا بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی میزبان دارد و باعث خسارت به گیاهان میزبان به ویژه گونه‌هایی از دو خانواده Chenopodiaceae و Fabaceae می‌شود (CAB International 2000). شته سیاه باقلا از نظر انتقال بیماری‌های ویروسی نظیر ویروس موزاییک و زردی چغندر قند نیز اهمیت دارد و گاهی خسارت از این لحاظ قابل توجه است Esmaili *et al*. (Khanjani, 2004 ؛1998). کنترل شته‌ها بیشتر مبتنی بر استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی است. سموم شیمیایی که در کنترل شته‌ها استفاده می‌شود باعث آلودگی‌های زیست محیطی و اثرات مخرب بر سایر موجودات زنده می‌شوند (Hasanshai *et al*. 2016).

تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت شناسی به منظور تخمین تأثیر پذیری موجودات زنده از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط زیست اهمیت روزافزون یافته است. این تغییرات با استفاده از نشانگرهای زیستی که نشانگر این تغییرات هستند، شناسایی می‌شوند. به علت این‌که غلظت برخی آلاینده‌ها برای ردیابی و شناسایی بسیار پایین است لذا برای شناسایی اثرات این آلاینده‌ها بر موجودات زنده از نشانگرها استفاده می‌کنند. آنزیم‌های سم‌زدا مانند آنزیم‌های مونواکسیژناز P_{450} و گلوتاتیون ترانسفراز نمونه‌ای از نشانگرهای زیستی پروتئینی می‌باشند. این آنزیم‌ها در سم‌زدایی و بیوترانسفرماسیون مواد شیمیایی آلی دخالت دارند (Hyne and Maher, 2003). در بسیاری از موارد، بررسی‌های نشانگرهای بیوشیمیایی بر موجودات زنده در معرض مواد سمی منتخب در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام می‌گیرد. این مطالعات آزمایشگاهی با نتایجی که در پی دارند، می‌توانند در پیش بینی اثرات آلودگی بر جمعیت‌های طبیعی در مزرعه راه‌گشا باشند (Hayes and Pulford, 2003).

از دیرباز، اثرات آفت‌کش‌ها و سایر مواد سمی بر موجودات زنده با استفاده از پارامترهای ساده شده‌ای برای تعیین اثر، مانند LC_{50} یا LD_{50} (دز یا غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد افراد یک جمعیت می‌شود) ارزیابی می‌شوند. ارزیابی‌های غلظت کشنده، تخمین و مقایسه سریع چندین ماده سمی را با توجه به اثر آن‌ها بر افراد یک گونه خاص امکان‌پذیر می‌سازد. هم‌چنین تخمین LC_{50} از این راه برای گونه‌های هدف و غیرهدف نسبتا ارزان است (Stark *et al*. 2007). به منظور طراحی زیست‌سنجی‌ها که اثرات آفت‌کش‌ها را بر موجود زنده ارزیابی می‌کنند برخی موارد مهم شامل گونه، مرحله زندگی جنس‌ها، راه‌های ورود آفت‌کش، پارامترهای تاریخچه زیستی، اندازه پلات مزرعه و فرمولاسیون‌های آفت کش باید در نظر گرفته شوند (Ruberson, 1998).

آنزیم‌های مونواکسیژناز P_{450} و گلوتاتیون ترانسفراز به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا نقش اصلی را در سم‌زدایی سموم کارباماتی و نیکوتینوئیدی دارند (Basij *et al*. 2016; Sulaiman *et al*. 2016). پیریمیکارب یک حشره کش دی متیل‌کاربامات است که علیه شته‌ها و سفید بالک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Syngenta, 2004). تیامتوکسام نیز از جمله حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی است که در داخل و خارج از گلخانه برای مدیریت حشرات مکنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cloyd and Bethke, 2011). پیریمیکارب و حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی اگرچه برای گرده افشان‌ها خطرناک هستند (Sanchez-Bayo and Goka, 2014)، اما شته‌کش‌های مناسبی به شمار می‌روند و در عین حال برای بسیاری از دشمنان طبیعی شته‌ها بی‌زیان هستند (Jalali *et al*. 2009).

گلوتاتیون اس-ترانسفرازها (EC 2.5.1.18, GSTs) آنزیم‌های سم‌زدای فاز دو در بیشتر موجودات زنده هستند.

(Hayes and Pulford, 1995). این آنزیم‌ها در سم‌زدایی برخی گروه‌های حشره‌کش‌های شیمیایی مانند ارگانوفسفره‌ها، پایروتروئیدها، کاربامات‌ها و هیدروکربن-های کلره مانند DDT دخالت دارند (Ronson *et al.* 2001) و در مقاومت به حشره‌کش‌ها از طریق متابولیسم مستقیم حشره‌کش (Wei *et al*. 2001)، تفرق (Sequestration) (Balabaskaran *et al*. 1989) یا با حفاظت در برابر اثرات سمی ثانویه مانند افزایش در پروکسیداسیون لیپید، القا شده با حشره کش درگیر هستند (Vontas *et al.* 2001).

دخالت گلوتاتیون اس-ترانسفرازها در متابولیسم حشره-کش‌ها از مگس خانگی، کنه شکارگر *Neoseiulus fallacis* (Mullin *et al*. 1982) ، لارو *Heliothis virescens* (Bull and Whitten, 1972) و سوسک آرد، *Tribolium castaneum* (Wool *et al*. 1982) گزارش شده است. نقش گلوتاتیون اس-ترانسفرازها هم‌چنین در *Plutella xylostella* ضمن توسعه مقاومت به ارگانوفسفره‌ها به خوبی مشخص شده است (Ho, 1966 ; Balabaskaran *et al*. 1989). از سوی دیگر، P_{450} ها گروه متنوعی از آنزیم‌ها با عملکردهای بسیار با طیفی گسترده از بیوسنتز تا متابولیسم زنوبیوتیک‌ها هستند. تعداد ژن‌های P_{450} در ژنوم حشره، از ٤٦ تا بیش از ١٥٠ عدد متغیر است که هر یک، کدکننده یک آنزیم ویژه از P_{450} هستند (Feyereisen, 2006; Nelson, 2006). افزایش بیان سیتوکروم P_{450} ها دلیل عمده مقاومت به حشره‌کش‌ها در گونه‌هایی از حشرات مهم از نظر تجاری بوده است (Opennorth, 1985).

در این بررسی، ابتدا به منظور تعیین اثر کشندگی دو حشره کش فرموله شده تیامتوکسام و پیریمیکارب بر شته سیاه باقلا، *A. fabae*، در طی ٢٤ ساعت، از طریق غوطه-وری برگ باقلا در غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی، آزمون‌های زیست سنجی انجام گرفت. سپس غلظت‌های زیرکشنده‌ای که باعث ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠ و ٥٠ درصد مرگ و میر شته می‌شدند برای ارزیابی چگونگی تغییرات در سیستم آنزیمی مونواکسیژنازها و گلوتاتیون اس-ترانسفرازهای شته سیاه باقلا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت باقلا

بذر گیاهان باقلا (*Faba vulgaris*) به طور منظم، دو بار در هفته، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک اره کاشته می‌شدند. خاک اره علاوه بر وزن سبک، که حمل و نقل گلدان‌ها را آسان می‌سازد، از شیوع آلودگی قارچی به ویژه رایزوکتونیا و فوزاریوم جلوگیری می‌کند و پوشش مناسبی برای انجام عمل تهویه و نگهداری رطوبت بوده و جایگزین مناسبی برای خاک محسوب می‌شود. بذرهای باقلا که پیش از کاشت به منظور تسریع در جوانه زنی، به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در آب خیس خورده بودند، به تعداد ١٠ تا ١٢ عدد در سطح خاک اره‌ای که به ارتفاع ١٠ تا ١٥ سانتی متری از کف گلدان ریخته می‌شد، قرار داده می‌شدند. نهایتا روی بذرها با مقداری دیگر خاک اره پوشانیده می‌شد. گیاهان (در شرایط گلخانه با دمای ٥±٢٥ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ٢٠±٥٠ درصد) یک روز در میان آبیاری می‌شدند و برای جبران کمبود مواد غذایی، هر چهار روز یک بار کود کامل هورتی-گرو (N: K: P: Mg: ٢٠: ٢٠: ٢٠: ٢ درصد؛ تولید هورتی‌لند، هلند) به نسبت یک و نیم تا سه گرم در لیتر به گیاهان داده می‌شد. دو هفته بعد از شروع کاشت، زمانی که گیاهان به ارتفاع حدود ١٢ سانتی متری می‌رسیدند، به اتاق رشد منتقل می‌شدند تا توسط شته‌ها آلوده شوند.

پرورش شته سیاه باقلا

جمعیت اولیه شته سیاه باقلا، (*Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae متعلق به آزمایشگاه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) واقع در ساختمان موزه جانورشناسی دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران، بود که در شرایط جدید روی گیاهان باقلا در اتاقک رشد، با دمای ١±٢٣ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ١٠±٧٠

درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده می‌شد. به منظور حفظ جمعیت شته-ها، هر دو تا سه روز یک بار، چند گیاه سالم و شاداب به اتاق رشد منتقل شده در اختیار شته‌ها قرار می‌گرفت.

حشره کش‌ها

دو ترکیب حشره‌کش پیریمیکارب (پریمور®، ۵۰٪ WP، گل سم گرگان) و تیامتوکسام (آکتارا®، ۲۵٪ WG، سینجنتا) برای آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. فرمولاسیون تجاری این دو حشره کش به ترتیب، از شرکت گل سم گرگان و اداره حفظ نباتات تهران تهیه شد.

تست زیست سنجی شته‌ها

زیست‌سنجی شته‌ها به روش تماس با باقیمانده خشک سم به جای مانده بر سطح برگ طی مدت زمان ۲۴ ساعت، با استفاده از شته‌های ماده بالغ بی بال ۲۴ ساعته، انجام شد. بدین منظور، پس از این که غلظت‌های بالا و پایین (کمتر از ۱۰ و بیش از ۹۰ درصد کشندگی) از فرمولاسیون‌های حشره‌کش طی آزمون‌های اولیه تعیین شدند، برای انجام آزمون‌های اصلی با استفاده از روش گفته شده در بالا، پنج غلظت از هر یک از فرمولاسیون-های تجاری (تیامتوکسام، بین ۱۷/۵ تا ۷۵۰ میلی گرم ماده مؤثر بر لیتر و پیریمیکارب، ۰/۲۵ تا ۱۵ میکرولیتر ماده مؤثر در لیتر) در آب مقطر به عنوان حلال ساخته شد. برای آزمایش زیست سنجی، برگ‌های باقلا از گیاهان هم سن و از نواحی هم‌سانی از گیاهان از قسمت دمبرگ بریده شدند. در آزمایشگاه در هر یک از غلظت‌های محلول‌های حشره‌کش، به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده، در زیر هود به مدت یک ساعت خشک شدند. برگ‌ها در محیط آگار-آگار ۱/۲ درصد طوری قرار داده شدند که سطح پشتی آن‌ها رو به بالا باشد. پس از بستن آگار، شته-های ماده بالغ هم‌سن (۲۴ ساعته) روی برگ‌ها مستقر - شدند. آزمایش در سه تکرار و طی روزهای مختلف با ۲۰ حشره در هر تیمار انجام گرفت و مجموعا برای هر غلظت، ۶۰ حشره و نهایتا برای هر یک از حشره کش‌ها، ۳۶۰ شته بالغ بدون بال مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور هم سن کردن شته‌ها، تعداد بیش از ۱۰۰ شته ماده بالغ بدون بال به هر گلدان دارای گیاهان هم سن باقلا درون انکوباتور با دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، این شته‌ها حذف شده و به پوره‌ها اجازه داده شد تا در اتاق رشد (دمای ۱±۲۳ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت) به بلوغ برسند. دمای بالاتر انکوباتور پوره‌زایی را تسریع می‌کرد و دمای پایین‌تر اتاق رشد مانع از مرگ و میر شته‌ها می‌شد. بدین ترتیب، شته‌های بالغ شش روزه برای آزمون‌های زیست سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون در فاصله زمانی ۲۴ ساعت و مجددا در انکوباتور با شرایط ثابت گفته شده در بالا انجام گرفت و شته‌هایی که بعد از این زمان با تحریک قلم موی نازک حرکت نمی‌کردند، مرده تلقی شدند.

تعیین فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

پس از تعیین غلظت زیر کشنده، واحدهای آزمایشی به شیوه زیست سنجی آماده شدند و شته‌های بالغ هم سن، به روش گفته شده تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده (LC_{10}، LC_{20}، LC_{30}، LC_{40} و LC_{50} برای شته) قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت افراد زنده مانده برای آزمون-های بیوشیمی در ویال‌های جداگانه قرار داده شدند.

تعیین غلظت پروتئین

میزان پروتئین توسط روش بردفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد، در جذب نوری ۶۳۰ نانومتر تعیین شد.

سنجش آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز

هموژنایز افراد زنده در بافر تریس-HCL سرد ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸ و سانتریفوژ در g۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس صورت گرفت

(Stump and Nauen, 2002). در سنجش گلوتاتیون اس-ترانسفراز روش (Stump and Nauen, 2002) مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای DCNB یا CDNB (دارای ۰/۱ درصد اتانول) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول GSH در بافر تریس- HCl (۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸) در چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و جذب نوری آنزیم طی زمان پنج دقیقه در طیف نوری ۳٤۰ نانومتر خوانده شد. غلظت نهایی GSH پنج میلی مولار و سوبستراهای بنزنی یک میلی مولار در محلول واکنش بودند.

فعالیت اکسیداز میکروزومی کل

کل بدن حشرات زنده مانده در بافر فسفات سدیم ۰/۰٤ مولار با اسیدیته ۷ هموژنایز شدند. هموژنات‌ها در g۱۰۰۰۰ در ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و رونشین به عنوان عصاره آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Wang *et al*. 2001). میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم مونواکسیداز با استفاده از سوبسترای TMBZ (۳، ۳'، ۵، ۵'، تترامتیل بنزیدین دی‌هیدروکلراید (خلوص بیشتر از ۹۸ درصد) با روش مارتین و همکاران (Martin *et al*. 2002) انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (اسیدیته ۷/۲)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۵۰ میکرولیتر TMBZ (۱۳ میلی گرم در ٦/۵ میلی لیتر متانل در ۱۹/۵ میلی لیتر در بافر استات سدیم ۰/۲۵ مولار با اسیدیته۵/۰) بود. سپس ۲۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (سه درصد) افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد به وسیله سیتوکروم c رسم شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

در آزمون تعیین سمیت در کوتاه مدت (۲٤ ساعت) رگرسیون غلظت-مرگ و میر در شته‌ها از طریق آنالیز پروبیت با استفاده از نرم افزار Polo-plus (Robertson *et al*. 2007). ارزیابی شد تا علاوه بر غلظت کشنده میانه، و LC های مورد نیاز برای آزمایش های بعدی، محدوده اطمینان ۹۵ درصد (FL) و شیب خطوط به دست آیند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی در سه تکرار و بر اساس طرح کامل تصادفی انجام گرفت. در تمامی واکنش‌ها در بلانک‌ها به جای عصاره آنزیمی، از آب مقطر استفاده شد. تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون LSD (Least significant difference) در نرم افزار SAS (SAS Institute Inc. 2003) انجام شد.

نتایج و بحث

اثرات کوتاه مدت (۲٤ ساعته) دو حشره‌کش تیامتوکسام و پیریمیکارب بر شته *Aphis fabae* نشان داد که غلظت میانه کشنده به ترتیب برای شته در معرض تیامتوکسام ۱۱۳/۸۵ و در معرض پیریمیکارب ۲/۹٤ میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر بودند. محققین از روش‌های مختلفی برای زیست‌سنجی استفاده کرده‌اند (Gerami and Heidari, 2013; Zuo *et al*. 2016). در این بررسی در مورد شته‌ها از روش غوطه‌ورسازی برگ در محلول سمی استفاده شد که تکنیک متداولی در ارزیابی اثر تماسی با حشره‌کش‌ها است (Coon *et al*. 2009; Zuo *et al*. 2016). نتیجه زیست سنجی‌ها، نشان‌گر حساسیت بالای شته‌ها به این حشره‌کش‌ها بودند (جدول ۱). نیکویی برازش در تیمارهای تیامتوکسام نسبتا مناسب بود و ناهمگونی ناچیز و نزدیک به یک در تیمار تیامتوکسام (۰/۹۹) مشاهده شد. ناهمگونی تیمارهای تحت تأثیر پیریمیکارب (۱/٦۱) شاید به دلیل فرمولاسیون پودر وتابل باشد، زیرا این آفت‌کش باید به طور مداوم در ظرف هم زده شود (جدول ۱). از آن جایی که LC_{50} پیریمیکارب برای شته ۳۸/۷ برابر

پایین‌تر از LC_{50} محاسبه شده برای تیامتوکسام بود، این موضوع پیریمیکارب را بیش از حشره‌کش دیگر به عنوان شته‌کش اختصاصی معرفی کرد. از سوی دیگر، شدت کشندگی پیریمیکارب نیز برای شته بالاتر از تیامتوکسام ارزیابی شد (جدول ۱).

پیریمیکارب یک شته‌کش اختصاصی کاربامات با عملکرد سریع است که از طریق تماسی، خوراکی، بخار، و سیستم ریشه فعالیت می‌کند (Jutsum *et al*. 1988). مطالعات مختلفی مقایسه جمعیت‌های حساس و مقاوم گونه‌های مختلفی از شته‌ها به پیریمیکارب را نشان می‌دهد (Coon *et al*., 2009). هم‌چنین در آزمایشی، استرین‌هایی از شته *Myzus persicae* را به صورت دوره‌ای با غلظت LC_{30} فرمولاسیون پیریمیکارب به این آفت‌کش مقاوم کردند (Kwon *et al*. 2009). زیست سنجی باقیمانده آفت‌کش روی برگ در مدت زمان ٤٨ ساعت میزان LC_{50} برای استرین حساس را ١٦/٥ پی پی ام نشان می‌داد و مقاومت استرین مقاوم ١٣١ برابر بیشتر بود که با توجه نوع فرمولاسیون پیریمیکارب (pirimicarb, 25% WP) و محاسبه میزان ماده تکنیکال، LC_{50} ١/٤ برابر بیشتر از جمعیت حساس *Aphis fabae* در زیست سنجی ٢٤ ساعته در آزمایش ما بود. هم‌چنین شدت کشندگی در هر دو شته تقریبا قابل مقایسه بود (٢/٥٨±٠/٤٢ و ٢/٣±٠/٤ = Slope ± SE به ترتیب در شته *Aphis fabae* و شته *Myzus persicae*).

حساسیت شته‌های مختلف به نئونیکوتینوئیدها به وسیله محققان مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. میزان LD_{50} ایمیداکلوپرید را بر دو جمعیت شته *Myzus persicae* جمع آوری شده از رشت و کرج به ترتیب ٨/٥٦ و ٧/٨٠ نانوگرم ماده مؤثره به ازای هر حشره محاسبه کردند(Ghadamyari *et al*. 2008). در یک آزمایش مشابه، شته‌های *Myzus persicae* حساس، LC_{50} معادل ١/٩ و ٣/٩ به فرمولاسیون ایمیداکلوپرید و استامیپرید (imidacloprid 10% WP، acetamiprid 8% WP) داشتند. در حالی که شته‌های مقاوم به پیریمیکارب به این دو حشره‌کش مقاومت تقاطعی نشان دادند و به ترتیب LC_{50} برابر با ١٠ و ١٧٥/٢ داشتند (Kwon *et al*., 2009).

حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی مختلف، اثرات مختلفی بر شته‌ها داشتند. ضمن زیست سنجی به صورت قطره‌گذاری با میکرواپلیکاتور، LC_{50} دو کلون شته *Myzus persicae* تحت تأثیر ماده تکنیکال تیامتوکسام ٠/٦٥ و ١٩/٧ میلی گرم در لیتر گزارش شد. هم‌چنین غلظت کشنده نیمی از جمعیت دوکلون این شته با ایمیداکلوپرید ١/١٣ و ٣١/١، با کلوتیانیدین ٠/٥٩ و ١٧/٧٧ و با تیاکلوپرید ٠/٦١ و ١٨/ ٢٥ میلی گرم در لیتر بود (Puinean *et al*. 2010).

نتایج حاکی از ارزیابی اثرات دو حشره کش تیامتوکسام و پیریمیکارب بر آنزیم‌های سم‌زدای شته *A. fabae* نشان داد زمانی که آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز با سوبسترای CDNB اندازه گیری می‌شود، در شته *A. fabae* نوعی القای آنزیم با افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب مشاهده می‌شود (df =١٢، F=١٨/٨٧ ، P = ٠/٠٠٠١) (شکل ١A). هم‌چنین تیامتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر اثر القا کنندگی آنزیم را نشان می‌داد اما روند افزایش آنزیم خطی نبود (df =١٢، F=٩/١٥ ، P=٠/٠٠٠٩) (شکل ١B). با این وجود اندازه گیری گلوتاتیون اس-ترانسفراز به وسیله سوبسترای DCNB داده قابل نتیجه گیری نشان نداد.

استفاده از سوبستراهای مختلف در بسیاری مواقع فعالیت-های متفاوتی از آنزیم را نشان می‌دهند. این موضوع به ویژه در ارتباط با سوبسترای DCNB در دو زنجرک تشخیص میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز قابل تأمل‌تر بوده است (Hung *et al*. 1990; Yang *et al*., 2001). محققین با مقایسه برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های سم‌زدا در کفشدوزک شکارگر *Harmonia axyridis* و دو شته شکار آن، *Aphis citricola* و *Myzus malisuctus* دریافتند در تمامی گونه‌های تست شده فعالیت GST از طریق CDNB بسیار بیشتر از DCNB بوده است.

جدول ۱- حساسیت ماده بالغ بدون بال شته سیاه باقلا، *A. fabae* به دو حشره کش تیامتوکسام و پیریمیکارب.

Table 1. Suscebtility of the apterous adult female of *A. fabae* to the insecticides, thiamethoxam and pirimicarb

حشره کش	تعداد	غلظت mg(ai)L^{-1}(95%Cl)$^{-1}$						
		LC_{50}	LC_{40}	LC_{30}	LC_{20}	LC_{10}	Slope±SE	X^2(df)
پیریمیکارب	۳٦۰	۲/۹٤(۱/۷۱-۳/۹۹)	۲/۳۵(۱/۱۷-۳/۲۹)	۱/۸٤(۰/۷۸-۲/۷۱)	۱/۳۹(۰/۲۳-۱/۱۹)	۰/۹۳(۰/۲۳-۱/٦٤)	۲/۵۸±۰/٤۲	۲۱/۰۰(۱۳)
تیامتوکسام	۳٦۰	۱۱۳/۸۵(٦۸/۹٤-۱٦٦/۲۱)	۷۵/۰٦(٤۰/۲٦-۱۱۳/۷۰)	٤۸/۰۷(۲۲/۱۱-۷۷/۵٦)	۲۸/۵۳(۱۰/۷۷-۵۰/٤٤)	۱۳/۸۵(۳/۹۱-۲۸/۲)	۱/٤۰±۰/۲۱	۱۲/۸۹(۱۳)

شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز شته *A. fabae* با استفاده از سوبسترای CDNB.

Figure 1. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the *A. fabae* Glutathione-s-transferase enzyme using CDNB as substrate.

در حقیقت، اتصال (conjugation) DCNB در هیچ یک از دو گونه *M. malisuctus* و *A. citricola* مشاهده نشد. هرچند، دلیل این عدم اتصال (conjugation) آشکار نگردید. مشابه با این بررسی، محققین گزارش کردند که فعالیت GST از طریق سوبسترای CDNB در تمامی حشرات تست شده بسیار بالاتر از DCNB بوده و هیچ اتصالی به سوبسترای DCNB در *Nilaparvata lugens* و *Laodelpha stiatellus* دیده نشده است (Hung *et al.* 1990). نیز محققین نشان دادند سوبسترای CDNB به وضوح تفاوت فعالیت آنزیم‌های GST را در کنه‌های پرورش یافته روی ذرت، لوبیا و خیار نشان می‌دهد (Yang *et al.* 2001). این روند افزایش فعالیت آنزیم هم سو با گذشت زمان صورت می‌گرفت. در مقابل، وقتی که DCNB به عنوان سوبسترا برای سنجش به کار رفت، تفاوتی در فعالیت GST در میان کنه‌های تارتن تغذیه شده با گیاهان مختلف دیده نشد.

تفاوت‌های موجود در میزان فعالیت آنزیم‌ها را هم‌چنین می‌توان در سایر انواع سوبستراها مشاهده کرد. به عنوان مثال، در یک بررسی ، ضمن مقایسه جمعیت‌های مختلف پسیل آسیایی مرکبات *Diaphorina citri* با جمعیت حساس آزمایشگاهی با استفاده از آلفا-نفتیل استات به عنوان سوبسترا تفاوت‌های آماری معنی داری مشاهده نکردند (Tiwari *et al.* 2011). با این وجود تفاوت‌ها ضمن استفاده از بتا-نفتیل استات چشم‌گیر بود. تعیین فعالیت‌های گلوتاتیون اس-ترانسفراز با سه سوبسترای CDNB، DCNB و DNIB در مراحل مختلف زندگی کفشدوزک *Adalia bipunctata* نیز حاکی از فعالیت‌های بسیار پایینی در ارتباط با DCNB بود، اما در ارتباط با دو سوبسترای دیگر سطوح بالاتری از آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز ارزیابی شد (Fransis *et al.* 2002).

سیتوکروم مونوکسیژنازهای P_{450} سیستم متابولیکی مهمی هستند که افزون بر آنابولیسم و کاتابولیسم ترکیبات درون زاد شامل هورمون‌ها و فرمون‌ها، در سم زدایی یا فعال سازی زنوبیوتیک‌ها نقش دارند (Brown *et al.*, 2003). تأثیر حشره‌کش پیریمیکارب بر آنزیم سیتوکروم P_{450} شته *A. fabae* باعث افزایش القای آنزیمی شد و تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف به وجود آورد (df=۱۲ ، F=۶۳/۶۲، P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۲A). هم‌چنین تأثیر حشره کش تیامتوکسام نیز بر آنزیم سیتوکروم P_{450} شته سیاه باقلا افزایشی معنی‌دار را در تیمارهای مختلف نشان می‌داد (df=۱۲ ، F=۲۹/۶۳، P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۲B).

در آزمایش حاضر، غلظت‌های پایین‌تر تیامتوکسام و پیریمیکارب، القاگران مؤثرتری بر فعالیت P_{450} شته سیاه باقلا بودند (شکل ۲). در این ارتباط، دیوید و همکاران (David *et al.* 2006) نتایج مشابهی را ارائه کردند. ایشان گزارش کردند که لاروهای پشه *Aedes aegypti* که در معرض دز زیرکشنده مواد سمی برگ بوده‌اند در میزان فعالیت اتوکسی کومارین-او- داتیلاز آن‌ها افزایش دیده می‌شود. در واقع، با افزایش دز تا حداکثر پنج درصد که باعث مرگ و میر ۳۰ درصدی لاروی می‌شد، افزایش معنی‌داری در فعالیت‌های P_{450} لاروی دیده شد. در دزهای بالاتر مواد سمی برگ، فعالیت‌های P_{450} مجددا کاهش می‌یافت؛ به طوری که در دز ۱۰ درصد، که باعث مرگ و میر ۹۷ درصد لاروها می‌شد، میزان فعالیت P_{450}به سطحی معادل شاهد می‌رسید. این روند می‌تواند نشان دهد که هر موجود زنده دارای ظرفیت متابولیکی و حد تحمل ویژه‌ای در مواجهه با یک ترکیب زنوبیوتیک است و در حقیقت، واکنش موجود زنده در برابر دزهایی بالاتر از حد تحمل به صورت افزایش احتمال مرگ و میر بروز می‌کند و در میزان فعالیت‌های آنزیم‌های سم‌زدا تغییرات خاصی دیده نمی‌شود. شواهد مشخصی از بررسی‌ها بر روی بدن جانور و مطالعات کشت بافت موجود است که ثابت می‌کند آفت‌کش‌ها القای استرس اکسیدی می‌کنند. از سوی دیگر، بیومارکرهای در معرض قرار گیری (Biomarkers of Exposure) در سم‌شناسی مهم هستند، زیرا آن‌ها شاخص‌های مناسبی برای دزهایی که وارد بدن می‌شوند یا مقادیری از مواد شیمیایی که

توسط بدن جذب می‌شوند، هستند. در بررسی حاضر، طی انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، بر سنجش آنزیم‌های سم‌زدا (گلوتاتیون اس-ترانسفرازها و سیتوکروم P_{450}) تکیه شد و مشخص شد که در شته *A. fabae* هر دو آنزیم‌های یاد شده این قابلیت را داشتند که به عنوان بیومارکر مورد توجه قرار گیرند. افزون بر این که مونواکسیژنازهای P_{450} آنزیم‌های بسیار مناسبی در تشخیص آلودگی شته تحت تأثیر سموم کاربامات و نئونیکوتینوتیدی در غلظت‌های بسیار پایین (۱۰ درصد کشنده) می‌باشند. در حالی که گلوتاتیون اس-ترانسفرازها به ویژه در ردیابی آلودگی ترکیبات کاربامات، فعالیتی وابسته به غلظت ترکیب دارند و با افزایش مقدار این ترکیبات، فعالیت آن‌ها افزایش پیدا می‌کند.

شکل ۲- تأثیر دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 شته *Aphis fabae*

Figure 2. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the activity of *A. fabae* Cytochrome P450 enzyme.

منابع

Adams M.D, Celniker S.E, Holt R.A, Evans C.A, Gocayne J.D, Amanatides P.G, Scherer S.E, Li P.W, Hoskins R.A, Galle R.F. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185.

Balabaskaran S, Chuen SS. And Muniandy S. 1989. Glutathione s-transferase from the diamond back moth (*Plutella xylostella* linnaeus). Insect Biochemistry 19: 435-443.

Basij M, Talebi K, Ghadamyari M, Hosseininaveh V, Salami SA. 2016. Status of resistance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to Neonicotinoids in Iran and Detoxification by Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. Neotropical Entomology 25(5): 1-10.

Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analithcal Biochemistry 72: 248–254.

Brown D., Zhang L, Wen Z., And Scott JG. 2000. Induction of P450 Monooxygenases in the German cockroach, *Blattella germanica* L. Arch. Insect Biochemistry Physiology 2003: 53:119–124.

CAB. 2000. International, Crop Protection Compendium, Global Module, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Chandrasena D, Difonzo Ch, and Byrne A. 2011. An Aphid-Dip Bioassay to Evaluate Susceptibility of Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) to Pyrethroid, Organophosphate, and Neonicotinoid Insecticides. Journal Economic Entomology 104(4): 1357-1363.

Cloyd R.A. and Bethke J.A. 2011. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. Pest Management Science 67: 3–9.

Coon M.J. Vaz A.D. Bestervelt L.L. 1996. Peroxidative reactions of diversozymes. Fedration of American Soceities for Experimental Biology 10: 428-434.

David J.P, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H. And Dauphin-Villemant C. 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. Insect Biochemistry Molocular Biology 36:410–420.

Esmaili M, Mirkarimi A.A, Azmayesh Fard P. 1998. Agriculture Entomology. Tehran University Publication (In Farsi with English Abstract).

Feyereisen R. 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicology Letter 82/83: 83–90.

Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. Biochemistry Society Transaction 34: 1252–1255.

Feyereisen R. 2015. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. Pest Management Science 71(6): 793–800.

Francis F. Haubruge E. And Dierick P. 2002. Glutathione S-Transferase Isoenzymes in the Two-Spot Ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Archive Insect Biochemistry Physiology 49:158–166.

Gerami Sh, and Heidari A. 2013. Effect of Different Bioassay Methods on Enzymatic Characteristics of Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Journal of Agricultural Science and Technology 3: 819-824.

Ghadamyari M, Talebi K, Mizuno H. & Kono Y. 2008. Oxydemeton-Methyl Resistance, Mechanisms, and Associated Fitness Cost in Green Peach Aphids (Hemiptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 101: 1432-1438.

Hasanshahi Gh, Abbasipour H, Jahan F, Askarianzadeh A, Karimi J, and Rastegar F, 2016. Fumigant toxicity and nymph production deterrence effect of three essential oils against two aphid species in the laboratory condition. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19 (3): 706 – 711.

Hayes J.D, And Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Biochemistry Molocular Biology 30: 445-600.

Ho T.H. 1965. The life history of the diamond-black moth in Malaya. Diversity of agriculture Bulletin 188: 26.

Hung C.F, Kao CH, Liu C.C, Lin J.G. And Sun C.N. 1990. Detoxifying enzymes of selected insect species with chewing and sucking habits. Journal of Economic Entomology 83: 361-365.

Hyne R.V. And Maher W.A. 2003. Invertebrate biomarkers. Links to toxicities that predict population decline. Ecotoxicology Environmental Safety 54: 366-374.

Jalali M.A, Leeuwen T.V, Tirry L. And De Clercq P. 2009. Toxicity of selected insecticides to the two-spot ladybird *Adalia bipunctata*. Phytoparasitica 37: 323-326.

James DG. 2003. Pesticide Susceptibility of Two Coccinellids (*Stethorus punctum* picipes and *Harmonia axyridis*) Important in Biological Control of Mites and Aphids in Washington. Biocontrol Science Technology 13:253-259.

Jutsum A.R, Franz J.M, Deacon J.W, Payne C.C, Lewis T, Paterson R.R.M, Waage J.K. And Van Emden HF. 1998. Commercial application of biological control: status and prospects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B 318: 357–373.

Khanjani M. 2004. Field Crop Pest in Iran. Bu-Ali Sina University Publication (In Farsi with English Abstract).

Kwon D.H, Choi B.R, Lee S.W, Clark J.M. & Lee S.H. 2009. Characterization of carboxylesterase-mediated pirimicarb resistance in *Myzus persicae*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93: 120-126.

Martin T, Chandre F, Ochou O.G, Vaissayre M, Fournierd D. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pesticide Biochemistry Physiology 74: 17–26.

Mullin C.A, Croft B.A, Strickler K, Matsumura F. and Miller J.R. 1982. Detoxification enzyme differences between a herbivorous and predatory mite. Science 217: 1270-1272.

Nelson D.R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J.J, Feyereisen R, Waxman D.J, Waterman M.R, Gotoh O, Coon M.J, Estabrook R.W, Gunsalus I.C, Nebert D.W. 1996. 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6:1-42.

Oppenoorth F.J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In And Gilbert LJ (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and PharmacologyKerkut GS. Pergamon, Oxford 12: 731-773.

Puinean A.M, Foster S.P, Oliphant L, Denholm I, Field L.M., Millar N.S, Williamson M.S, And Bass C. 2010. Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. PLoS Genetics 6: 1-11.

Ranson H, Rossiter L, Ortell F, Jensen B, Wang X, Roth C.W, Collins F.H. And Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemistry Journal 359: 295–304.

Rendic S and DiCarlo F.J. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drag Metabolism review. 29: 413-580.

Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., & Savin, N.E. 2007. Bioassays with Arthropods. Second Edition, Taylor and Francis, Boca Raton London New York, pp 199.

Ruberson J.R, Nemoto H. And Hirose Y. 1998. Pesticides and conservation of natural enemies in pest management, In: Barbosa P. (Ed.), Conservation Biological Control, Academic Press, New York 207-220.

Sánchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees – a risk assessment. PLoS One 9:e94482.

SAS Institute, SAS/STAT. 2003. Guide for Personal Computers. Ver. 6.12. SAS Institute, Cary, NC.

Stark J.D, Sugayama R.L, and Kovaleski A. 2007. Why demographic and modeling approaches should be adopted for estimating the effects of pesticides on Biocontrol agents. BioControl 52: 365-374.

Stumpf N. And Nauen R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry Physiology 72: 111-121.

Sulaiman S, Ndula M, Riveron J.M, Irving H and Wondji Ch. 2016. The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid crossresistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. Molecular Ecology 25(14): 3436–3452.

Syngenta, Catalogo. 2004. Syngenta Crop Protection. Syngenta, LisboaPortugal.

Tiwari S, Mann R.S, Rogers M.E. And Stelinski L.L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. Pest Management Sciety 2011: 67: 1258–1268.

Vontas J.G, Small G.J, Hemingway J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. Biochemistry Journal 357: 65-72.

Wang K.Y, Liu T.X, Yu C.H, Jiang X.Y. And Yi M.Q. 2002. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. Journal of Economic Entomology 2002: 95: 407-413.

Wei SH, Clark AG, And Syvanen M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly Musca domestica. Insect Biochemistry Molocular Biology 31: 1145–1153.

Wool D, Noiman S, Manheim O. And Cohen E. 1982. Malathion resistance in *Tribolium strains* (Coleoptera, Tenebrionidae) and their hybridsinheritance patterns and possible enzymatic mechanisms. Biochemistry Genetic 20: 621-636.

Yang TC, Chi H. 2006. Life tables and development of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) at different temperatures. Journal of Economic Entomology 99: 691-698.

Yang X, Margolies DC, Zhu KY. 2001. And Buschman LL: Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology 94: 381-387.

Zuo Y, Wang K, Zhang M, Peng X, Jaime C. Chen M. 2016. Regional susceptibilities of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) to ten insecticides. Florida Entomologist 99(2): 269-275.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه۱۶۶-۱۵۵

تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین روی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد

Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame

شهره امان‌الهی[۱]، فاطمه دهقان نیری[۲،*]، میترا محمدی بازرگانی[۳]

Shohreh Amanelahy[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*], Mitra Mohammadi Bazrgani[3]

۱- کارشناس‌ارشد، ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

1. M.Sc. 2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3. Assistant Professor of Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) منبع منگنز، مس و سرشار از کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. همچنین حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید گروه لیگنان‌ها با نام‌های سزامین و سزامولین می‌باشد که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند. دراین تحقیق تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل‌آلانین بر میزان بیان دو ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز سزامین (*CYP81Q1* و *C3H*) در کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بررسی گردید. تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین به ترتیب در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نمونه‌برداری انجام شد. بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین در همه نمونه‌های تیمار شده با اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین افزایش یافت. در مورد ژن *CYP81Q1* بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود. بیشترین افزایش بیان ژن *C3H* مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود.

واژه‌های کلیدی

کنجد،
سزامین،
اسیدسالیسیلیک،
فنیل‌آلانین،
qRT-PCR.

مقدمه

گیاهان دارویی از منابع قابل توجه در تهیه داروهای گیاهی و مصنوعی هستند و شرکت‌های داروسازی از بیش از ۲۵۰۰۰ گیاه برای تهیه داروها استفاده می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه مسئول خاصیت دارویی گیاهان هستند. اغلب متابولیت‌های ثانویه با قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون تولید می‌شوند. کشت سوسپانسیون سلولی شامل توده‌های سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع در حال تکان خوردن است. شروع این کشت معمولاً با انتقال قطعات کوچکی از کالوس ترد و تمایز نیافته به محیط کشت مایع است. ارلن‌های حاوی ریزنمونه یا کالوس روی یک شیکر به طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شوند. تکان دادن محیط کشت با استفاده از شیکر با اعمال فشار ملایمی بر توده‌های سلولی آن‌ها را به توده‌های کوچک‌تر و سلول-های انفرادی می‌شکند و پراکنش یکنواختی از سلول‌ها در محیط کشت ایجاد می‌شود. همچنین در اثر این حرکت، تبادل گازی مطلوبی بین محیط کشت و هوا برقرار می-شود. از کشت سوسپانسیون سلولی برای بررسی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی و نیز به عنوان منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش استفاده می‌شود. کنجد احتمالا قدیمی‌ترین دانه روغنی است که توسط انسان شناخته و به عنوان یک منبع غذایی استفاده شده است کنجد سرشار از منگنز، مس، کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. به جز این مواد مغذی مهم، کنجد حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید به نام لیگنان‌ها شامل سزامین و سزامولین است که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند، از فشار خون بالا جلوگیری می‌کنند و مشتقات ویتامین E را در حیوانات افزایش می‌دهند. روغن کنجد در بین روغن‌های خوراکی به ملکه روغن‌ها مشهور است (Wahid, 2007; Moazzami et al., 2006). روغن کنجد حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و تاثیر چشمگیری در پیشگیری از بیماری‌های مختلف دارد (Hirose, 1991; Kang et al., 1999)، به دلیل کاربرد آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان‌ها در دهه گذشته تلاش‌های زیادی در راستای شناخت بیشتر فواید سزامین، ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین و افزایش میزان بیان ژن-های دخیل در مسیر بیوسنتز آن انجام شده است. یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر تولید سزامین ژن *CYP81Q1* است که با افزایش بیان آن در مراحل تشکیل دانه کنجد محتوای سزامین دانه افزایش می‌یابد. بطورکلی ترکیبی از انتقال ژن، نور، و الیسیتور یک استراتژی امیدوار کننده برای بهبود بیشتر تولید و بهره وری لیگنان ها از جمله سزامین می باشد (Satake et al., 2015)، که از سه عامل نام برده شده تا کنون فقط اثر دوره روشنایی بر رشد گیاهان، و محتوای سزامین و بیان ژن *CYP81Q1* درگیاه کنجد بررسی شده است (Hata et al., 2012). سنتز سزامین از پینورزینول توسط ژن *CYP81Q1* طی دو مرحله صورت می‌گیرد (Ono et al., 2006; Hata et al., 2010). روش RT-PCR کمی از معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن می‌باشد. اساس این روش بر پایه نسبت بیان ژن موردنظر به بیان ژن خانه‌دار است. یکی از روش‌های نمایش داده‌های RT-PCR کمی روش CT مقایسه‌ای است که به عنوان روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ شناخته می-شود. در این روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ به عنوان Fold Change (FC) است یعنی ژن موردنظر چند برابر ژن خانه‌دار بیان شده است. از این روش برای بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد استفاده می‌شود. طی دهه-های اخیر تحقیق روی آنتی‌اکسیدان‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده و مطالعه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در غذا و فواید سلامتی بالقوه آنها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Qusti et al., 2010). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز سزامین (*CYP81Q1* و *C3H*) در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد است.

مواد و روش‌ها

کشت سوسپانسیون سلولی

دانه کنجد رقم کرج۱ از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. در این مطالعه از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به عنوان محیط کشت پایه جهت کشت دانه و تولید گیاهچه درون شیشه‌ای، کالوس‌زایی و تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور دانه‌های کنجد ابتدا به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ مرتبه و هر بار به مدت دو دقیقه شستشو شدند. تمام مراحل ضدعفونی زیر هود لامینار و در ظروف استریل انجام گرفت. پس از ضدعفونی، دانه‌ها در ظروف کشت حاوی محیط MS فاقد هورمون و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. دانه‌ها به منظور جوانه‌زنی ۳ روز در تاریکی نگهداری و سپس به اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در این پژوهش از هیپوکوتیل گیاهچه‌های ۱۸ روزه رقم کرج۱ به عنوان ریزنمونه استفاده شد. هیپوکوتیل به قطعات یک سانتی‌متری برش داده شد و به حالت افقی و به صورت جداگانه روی محیط کشت قرار گرفت. پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کالوس‌زایی پتری‌های حاوی کشت در شرایط تاریکی در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه‌ها انجام شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، در یک ارلن متناسب با حجم تیمارها، ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر، به عنوان منبع کربن در آب مقطر به وسیله همزن مغناطیسی حل شد. سپس نمک‌های محیط MS به محلول اضافه و با آب مقطر به حجم نهایی رسانده شد. پس از اضافه کردن هورمون‌ها، با استفاده از آب مقطر حجم نهایی هر ارلن تعیین و pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد و برای ضدعفونی اتوکلاو گردید. سپس از محیط‌های به دست آمده به میزان ۳۰ میلی‌لیتر به ارلن‌های ۱۰۰ میلی-لیتری منتقل شد. به ارلن‌ها ۰/۵ گرم کالوس انتقال داده شد. ارلن‌های حاوی سوسپانسیون سلولی روی شیکر با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند.

اعمال محرک (الیسیتور)

جهت افزایش تولید سزامین، از الیسیتور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل‌آلانین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور تیمارهای اسیدسالیسیلیک با غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فنیل‌آلانین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، در روز هجدهم در کشت سوسپانسیون سلولی اعمال شدند. نمونه‌برداری در ۳ بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. آزمایش تیمار سوسپانسیون سلولی کنجد با الیسیتورها در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه‌برداری از کشت‌های سلولی در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیسیتور انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA کل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-PLUS (ساخت شرکت سیناکلون) انجام شد. قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم *DNase*I (شرکت سیناکلون) استفاده شد. کمیت RNA با استفاده از ژ ل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در این روش میزان جذب نمونه RNA در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به منظور بررسی کیفیت RNA اندازه-گیری شد. این نسبت برای نمونه‌های RNA استخراج شده از سلولها، بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشانگر کیفیت مطلوب RNA استخراج شده است. cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت سیناکلون) سنتز

شد. جهت اطمینان از سنتز cDNA ها، با استفاده از آغازگر ژن *18S rRNA* (ژن خانه‌دار) واکنش PCR انجام شد و درستی ساخت آنها مورد تایید قرار گرفت. با استفاده از توالی ژن‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و نرم‌افزار Oligo5 آغازگرهای موردنظر طراحی شدند. آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیر اختصاصی و تشکیل دایمر با استفاده از Primer blast مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱– طراحی آغازگرهای واکنش qRT-PCR

Table 1. Primer design for qRT-PCR

شماره دسترسی ژن accession number	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای ذوب Tm (°C)	% GC	اندازه محصول PCR PCR product size
KP771974	CYP81Q1 F	5'-TCTCGCTCTCACCTTCGCC-3'	57.4	60	169 bp
	CYP81Q1 R	5'-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG -3'	60.9	50	
AY065995	C3H F	5'- GCCCCCACTATGTTAAGGTC -3'	66.8	55	173 bp
	C3H R	5'- GTATTCACGCAACACCAAAG -3'	65.2	45.6	
AJ236041	18SrRNA F	5- TCTTAGTTGGTGGAGCGATT -3	65.9	45	171 bp
	18SrRNA R	5- GAACATCTAAGGGCATCACA -3	64.6	45	

واکنش qRT-PCR

میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین شامل *CYP81Q1* و *C3H* در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با روش qRT-PCR بررسی شد. برای اطمینان از آلوده نبودن ترکیبات بکار رفته در این واکنش از کنترل منفی استفاده شد. در این روش از معرف SYBR Green (شرکت امینسان) و دستگاه ترمال سایکلر Rotor Gene Q (شرکت کیاژن) استفاده شد. برنامه PCR در ٤٠ چرخه انجام شد.

نتایج

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه های تیمار شده با کیت RNX-PLUS (شرکت سیناکلون) انجام شد. به منظور اطمینان یافتن از کیفیت RNAها مقدار ۳ میکرولیتر از RNAهای استخراج شده روی ژل اگارز ۱/۵٪ (w/v) الکتروفورز شد. وجود دو باند مربوط به *18S rRNA* و *28S rRNA* و عدم کشیدگی باندها نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA بود. از این RNA برای سنتز cDNA و بررسی بیان ژن استفاده شد. تمام cDNAهای سنتز شده (با غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر) به میزان ۱۵ برابر رقیق شدند و در واکنش qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش qRT-PCR

برای بررسی میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین از روش qRT-PCR استفاده شد. جهت اطمینان برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمایش از معرف SYBR Green در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها به صورت اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی مثل دایمر آغازگر بود. در این آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی در ترکیبات مورد استفاده در واکنش از کنترل

منفی استفاده شد که نتایج غیرآلوده بودن ترکیبات مورد استفاده را نشان دادند. نرمال‌سازی داده‌های CT مربوط به نمونه‌های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از روش CT ژن مرجع و صورت گرفت. بیان ژن‌ها در نمونه‌های مختلف تیمار شده با الیسیتورها به صورت FC گزارش شد.

مقایسه میانگین بیان ژن‌ها

تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن *CYP81Q1*

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی الیسیتور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور، بین زمان‌های مختلف ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ٤٨ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل۱-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت‌های مختلف الیسیتور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف الیسیتور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ٠/٥ میلی-گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ٠/١ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نشان داد که افزایش غلظت تا حدی باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است و هرچه غلظت از مقدار مشخصی بیشتر شده است بیان ژن به همان نسبت افزایش پیدا نکرده بلکه به مقدار کمی کاهش یافته است که این نشان می‌دهد همیشه افزایش غلظت الیسیتور باعث افزایش بیان ژن به همان نسبت نمی‌شود بلکه ممکن است تاثیرات منفی نیز داشته باشد. به عبارتی رابطه مستقیم بین غلظت اسیدسالیسیلیک و میزان بیان ژن وجود ندارد (شکل۱-ب).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ٠/٥ و ١ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور اسیدسالیسیلیک حاصل شد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند و کمترین تغییر در بیان ژن، در دو بازه زمانی ٢٤ و ٤٨ ساعت به ترتیب در غلظت های ١ و ٠/١ میلی‌گرم در لیتر و ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ٠/١ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد به طوری که این تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. همانطور که در شکل ١ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است (شکل۱-ج).

شکل ۱- بیان ژن *CYP81Q1* الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. ب) غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک. ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند

Figure 1. CYP81Q1 gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$.

تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمار های مختلف زمانی اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور بین زمان های مختلف ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند بطوریکه بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲٤ و ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ٤٨ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل۲-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نشان داد که افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک باعث کاهش بیان این ژن نسبت به شاهد شده است. در نتیجه همیشه افزایش غلظت الیسیتور باعث افزایش بیان یک ژن به همان نسبت نمی شود و رابطه مستقیم بین آنها وجود ندارد (شکل۲-ب).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در میزان بیان ژن بعد از اعمال ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲٤ ساعت حاصل شد و کمترین تغییر در میزان بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است و تیمارها تفاوت معنی‌دار با هم داشتند (شکل۲-ج).

شکل۲- بیان ژن *C3H* در الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. ب) غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک. ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 2. *C3H* gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

شکل۳- بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 3. *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different times after treatment with phenylalanine. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

تاثیر فنیل‌آلانین بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

آنالیز داده‌های تاثیر فنیل‌آلانین در زمان‌های مختلف در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس تاثیر فنیل‌آلانین در زمان‌های مختلف بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* نشان از معنی‌دار بودن اثر زمان در سطح یک درصد داشت. براساس نتایج حاصل دو تیمار زمانی با هم اختلاف معنی‌دار بر بیان ژن *CYP81Q1* دارند.

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین و به ترتیب بعد از آن زمان ٤۸ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین بیشترین تاثیر را داشتند. بعبارت دیگر هرچه زمان بیشتری از اعمال فنیل‌آلانین می‌گذرد بیان ژن *CYP81Q1* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده و تفاوت معنی‌داری با آن دارد. (شکل۳-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوتی معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲٤ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین به دست آمد. بیان ژن *C3H* تحت تاثیر فنیل‌آلانین روند تصاعدی نشان داد بطوری‌که هرچه از زمان اعمال فنیل-آلانین می‌گذرد بیان ژن *C3H* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیان ژن *C3H* در غلظت مورد استفاده نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده است و تفاوت معنی‌داری با آن دارد (شکل۳-ب).

تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

نتایج مقایسه میانگین اثر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به-طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. کمترین میزان بیان ژن، در تیمار فنیل‌آلانین در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۲٤ ساعت بعد از اعمال آن حاصل شد. همان‌طور که در نمودار زیر مشاهده می‌شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد شده است. معنی‌دار شدن اثر الیسیتور در غلظت در زمان نشان‌دهنده تاثیر متفاوت غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار با اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین بر بیان ژن *CYP81Q1* می‌باشد (شکل٤-الف).

نتایج مقایسه میانگین اثرهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۱ و پس از آن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری داشتند. کمترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۷۲ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال الیسیتور حاصل شد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم داشتند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می-شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است. معنی‌دار شدن اثرهای الیسیتور در غلظت در زمان نشان‌دهنده تاثیر متفاوت اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین با غلظت‌ها و زمان-های مختلف بر بیان ژن *C3H* می‌باشد (شکل٤-ب).

شکل ٤- تغییر بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در اثر متقابل زمان و غلظت اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 4. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at the interaction of time and concentration of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

شکل ۵- تغییر بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 5. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different concentrations of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت‌های مختلف بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی-گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک رخ داده است به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و کمترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی-گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین به دست آمد به-

طوری که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (شکل۵-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد به ترتیب در غلظت ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل۵-ب).

بحث

بررسی بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین

در مطالعه تیمارهای مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت‌های مختلف و بازه‌های زمانی مختلف به طور جداگانه، افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. با توجه به نتاج حاصل از مقایسه میانگین، اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* می‌شوند، در نتیجه به دلیل افزایش بیان این ژن در اثر اعمال الیسیتور، افزایش احتمالی لیگنان سزامین مورد انتظار است زیرا ژن *CYP81Q1* از ژن‌های اصلی مسیر سنتز سزامین می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک حاصل شد به‌طوری که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل-آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال آن مشاهده گردید. هرچه زمان اعمال فنیل‌آلانین بیشتر شده است بیان ژن *CYP81Q1* افزایش پیدا کرده است. از آنجایی که فنیل آلانین پیش ماده تولید سزامین است می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که افزایش پیش ماده (فنیل‌آلانین) در محیط سبب القای بیان ژن و تولید آنزیم لازم (CYP81Q1) برای تبدیل آن به ماده نهایی (سزامین) می-شود. با توجه به منحنی رشد سلول‌ها در بازه زمانی روزهای ۱۸ تا ۲۲ سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی هستند و سپس وارد فاز سکون می‌شوند (Heidarifar and Dehghan Nayeri, 2015). همچنین طبق تحقیقات به عمل آمده اسیدسالیسیلیک باعث افزایش تقسیم سلولی می‌شود (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). بر اساس منحنی رشد سلول‌های کنجد، تکثیر سلول‌ها به‌طور طبیعی تا حدود روز ۲۲ ادامه دارد که در حضور اسیدسالیسیلیک افزایش می‌یابد و در نتیجه نسخه‌های بیشتری از ژن در محیط کشت تولید می‌شوند و از سوی دیگر تأثیر مثبت الیسیتور روی القای احتمالی بیان ژن طی ۷۲ ساعت که می‌توانند دلایل افزایش بیان ژن طی این مدت باشند. تحقیقات کمی در مورد تأثیر اسیدسالیسیلیک بر عملکرد نهایی گیاهان صورت گرفته است از جمله در آزمایشی، محلول‌پاشی برگ‌های گیاهان ۳۰ روزه *Brassica junce* با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار این ماده، موجب افزایش غلاف‌ها (۱۳/۷۸ درصد) و افزایش عملکرد دانه (۸/٤ درصد) گردید که نشان دهنده این واقعیت است که ترکیبات فنلی در انتقال دادن مواد فتوسنتزی به سمت مقصد دخالت می‌کنند. ضمن اینکه افزایش ماده خشک نیز از طریق افزایش در میزان فتوسنتز خالص، بازده کربوکسیلاسیون و افزایش در فعالیت نیترات‌ردوکتاز و کربنیک‌آنهیدراز در مقایسه با گیاهان شاهد در این گیاه گزارش شده است. فعالیت بالاتر آنزیم کربنیک‌آنهیدراز به طور معنی‌داری با فتوسنتز خالص همبستگی نشان داده است. فتوسنتز خالص بالاتر کسب شده از کاربرد غلظت‌های پایین اسیدسالیسیلیک، به طور

طبیعی در رشد بهتر گیاهان و افزایش تولید ماده خشک منعکس گردیده است. از طرفی ترکیبات فنلی و از جمله سالیسیلات‌ها مانع اکسیداسیون اکسین می‌گردند. به این ترتیب کاهش در محتوای اکسین اکسید شده نیز دلیل دیگری است که منجر به افزایش فتوسنتز خالص می‌گردد (Fariduddin et al., 2003).

بررسی بیان ژن *C3H* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از افزودن ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر این الیسیتور به محیط کشت سلولی کنجد حاصل شد به طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی را از طریق تنظیم سرعت بیوسنتز آنها، ذخیره و انتقال واکوئلی، تجزیه و یا تغییر و تبدیل آنها تحت تأثیر قرار می‌دهند (Jeong and Park, 2006). براساس تحقیقات انجام شده ترشح جنیستئین از ریشه-های گیاه لوپن زرد توسط اسیدسالیسیلیک، کیتوزان و سیانیدپتاسیم افزایش می‌یابد. به عبارتی پیش‌ماده‌های مسیرهای بیوسنتزی می‌توانند جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون گیاه مورد استفاده قرار گیرند (Zhang et al., 2006). در این رابطه در این تحقیق نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان داد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از عمال فنیل-آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوتی معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین به دست آمد. با افزایش زمان اعمال فنیل‌آلانین بیان ژن *C3H* نیز افزایش پیدا کرده است. ژن *C3H* از ژن‌های کلیدی در مسیر فنیل‌پروپانوئید است که کافئیل‌شیکیمات را به P-کوماریل‌شیکیمات تبدیل می‌کند. این ترکیب در ادامه‌ی مسیر به لیگنان‌های گروه S و G تبدیل می‌شود (Ralph et al., 2006). بنابراین می‌توان گفت که احتمالا با افزایش بیان ژن *C3H* تحت تاثیر الیسیتور می‌توان تولید سزامین و دیگر لیگنان‌ها را افزایش داد.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق بنظر می‌رسد که وجود پیش ماده فنیل‌آلانین در غلظت بکار رفته برای کشت سوسپانسیون سلولی کنجد سمی نبوده است و براحتی در اختیار سلول‌ها قرار گرفته وسبب القای بیان دو ژن کلیدی در مسیر تولید سزامین شده است. از اینرو احتمالا می‌توان از این ماده برای افزایش سزامین استفاده کرد که برای اثبات این موضوع باید مقدار سزامین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی تیمار شده و نمونه شاهد اندازه‌گیری شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیولوژی مولکولی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) و گروه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica 41: 281-284.

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E, Satake H, Kobayashi A. 2012. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (Sesamum indicum L.). Environmental and experimental botany 75:.212-219.

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E., Satake H, Kobayashi A. 2010. Comparison of sesamin contents and *CYP81Q1* gene expressions in aboveground vegetative organs between two Japanese sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties differing in seed sesamin contents. Plant Science 178: 510-516.

Heidarifar M, Dehghan Nayeri F. 2015. Establishment of callus and suspension culture in *Sesamum indicum* L. Inte tional Jou l of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7(4): 255-258.

Hirose NIT, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S,Yamada H. 1991. Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. Jou l of Lipid Research 32: 629-638.

Jeong GT, Park DH. 2006. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors. Applied biochemistry *and* biotechnology 29(132): 436-46.

Kang MH, Kawai Y, Naito M, Osawa T. 1999. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. The Jou l of Nutrition 129: 1885-1890.

Moazzami AA, Andersson RE, Kamal Eldin A. 2006. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. Jou l of Agricultural and Food Chemistry 54: 633-638.

Ono E, Nakai M, Fukui Y, Tomimori N., Fukuchi Mizutani M, Saito M, Satake H, Tanaka T, Katsuta M, Umezawa T. 2006. Formation of two methylenedioxy bridges by a Sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan,(+)-sesamin. Proceedings of the National Academy of Sciences 103**:** 10116-10121.

Qusti S, Abo Khatwa A, Lahwa M. 2010. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. Jou l Biological Sciences 2: 40-51.

Ralph J, Akiyama T, Kim H, LU F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MS, Chen F, Dixon RA. 2006. Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. Jou l of Biological Chemistry 281**:** 8843-8853.

Rivas San Vicente M, Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Jou l of Experimental Botany 62(10): 3321-3338.

Satake H, Koyama T, Bahabadi SE, Matsumoto E, Ono E, Murata J. 2015. Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. Metabolites. 5(2): 270-290.

Wahid OARA. 2007. El-Bramawy, Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions. Jou l of Plant Protection Research 47: 321-327.

Zhang B, Hettiarachchy N, Chen P, Horax R, Cornelious B, Zhu D. 2006. Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds. Jou l of Agricultural and Food Chemistry 54 (15): 5548–5554.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۷۷-۱۶۷

باززایی درون شیشه‌ای گیاه تاجریزی قرمز از ریزنمونه‌های مختلف و بررسی پتانسیل انتقال ژن به روش ریزپرتابی

In vitro regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun

نرگس پشم فروش[۱]، محمد احمدآبادی[۲*]
Narges Pashmforosh[1], Mohammad Ahmadabadi[2*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

1- MSc. Student, 2-Associate Professor, Biotechnology Dept. Agriculture Fac. Azarbaijan Shahid Madani University, Km35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۵)

چکیده

تاجریزی قرمز (*Solanum alatum* Moench.) یکی از گیاهان دارویی مهم خانواده سولاناسه است. فن‌آوری کشت بافت بزرگ‌ترین کاربرد بیوتکنولوژی محسوب می‌شود و می‌توان از آن برای نگهداری، تکثیر سریع و اصلاح ژنتیکی گیاهان در جهت اصلاح مولکولی و یا بهینه سازی تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد. در این مطالعه، باززایی گیاه کامل از ۳ نوع ریزنمونه شامل هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، دستورالعمل‌هایی برای باززایی گیاه تاجریزی قرمز از هر ۳ نوع ریزنمونه گزارش می‌شود. بهترین پاسخ باززایی ساقه (۱۰۰٪) در غلظت BAP ۰/۵ mg/l در ریزنمونه برگ بدست آمد. گیاهچه‌های حاصل با کارآیی بالا (۱۰۰٪) به محیط گلخانه سازگار شده و گل‌ها و میوه‌های طبیعی تولید کردند. ریزنمونه برگ نیز به عنوان بهترین ریزنمونه برای حداکثر شاخه‌زایی (با میانگین ۲۹/۹۳ ساقه‌چه در هر ریزنمونه) معرفی می‌شود. همچنین، پتانسیل ریزنمونه‌های برگ برای انتقال و بیان ژنهای خارجی با استفاده از تفنگ ژنی (فشارهای پرتاب ۱۱۰۰ یا psi ۱۳۵۰)، از طریق بیان موقت ژن GUS ارزیابی شده و به عنوان ریزنمونه مناسب برای انتقال ژن گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تاجریزی قرمز،
ریزازدیادی،
باززایی درون شیشه‌ای،
Solanum alatum

مقدمه

تاجریزی قرمز با نام علمی *Solanum alatum* Moench. یک گیاه دارویی مهم از خانواده سولاناسه است. این گونه به داشتن آلکالوئیدهای استروئیدی، به ویژه سولاسونین، سولاسودین، و سولامارژین شناخته شده است (Gunana Sundari et al. 2013, Yogananth et al. 2009). مواد باارزش زیادی با خواص آنتی‌اکسیدانت، ضد درد، ضداسپاسم، ضد باکتری و ادرارآور در این گیاه شناسایی شده و در درمان بیماری‌هایی از قبیل ورم پستان، گردن رحم، برونشیت مزمن، سرطان معده، و کبد استفاده می‌شود. همچنین دارای یک اثر محافظتی در برابر آسیب حاد کبدی ناشی از تترا کلرید کربن (CCl_4) بوده و عصاره آبی آن هر دو اثر ضد التهابی و محافظت کبدی را نشان داده است (Lin Ch. Ch. et al. 1995, Lin S. C. et al. 2000). استفاده از فن‌آوری کشت بافت برای تکثیر رویشی گیاهان در سطح وسیع، بزرگ‌ترین کاربرد بیوتکنولوژی محسوب می‌شود. مهم‌ترین مزیت این تکنولوژی برای گیاهان دارویی، ارائه یک منبع گیاهی مطمئن است که می‌تواند برای کشت بافت گیاه مورد نظر در مقیاس وسیع برای استخراج ماده موثره از آن در سطح انبوه استفاده شود. پیشرفت در کشت بافت، همراه با بهبود در روش‌های مهندسی ژنتیک به ویژه فن‌آوری انتقال ژن، راه‌های جدیدی برای تولید مواد دارویی، افزودنی‌های بیولوژیکی فعال، و دیگر مواد مفید، باز کرده‌اند. با توجه به ارزش بالای برخی گیاهان گونه سولانوم از نظر دارویی، مطالعاتی روی کشت درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلفی از آن از قبیل *S. nigrum* (Xu et al. 2014)، *S. aethiopicum* (Gisbert et al. 2006)، *S. virginum* (Borgato et al. 2007)، *S. americanum* (O'Connor-Sánchez et al. 2010)، *S. villosum* (Hussein and Aqlan 2011)، و برخی دیگر گزارش شده است. کشت و تکثیر و تولید ترکیبات فیتوشیمیایی در محیط درون‌شیشه‌ای می‌تواند به‌وسیله فاکتورهایی از قبیل نوع ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد تحت تاثیر قرار گیرد (Su and Zhang 2014). پاسخ به باززایی درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلف خانواده سولاناسه از ریزنمونه‌های متنوعی از قبیل برگ (Ahmadabadi et al. 2007, Mohammed et al. 2015, Mohana Priya et al. 2011, Naing et al. 2014, O'Connor-Sánchez et al. 2010, Ramesh et al. 2009, Wang et al. 2008)، نوک ساقه (Ahmed et al. 2001, Babaei et al. 2014, Mythili et al. 2001, Syamala and Devi 2003)، گره (Misra 1996, Sommer et al. 2012)، کوتیلدون (Detrez et al. 1994, Mulwa and Bhalla 2006, Shyamali and Hattori 2007, Singh and Chand 2003)، پروتوپلاست (Jones et al. 2015, Karamian 2007, Yuan et al. 2000, Zhang et al. 2006)، و ... گزارش شده است که در این بین، باززایی از قطعات برگ به دلیل تهیه آسان مطلوب‌تر بوده است. با توجه به ارزش بالای اقتصادی و دارویی گیاه تاجریزی قرمز و ضرورت وجود یک سیستم کارآمد کشت بافت و باززایی برای فراهم کردن بستر لازم برای اصلاح مولکولی این گیاه از طریق مهندسی ژنتیک، در این پژوهش، ایجاد پروتکل‌های کارآمد باززایی از ریزنمونه‌های مختلف بررسی شد. نتایج این بررسی می‌تواند در پژوهش‌ها مختلف روی این گیاه مهم دارویی از قبیل حفاظت ژنتیکی، ریزازدیادی، تولید ترکیبات دارویی و اصلاح مولکولی از طریق دستکاری ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه گیاهچه‌های استریل

بذرهای تاجریزی قرمز(*Solanum alatum* Moench.) از شهر خسروشاه استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شدند. ضدعفونی سطحی بذور با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، و سپس هیپوکلریت سدیم ۲/۶٪ به‌اضافه یک قطره Tween20 به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از ۴-۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بذور روی محیط MS (Murashige and Skoog 1962) تکمیل شده با ۳٪ ساکارز کشت شدند. pH محیط روی ۵/۸ تنظیم شده و برای جامد کردن محیط از ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. بذور استریل پس از ۲ هفته جوانه زده و پس از ۱ تا ۴ هفته رشد، برای تهیه ریزنمونه استفاده شدند.

تهیه ریزنمونه و نحوه کشت روی محیط

آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۴×۳ در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. ریزنمونه‌های محور زیرلپه (هیپوکوتیل) و لپه از گیاهچه‌های یک هفته-ای و جداکشت‌های برگی از گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای تهیه شدند. هیپوکوتیل به قطعات ۰/۵ سانتیمتری و لپه و برگ به قطعات حدود ۳ میلی‌متر مربعی تقسیم شدند. سپس، جداکشت‌ها در پتریدیش‌های شیشه‌ای با ارتفاع ۲ سانتی-متر روی محیط‌های کشت مورد نظر کشت شدند. برای آزمایش جابجایی و انتقال هورمون‌ها، قطعات ۱ یا ۲ سانتی‌متری از پایین ساقه (محور زیرلپه) گیاهچه‌های استریل یک هفته‌ای، تهیه شد. سپس، جداکشت‌ها به صورت عمودی از ناحیه پایه و یا نوک در داخل شیشه مرباهای حاوی محیط کشت‌های مورد نظر کشت شدند.

محیط‌های کشت و غلظت تنظیم کننده های رشد استفاده شده

برای بررسی باززایی ریزنمونه‌های مختلف، از محیط MS تکمیل شده با ۳٪ ساکارز استفاده شده و چهار غلظت مختلف هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در آزمایش بررسی جابجایی هورمون‌ها در دو جهت پایه به نوک و نوک به پایه، همان چهار غلظت ذکر شده از دو نوع سیتوکنین BAP و زآتین (Zeatin) مورد بررسی قرار گرفتند.

شرایط رشد و یادداشت‌برداری از نمونه‌های کشت شده

تمامی کشت‌ها در اتاق رشد با چرخه روزانه ۱۶ ساعت روشنایی ۲۵ $\mu E/m^2s$ با درجه حرارت ۲۵ °C و ۸ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۲۲ °C قرار داده شدند. پس از ۶ هفته کشت (بدون واکشت) پارامترهایی از قبیل درصد کالوس‌زایی و اندام‌زایی، و تعداد شاخه‌های باززا شده در هر ریزنمونه، ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک و تولید بذر

گیاهچه‌های باززا شده برای ریشه‌زایی روی محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند. پس از ۲ هفته، تمام گیاهچه‌ها با کارآیی بالا ریشه‌زایی کرده و سپس به گلدان‌های کوچک حاوی خاک برگ و خاک معمولی به نسبت ۱:۱ منتقل شدند. تمام گیاهچه‌ها پس از یک هفته با محیط گلخانه سازگار شده، گل و میوه حاوی بذور سالم تولید کردند.

انتقال ژن به نمونه‌های برگی به روش ریزپرتابی

انتقال ژن در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی مدل PDS-1000/He (BioRad–آمریکا) و به روش شرح داده شده توسط قربان‌زاده و احمدآبادی (Ghorbanzade and Ahmadabadi 2015) انجام گرفت. برای آماده‌سازی مواد گیاهی لازم برای انتقال ژن به روش ریزپرتابی، تمام

برگهای یک گیاهچه جوان چهار هفته‌ای شامل ۹ الی ۱۰ برگ، قطع شده و از قسمت فوقانی و یا تحتانی برگ در مرکز یک پتریدیش حاوی محیط پایه MS گذاشته شدند. پلاسمید pFF19G حاوی ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پیشبر و پایانبر 35S (Ghorbanzade and Ahmadabadi 2015) روی ذرات طلا با قطر ۰/۶ میکرومتر رسوب داده شده و با فشار پرتاب ۱۱۰۰ و یا ۱۳۵۰ psi روی برگ‌ها شلیک شدند. نمونه‌ها سپس برای بیان ژن *GUS* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند.

رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS

برای رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUG، برگ‌های شلیک شده با ذرات طلای پوشیده شده با پلاسمید pFF19G، پس از یک روز قرار گرفتن در ۲۵ °C، به روش ذکر شده در قربان‌زاده و همکاران (۲۰۱۵)، رنگ‌آمیزی شدند. بطور خلاصه، برگ‌ها به مدت یک شب در محلول رنگ‌آمیزی GUS[1 mM EDTA (pH=8)، 5 mM potassium ferricyanide، 5 mM potassiumferrocyanide، 200 mM potassium phosphate (pH=7.0)، 1% Triton-X-100، و 1 mg/ml X-Gluc] و در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس برای حذف رنگدانه‌های طبیعی، برگ‌های رنگ‌آمیزی شده به مدت یک ساعت با محلول ۵۰٪ اتانول و سپس چندین ساعت با اتانول خالص در دمای اتاق تیمار شدند.

نتایج و بحث

برای بررسی قابلیت بازززایی گیاه تاجریزی قرمز از ۳ نوع ریزنمونه برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون، از چهار سطح مختلف هورمون سیتوکنین بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلیگرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که BAP تقسیم سلولی و بازززایی ساقچه از هر ۳ نوع ریزنمونه را به شدت تحریک می‌کند، به طوری‌که در تمام ریزنمونه ها اضافه کردن سطوح مختلف BAP تاثیر معنی‌داری روی بازززایی نشان داد (جدول ۱و۲، و شکل ۱-الف و ب). بازززایی هم بصورت اندام‌زایی مستقیم و هم بصورت غیرمستقیم و با واسطه تشکیل کالوس انجام شد (شکل ۱، ج-ه). با این حال، در غلظت-های بالاتر سیتوکنین، از میزان کالوس‌زایی کاسته شده و اندام‌زایی بیشتر بطور مستقیم و بدون واسطه کالوس انجام گرفت. اندام‌زایی مستقیم در محیط درون شیشه ای با کاربرد سیتوکنین‌ها، در مقالات متعددی گزارش شده است (Aremu et al. 2015, Malik et al. 2007, Milazzo et al. 1999, Montalban et al. 2013, Soniya and Das 2002) که کنترل آن بیشتر از طریق تنظیم توزیع حامل اکسین PIN1 انجام می‌شود (Marhavy et al. 2011). در ریزنمونه برگ، بالاترین درصد بازززایی در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که ۱۰۰٪ ریزنمونه‌ها به بازززایی پاسخ دادند. با این حال، در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، میانگین تعداد شاخسارهای تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه بطور معنی داری بیشتر بود (جدول ۲). برای ریزنمونه کوتیلدون، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از لحاظ درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخسارهای تشکیل شده بهترین تیمار تشخیص داده شد. برای ریزنمونه هیپوکوتیل که بر خلاف دو ریزنمونه دیگر در محیط بدون هورمون نیز تا حدودی کالوس‌زایی و بازززایی نشان داد، افزودن BAP تا ۰/۵ گرم در لیتر اثر مثبت در کالوس‌زایی، بازززایی و تعداد شاخسارهای تشکیل شده نشان داد (جدول ۲)، ولی افزایش سطح هورمون تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، تا حدودی اثر منفی روی درصد بازززایی داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نسبت سیتوکنین‌های داخلی در بافت‌های مختلف گیاهچه‌های تاجریزی شامل برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون یکسان نیست و مثلا، غلظت‌های بالاتری از آن در هیپوکوتیل تجمع یافته و به همین دلیل، این بافت روی محیط فاقد هورمون نیز قادر به بازززایی بوده و یا زودتر از سایر ریزنمونه‌ها به سطح اشباعی از سیتوکنین می‌رسد. مطالعات نشان می‌دهند که نه تنها غلظت هورمون‌های داخلی روی بازززایی تاثیر دارند، بلکه غلظت آنها نیز در طول پاسخ بازززایی در

کشت درون شیشه‌ای تغییر می‌کند (Montalban et al. 2013, Perez-Jimenez et al. 2014a, Perez-Jimenez et al. 2014b). روی هم رفته می‌توان گفت، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای بازززایی کارآمد از هر ۳ نوع ریزنمونه کافی است (جدول ۲ و شکل ۱). با این حال، با توجه به بالاتر بودن تعداد شاخسارهای تشکیل شده در هر ریزنمونه برگ و ساده‌تر بودن تهیه و آماده‌سازی آن، این ریزنمونه برای آزمایش‌های انتقال ژن و مهندسی ژنتیک توصیه می‌شود.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BAP روی میزان کالوس‌زایی و بازززایی از ریزنمونه‌های متنوع گیاه تاجریزی قرمز

Table 1. Variance analysis on the effect of different concentrations of BAP on callus induction and regeneration frequency from various explants of red nightshade

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean of squares)		
		درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	درصد بازززایی ساقه Shoot regeneration (%)	تعداد شاخسارها در ریزنمونه Number of shoots per explant
هورمون BAP	3	2656.250**	12309.028**	1422.922**
ریزنمونه	2	15950.521**	4843.750**	15.551ns
ریزنمونه×BAP	6	638.021ns	1944.444**	54.811**
خطای آزمایش	36	694.444	243.056	8.475

**: اختلاف در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نیست.

**: Differences are significant at the 1% probability level. ns: Differences are not significant.

جدول ۲- میزان کالوس‌زایی و بازززایی از ریزنمونه‌های متنوع گیاه تاجریزی قرمز شامل برگ (L)، کوتیلدون (C) و هیپوکوتیل (H) روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP

Table 2. Callus induction and regeneration frequency from various explants of red nightshade on MS medium containing different concentrations of BAP

غلظت BAP BAP concentration	نوع ریزنمونه Explants type	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	درصد بازززایی ساقه Shoot regeneration (%)	تعداد شاخسارها در ریزنمونه Number of shoots per explant
0	H	50c	81.25bc	1.93de
	C	0f	0e	0e
	L	0f	0e	0e
0.1	H	62.5bc	87.5abc	5.68c
	C	25cd	50d	2.9d
	L	18.75ef	75c	1.31de
0.5	H	87.5a	100a	18.18b
	C	56.25c	93.75ab	19.56b
	L	12.5ef	100a	29.93a
2	H	81.25ab	93.75ab	18.18b
	C	43.75cd	81.25bc	18.56b
	L	0f	100a	17.68b

حروف روی اعداد در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین اعداد آن ستون نسبت به هم در سطح احتمال ۵٪ است.

The letters on the numbers in each column represents a significant difference between the values at the 5% probability level.

شکل ۱- باززایی گیاه تاجریزی از ۳ نوع ریز نمونه برگ (L)، کوتیلدون (C) و هیپوکوتیل (H) پس از ۶ هفته کشت روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP (الف). ب: تصویری از تعداد و رشد شاخسارهای حاصل از باززایی قطعات برگ روی محیط MS حاوی غلظتهای مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP) شامل ۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر (به ترتیب از چپ به راست). بزرگ نمایی از ریزنمونه های در حال باززایی از قطعات برگ (ج)، کوتیلدون (د) و هیپوکوتیل (ه) پس از ۳ هفته کشت روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP نشان داده شده اند.

Fig. 1. Regeneration of red nightshade from 3 different explants including leaf (L), cotyledon (C) and hypocotyl (H) after 6 weeks culture on MS medium containing 0.5 mg/l BAP (A). B: A picture of the number and growth of the plantlet derived from leaf regeneration on MS medium containing different BAP concentration including 0.1, 0.5 and 2 mg/l (from left to right, respectively). A close-up from regenerating leaf (C), cotyledon (D) and hypocotyl (E) explants after 3 weeks culture on MS medium containing 0.5 mg/l BAP are shown.

با توجه به اینکه ریزنمونه برگ بهترین پاسخ را از نظر باززایی نشان داد، در ادامه، قابلیت این ریزنمونه برای انتقال و بیان ژن با استفاده از بیان موقت ژن گزارشگر GUS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های برگی حاصل از گیاهچه‌های استریل، برای انتقال و بیان ژنهای خارجی بسیار مناسب هستند (شکل ۲). تمام برگ‌های گیاهچه‌ای با سن و اندازه‌های متفاوت و در هر دو جهت پشت و روی برگ، در هر دو فشار پرتاب ۱۱۰۰ و ۱۳۵۰ psi بطور نسبتا یکنواخت رنگ آبی حاصل از فعالیت آنزیم GUS را تولید کردند و بنابراین، اختلافی از نظر کارآیی انتقال ژن در دو فشار پرتاب آزمایش شده مشاهده نشد (شکل ۱). این نشان می‌دهد که سلولهای برگ گیاه تاجریزی قرمز که در محیط درون شیشه‌ای تولید می‌شوند، ویژگی‌های مطلوب برای نفوذ ذرات طلای حاوی پلاسمید را پیدا کرده و با توجه به پتانسیل بالای این سلولها برای باززایی (شکل ۱) به احتمال زیاد بافت مناسبی برای انتقال پایدار ژنهای خارجی به این گیاه هستند. همچنین، بافت برگ به ویژه با توجه به تجمع تعداد زیادی کلروپلاست در سلول‌های مزوفیل، مناسب‌ترین ریزنمونه برای انتقال ژن به اندامک کلروپلاست نیز است و دستورالعمل‌های موجود برای انتقال ژن به اندامک‌ها در گیاهان خانواده سولاناسه از قبیل توتون، گوجه‌فرنگی، و سیب‌زمینی با استفاده از بافت برگ به عنوان ریزنمونه توسعه یافته‌اند (Ruf and Bock 2014, Svab and Maliga 1993, Valkov et al. 2014).

شکل ۲- بررسی پتانسیل انتقال ژن به ریزنمونه های برگ گیاه تاجریزی به روش تفنگ ژنی از طریق بیان موقت GUS. نمونه های برگی از قسمت رو (Adaxial) و یا پشت (Abaxial) با فشار پرتاب ۱۱۰۰ یا ۱۳۵۰ psi شلیک شدند.

Fig. 2. Evaluation of gene transfer potential to the leaf explants of red nightshade by the gene gun using transient GUS expression method. Leaves were bombarded on their Adaxial or Abaxial side with a 1100 or 1350 psi pressure.

با توجه به باززایی گیاه تاجریزی قرمز از نمونه‌های هیپوکوتیل روی محیط فاقد هورمون و عدم باززایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون و برگ، برای اثبات امکان یا عدم امکان جابجایی هورمون سیتوکنین در طول آوندهای چوبی و آبکش بدون نیاز به کنترل سلولی و صرفا بر اساس شیب غلظت، آزمایشی با استفاده از دو نوع سیتوکنین زآتین (سیتوکنین طبیعی گیاه) و BAP (سیتوکنین مصنوعی) انجام شد. برای اینکار ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با اندازه ۱ تا ۲ سانتی‌متر، بصورت عمودی و در دو جهت بالا به پایین یا بالعکس، روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف از این دو سیتوکنین کشت شد. نتایج نشان داد که صرفنظر از جهت ریزنمونه، هر دو نوع هورمون فقط در محل تماس ریزنمونه با محیط کشت روی شدت باززایی تاثیر می‌گذارند و واکنش ریزنمونه‌ها در قسمت برش‌یافته دور از محیط، از نظر پاسخ به کالوس‌زایی و یا باززایی، در تمام تیمارها نسبتا مشابه و تشکیل ۱ یا تعداد محدودی گیاهچه و مقداری کالوس بود (شکل ۲). این نتایج با گذاشتن قطعات هیپوکوتیل بصورت افقی روی محیط کشت نیز تایید شد، که در این حالت کالوس‌زایی و باززایی از هر دو انتهای برش‌یافته هیپوکوتیل قابل مقایسه بود (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد که حداقل، جابجایی این دو نوع هورمون سیتوکنین از طریق آوندهای چوبی و آبکش گیاه تاجریزی قرمز امکان‌پذیر نبوده و تماس محل‌های برش یافته با محیط حاوی هورمون یک فاکتور تعیین کننده در آغاز فرآیند القای کالوس‌زایی و باززایی است. پیش از این، ترانس-زآتین، که بطور طبیعی در گیاه تولید می‌شود، به عنوان فرم اصلی سیتوکنین‌ها با قابلیت جابجایی در آوند چوبی و آبکش معرفی شده بود (Davey and van Staden 1976, Hirose et al. 2008).

شکل ۳- باززایی گیاهچه از قطعات هیپوکوتیل با اندازه های مختلف پس از ۳ هفته کشت بصورت عمودی (vertical)، عمودی وارونه (vertical-inverted) و افقی (horizontal) روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و یا زآتین (Zea).

Fig. 3. Plant regeneration from hypocotyl segments with different size after 3 weeks culture in vertical, vertical-inverted and horizontal orientations on MS medium containing 0.5 mg/l BAP or zeatin (Zea).

شکل ۴- ریشه زایی (الف)، سازگاری به محیط گلخانه (ب)، گلدهی (ج)، و تشکیل میوه و بذر (د) از گیاهچه های حاصل از باززایی در شرایط درون شیشه ای.

Fig. 4. Root induction (A), adaptation to the greenhouse condition (B), flowering (C), and fruit and seed production (D) from *in vitro* regenerated plants.

در نهایت، برای بررسی قابلیت گیاهچه‌های حاصل از باززایی برای سازگار شدن به محیط گلخانه و تولید گل و دانه سالم، تعدادی از گیاهچه‌های باززا شده روی محیط فاقد هورمون منتقل شدند. پس از حدود ۲ هفته، همه گیاهچه‌ها ریشه‌های سالم و کافی برای انتقال به خاک تولید کردند (شکل۳-الف). پس از شستشوی محیط کشت از ریشه‌ها با آب شیر، گیاهچه‌ها در گلدان‌های کوچک کشت شدند و پس از حدود ۱۰ روز همه آنها به شرایط گلخانه سازگار شدند (شکل ۳-ب). رشد همه گیاهان در گلخانه طبیعی بوده و گل‌ها و میوه‌های طبیعی حاوی بذور بارور تولید کردند (شکل ۳-ج و د). تولید گیاهان بارور با بذور سالم، یکی از عوامل تعیین کننده در معرفی یک دستورالعمل باززایی به شمار می‌رود، به ویژه

اگر هدف از آن، استفاده در آزمایشهای مهندسی ژنتیک و انتقال ژن باشد.

بطور کلی، در این پژوهش دستورالعمل‌های کارآمد برای کشت بافت و باززایی درون شیشه‌ای گیاه تاجریزی قرمز از سه نوع ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ ایجاد شد. ریزنمونه برگ با توجه به سهولت تهیه و باززایی بهتر، مناسب‌ترین ریزنمونه برای آزمایش‌های انتقال ژن تشخیص داده شد. گیاهان باززا شده رشد طبیعی داشته، گل و میوه طبیعی تولید کردند. کارآیی برگ‌ها در دریافت ژنهای خارجی از طریق تفنگ ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که بافت برگی برای انتقال و بیان ژنهای خارجی بسیار مناسب است. نتایج این پژوهش میتواند علاوه بر استفاده در حفاظت و تکثیر سریع گیاه تاجریزی قرمز به عنوان یک گیاه دارویی مهم در محیط درون شیشه‌ای، در انجام آزمایش‌های آتی برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به مناسب بودن ریزنمونه برگ برای آزمایش‌های انتقال ژن به کلروپلاست (Ruf et al. 2001)، می‌توان از این دستورالعمل در توسعه این تکنولوژی ارزشمند (Maliga and Bock 2011) برای گیاه دارویی تاجریزی قرمز استفاده کرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). Transgenic Res 16:437-448.

Ahmed G, Roy PK, Mamun AN. 2001. High frequency shoot regeneration from nodal and shoot tip explants in *Holarrhena antidysenterica* L. Indian J Exp Biol 39:1322-1324.

Aremu AO, Stirk WA, Masondo NA, Plačková L, Novák O, Pěnčík A, Zatloukal M, Nisler J, Spíchal L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J. 2015. Dissecting the role of two cytokinin analogues (INCYDE and PI-55) on *in vitro* organogenesis, phytohormone accumulation, phytochemical content and antioxidant activity. Plant Sci 238:81-94.

Babaei N, Abdullah NA, Saleh G, Abdullah TL. 2014. An efficient *in vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. ScientificWorld Journal 2014:275028.

Borgato L, Pisani F, Furini A. 2007. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (Solanaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88:247–252.

Davey JE, van Staden J. 1976. Cytokinin translocation: Changes in zeatin and zeatin-riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development. Planta 130:69-72.

Detrez C, Ndiaye S, Dreyfus B. 1994. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. Plant Cell Rep 14:87-93.

Ghorbanzade Z, Ahmadabadi M. 2015. Stable transformation of *Saintpaulia ionantha* by particle bombardment. Iranian Journal of Biotechnology 13:11-16.

Gisbert C, Prohens J, Nuez F. 2006. Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 34:55-62.

Gunana Sundari S, Rekha S, Parvathi A. 2013. Phytochemical evaluation of three species of Solanum L. . International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 4:420-425.

Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. J Exp Bot 59:75-83.

Hussein EA, Aqlan EM. 2011. Regeneration of *Solanum villosum* Mill., via Direct Organogenesis *in vitro*: A Novel Study. International Journal of Botany 7:177-182.

Jones AM, Shukla MR, Biswas GC, Saxena PK. 2015. Protoplast-to-plant regeneration of American elm (*Ulmus americana*). Protoplasma 252:925-931.

Karamian R. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast culture of *Crocus pallasii* subsp. haussknechtii. Pak J Biol Sci 10:659-663.

Lin CC, Lin WC, Yang SR, Shieh DE. 1995. Anti-inflammatory and Hepatoprotective effects of *Solanum alatum*. American Journal of Chinese Medicine 13:65-69.

Lin SC, Chung TC, Ueng TH, Lin YH, Hsu SH, Chiang CL, Lin CC. 2000. The hepatoprotective effects of *Solanum alatum* Moench. on acetaminophen-induced hepatotoxicity in Mice. American Journal of Chinese Medicine. 28:105-114.

Maliga P, Bock R. 2011. Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. Plant Physiol 155:1501-1510.

Malik S, Zia M, Riaz ur R, Chaudhary MF. 2007. *In vitro* plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Memordica charantia*. Pak J Biol Sci 10:4118-4122.

Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. Dev Cell 21:796-804.

Milazzo MC, Zheng Z, Kellett G, Haynesworth K, Shetty K. 1999. Stimulation of benzyladenine-induced *in vitro* shoot organogenesis and endogenous proline in melon (*Cucumis melo* L.) by fish protein hydrolysates in combination with proline analogues. J Agric Food Chem 47:1771-1775.

Misra M. 1996. Regeneration of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plants from leaf and node callus, and evaluation after growth in the field. Plant Cell Rep 15:991-994.

Mohammed A, Chiruvella KK, Namsa ND, Ghanta RG. 2015. An efficient *in vitro* shoot regeneration from leaf petiolar explants and *ex vitro* rooting of *Bixa orellana* L.- A dye yielding plant. Physiol Mol Biol Plants 21:417-424.

Mohana Priya A, Karutha Pandian S, Ramesh M. 2011. Efficient *in vitro* plant regeneration through leaf base derived callus cultures of abiotic stress sensitive popular Asian Indica rice cultivar IR 64 (*Oryza sativa* L.). Acta Biol Hung 62:441-452.

Montalban IA, Novak O, Rolcik J, Strnad M, Moncalean P. 2013. Endogenous cytokinin and auxin profiles during *in vitro* organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. Physiol Plant 148:214-231.

Mulwa RM, Bhalla PL. 2006. *In vitro* plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson). Plant Cell Rep 25:1281-1286.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15:473-497.

Mythili PK, Madhavi A, Reddy VD, Seetharama N. 2001. Efficient regeneration of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) from shoot tip cultures. Indian J Exp Biol 39:1274-1279.

Naing AH, Jeon SM, Han JS, Lim SH, Lim KB, Kim CK. 2014. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of Chrysanthemum. C R Biol 337:383-390.

O'Connor-Sánchez A, Domínguez-May ÁV, Keb-Llanes MA, González-Estrada TA, Peña–Ramírez YJ. 2010. Efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum americanum*. African Journal of Biotechnology 9:5830-5835.

Perez-Jimenez M, Cantero-Navarro E, Perez-Alfocea F, Cos-Terrer J. 2014a. Endogenous hormones response to cytokinins with regard to organogenesis in explants of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and rootstocks (*P. persica* x *Prunus dulcis*). Plant Physiol Biochem 84:197-202.

Perez-Jimenez M, Cantero-Navarro E, Perez-Alfocea F, Le-Disquet I, Guivarc'h A, Cos-Terrer J. 2014b. Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* × *Prunus dulcis* rootstocks. J Plant Physiol 171:619-624.

Ramesh M, Murugiah V, Gupta AK. 2009. Efficient *in vitro* plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa* L.). Indian J Exp Biol 47:68-74.

Ruf S, Bock R. 2014. Plastid transformation in tomato. Methods Mol Biol 1132:265-276.

Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. Nat Biotechnol 19:870-875.

Shyamali S, Hattori K. 2007. Effect of polyamines and silver nitrate on the high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*; sp. asiatica). Pak J Biol Sci 10:1288-1293.

Singh AK, Chand S. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. J Plant Physiol 160:415-421.

Sommer T, Buettner M, Bruns F, Breves G, Hadamitzky C, Pabst R. 2012. Improved regeneration of autologous transplanted lymph node fragments by VEGF-C treatment. Anat Rec (Hoboken) 295:786-791.

Soniya EV, Das MR. 2002. *In vitro* organogenesis and genetic transformation in popular *Cucumis sativus* L. through Agrobacterium tumefaciens. Indian J Exp Biol 40:329-333.

Su YH, Zhang XS. 2014. The hormonal control of regeneration in plants. Curr Top Dev Biol 108:35-69.

Svab Z, Maliga P. 1993**.** High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90:913-917.

Syamala D, Devi P. 2003. Efficient regeneration of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from shoot-tip explant. Indian J Exp Biol 41:1482-1486.

Valkov VT, Gargano D, Scotti N, Cardi T. 2014. Plastid transformation in potato: *Solanum tuberosum*. Methods Mol Biol 1132:295-303.

Wang QQ, Liu H, Zhu JQ, Wang CT, Zhang HX. 2008. *In vitro* culture and direct shoot regeneration from leaf explants of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*). Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao 41:227-232.

Xu K, et al. 2014. Regeneration of *Solanum nigrum* by somatic embryogenesis, involving frog egg-like body, a novel structure. PLoS One 9:e98672.

Yogananth N, Bhakyaraj R, Chanthuru A, Parvathi S, Palanivel S. 2009. Comparative analysis of Solasodine from *in vitro* and *in vivo* cultures of *Solanum nigrum* Linn. Journal of Science, Engineering and Technology 5:99-103.

Yuan ZH, Wei ZM, Xu SP, Sun HT, Wu CB, Ji YR, Song SM, Yu L. 2000. [Plant regeneration from protoplast culture in flax (*Linum usitatissimum*)]. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 33:163-169.

Zhang GN, Wang YH, Wang XR, He T, Hao JG, Jia JF. 2006. Protoplast culture and plant regeneration of the methionine resistant variant of *Astragalus cicer* L. Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao 39:191-198.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۸۶-۱۷۹

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ خزک سیستان

احمد ابراهیم زاده اله آباد[۱]، امین شهابی[۲]، زهرا پزشکیان*[۳]

Genetic analysis of the cytochrome b sequence in Khazak native chickens of Sistan

Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad[1], Amin Shahabi[2], Zahra Pezeshkian[3]*

۱- کارشناس ارشد اصلاح نژاد دام، پژوهشکده دامهای خاص، پژوهشگاه دانشگاه زابل

۲- دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، دانشگاه گیلان

1. Master graduate of Animal breeding, Special livestock Institute, Research center of the University of Zabol 2. PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad , Iran
3. PhD Student, Animal Science Department, University of Guilan, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۸/ ۹۵/۸- تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱)

چکیده

لزوم حفظ ذخایر ژنتیکی طیور بومی و نیز استفاده از این موجودات به عنوان مواد ژنتیکی پایه در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور کشور، کسب اطلاعات و شناخت دقیق‌تر از این حیوانات را ضروری می‌سازد. هدف از این پژوهش، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی مرغ خزک سیستان با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری بود. بدین منظور از ۲۰ قطعه مرغ خزک سیستان نمونه خون جمع‌آوری گردیده و پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۸۶۴ جفت بازی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری توسط آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. قطعات تکثیر شده پس از خالص سازی توالی‌یابی شدند. تعداد ۵ هاپلوتیپ مختلف براساس ۳ نوکئوتید چندشکل موجود در توالی‌ها تعیین گردید. توالی‌های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی ۷۸۹ جفت باز شامل ۲۶/۳۷ درصد آدنین، ۱۳/۳۱ درصد گوانین، ۳۶/۵۰ درصد سیتوزین و ۲۳/۸۲ درصد تیمین بود. نتایج نشان داد که مرغ بومی خزک با مرغ‌های ژاپن و چین تفاوت ژنتیکی کمتری دارد.

واژه‌های کلیدی

فیلوژنی،
سیتوکروم b،
مرغ بومی خزک سیستان،
ژنوم میتوکندری،
هاپلوتایپ

مقدمه

توده‌های بومی در هر کشور بعنوان یک سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح می‌باشند که حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است، زیرا این موجودات بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و با غلبه بر شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند. مرغ‌های بومی علاوه بر اهمیتی که در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی دارند، یک ذخیره مهم ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور هستند و شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد (Pirani et al., 2010).

یکی از راه‌های شناسایی این نژادها استفاده از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) است. میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارند. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و ۲ ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن در طیور ۱۶ هزار جفت باز است (Mohammadi Pestehbig et al., 2011). DNA میتوکندریایی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم روابط فیلوژنتیکی دارای مزیت هایی از جمله تعداد زیادی نسخه به ازای هر سلول، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن‌ها، وجود نواحی حفاظت شده و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته است (Bellagamba et al., 2001). توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج ترین روشها برای طبقه بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، بررسی امکان اشتقاق گونه‌های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد. بررسی شباهت توالی-ها به کمک تعیین توالی کل ژنوم به پیش‌بینی محل و عملکرد نواحی کد کننده پروتئین‌ها و نواحی تنظیم رونویسی و دیگر نواحی DNA ژنومی منجر خواهد شد.

بخشی از ژنوم میتوکندری، منطقه سیتوکروم b (Cytb) است که شناسایی توالی این مناطق به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک می‌کند و با مقایسه گونه‌ها و نژاد های دیگر که در سالهای مختلف مطالعه شده است و توالی آنها در بانک ژن موجود است امکان مطالعات فیلوژنیکی، بررسی انشقاق گونه‌ها و فاصله نسلی را فراهم می‌کند. از طرفی توالی‌یابی این مناطق شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت بوده و امکان تشخیص گونه‌ها و نژادها را فراهم می‌کند و به حفظ گونه‌های بومی از خطر انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها کمک می‌کند (Hiendleder et al., 1998). بنابراین مطالعه توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندری به منظور شناسایی بهتر طیور بومی ضروری است.

بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتها با استفاده از میتوکندری از سال ۱۹۷۹ شروع شد. از آن زمان به بعد مطالعات تئوری و تجربی این اندامک بسیار متغیر به دانش ما درباره جمعیت‌های جانوری افزوده است. اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری مرغ به طول ۱۶۷۷۵ جفت باز و طول قطعات ژنی آن از قبیل ناحیه Cty-b به طول ۱۱۴۲ جفت باز با کد دسترسی X52392.1 گزارش شد (Desjardins and Morais, 1990). در مطالعه ای توالی کامل ژن Cyt-b در ۹ گونه پرندگان و ۱۳ گونه قرقاول آفریقایی و بلدرچین ژاپنی گزارش شده است (Kornegay et al., 1993). از آن زمان تاکنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتوکندری سرعت گرفته است. در مطالعه دیگری توالی ناحیه Cyt-b میتوکندری به طول

۱۱۴۰ جفت باز در مرغ بومی ژاپن نژاد گوشتی Chuncky که متعلق به لاین تجاری کورنیش است بررسی و روابط فیلوژنتیک و مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه فوق ۹ عدد SNP از۱۸ هاپلوتیپ از ۷ گروه هاپلوئیدی مشخص شد (Shen et al., 2002). همچنین در تحقیقی که بر روی ژنوم میتوکندری ۱۴۰ پرنده از زیر گونه‌های مرغ جنگلی انجام گرفت ۴۴ عدد SNP از ۴۲ هاپلوتیپ از ۶ گروه هاپلوئیدی شناسایی شد (Silva et al., 2008).

با استفاده از توالی ناحیه ای از ژنوم میتوکندری تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغان بومی مازندران انجام شد (Pirany et al., 2010). مطالعه ای روی مرغان بومی مرندی به منظور تعیین توالی بخشی از ژنوم میتوکندری و ترسیم رابطه فیلوژنی آن با سایر مرغان اهلی انجام گرفت (Mohammadi Pestehbig et al., 2011). طی مطالعه ای دیگر تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b مرغ بومی خراسان صورت گرفت (Nassiri and Roudbari, 2014).

از آنجاییکه مرغ خزک یک نژاد بومی منطقه سیستان است وهیچ گونه مطالعه ای در جهت تعیین ساختار ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی این نژاد انجام نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه Cyt-b از DNA میتوکندریایی مرغ بومی خزک سیستان است.

مواد و روشها

نمونه‌های خون به طور تصادفی از تعداد ۲۰ قطعه مرغ خزک گرفته شد. این نمونه ها از هر دو جنس مرغ خزک پژوهشکده دامهای خاص پژوهشگاه دانشگاه زابل جمع آوری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت دنا زیست انجام گرفت. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 2000 شرکت Thermo امریکا مشخص شد و کیفیت آن روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

طراحی آغازگرها جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی به طول ۸۶۴ جفت باز با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 انجام شد. آغازگرهای رفت در فاصله ۱۴۹۲۹-۱۴۹۰۶ و آغازگرهای برگشت در فاصله ۱۵۷۴۵-۱۵۷۶۹ از ژنوم میتوکندریایی متصل شدند. توالی آغازگرها مورد استفاده به شرح زیر بود:

Forward: 5'-CACCCAACATTCGAAAATCCCA -3'

Reverse: 5'- CAAGTTTGTTGGGGATGGAGCGTAG -3'

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه، ۳۴ سیکل دمایی با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گرد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل۱۷/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر۱۰X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار،۲ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار ، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمر ۵ پیکومولار و ۰/۲ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز بود. محصولات PCR به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و نتیجه در دستگاه ژل داکیومنت مورد بررسی قرار گرفت.

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR، خالص‌سازی شده و به همراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت MACRO GEN کره جنوبی ارسال شدند و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی و همپوشانی توالی‌ها و به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها از نرم‌افزار MEGA v.5 (Tamura et al., 2011) استفاده شد. جهت رسم نمودار فیلوژنی از رویه Neighbor-Joining بر پایه Maximum Likelihood نرم افزار MEGA v.5 و برای رسم ماتریس فواصل ژنتیکی و درصد شباهت توالی ژن Cyt-b از DNA میتوکندریایی مرغ خزک بومی سیستان با توالی‌های مشابه با مرغ های موجود در بانک ژن از نرم‌افزار MegAlign استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از خون در تمامی نمونه ها با موفقیت انجام شد. الکتروفورز تمام نمونه های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان دهنده باندهای به طور کامل شفاف و روشن ، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی در اثر آلودگی با نمک یا RNA بودند. همچنین شفاف و متراکم بودن باند ها بیانگر غلظت بالای DNA و نشان دهنده موفقیت این روش در استخراج DNA از خون کامل در مرغ بومی خزک است.

واکنش PCR نمونه ها بر طبق آنچه که در قسمت مواد و روش ها شرح داده شد انجام شد. جهت بررسی صحت PCR های انجام شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. نتایج الکتروفورز مربوط به نمونه ها در شکل ۱ قابل مشاهده است.

نتایج نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای سیتوکروم b به طول ۸۶۴ جفت باز را تکثیر نمودند . قطعه ۸۶۴ بدست آمده از توالی‌یابی، ویرایش و قطعه ۷۸۹ جفت بازی در همه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۵ هاپلوتیپ در بین ۲۰ نمونه مشاهده شد و در بین هاپلوتیپ‌ها ۳ جایگاه SNP وجود داشت. فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در توالی مورد توافق سیتوکروم b مرغ خزک سیستان با درصد نوکلئوتیدها در این ناحیه از mtDNA مرغ اهلی ثبت شده در NCBI که به عنوان اجداد مرغان اهلی امروز مطرح است (جدول ۱). توالی‌های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی ۷۸۹ جفت باز شامل ۲۶/۳۷ درصد آدنین، ۱۳/۳۱ درصد گوانین، ۳۶/۵۰ درصد سیتوزین و ۲۳/۸۲ درصد تیمین بود.

از آنجائیکه تعداد جایگاهای چند شکلی به تعداد نمونه وابسته می‌باشند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی(π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه است (Nei and Kumar, 2000). تنوع نوکلئوتیدی (π) در جمعیت مرغ بومی خزک مورد مطالعه در این پژوهش ۰/۰۰۱ تخمین زده شد. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت مرغ مازندرانی ۰/۰۰۵۱ تخمین زده شد (Pirani et al., 2010). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ۰/۶۳برآورد شد که در دامنه مقدار تنوع هاپلوتیپی گزارش شده (۰/۷۸-۰/۲۹) برای مرغان آسیای جنوب شرقی، مرغان زیمبابوه ای با منشا هندی و برخی لاینهای تخمگذار و گوشتی تجارتی و خیلی نزدیک به مقدار گزارش شده برای لاینهای گوشتی تجاری است (Munchadeyi et al., 2008). در صورتی که این مقدار برای برخی از جمعیتهای مرغ ویتنامی خیلی زیاد (۰/۹۴) گزارش شده است (Cuc et al., 2011). که نشان دهنده تنوع متوسط و پایین در این جمعیت است. همچنین مقدار تنوع هاپلوتایپی برای جمعیت مرغ بومی خراسان ۰/۵گزارش شده که بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت مذکور است (Nassiri and Roudbari, 2014). این مقدار برای مرغ مازندرانی ۰/۷۴۲۴ گزارش شد (Pirani et al., 2010).

توالی مورد توافق ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرایند BLAST مورد مقایسه قرار گرفتند. طی این

فرایند تعداد ۱۲ توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک از کشورهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم پوشانی داشتند از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustal برنامه MEGA 5 با توالی های بدست آمده در این مطالعه همردیف سازی شدند. فواصل ژنتیکی بین توالی گونه‌های مورد مطالعه بوسیله نرم افزار CLC Workbench 5 محاسبه گردید. بر اساس این فواصل ژنتیکی در مرحله بعدی از رویه Neighbor-Joining نرم افزار MEGA5 به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد (شکل ۲). ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک و نژادهای مرغ موجود در NCBI نشان می‌دهد که ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با توالی مرغ اهلی و نژادهای مرغ در کشورهای چین و ژاپن نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک مرغ بومی خزک با نژادهای مرغ در این کشورها باشد، اما با مرغ های Voucher، Cenxi و Tibetan هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژادها دارد.

شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR به طول۸۶۴ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

Fig 1. Electrophoresis of 864 bp PCR Products on 1.5 % Agarose gel**.**

جدول ۱- مقایسه فراوانی نوکلئوتیدها در توالی ژن سیتوکروم b میتوکندریای مرغ خزک سیستان و مرغ اهلی

Table 1- Comparison of frequency of nucleotides in cytochrome b region in Khazak native chicken of Sistan and Domestic Chicken.

	Nucleotides frequency percentage					
Population	C	G	T	A	G+C	A+T
Khazak native chicken of Sistan	(288) 36.5	(105) 13.31	(188) 23.82	(208) 26.37	49.81	50.19
Domestic chicken	(284) 36.41	(105) 13.46	(186) 23.85	(205) 26.28	(49.87)	50.13

در پژوهشی دیگر که به منظور بررسی منشا مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک ۲۰ نژاد بومی ژاپنی و مرغهای بومی اندونزیایی انجام گرفته است، نتایج نشان داد که بعضی نژادهای منتسب به ژاپن از داخل ژاپن نشات نگرفته اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغهای بومی ژاپنی را تشکیل می دهند (Oka et al., 2007).

در پژوهشی که بر روی مرغان بومی خراسان انجام گرفته است نتایج حاکی از این است که توالی ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان با مرغ بومی چین، بومی لاوس و لگهورن سفید نزدیکی بیشتری دارد و بیشترین فاصله ژنتیکی را با نژاد نیوهمشایر دارد (Nassiri and Roudbari, 2014).

در سال های اخیر تعیین توالی نقاطی از DNA میتوکندری برای برخی موجودات به منظور کسب اطلاعات و شناخت دقیق تر از نژادهای بومی انجام شده است، اگر چه انجام تحقیقات در مقیاس وسیع و با تعداد نمونه بالا (Large-Scale) در حال حاضر مقدور نیست اما انجام تحقیقات در مقیاس کوچک (Fine-Scale) و انتخاب توالی بخش هایی از ژن که توالی آنها در بانک ژن موجود است و مقایسه توالی های به دست آمده با آنها می تواند به اطلاعات ما درباره نژادهای بومی کمک کند و زمینه را برای استفاده بهتر از آنها در برنامه های اصلاحی باز کند. با توجه به اینکه هیچ اطلاعاتی از توالی های مربوط به مرغ بومی خزک در بانک جهانی ژن وجود ندارد، با انجام این مطالعه بر روی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک علاوه بر ثبت این توالی در بانک جهانی ژن برای اولین بار نام مرغ بومی خزک در بانک جهانی ژن آورده می شود و این نژاد به دیگر کشور ها معرفی می شود.

ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک و نژادهای مرغ موجود در NCBI نشان داد که ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با مرغ اهلی و نژادهای مرغ در کشورهای چین و ژاپن نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک مرغ بومی خزک با نژادهای مرغ در این کشورها و بطور کل نژادهای آسیایی باشد.

نتایج پژوهشی که به منظور بررسی منشاء مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک ۲۰ نژاد بومی ژاپنی انجام شده بود نشان داد که برخی از نژادهای بومی ژاپن از داخل ژاپن منشا نگرفته اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغ بومی ژاپنی را تشکیل داده اند، نتایج این پژوهشگران می تواند تائیدی بر نتایج به دست امده در این پژوهش و دلیل احتمالی وجود قرابت زنتیکی بین مرغ بومی خزک و نژادهای ژاپنی و چینی باشد(Nishibori et al., 2001). همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با مرغ های Voucher Cenxi , و Tibetan هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژادها دارد.

شکل ۲- نمودار فیلوژنی براساس توالی کلی مرغ بومی خزک و برخی نژادهای مرغ موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها.

Fig 2. Phylogenetic tree based on consensus sequences of Khazak native chicken and other chicken breeds are taken from GenBank along with their accession numbers

منابع

Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfre F. 2001. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. 49:3775-3781.

Cuc NTK, Simianer H, Groeneveld LF, Weigend S. 2011. Multiple maternal lineages of Vietnamese local chickens inferred by mitochondrial DNA D-loop sequences. Asian-Australian Journal of Animal Sciences 24: 155-161.

Desjardins P, Morais R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. Journal of Molecular Biology 212: 599- 634.

Eyre-walker A, Awadalla P. 2001. Does human mtDNA recombine? Journal of Molecular Evolution 53: 430- 435.

Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. Molecular Biology and Evolution 47: 441-448.

Kornegay JR, Kocher TD, Williams LA, Wilson AC. 1993. Pathway of lysozyme evolution inferred from the sequence of cytochrome b in birds. Journal of Molecular Biology, 37: 367-379.

Mohammadi Pestehbig F, Pirani N, shoja J, Mohammadhashemi A. 2011. Determination the mtDNA D-loop Sequence in Marandi Native Chicken Population and Its Phylogenic Relationships with Other Breeds. Research Journal of Animal Sciences 21(2): 1-9.

Muchadeyi FC, Eding H, Simianer H, Wollny CBA, Groeneveld E, Weigend S. 2008. Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. Animal Genetics 39: 615–622.

Nassiri MR, Roudbari Z. 2014. Genetic analysis of cytochrome b region in native chicken of Khorasan. Journal Agriculture Biotechnology 6(2): 189-198 (In Farsi with English abstract).

Nei M, Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nishibori M, Hanazono M, Yamamoto Y, Tsudzuki M, Yasue H. 2003. Complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA in White Leghorn and White Plymouth Rock chickens. Animal Science Journal. 74, 437–439.

Oka T, Ino Y, Nomura K, Kawashima S, Kuwayama T, Hanada H, Amano T, Takada

Shen XJ, Ito S, Mizutani M. 2002. Phylogenetic Analysis in Chicken Breeds Inferred From Complete Cytochrome b Gene Information. Biochemical Genetics. 40(3/4), 129-141.

Silva P, Guan X, Ho-Shing O, Jones J, Xu J, Hui D, Notter D, Smith E. 2008. Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon jungle fowl (*Gallus lafayetti*). Animal Genetics 40: 1–9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol.; 28(10):2731-9.

M, Takahata N, Hayashi Y, Akishinonomiya F. 2007. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. Animal Genetics 38: 287-293.

Pirani N, Elyasi Zarringhabaei Gh, Taghizadeh A. 2010. Genetic relationship of 6 Iranian native chicken populations using RAPD markers. Animal Science Researches. 19(1):69-79 (In Farsi with English abstract).

Pirany N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S. 2010. Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Journal Agriculture Biotechnology 1(2): 53- 60.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۹۶-۱۸۷

شناسایی، جداسازی و بررسی توالی پیشبراختصاصی بذر β-کانگلایسینین

Identification, isolation and sequence analysis of a β-Conglycinin seed specific promoter

الهام صبوری رباط[۱]، علی اکبر حبشی[۲*]، محمود سلوکی[۱]، مطهره محسن پور[۲] و عباسعلی امام جمعه[۱]

Elham Saboori Robat[1], Ali Akbar Habashi*[2], Mahmood Solouki[1], Motahhareh Moshenpour[2] and Abbasali Emamjomeh[1]

۱- دانشگاه زابل، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی کشاورزی

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Department of Gene Transformtion, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۵)

چکیده

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی مهندسی ژنتیک برای بیان هدفمند ژن‌ها محسوب می‌شوند. به طوریکه انواع مختلفی از پیشبرها با توجه به نوع بافت و یا میزان بیان می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از پروتئین‌های ذخیره‌ای مهم در بذرهای سویا پروتئین β- کانگلایسینین است که طی توسعه بذر ساخته می‌شود. سنتز پروتئین‌های ذخیره‌ای در ابتدا در سطوح رونویسی کنترل می‌شود و بیان اختصاصی آن‌ها در بذر، تحت کنترل نواحی پیشبری ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌باشد. به علت مختص بذر بودن پروتئین β-کانگلایسینین انتظار می‌رود که پیشبر ژن آن نیز مختص بذر باشد در این تحقیق جداسازی پیشبر مختص بذر β-کانگلایسینین از گیاه سویا رقم بومی "کتول" صورت گرفت. پس از همسانه سازی پیشبر در ناقل pTZ57R/T و تعیین توالی آن، نواحی حفاظت شده مهم در این پیشبر از قبیل جعبه TATA، جعبه CAAT و سایر موتیف‌های مختص بذر مانند عناصر تکراری SKn-1، عناصر تکراری RY، جعبه G، شناسایی شدند. سپس پیشبر β-کانگلایسینین به همراه سیگنال پپتید مورد نظر و ژن دلتازئین، برای مطالعات بعدی در ناقل گیاهی pBI121 همسانه سازی شد.

واژه‌های کلیدی

پیشبر،
β-کانگلایسینین
سویا
موتیف
سیگنال پپتید

مقدمه

مطالعات پیشبرها که در حد وسیعی تنظیم بیان ژن را در سطح رونویسی بر عهده دارند، برای درک چگونگی تنظیم بیان ژن و به عنوان ابزاری برای بیوتکنولوژی گیاهی و مهندسی ژنتیک ضروری می‌باشند (Truksa *et al*., 2003). پیشبرها بسته به نوع فعالیت آنها به سه دسته تقسیم می‌شوند (Dynan and Tjian 1985): دسته اول پیشبرهای دائمی (Constitutive) هستند که عناصر آنها توسط فعال کننده‌ها و یا عوامل رونویسی، جهت شروع رونویسی تشخیص داده می‌شوند. دسته دوم شامل پیشبرهای تحریک شونده (Inducible) هستند و توسط یک یا چند محرک مانند هورمون‌ها، مواد شیمیای و شرایط محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده فعال می‌شوند. دسته سوم پیشبرهایی هستند که در بافت‌های خاص و مراحل رشدی خاص در گیاه فعال می‌شوند. تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های بذری در گونه‌های گیاهی متنوع شناسایی شدند و پیشبر مربوط به آنها منجر به شناسایی عناصر Cis-acting و Trans-acting در گیر در بیان ژن شده است. پیشبرهای مختص دانه در مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخته به منظور افزایش تولید ترکیبات دارویی یا صنعتی و همچنین برای افزایش کیفیت تغذیه ای دانه استفاده می‌شود. با مطالعات مولکولی تا کنون چندین پیشبر مختص بذر شناسایی شده است، از جمله پیشبر آلفا گلوبولین (α-globulin) در پنبه (Sunilkumar *et al*., 2002)، پیشبرهای گاما زئین (gamma-zein) در ذرت (Marzábal *et al*., 1998)، پیشبر گلوتنین (glutenin) در گندم (Lamacchia *et al*., 2001)، پیشبر بتا فازئولین در کلزا (β-phaseolin) (Sohrabi *et al*., 2015)، پیشبر β-کانگلایسینین(β-conglycinin) در سویا (Chen *et al*., 1989) و پیشبر (α-Kaf) در سورگوم (Ahmad *et al*., 2012). رایج ترین پیشبرهای مورد استفاده در مهندسی ژنتیک برای صفات مختلف، پیشبرهای دائمی مانند ویروس موزاییک کلم (*CaMV*35S) (Odell *et al*., 1985) و پیشبر یوبی‌کوئیتن (ubiquitin) ذرت (Christensen *et al*., 1992) می‌باشد. با این حال، استفاده از پیشبرهای دائمی هزینه‌های بالای متابولیکی و اثرات نامطلوب پلیوتروپی را به دنبال داشته است. از این‌رو در مهندسی ژنتیک استفاده از پیشبرهای القایی و اختصاصی بافت، برای هدف‌گیری ژن مطلوب در بافت‌های مورد نظر یا تحت شرایط اختصاصی یک جزء ضروری محسوب می‌شود که نه تنها اینکه مانع از هزینه‌های متابولیکی بالا برای گیاه میزبان می‌شود بلکه تا حدودی نگرانی‌های ایمنی زیستی را برطرف می‌کند (Kasuga *et al*., 1999, Hsieh *et al*., 2002).

سویا به منظور تولید و بهره برداری اقتصادی از روغن و پروتئین کشت می‌شود. این گیاه همانند سایر گیاهان خانواده نخود حاوی مقادیر کم اسیدهای آمینه گوگرددار (متیونین و سیستئین) است. گلایسینین (11 S) و β-کانگلایسینین (7 S) با اختصاص ۷۰ درصد پروتئین‌های ذخیره‌ای کل، دو رده اصلی پروتئین‌های سیتوسولی دانه سویا به شمار می‌روند (Birt *et al*., 2004). پروتئین β-کانگلایسینین از سه زیر واحد β, α, α‘ تشکیل شده است که زیرواحد β آن داری مقادیر بسیار کم اسیدهای آمینه گوگرددار (کمتر از یک درصد) است و افزایش این پروتئین می‌تواند افزایش کیفیت تغذیه‌ای سویا را به دنبال داشته باشد. بنابراین استفاده از پیشبرهای مختص دانه با منشاء لگوم‌ها در توسعه تکنولوژی تولید لگوم‌های تراریخته به منظور بهبود کیفیت پروتئین دانه مفید می‌باشد.

β-کانگلایسینین زیر واحد آلفا یک پیشبر مختص بذر می‌باشد که طی توسعه بذر در کوتیلدون‌ها محور لپه بیان می‌شود که در بذرهای ترنسژنیک در مراحل مختلف توسعه دانه بیان آن تعیین شده است (Nishizawa *et al*., 2003). اطلاعات تنظیمی برای بیان اختصاصی بافت در پیشبر β-کانگلایسینین تقریبا در ۲۵۰ جفت بازی ناحیه فرادست نقطه شروع رونویسی قرار دارد. همواره تکنیک‌های مولکولی در جهت بهبود خصوصیات تغذیه‌ای سویا کاربرد داشته است یکی از روش های مورد استفاده

در جهت افزایش محتوی اسیدهای آمینه سولفوردار مانند متیونین در بذر سویا انتقال و بیان ژن‌های حاوی متیونین بالا از جمله دلتا زئین می‌باشد (Kim *et al.*, 2004). در این پژوهش پیشبر β-کانگلایسینین از سویا رقم ایرانی "کتول" جداسازی شده و در نهایت به همراه ژن دلتا زئین برای مطالعات بعدی در ناقل گیاهی pBI121 همسانه سازی شد. این جداسازی برای اولین بار از ارقام بومی ایران صورت گرفته و امید بر این است در غنی سازی بذر به منظور بهبود خصوصیات تغذیه‌ای سویا جهت مصرف خوراک دام و طیور مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتری و ناقل های مورد استفاده

در این تحقیق گونه سویا زراعی، رقم "کتول" و گونه ذرت رقم "KE72012" برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. باکتری‌های مورد استفاده *E. coli* سویه XLI-Blue و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 به عنوان میزبان برای پلاسیمدهای نوترکیب استفاده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمیدهای pTZ57R/T با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین و ناقل گیاهی pBI121 حامل نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین استفاده شد. آنزیم‌های به کار رفته در این تحقیق از شرکت Roche تهیه شد.

همسانه‌سازی و آنالیز توالی پیشبر β-کانگلایسینین

توالی مربوط به ژن β-کانگلایسینین از بانک اطلاعاتیNCBI با شماره دسترسی GU723691 گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای β-کانگلایسینین (F1, R1) انجام شد (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی‌مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) در ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن ۹۵ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ۵۸ درجه و یک دقیقه و ۳۰ ثانیه دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. قطعه تکثیر شده به طول ۹۶۱ جفت بار خالص سازی شده و واکنش اتصال، مخلوط حاصل به سلول‌های مستعد، با استفاده از روش شوک حرارتی تراریزش شد (An 1987). کلونی‌های نوترکیب *E- coli* سویه XL1-Blue حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین رشد کرده و پس از انتخاب کلونی‌های حاوی ژن مورد نظر ، به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی، قطعه مربوط به ژن β-کانگلایسینین توسط دو آنزیم *Hind*III و *Sac*I هضم و خالص سازی گردید. پلاسمید نوترکیب pTZ-Pcong برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. آنالیز توالی پیشبر β-کانگلایسینین با استفاده از پایگاه داده‌ای PlantPAN (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/) انجام شد.

ساخت ناقل بیانی

در این تحقیق به منظور ساخت ناقل بیانی اختصاصی بذر، ناقل بیانی pBI121 حاوی ژن دلتا زئین تحت کنترل پیشبر β-کانگلایسینین و ترمیناتور نوپالین ستتاز ساخته شد. توالی ژن دلتا زئین از بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی AF461049 گرفته شد. استخراج DNA از گیاه ذرت رقم KE72012 استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن دلتا زئین (F2, R2) انجام شد (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) در ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن

۹۵ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ٦۰ درجه و یک دقیقه دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از اطمینان از اینکه پرایمرهای طراحی شده قادر به تکثیر پیشبر مورد نظر می باشند واکنش PCR ذکر شده با آنزیم دارای خاصیت تصحیح کنندگی (High fidelity PCR) انجام شد. باند حاصل از تکثیر با آغازگرهای F1، R1 و نیز باند حاصل از تکثیر با آغازگرهای F2، R2، از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. محصول خالص شدهٔ این دو قطعه با هم به نسبت مولی مساوی مخلوط شدند و به عنوان الگو برای اتصال آنها و ساخت قطعه هیبرید ژن دلتا زئین/پیشبر در SOEing PCR با استفاده از آغازگرهای F3 و R3، مورد استفاده قرار گرفتند و قطعه مربوطه موسوم به Cong-CZ تکثیر گردید (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم High fidelity PCR، ۱۵ نانوگرم DNA، ٦۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۳/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) می‌باشد (برنامه دمایی طبق جدول ۲).

جدول ۱- نام و توالی آغازگر های مورد مطالعه در پژوهش

Table 1. Primer sequences used in this study

نام آغازگر primer	توالی sequence
F1: conGly-P-F	5'*Hind*III site ATTATATCAAAATGGCAAAAAC-3'
R1: conGly-TP-R	5' *Sac*I site TGAGACAGAAACTGATGCCAGG-3'
F2: Zein-F	5'- *Hind*III site ACGCATATTCCAGGGCACTTG-3'
R2: Zein-R	5'- *Sac*I site TATCTAAAATGCAGCACCAACAAAG-3'
F3: Fusion-R	5' *Hind*III site TGGAATATGCGTTGGACAGAAACTGATGCCAGG-3'
R3: Fusin-F	5'- *Sac*I site AGTTTCTGTCTCACGCATATTCCAGGGCACTTG-3'

جدول ۲- برنامه چرخه های استفاده شده برای SoEing PCR

Table 2. Cycles used in SoEing PCR

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱	۲ دقیقه	۹٤
۱۰	۳۰ ثانیه	۹٤
	۱ دقیقه	۵۰
	۲ دقیقه	۷۲
۱۵	۳۰ ثانیه	۹٤
	۳۰ ثانیه	۵۵
	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲
۱	۱۵ دقیقه	۷۲

قطعه Cong-CZ ابتدا در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی اولیه شد. پس از تایید صحت ناقل نوترکیب حاصل (pTZ-Cong-CZ)، هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Sac*I انجام شد و قطعه Cong-CZ در جایگاه متناظر با ناقل دوگانه pBI121 پس از حذف پیشبر CaMv35S و ژن GUS همسانه سازی شد. کلونی‌های نوترکیب pBI121-Cong-CZ حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم برلیتر کانامایسین رشد کرده و کلونی‌های حاوی قطعه مورد نظر، به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *Hind*III و *Sac*I انتخاب شدند. پلاسمید نوترکیب حاصل (pBI121-Cong-CZ) در *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA 4404 همسانه سازی شد. کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های (Sambrook *et al.*, 1989) گردید.

نتایج وبحث

تعیین صحت جداسازی پیشبر β-کانگلایسینین

قطعه پیشبر β-کانگلایسینین با اندزه ۹٦۱ جفت باز توسط آغازگرهای F1,R1 شناسایی شد (شکل ۱). محدوده‌ای که برای طراحی پیشبر در نظر گرفته شد از نوکلئوتید ۱۵۹۸تا ۲٤۹٤ بود که ناحیه ۲٤۹٤ تا ۲۵۵۹ به عنوان سیگنال پپتید در نظر گرفته شد (۲۱ اسید آمینه). پیشبر داخل پلاسمید pTZ57R/T همسانه سازی شد.

کلونی‌های مثبت با کلنی PCR تایید شده و ظهور باند ۹٦۱جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I حضور پیشبر در پلاسمید pTZ را به اثبات رساند.

نتایج مربوط به بررسی پیشبر β-کانگلایسینین

پس از دریافت توالی‌یابی، بررسی توالی حاصل در بانک اطلاعاتی PLANTPAN نشان داد که این قطعه ۹٦٤ جفت باز دارد که شامل نقطه آغاز رونویسی (ATG) و چندین عنصر اساسی پیشبرها مانند جعبه CAAT (۹ تکرار) و جعبه TATA (TATAAA) در محدوده ۸٤- تا ۹۰- می‌باشد (جدول ۳). سایر موتیف‌های مختص بذر مانند موتیف Skn-1(GTCAT) که از اجزای تنظیمی مورد نیاز برای بیان در آندوسپرم می‌باشد در محدوده ۸۷- تا ۹۲- و ٦۷۰- تا ٦۰۵- شناسایی شد. جعبه G (CACGTA) در محدوه ۲۵۸- تا ۲٦٤- تشخیص داده شد. عنصر جعبه W (TGACG) که در بیان القاء شده در اثر زخم شناسایی شده، در محدوده ۱۱٦- تا ۱۲۱- قرار دارد. و به طور مشابه، موتیف RY(CATGCA) در محدوده ۲۷۰- تا ۲۷٦- در توالی پیشبر بتا کانگلایسینین شناسایی شد. این مشاهدات نشان داد که حضور چند کپی از موتیف‌های مختص بذر در پیشبر β-کانگلایسینین ممکن است مسئول عمل اختصاصی آن باشد.

شکل ۱- شناسایی پیشبر β- کانگلایسینین در سویا. ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ، ۲: پیشبر β- کانگلایسینین، ۳: واکنش PCR بدون استفاده از DNA الگو.

Fig 1: Identification of β-Conglycinin seed specific promoter in soybean

جدول ۳- اجزای موجود بر روی توالی همسانه سازی شده پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین

Table 3. Sequence analysis of β-Conglycinin seed specific promoter

نوع موتیف	نام موتیف	توالی موتیف	موقعیت موتیف	رفرنس
موتیف های اساسی	جعبه TATA	TATAAA	۸٤- تا ۹۰-	(Forde *et al*., 1985)
	جعبه CAAT	CAAT	۲۰۵- تا ۲۰۹	(Forde *et al*., 1985)
	Skn-1	GTCAT	۸۷- تا ۹۲-	(Blackwell *et al*., 1994)
	جعبه E	ACCCATCAAG	۲۰۱- تا ۲۱۱-	(Kawagoe and Murai 1992, Stålberg *et al*., 1996)
	جعبه W	TGACG	۱۱٦- تا ۱۲۱-	(Eulgem *et al*., 2004, Nishiuchi *et al*., 2004)
موتیف های مختص بذر	محل اتصال فاکتور رونویسی SEF4	GCATTTTTATCA	۷۹- تا ۹۰-	(Allen *et al*., 1989)
	Alpha 4، محل اتصال فاکتور رونویسی SEF1	AACCCAAACCCA	۱٦۵- تا ۲۰٤-	(Allen *et al*., 1989)
	موتیف RY	CATGCA	۲۷۰- تا ۲۷٦-	(Bobb *et al*., 1995)
	عنصر تنظیمی دخیل در بیان اختصاصی بذر	AAAGAA	۱۳- تا ۱۹-	(Bobb *et al*., 1995)
	موتیف ABRE	TACGTG	۲۷۰- تا ۲۷٦-	(Ogawa *et al*., 2003)
	محل اتصال فاکتور رونویسی MYB	TAACTG	۵۱۰- تا ۵۱٦-	(Ogawa *et al*., 2003)
	موتیف ARE	TGGTTT	۲٦٦- تا ۲۷۲-	(Ogawa *et al*., 2003)
	عنصرLAMP	CCAAAACCA	۲٦٦- تا ۲۷۵-	(Argüello-Astorga and Herrera-Estrella 1998)
سایر موتیف ها	موتیف TCT	TCTTAC	۲۰٤- تا ۲۰۹-	(Argüello-Astorga and Herrera-Estrella 1998)
	جعبه G	CACGTA	۲۵۳- تا ۲۵۹-	(Milisavljević *et al*. 2004)

نتایج مربوط به ساخت ناقل دوگانه بیانی گیاهی مختص بذر

به منظور ساخت ناقل بیانی اختصاصی بذر، قطعه ژن دلتا زئین با اندازه ٤۰۹ جفت باز در ذرت شناسایی شد (شکل ۲). پایگاه داده ای SMART وجود یک سیگنال پپتیدی (۲۱ اسید آمینه) در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۲ تا ۸۵ از توالی ژن مذکور را مشخص کرد و با توجه به اینکه پیشبر β- کانگلایسینین با در نظر گرفتن سیگنال پپتید جداسازی شده بود، بنابراین طراحی آغازگر برای ژن دلتا زئین بدون در نظر گرفتن ناحیه سیگنال پپتید در نظر گرفته شد. قطعه ژن دلتا زئین پس از خالص سازی از ژل به همراه قطعه ۹٦۱ جفت بازی پیشبر β- کانگلایسینین با آغازگرهای F3,R3 به هم متصل شد در شکل ۲ توالی محل اتصال دو قطعه هیبرید پیشبر β- کانگلایسینین/ ژن دلتا زئین با توالی آغازگرهای طراحی شده نشان داده شده است. در برنامه SoEing PCR، طول آغازگر برگشتی ۳٤ باز می‌باشد، که ۱۲ باز انتهای '۵ این آغازگر مکمل ابتدای '۵ ژن زئین بعد از حذف سیگنال پپتید می‌باشد. علاوه بر آن برای ژن دلتا زئین آغازگری به طول ۳٤ باز طراحی شد به طوریکه ۱۳ باز آن، همپوشان با انتهای '۳ سیگنال پپتید پیشبر ژن β- کانگلایسینین بود. بدین ترتیب انتظار بر این بود که بعد از تکثیر اولیه و بدست آوردن دو محصول PCR پیشبر β- کانگلایسینین و ژن دلتا زئین به صورت جداگانه دو قطعه تکثیر شده شامل ۲۵ باز همپوشان باشد. در نهایت حضور قطعه ۱۳۷۰ جفت بازی (Cong-CZ) صحت آنرا تایید کرد (شکل ۲).

شکل ۲- الف) محصول PCR: ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ۲: ژن دلتا زئین در ذرت، ۳: پیشبر β- کانگلایسینین، ٤: اتصال پیشبر β- کانگلایسینین به همرا سیگنال پپتید و ژن دلتا زئین ٥: واکنش PCR بدون استفاده از DNA الگو.

ب) ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ۲: هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I برای تایید پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ)، ۳: پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ) هضم نشده، ٤: ناقل گیاهی pBI121 هضم شده با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I ٥: ناقل دوگانه pBI121 هضم نشده.

ج): محل اتصال دو توالی پیشبر β- کانگلایسینین به همراه سیگنال پپتید و ژن دلتا زئین. ۱: محل اتصال دو قطعه هیبرید پیشبر β- کانگلایسینین/ ژن دلتا زئین. ۲: توالی آغازگر ریورس برای ژن دلتا زئین. ۳: توالی آغازگر برگشتی برای SoEing PCR. توالی‌های ایتالیک مناطق همپوشان می‌باشد.

Fig 2. Confirmation of isolation and junction of β-conglycinin promoter containing signal peptide and zein gene fragments using SOEing PCR and construction of recombinant plasmid pBI121-cong-CZ.

حذف کاست ژنی *GUS* به همراه *CaMV*35S از ناقل گیاهی PBI121 در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم های *Hind*III و *Sac*I با ظهور قطعه ٢٦٤٥ جفت بازی تایید شد. سپس قطعه ۱۳۷۰جفت بازی از ژل خالص سازی شده ودر پلاسمید نوترکیب PBI121 (-*GUS*) تحت ترمیناتور نوپالین سنتتاز قرار گرفت. کلونی های مثبت با کلنی PCR تایید شده و ظهور باند ۱۳۷۰ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I حضور کاست پیشبر β- کانگلایسینین به همراه ژن دلتا زئین در پلاسمید PBI121 را به اثبات رساند (شکل ۲).

بحث

در این مطالعه پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین از گونه گیاهی سویا رقم ایرانی کتول جداسازی شد و آنالیز توالی آن نشان داد که این توالی شامل چندین موتیف پیشبر اختصاصی بذر می‌باشد. در توالی پیشبر β- کانگلایسینین دو تکرار از موتیف Skn-1 شناسایی شد که این موتیف همراه با فاکتورهای رونویسی افزایش دهنده پروتئین ذخیره‌ای (SPA) برای کنترل بیان اختصاصی آندوسپرم ضروری می‌باشد. موتیف Skn-1 در پیشبر ژن‌های بسیاری از غلات شناسایی شده است (Washida *et al*., 1999,. Fauteux and Strömvik 2009, Gu *et al*.,

2010). موتیف RY برای کنترل بیان ژن در طی جنین زایی و بلوغ بذر ضروری می‌باشد. آنالیز توالی پیشبر β- کانگلایسینین حضور دو کپی از این موتیف را نشان داد که در آرابیدوپسیس تالیانا یک کپی (Fauteux *et al.*, 2008) و در گیاه کلزا سه کپی (Sohrabi *et al.*, 2015) از این موتیف مشاهده شده است. دو تکرار از موتیف G-box در توالی پیشبر β- کانگلایسینین وجود دارد که برای بیان ژن در استرس های مختلف مانند نور و اسیدآبسزیک ضروری می‌باشد. اغلب گزارشات نشان دادند که اسید آبسزیک یک فاکتور مهم در تنظیم بیان ژن در طی بلوغ بذر می‌باشد (Ng *et al.*, 2004, Ross and Shen 2006). همچنین پیشبر استخراج شده از β- کانگلایسینین شامل دو کپی از موتیف TACGTG می‌باشد که هسته توالی عنصر ABRE پاسخ به اسیدآبسزیک می‌باشد. چهار تکرار از موتیف TGCA در پیشبر β- کانگلایسینین یافت شد که در اتصال پروتئین‌های متصل شونده به DNA هسته‌ای نقش دارند(Vincentz *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 2000) . موتیف‌های درگیر در پاسخ به نور مانند باکس G، عنصر LAMP و موتیف TCT در توالی پیشبر β- کانگلایسینین شناسایی شد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که نور یک فاکتور مهم در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین-های ذخیره‌ای بذر می‌باشد (Tang *et al.*, 2003, Hacham *et al.*, 2013).

سایین و همکاران (۲۰۰۷) حدود ٦٦٠ جفت باز از توالی پیشبر β- کانگلایسینین را جداسازی کردند که نتایج آنالیز توالی پیشبر β- کانگلایسینین چندین موتیف مختص بذر مانند موتیف‌های تکراری RY، موتیف‌های AGCCA، موتیف‌های TACACAT، موتیف‌های ACGT و باکس E را نشان داد (Caiyin, *et al.* 2007). در تحقیق حاضر حدود ۹٦۰ جفت باز از پیشبر β- کانگلایسینین که از گیاه سویا رقم بومی "کتول" جداسازی شده که موتیف‌های مختص بذر بیشتری مانند Skn-1 و باکس G شناسایی شد که این می‌تواند در کارایی عملکرد این پیشبر برای اهداف مهندسی ژنتیک موثر باشد. ناقل دوگانه بیانی گیاهی ساخته شده در این پژوهش چندین مزیت را شامل می‌شود از جمله، با توجه به اینکه استفاده از پیشبرهای دائمی هزینه‌های متابولیکی بالا و اثرات نامطلوب پلیوتروپی را برای گیاه به دنبال داشته است استفاده از پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین در جهت تولید لگوم‌های تراریخته می‌تواند مفید واقع شود. با توجه به اینکه سویا از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین و سیستئین فقر می‌باشد و هر ساله هزینه زیادی صرف اسیدهای آمینه سنتتیک برای مصرف کنجاله سویا در خوراک دام و طیور می‌شود، ژن دلتا زئین استفاده شده در این ناقل می‌تواند در جهت افزایش بیان اسیدآمینه متیونین بذر مفید واقع شود.

منابع

Allen, R. D., F. Bernier, P. A. Lessard and R. N. Beachy. 1989. "Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer." The Plant Cell 1(6): 623-631.

An, G. 1987. "[17] Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis." Methods in Enzymology 153: 292-305.

Argüello-Astorga, G. and L. Herrera-Estrella. 1998. "Evolution of light-regulated plant promoters." Annual Review of Plant Biology 49(1): 525-555.

Birt, D. F., S. Hendrich, D. L. Alekel and M. Anthony. 2004. "Soybean and the prevention of chronic human disease." Soybeans: Improvement, Production, and Uses(soybeansimprove): 1047-1117.

Blackwell, T. K., B. Bowerman, J. R. Priess and H. Weintraub. 1994. "Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements." SCIENCE-

NEW YORK THEN WASHINGTON 266: 621-621.

Bobb, A. J., H. G. Eiben and M. M. Bustos. 1995. "PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters." The Plant Journal 8(3): 331-343.

Caiyin, Q., Li, M., Wei, D., Cai, Y., & Xing, L. 2007. Isolation and sequencing analysis on the seed-specific promoter from soybean. Frontiers of Agriculture in China, 1(1), 17-23.

Chen, Z. L., S .Naito, I. Nakamura and R. N. Beachy. 1989. "Regulated expression of genes encoding soybean β-conglycinins in transgenic plants." Developmental Genetics 10(2): 112-122.

Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail. 1992. "Maize polyubiquitin genes : structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation." Plant Molecular Biology 18(4): 675-689.

Dynan, W. S. and R. Tjian. 1985. "Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins." Nature 316(6031): 774-778.

Eulgem, T., V. J. Weigman, H.-S. Chang, J. M. McDowell, E. B. Holub, J. Glazebrook, T. Zhu and J. L. Dangl. 2004. "Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance." Plant Physiology 135(2): 1129-1144.

Fauteux, F., M. Blanchette and M. V. Strömvik. 2008. "Seeder: discriminative seeding DNA motif discovery." Bioinformatics 24(20): 2303-2307.

Fauteux, F. and M. V. Strömvik. 2009. "Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae." BMC plant biology 9(1): 126.

Forde, B., A. Heyworth, J. Pywell and M. Kreis. 1985. "Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize." Nucleic Acids Research 13(20): 7327-7339.

Gu, Y. Q., H. Wanjugi, D. Coleman-Derr, X. Kong and O. D. Anderson. 2010. Conserved globulin gene across eight grass genomes identify fundamental units of the loci encoding seed storage proteins." Functional & Integrative Genomics 10(1): 111-122.

Hacham, Y., I. Matityahu and R. Amir. 2013. "Light and sucrose up-regulate the expression level of Arabidopsis cystathionine γ-synthase, the key enzyme of methionine biosynthesis pathway." Amino Acids 45(5): 1179-1190.

Hsieh, T.-H., J.-t. Lee, Y.-y. Charng and M.-T. Chan. 2002. "Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress." Plant Physiology 130(2): 618-626.

Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1999. "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor." Nature biotechnology 17(3): 287-291.

Kawagoe, Y. and N. Murai. 1992. "Four distinct nuclear proteins recognize in vitro the proximal promoter of the bean seed storage protein β-phaseolin gene conferring spatial and temporal control." The Plant Journal 2(6): 927-936.

Kim, Won-Seok, and Hari B. Krishnan. 2004. "Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells." Plant Biotechnology Journal 2.3 : 199-210.

Lamacchia, C., P. R. Shewry, N. Di Fonzo, J. L. Forsyth, N. Harris, P. A. Lazzeri, J. A. Napier, N. G. Halford and P. Barcelo. 2001. "Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed." Journal of Experimental Botany 52(355): 243-250.

Marzábal, P., P. K. Busk, M. D. Ludevid and M. Torrent. 1998. "The bifactorial endosperm box of γ-zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZMcis-acting elements." The Plant Journal 16(1): 41-52.

Milisavljević, M., M. Konstantinović, J. Brkljačić and V. Maksimović. 2004.

Stålberg, K., M. Ellerstöm, I. Ezcurra, S. Ablov and L. Rask. 1996. "Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds." Planta 99 (4): 519-515

Sunilkumar, G., J. P. Connell, C. Smith, A. S. Reddy and K. S. Rathore. 2002. "Cotton α-globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, Arabidopsis, and tobacco." Transgenic Research 11(4): 347-359.

Tang ,L., S. Bhat and M. E. Petracek. 2003. "Light control of nuclear gene mRNA abundance and translation in tobacco." Plant Physiology 133(4): 1979-1990.

Truksa, M., S. L. MacKenzie and X. Qiu. 2003. "Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter." Plant Physiology and Biochemistry 41(2): 141-147.

Vincentz, M., A. Leite, G. Neshich, G. Vriend, C. Mattar, L. Barros, D. Weinberg, E. De Almeida, M. P. De Carvalho and F. Aragao. 1997. "ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein." Plant Molecular Biology 34(6): 879-889.

Washida, H., C.-Y. Wu, A. Suzuki, U. Yamanouchi, T. Akihama, K. Harada and F. Takaiwa. 1999. "Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1." Plant Molecular Biology 40(1): 1-12.

Wu, C. Y., H. Washida, Y. Onodera, K. Harada and F. Takaiwa. 2000. Quantitative nature of the prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression." The Plant Journal 23(3): 415-421.

"Cloning and computer analysis of the promoter region of the legumin-like storage protein gene from buckwheat, Fagopyrum esculentum Moench." Arch. Biol. Sci 56: 1-7.

Ng, D. W., M. B. Chandrasekharan and T. C. Hall. 2004. "The 5′ UTR negatively regulates quantitative and spatial expression from the ABI3 promoter." Plant Molecular Biology 54(1): 25-38.

Nishiuchi, T., H. Shinshi and K. Suzuki. 2004. "Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves POSSIBLE INVOLVEMENT OF NtWRKYs AND AUTOREPRESSION." Journal of Biological Chemistry 279(53): 55355-55361.

Nishizawa, Keito, et al. 2003. "AC-terminal sequence of soybean β-conglycinin α′ subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells." The Plant Journal 34.5 (2003): 647-659.

Odell, J. T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter". Nature 313, 810- 812.

Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya and S. Yamaguchi. 2003. "Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination." The Plant Cell 15(7): 1591-1604.

Ross, C. and Q. J. Shen. 2006. "Computational prediction and experimental verification of HVA1-like abscisic acid responsive promoters in rice (Oryza sativa)." Plant Molecular Biology 62(1-2): 233-246.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory press New York. Molecular Cloning (Vol. 2, pp. 14-9).

Sohrabi, M., A. Zebarjadi, A. Najaphy and D. Kahrizi. 2015. "Isolation and sequence analysis of napin seed specific promoter from Iranian Rapeseed (Brassica napus L.)." Gene 563(2): 160-164.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه۲۰۹-۱۹۷

کاربرد ناقل‌های ویروسی گیاهی در بیوتکنولوژی

Application of plant viral vectors in biotechnology

مسعود شمس بخش[۱]*، عبدالباسط عزیزی [۱ و ۲]

Masoud Shams-bakhsh [1]*, Abdulbaset Azizi [1, 2]

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- گروه گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

1. Department of plant pathology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of plant protection, University of Kurdestan, Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/٦ – تاریخ پذیرش:۹۵/۹/۱۱)

چکیده

از حدود ٤٠ سال پیش شاخه‌ای از ویروس‌شناسی با هدف استفاده از ویروس‌های گیاهی پایه-گذاری شد و از ویروس‌های گیاهی متعددی به عنوان ناقل‌های بیانی استفاده شده است. استفاده از ویروس‌های گیاهی برای بیان پروتئین نوترکیب، باعث افزایش سرعت تولید پروتئین، کاهش هزینه و هم‌چنین افزایش راندمان تولید برای مصارف صنعتی و پزشکی و در برخی موارد برای افزایش کارائی واکسن‌ها شده است. به این منظور لیگاندهای غیر پپتیدی ایمونوژنیک به سطح خارجی پوشش پروتئینی ویروس متصل می‌شود. از دیگر کاربردهای مهم ویروس‌های گیاهی در زیست‌شناسی کشف عملکرد ژن‌ها است. در این مقاله سعی شده است استفاده از ویروس‌های گیاهی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب مرور شود.

واژه‌های کلیدی

ویروس‌های گیاهی،
عملکرد ژنها،
پروتئین های نوترکیب

مقدمه

با پیشرفت دانش ویروس شناسی، استفاده از ویروس‌ها به عنوان ناقل‌های بیانی در زیست فناوری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با اهداف درمانی و صنعتی افزایش یافته‌است. به‌کاربردن یک بیمارگر گیاهی در صنعت و درمان در واقع تبدیل کردن تهدید به فرصت است. شاخه-ای از علم ویروس شناسی به سمت استفاده از ویروس‌ها متمرکز شده‌است (Werner *et al.* 2006). این تغییر مسیر از حدود ٤٠ سال پیش به سبب تلفیق و همراه شدن ویروس‌شناسی با Biomimic chemistry و توسعه ابزارهای مطالعات زیست‌شناسی مولکولی شتاب فزاینده‌ای گرفته است (Young *et al.* 2008). این مقاله سیر تکاملی بکارگیری ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل بیانی (Expression vector) با تاکید بر ویروس‌های با ژنوم آر ان ا مثبت را بررسی می‌کند.

بیانی پروتئین نوترکیب

تولید پروتئین فعال به‌منظور انجام پژوهش‌های پزشکی و زیست شناسی ضروری است. در پزشکی مدرن از پروتئین های نوترکیب به عنوان واکسن و آنتی ژن در کارهای درمانی و تشخیصی استفاده می‌شود (Pogue *et al.* 2002). بعضی از این پروتئین‌ها مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، آنزیم یا هورمون‌های درمانی، سیتوکنین یا فاکتور رشد برای سامانه‌های درون شیشه‌ای، آنتی ژن برای تیمارهای ضد سرطانی و واکسن‌ها علیه بیماری‌های عفونی از این قبیل موارد محسوب می‌شوند (Klimyuk *et al.* 2005). به منظور حفظ فعالیت زیستی بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب، آنها را در سلول‌های یوکاریوتی تولید می‌کنند (Baneyx 1999). پروتئین نوترکیب یوکاریوتی ابتدا توسط تکنولوژی راکتور زیستی سلولی مانند Chinese hamster ovary (CHO) cells (Hesse & Wagner 2000)، سلول های حشرات (Condreay *et al.* 1999) و سامانه مخمر (Eckart & Bussineau 1996) تولید شد. تولید در این سامانه‌ها به دلیل استفاده از تجهیزات خاص پرهزینه است (Odum 2001).

هزینه تولید پروتئین نوترکیب در سیستم جانوری بالا و حجم پروتئین تولیدی پائین است (Pogue *et al.* 2002). برای تولید جمعیت بالایی از لاین سلولی تراریخته جانوری وقت و هزینه زیادی صرف می‌شود و سمیت بیان بعضی از پروتئین‌های نوترکیب برای خود سلول تراریخته در شرایط طبیعی، به عنوان مهمترین محدودیت این فرایند مطرح است. بنابراین تلاش برای جایگزینی یک سامانه مطلوب انجام شد (Pogue *et al.* 2002). در نتیجه گیاهان تراریخته به عنوان ابزاری برای حل این محدودیت‌ها مورد توجه قرار گرفته است، تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان نیازمند تجهیزات کمتر، هزینه‌های پائین‌تر، عملکرد بالا و سریع تر نسبت به سامانه استفاده از حیوان‌ها بوده و هزینه تولید را کاهش می دهد (Pogue *et al.* 2002).

گیاهان به عنوان راکتورهای زیستی برای تولید پروتئین های نوترکیب:

هرچند از دیرباز گیاهان به عنوان راه حل مشکل تولید پروتئین‌های نوترکیب و به عنوان راکتور زیستی به شمار می‌آمدند. اما در سال‌های گذشته استفاده از گیاهان به عنوان کارخانه تولید پروتئین‌ها برای استفاده‌های پزشکی و صنعتی رشد کرده است. در این راه‌کار کل اندام گیاه همانند سامانه کشت سلول گیاهی می‌تواند پروتئین ارزان، ایمن و با فراوانی بالا تولید کند (Karg & Kallio. 2009).

دو روش کلی برای تولید پروتئین در گیاهان وجود دارد؛ بیان دائمی از طریق انتقال ژن به هسته سلول یا انتقال ژن به پلاستیدها و بیان موقت در گیاهان با استفاده از اگروباکتریوم یا ناقل های بیانی ویروس‌های گیاهی (Pogue *et al.* 2002). هر چند تولید گیاهان تراریخته در حال تبدیل شدن به یک روش استاندارد در کشاورزی

است، اما برای تولید لاین بذری پایدار زمان زیادی لازم است، بیان پروتئین توسط پدیده خاموشی ژن، هم‌چنین آلودگی‌های ژنتیکی و عدم پذیرش این گیاهان از طرف جامعه، از جمله مشکلاتی است که برای این روش مطرح می‌شود (Pogue *et al.* 2002). در روش انتقال ژن به پلاستیدها مشکل اینست که پلاستیدها مانند باکتری‌ها توانائی تغییرات بعد از ترجمه ازجمله گلیکوزیله شدن را ندارند. این روش هم مانند انتقال ژن به هسته زمان بر و کند است (Gleba *et al.* 2005). از طرف دیگر در بیان موقت توسط اگروباکتریوم، معمولا" سطح پائینی از بیان صورت گرفته و عقیده براین است که نمی‌توان از بیان موقت توسط اگروباکتریوم برای تولید پروتئین در سطح صنعتی استفاده کرد (Gleba *et al.* 2005). بنابراین استفاده از ویروس‌ها به عنوان ناقل بیانی جهت بیان پروتئین‌های هترولوگوس در گیاهان به عنوان راه حل جایگزین معرفی شده است (Egelkrout *et al.* 2012). ویروس مهندسی شده که حاوی ژن مورد نظر است، در بافت‌های گیاهی تکثیر شده و به همین سبب میزان بیان پروتئین در این روش به‌مراتب بیشتر است. با استفاده از ناقل ویروسی می‌توان در زمان محدودی میزان نسبتا" بالائی پروتئین تولید کرد. هم‌چنین به این سبب که ژن هدف به ژنوم گیاه ملحق نمی‌شود، درنتیجه به ارث نمی‌رسد و سبب نگرانی-های زیست محیطی کمتری می‌شود (Gleba *et al.* 2007). در مقایسه با سامانه بیانی باکتریایی، استفاده از سامانه‌های بیانی ویروسی برای بیان پروتئین‌های درمانی خطر آلودگی اندوتوکسین‌ها را کاهش می‌دهد و ظرفیت تولید پروتئین را در سطح وسیع افزایش می‌دهد (Yevtushenko & Misra 2012). هم‌چنین این سامانه‌ها مشکلاتی نظیر محدودیت‌های سامانه پروکاریوتی ازجمله تولید سموم اندوتوکسین، pyrogene ها، ناپایداری پلاسمیدی و عدم تشابه تغییرات پس از ترجمه با سامانه یوکاریوتی مانند باندهای دی سولفیدی و گلیکوزیله شدن را ندارند (Bagheri *et al.* 2010).

یکی دیگر از مزایای استفاده از ناقل‌های ویروسی گیاهی آلوده‌کردن گونه‌های گیاهی متفاوت توسط آنها است. با این کار ما می‌توانیم میزبان‌های مختلف برای بیان پروتئین با میزان، کیفیت و خلوص بالا را آزمایش کرده و از بین آنها بهترین را انتخاب کنیم (Verch *et al.* 1998). روش-های مختلفی برای آلوده سازی گیاهان با ناقل‌های ویروسی وجود دارد که بطور کلی می‌توان به صورت زیر دسته بندی کرد. روش مایه زنی توسط پلاسمید دارای سازه، روش مایه زنی توسط عصاره گیاه آلوده و به‌صورت پیکره کامل ویروسی (ویریون)، مایه زنی توسط اگروباکتریوم دارای سازه ویروسی و این روش خود شامل مایه زنی با تزریق اگروباکتریوم به زیر برگ گیاه میزبان و استفاده از مکش برای تزریق باکتری به کل گیاه (Magnifection) اشاره کرد.

نسل اول ناقل‌های ویروسی: ویروس کامل

توانائی ویروس‌های گیاهی در تغییر سلول آلوده برای تولید پروتئین‌هایی رمز شده توسط ژنوم ویروسی این فرضیه را تقویت کرد که ویروس‌های گیاهی می‌توانند بعنوان ناقل برای بیان پروتئین‌های خارجی در گیاهان استفاده شود. ویروس‌های آر ان ا دار مثبت در سیتوپلاسم سلول مشابه با آر ان ا پیامبر عمل کرده و ریبوزوم بر روی آن‌ها قرار گرفته و از روی توالی آن‌ها پروتئین می‌سازد. باتوجه به تکثیر بسیار بالای ویروس‌ها در سلول، استفاده ویروس‌های گیاهی از سیستم آر ان ا زیر ژنومی و بهره گرفتن از آر ان ا های پلی سیسترونیک، تعداد بالای رشته-های ویروسی (Bustamante and Hull, 1998) باعث می-شود که عملا" سلول به خدمت ویروس جهت بیان پروتئین‌های آن‌ها در آید. نسل اول ناقل‌های ویروسی گیاهی، ویروس‌های هستند که دارای تمام ژن‌های خود بوده و ژن خارجی یا مورد نظر را همراه با ژن‌های خود بیان می‌کنند. به این راهبرد "ویروس کامل" اطلاق می‌شود (Gleba *et al.* 2007). پروتئین مورد نظر تحت یک پیشبر (پروموتر) قوی ویروسی و در جایگاهی مابین ژن‌های

ویروس و یا پس از آنها بیان می‌شود و یا بصورت متصل شده به پروتئین پوششی ویروس و تحت همان پیشبر بیان می‌شود (Gleba *et al*. 2007; Mirzaee *et al*, 2016). در این راهبرد ژن هدف از طریق ژنوم ناقل آلوده کننده و یا ترجیحا" از طریق پیکره کامل ویروسی به داخل سلول گیاهی وارد می‌شود. این فرایند در سطح وسیع با پاشیدن پیکره بالغ ویروس به گیاهان زراعی و با خراش توسط پودر کاربوراندوم انجام می‌شود. بسته به کارائی ناقل و توانائی سیستمیک شدن آن، طی دو تا سه هفته گیاه به‌طور کامل توسط ویروس آلوده شده و ژن مورد نظر را در سلول‌های آن بیان می‌کند. بیان موقت cDNAی ویروس با استفاده از اگروباکتریوم نیز روشی جایگزین برای مایه‌زنی ویروس حاوی ژن مورد نظر است (Gleba *et al*. 2007)، برای مثال از Amplicon-plus Targeting Technology برای مایه‌زنی ویروس ایکس سیب زمینی استفاده شده است (Azhakanandam *et al*. 2007). در این روش گیاهان میزبان را با عامل مهارکننده خاموشی تراریخته می‌کنند تا مقاومت گیاه مقابل ویروس کاهش یابد و تکثیر ویروس با سرعت بیشتری انجام گیرد و همچنین با اضافه کردن توالی chloroplast transit peptide (CTP) باعث هدایت پپتید پاپیلومای ویروس L1 به سمت کلروپلاست شدند و با این کار میزان بیان پروتئین نیز افزایش یافت. آلودگی توسط اگروباکتریوم بسیار سریع و ساده انجام می‌گیرد، اما محصول پروتئینی بدست آمده بسیار ناچیز است (۰/۳ تا ۰/۰٤ کل پروتئین محلول) از اینرو این روش نیاز به بهینه شدن دارد. همچنین به علت استفاده از اگروباکتریوم، این فرآیند در سطح صنعتی سبب آلودگی‌های زیستی به اگروباکتریوم تراریخت می‌شود (Gleba *et al*. 2007).

پژوهش‌های انجام شده روی ناقل‌های ویروسی نسل اول، نقاط قوت و ضعف این راهبرد را نمایان کرد. از جمله نقاط مثبت می‌توان به بیان پروتئین‌های فعال و عملکردی با استفاده از این ناقل‌ها اشاره کرد. همچنین در پژوهش‌های انجام شده با اتصال اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک به ژن پروتئین پوششی، علاوه بر ایمونوژن بودن این اپی‌توپ‌ها، میزان بالایی از آنتی بادی علیه این اپی توپ‌ها تولید شده و سطح بالائی از ایمنی در حیوان‌ها مدل گزارش شده است (Gleba *et al*, 2007). در مقابل گروه‌های مختلفی از جمله گروه Rybicki (2006) که روی بیان پوشش پروتئینی L1 ویروس پاپیلومای انسانی (Papillomavirus) در گیاهان مطالعه می‌کردند، نشان دادند که مونتاژ پیکره‌های شبه ویروسی در سلول‌های گیاهی دچار مشکل شده و مهمتر از آن، راندمان تولید با این روش کمتر از پروتئین تولید شده توسط گیاهان تراریخته است (Varsani *et al.* 2006). این پژوهشگران دلیل کاهش بیان پروتئین را حذف سریع تراریخته در ناقل بعلت اندازه بزرگ ژن L1 (1.5 kb) دانسته‌اند. محدودیت در اندازه ژن وارد شده به ناقل ویروس کامل در ناقل‌های ویروسی دیگر از جمله ویروس ایکس سیب‌زمینی و ویروس موزائیک توتون نیز بررسی شده است (Avesani *et al*. 2007) و مشاهده شد که بین اندازه توالی خارجی و پایداری ناقل ارتباط معکوس وجود دارد.

تا سال‌های گذشته فقط اپی‌توپ‌های کوچک (کمتر از ۲۵ آمینواسید) بطور موفقیت آمیز به‌صورت متصل با پروتئین پوششی ویروسی بیان شده است، اپی‌توپ‌های بزرگتر باعث جلوگیری از مونتاژ (assembly) ویروس می‌شوند. برای حل این مشکل از اتصال دهنده‌های قابل انعطاف پلی پپتید بزرگتر، مانند قطعه کامل و عملکردی پروتئین A (دارای ۱۳۳ آمینو اسید) در سطح توباموویروس‌ها (tobamoviruses) بدون تاثیر روی مونتاژ ویروس بصورت ناحیه اتصالی به انتهای کربوکسیل پروتئین پوششی ویروس استفاده شده‌است (Werner *et al.* 2006). این نتایج هم‌چنین نشان داده است که اندازه نهایی برای پروتئین‌های اتصالی به پروتئین پوششی دارای محدودیت اندازه ۲۵-۲۰ آمینواسیدی نبوده و با استفاده از این نوع پروتئین‌های متصل شده به پروتئین پوششی می‌توان این ظرفیت را افزایش داد.

راه‌اندازهای آرانای زیر ژنومی نیز برای بیان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفته اند. برای این منظور توالی متناظر آنها در ابتدای توالی ژن خارجی قرار داده شد (Chapman *et al.* 1992; Scholthof *et al.* 1996) در این سازه راه‌انداز ژن پروتئین پوششی ویروس که در ابتدای ژن GUS در ناقل بیانی PVX درج شده است سبب افزایش بیان GUS در برگ‌های مایه‌زنی شده و همچنین به صورت سیستمیک در برگ‌های بالایی گیاه توتون *Nicotiana clevelandii* شد. در بعضی موارد ژن مورد نظر در درون یک چارچوب خواندنی ویروسی همسانه سازی شده و یک توالی پپتیدی جهت تسهیل جداشدن پروتئین متصل شده به پروتئین ویروسی در آن درج می‌شود. این روش برای اعضای پوتی‌ویروس‌ها و کلسترو‌ویروس‌ها که پروتئین بزرگ و مرکب از چند پروتئین عملکردی بهم چسبیده دارند انجام شده است. در این سیستم ویروسی چند پروتئین عملکردی را از طریق یک چارچوب خوانش بیان می‌کند و بعد از بیان توسط قسمت‌هایی از همین پروتئین که خاصیت پروتئازی دارد، پروتئین اولیه برش خورده و به چند پروتئین جداگانه فعال تبدیل می‌شود. حال در این راهبرد توالی مورد نظر مشابه ژن‌های ویروسی بصورت پلی پروتئینی بیان شده و مکان برشی مناسب برای برش توسط پروتئاز و جدا کردن پروتئین مورد نظر از پروتئین-های ویروسی اضافه می‌شود (Hagiwara *et al.* 1999). از ویروس موزائیک زرد کدو که یک پوتی ویروس است برای بیان پروتئین اینترفرون گامای انسانی INF-γ در گیاهان استفاده شده است و ژن مورد نظر بین چارچوب-های خواندنی P1 و HC-Pro قرار داده شد و در نتیجه INF-γ در گیاه سلمه تره به‌طور پایدار بیان شد (Nassaj Hosseini *et al.* 2012). هم‌چنین از همین سیستم برای بیان ژن کد کننده پروتئین حرکتی ویروس موزائیک خیار به‌طور موفقیت آمیزی استفاده شده است (Nassaj Hosseini *et al.* 2013).

نسل دوم ناقل‌های ویروسی: ناقل های تغییریافته و Magnifection

تولید انبوه پروتئین نیازمند انتقال ژن به سلول‌های زیادی از گیاه است. هر چند این هدف با استفاده از ناقل‌های ویروسی نسل اول که قادر به حرکت سیستمیک می‌باشند به دست می‌آید، اما محدودیت‌هایی نیز دارند: در حرکت سیستمیک کل گیاه و یا کل بافت قابل برداشت گیاه مانند برگ‌های تحتانی آلوده نمی‌شود، همچنین توالی‌های هترولوگوس بیش از یک کیلو جفت باز را نمی‌توان با استفاده از ناقل‌های ویروسی نسل اول بیان کرد، فقط اپی-توپ‌های کوتاه به‌طور موثر به پروتئین پوششی ویروسی متصل و بیان می‌شود. این محدودیت‌ها باعث شد که در مورد طراحی ناقل‌های کلاسیک تجدید نظر شود. بیشتر تلاش‌های انجام گرفته در جهت دستکاری ویروس و طراحی سامانه تلفیقی جدیدی بود که در آن فقط عناصر ویروسی لازم برای بیان توالی مورد نظر نگهداری شده و عملکردهای از دست رفته با استفاده از روش‌های غیر ویروسی تامین شود. توانائی تکثیر این سازه‌ها خیلی قوی بوده و بنظر می‌رسد که این راهبرد بسیار موفقیت آمیز است (Gleba *et al.* 2007).

دو عامل محدود کننده در ناقلین نسل اول ویروس‌های گیاهی، عدم توانایی ناقل در انتقال سیستمیک در گیاه میزبان و سطح پائین بیان پروتئین مورد نظر را می‌توان با حذف توالی رمزکننده پروتئین پوششی و قرار دادن توالی رمزکننده حرکت سیستمیک در گیاه توسط اگروباکتریوم حل کرد. پژوهش‌های انجام گرفته در سال ۱۹۹۳ نشان داد که انتقال ژن توسط اگروباکتریوم کارائی کافی را نداشته و تخمین زده می‌شود که یک آلودگی به ازاء $۱۰^{۸}$ سلول اگروباکتریوم صورت می‌گیرد، هرچند که کارهای انجام گرفته با ناقل‌های ساخته شده از سویه‌های مختلف توبامو‌ویروس‌ها (tobamoviruses) تا حدی این مشکل را مرتفع کرد. بررسی‌ها نشان داده است که آلودگی زود هنگام گیاه به ناقل ویروسی توسط اگروباکتریوم، باعث

کاهش رونویسی و تکثیر ناقل در هسته می‌شود (Gleba *et al.* 2007).

از آنجائیکه ژنوم ویروس‌های آر ان ا دار مانند ویروس موزائیک توتون هیچ وقت وارد هسته نمی‌شوند، بنابراین تحت تاثیر ماشین تغییر دهنده آر ان ا هسته‌ای قرار نمی-گیرند. در حالتی که توالی بدون تغییر ویروس تیپ وحشی بصورت دی ان ا توسط اگروباکتریوم به هسته وارد می-شود، رونوشت‌های آنها قبل از رسیدن به سیتوزول تجزیه می‌شود. درنتیجه برای جلوگیری از تجزیه، تغییر ناقل‌ها به روش‌های مختلف بطور مثال، ایجاد جهش خاموش جهت جلوگیری از حذف اینترون، تغییر در کدون معمول و اضافه کردن چندین اینترون گیاهی صورت گرفته و در نهایت قالب T-DNA سنتزی بسیار فعال ساخته می‌شود. وقتی که این قالب‌ها از طریق اگروباکتریوم بصورت دی ان ا به داخل گیاه وارد می‌شوند، تبدیل اطلاعات دی ان ا به ریپلیکون‌های فعال و کارا، تقریبا" در همه سلول‌ها (۹۳٪ <)، انجام می‌شود (Marillonnet *et al*. 2005; Gleba *et al.* 2007).

در ناقل‌های تکمیل شده نسل دوم از هر ۲۰-۱۰ سلول اگروباکتریوم اسپری شده یک آلودگی موفق صورت می-گیرد. هم‌چنین فرایند آلوده سازی نشان داد که در چندین گونه گیاهی عمل کرده، هرچند که بهترین کارائی را در *Nicotiana benthamiana* داشته است (Marillonnet *et al.* 2005).

برپایه این یافته‌ها، دستورالعمل‌های ساده‌ای برای بالابردن بیان پروتئین‌های هترولوگوس در گیاهان طراحی شده است که بدون تغییر ژنتیکی پایدار در گیاه و با تکثیر گذرای ناقل ویروسی وارد شده به کل گیاه توسط اگروباکتریوم، صورت می‌گیرد. ماهیت این دستورالعمل برپایه اسپری گیاه توسط سوسپانسیون بسیار رقیق اگروباکتریوم حامل ریپلیکون پیش ویروسی در T-DNA، استوار است. در این مورد آلوده سازی بصورت آغشته کردن کل گیاه با اگروباکتریوم صورت می گیرد تا حرکت سیستمیک را جبران کند (Gleba *et al*. 2007). تکثیر در هر سلول و حرکت سلول به سلول توسط ریپلیکون‌ها انجام می‌گیرد. بسته به ناقل استفاده شده، میزبان و تراکم اولیه باکتری، این عمل ۱۰-٤ روز طول می‌کشد و بسته به ژن اختصاصی مورد نظر وارد شده، نتایج می‌تواند از پنج گرم پروتئین نوترکیب در هر کیلوگرم زیست توده برگ تازه و یا تا بیشتر از ۵۰ درصد کل پروتئین محلول است. بنابراین از آنجا که ناقل ویروسی فاقد ژن پروتئین پوششی است، می تواند ژن‌های بیشتر از kb ۲/۳ توالی هترولوگوس یا پروتئین با وزن بیش از KDa ۸۰ را بیان کند. آلوده سازی گیاهان با استفاده از آغشته کردن برگ‌ها به باکتری به روش‌های مختلفی انجام می‌شود، یکی از روش‌های متداول آلوده سازی استفاده از مکش(Vacuum infiltration) است. در این روش بعد از شناورکردن برگ-های گیاه در سوسپانسیون باکتری با مکش ضعیف آلودگی انجام می‌گیرد (Gleba *et al*. 2005). این راهبرد جدید بیانی Magnifection نامیده می‌شود. سرعت و سطح بالای بیان محصول ویروسی، کارائی بالای انتقال توسط اگروباکتریوم، توانائی تغییرات بعد از ترجمه و کم هزینه بودن تولید در گیاه از جمله مزایای این راهبرد است (Gleba *et al*. 2007) و تاکنون بیشتر از ۵۰ پروتئین مختلف و ترکیبات پیچیده از همه دسته‌های پروتئین‌های پزشکی ازجمله هورمون رشد انسانی، هم چنین دو آنتی ژن متفاوت Yersina pestis، F و V، و پروتئین متصل شده F1-V بطور موفقیت آمیز با استفاده از Magnifection بیان شده است (Gleba *et al*. 2007; Gleba *et al*. 2005; Santi *et al*. 2006).

از آن جایی‌که گیاهان میزبان دارای واکنش مقاومت به ویروس‌ها هستند، در پژوهشی سعی شد که گیاه میزبان حساس به ویروس تولید شود. به این منظور گیاهان تراریخته‌ای معرفی شد که قادر به تولید بالای برخی از پروتئین‌های ویروسی مثل پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی بوده و باعث گسترش دامنه حساسیت میزبان‌ها شدند (Sanz *et al.* 2000). بعلاوه با خاموش کردن ژن

RdRp در گیاه توتون میزان حساسیت آن به تعدادی از ویروس‌ها افزایش یافت (Shams-bakhsh 2011). بعلاوه با تراریخته کردن گیاه توتون با ژن بازدارنده خاموشی HC-Pro نتایج مشابهی بدست آمد (Shams-bakhsh *et al.* 2007). ناقلین بیانی برپایه جیمنی ویروس‌ها که در آن ژن *rep* تحت کنترل یک راه‌انداز قرار گرفته، توانست بخوبی بر مشکل کاهش بیان و همچنین محدودیت اندازه پپتید خارجی فائق بیاید (Hefferon & Fan 2004). بطور کلی تابحال برای تولید تعداد زیادی از ویروس‌های جانوری و انسانی با استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل بیانی واکسن تهیه شده است، که تعدادی از آنها شامل ویروس هپاتیت B (Rybick & Martin 2014)، هپاتیت C (Mason *et al.* 2012; Nuzzaci *et al.* 2010) ، ویروس آنفلوانزا (Mallajosyula *et al*, 2013; Petukhov *et al.* 2013)، ویروس پاپیلوما (Cerovska *et al.* 2012) ویروس عامل بیماری ایدز (Kessans *et al.* 2013)، ویروس ابولا (Phoolcharoen *et al.* 2011) و دیگر ویروس‌های جانوری (Yusibov *et al.* 2002) است. اما درواقع تنها پروتئین درمانی تولیدی در گیاهان که تابحال از طرف سازمان غذا و دارو آمریکا مورد تائید قرار گرفته است آنزیم درمانی glucocerebrosidase است که در سال ۲۰۱۲ برای درمان Type 1 Gaucherdisease در آمریکا تولید و توسط FDA مورد تائید قرار گرفت. سپس این ترکیب توسط شرکت PROTALIX با نام asELELYSO™ و یک شرکت برزیلی نیز تولید شد (Rybicki 2014).

ناقل‌های غیر رقابتی نسل دوم برای بیان پروتئین‌های hetero-oligomeric :

اگرچه توانایی گیاهان در بیان آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کامل بیش از بیست سال است که شناخته شده، دستورالعمل‌های بیانی اولیه دارای نواقصی بودند. به‌ویژه، هرچندکه در ترانسفرم کردن پایدار گیاه، ایمونوگلوبین های کلاس A و G (IgA, IgG) به‌صورت صحیح تاخوردگی پیدا کرده و بصورت عملکردی بیان می‌شوند، میزان محصولات بسیار پائین (mg/kg ۱-۲۵ از بافت گیاهی) است (Gleba *et al.* 2005). همچنین بیشتر از دو سال وقت لازم است تا به اولین میزان تولید آنتی بادی رسید. سامانه بیانی موقت باعث تولید محصول هدف بطور سریع در مقدار مورد نظر می‌شود. درحالی که میزان بیان در قالب‌های بیانی غیرتکثیری بسیار پائین است (Vaquero *et al.* 1999).

یک روش سریع برای تولید وسیع و به میزان نامحدود آنتی‌بادی مونوکلونال کلاس ایمونوگلوبین G (IgG) با طول کامل در گیاهان معرفی شده است (Giritch *et al.* 2006). این روش براساس آلودگی همزمان با دو ناقل ویروسی است که هرکدام یکی از زنجیره‌های آنتی‌بادی را بیان می‌کنند. سازه‌های ساخته شده از دو ناقل ویروسی جداگانه که با همدیگر رقابت ندارند ایجاد شده‌اند. این ناقل‌ها قادراند در یک سلول گیاهی با کارائی بالائی زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی را بیان کنند. این روش برای آنتی بادی‌های کلاس IgG1 و IgG2 استفاده شده است و آنتی بادی مونوکلونال کامل عملکردی را تولید کرده است. با این روش اولین مقدار آنتی‌بادی در ۲ هفته بعد از آلوده سازی قابل دسترسی است. این دستورالعمل یک روش بسیار مناسب برای تولید آنتی‌بادی-های جدید بوده و باعث شده که زمان صرف شده برای تولید آنتی بادی بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یابد (Gleba *et al.* 2007).

ناقل نوترکیب ویروس آر ان ا دار برای حمل واکسن

مصرف خوراکی واکسن از طریق مصرف بافت‌های گیاهی بطور موثری باعث تحریک واکنش تولید آنتی‌بادی و افزایش آن در مخاط بدن می‌شود (Warzecha *et al.* 2003). همچنین آنتی بادی نوترکیب تولید شده در گیاهان در شرایط نامساعد محیطی مخاط پایدار است.

استفاده از ویروس‌ها در تولید واکسن‌ها هنوز در مراحل ابتدائی خود است. یکی از مشکلات ایمنی‌زایی با دی ان ای‌های ژن تولید واکسن این است که امکان ورود دی ان

ای پلاسمیدی به ژنوم میزبان وجود دارد. یک راه جایگزین برای حل این مشکل تولید واکسن توسط آر ان ای به جای دی ان ای است. ویروس شناسان گیاهی یک راه حل جالبی پیشنهاد کرده‌اند، با قرار دادن توالی ناحیه شروع مونتاژ ویروس موزائیک توتون در ژنوم Semliki forest virus (SFV) و درنتیجه مونتاژ SFV با پروتئین پوششی ویروس موزائیک توتون، ناقل بوجود آمده در ارزیابی سلولی ایمن بوده و تولید آن در شرایط درون شیشه‌ای آسان شد و تولید و ساماندهی ترکیب نوکلئیک اسید/پروتئین آنتی ژن آسان است (Smith *et al*. 2006).

در پژوهشی از ناقل ویروس ایکس سیب زمینی و ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی برای تولید ذره مرکزی ویروس هپاتیت B در گیاهان *N. benthamiana* و لوبیا چشم بلبلی استفاده شد. این پژوهشگران موفق به تولید آنتی‌ژن HB در این گیاهان شدند (Mechtcheriakova *et al*. 2005).

پروتئین‌های درمانی

نزدیک به یک چهارم جمعیت جهان نسبت به آنتی ژن‌های گیاهی آلرژی دارند. در شرایط همه‌گیری بیماری که افراد آلوده شده مجبور به استفاده از پروتئین‌های درمانی تولید شده در گیاه در حجم بالا هستند، در این شرایط باید اغلب افراد تحت تیمار تحمل قرار گرفته تا تحمل شرایط ایمونولوژیکی را پیدا کنند (Wardrop & Whitacre 1999). برای موفقیت آمیز بودن اینگونه درمان‌ها، آنتی ژن فقط باید در یک گونه گیاهی تولید شود و افراد نسبت به پروتئین تولیدی در آن گیاه تحت تیمار تحمل قرار گیرند.

توانایی بسیاری از ناقل‌های ویروسی برای تولید پروتئین آزاد این امکان را فراهم می‌کند که بتوان آنها را با قرار دادن سیگنال‌هایی به سمت بافت یا قسمت خاصی جهت تثبیت و قرارگیری در آنجا هدایت کرد. پروتئین‌هایی که بصورت طبیعی در اندام خاصی تجمع می‌یابند، اغلب در آن اندام پایداری بیشتری داشته و در بسیاری موارد تجمع بسیار بالاتر زمانی صورت می‌گیرد که پروتئین به سمت اندامک جایگزینی در سلول هدایت شود (Schouten *et al*. 1996). بنابراین در بعضی سامانه‌ها بیان به‌صورت اتصال پروتئین مورد نظر با دیگر پروتئین‌های ویروسی صورت می‌گیرد. یکی از مثال‌هایی که از سامانه بیانی ویروس گیاهی برای درمان استفاده کرده‌اند، بیان پروتئین ضد HIV به نام α-tricosanthin بود که غلظت این پروتئین تا ۵٪ پروتئین قابل حل رسید و در بیان این پروتئین از ویروس موزائیک توتون به عنوان ناقل استفاده شده است (Kumagai *et al*. 1993).

کشف عملکرد ژن‌های گیاهی

از ناقل‌های ویروسی برای کشف عملکرد ژن‌ها استفاده شده است. هرچند که از دیگر روش‌ها بطور موفقیت آمیزی برای شناسایی عملکرد ژن‌ها در گیاهان استفاده شده است، اما این روش‌ها به نوع لکه‌ها (Lessions) القاء شده در میزبان، تیپ میزبان مورد مطالعه (کوچک و آسان بودن برای ترانسفرم کردن)، و دامنه ژن‌هایی که می توان مطالعه کرد (ژن‌های عامل مرگ گیاهچه، بطور مثال، به علت عدم دستیابی به نتاج مطالعه محدود می‌شود) بستگی دارند (Pogue *et al*, 2002).

به علت توانایی ناقل بیانی ویروسی در آلوده کردن گیاهان جوان و بالغ در تمام مراحل رشدی، امکان بررسی واقعی تمام صفات گیاهان میسر می‌شود. صفات بذری یک استثناء است و درحال حاضر ناقل‌های ویروسی گیاهی نمی‌توانند برای بررسی رشد و نمو بذر بکار روند. یکی از کاربردهای ناقل‌های ویروسی استفاده از آن برای ساخت کتابخانه ژنومی است. این ویژگی باعث می‌شود که ویروس‌های گیاهی بعنوان ابزاری برای بررسی عملکرد ژنها ازجمله عملکرد ژنهای پروفایل متابولیکی، پروفایل آر ان ای یا پروتئین، و غیره، مورد استفاده قرار گیرند. سامانه ناقل‌های ویروسی می‌تواند غربال اولیه ژنومی را آسان‌تر و کامل‌تر کرده و یا به پالایش توالی‌هایی که در مطالعات دیگر شناخته شده‌اند سرعت دهد. ناقل بیانی ویروسی می‌تواند به‌عنوان ابزاری جهت القای خاموشی سیستمیک ژنها یا خانواده‌های ژنی خاص بکار رود (Pogue *et al*. 2002).

هنگامی که گیاهان توسط ناقل ویروس حاوی بخشی از توالی یک ژن آلوده شوند، بصورت سیستمیک از بیان آن ژن در گیاه ممانعت شده و عملکرد و فنوتیپ آن ژن حذف می‌شود (Waterhouse *et al.* 2001). خاموشی ژن برپایه ویروس‌های گیاهی برای مطالعه نقش ژن‌های خاصی در مسیرهای متابولیکی استفاده شده است. همچنین مایه‌زنی گیاهان توسط ناقل ویروسی دارای cDNA یک ژن خاص باعث بیان سیستمیک ژن دربافت گیاه می‌شود. اثر چنین بیانی می‌تواند در فنوتیپ مشاهده شود و افزایش بیان این ژن نه تنها روی تجمع مواد متابولیکی اثر گذار است، بلکه بر مسیرهای بیوشیمیای تولید مواد دیگر هم می‌تواند موثر باشد (Pogue *et al.* 2002).

در سامانه ناقل‌های ویروسی جهت خاموشی ژن، این ناقل-ها می توانند برای شناسایی ژن‌هایی که مورد هدف علفکش‌ها هستند یا ژن‌هایی که باعث مقاومت به علفکش‌های اختصاصی می‌شوند، مورد استفاده قرار گیرند. در این حالت کتابخانه ژنومی گیاهان یا موجودات مختلف که متابولیزه کننده علفکش‌ها هستند را در ناقل بیانی قرار داده و ناقل بدست آمده را به گیاه مایه زنی می‌کنند و می-توان انتظار القای بیان این ژن با مقاومت به مواد شیمیایی در گیاه میزبان را داشت (Shiboleth *et al.* 2001).

بیان قطعاتی از ژن phytoene desaturase (*pds*) در ناقل-های ویروس جغ‌جغه توتون و ویروس موزائیک خطی جو باعث پریدگی رنگ و سفید شدن بافت‌های آلوده گیاهی می‌شود. در بافت آلوده شده با ناقل TMV-*pds*، به علت خاموشی ژن *pds* کاروتنوئید phytoene تجمع می-یابد (Pogue *et al.* 2002). از ویروس جغ‌جغه توتون (TRV) برای بررسی ژن‌های دخیل در بیماریزایی نماتد مولد گره استفاده شده است و کارائی این ناقل برای خاموشی یک سری از ژن‌های نماتد مولد گره مثبت ارزیابی شده است (Dubreuil *et al.* 2009).

ناقل‌های القا کننده خاموشی ژن (VIGS) بر پایه ویروس-های دی ان ای دار مانند ویروس موزائیک آفریقایی کاساوا و ویروس چروکیدگی برگ پنبه طراحی شده‌اند که برای مطالعات ژنومیکس عملکردی در گیاهان پنبه و کاساوا استفاده شده‌اند (Tuttle *et al.* 2008). با استفاده از VIGS می توان عملکرد چندین ژن را بطور همزمان با استفاده از دومین‌های حفاظت شده خاموش کرد. درحالی که برای خاموش کردن یک ژن خاص در میان یک خانواده ژنی از ناحیه اختصاصی آن ژن استفاده می‌شود و این امکان بررسی سریع عملکرد ژن‌های همولوگوس در میان گونه-های مختلف گیاهی به صورت همزمان و با دقت بالا را به ما می دهد (Becker *et al.* 2010). همچنین از ویروس‌های وابسته به ویروس‌های دی ان ا دار بطور موثری برای خاموشی ژن استفاده شده است (Huang *et al.* 2011).

ویژگی‌های ضروری ناقل‌های عملکردی (Functional):

در سامانه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب جهت مصارف پزشکی، محصول پروتئینی باید خالص و از نظر زیستی فعال، عاری از آلودگی، همچنین عاری از اندوتوکسین‌ها و عوامل آلوده کننده عفونی بوده و تولید آن هم مقرون به صرفه باشد. همچنین سامانه های ویروسی نباید توسط حشرات ناقل منتقل شده و موجب ملاحظات زیست محیطی شود. گاهی یکی از مشکلاتی که برای ناقل ها پیش می‌آید این است که تغییرات ناخواسته ژنتیکی در توالی غیرویروسی صورت می‌گیرد. جهت افزایش کارائی سامانه‌های ویروسی، ضروری است که ناقل بیانی ویروسی دارای ژن هدف، از نظر ژنتیکی پایدار بوده و در مقابل شرایط مختلف محیطی و واکنش‌های دفاعی میزبان پایدار بماند.

ناقل ویروسی مطلوب باید از توالی غیرهمولوگ (nonhomogenous) محصولی تولید کند که کمترین اثرات ایمونوژنیک یا آلرژی‌زایی را داشته باشد. باتوجه به نرخ بالای جهش در ویروس‌های آر ان ای دار و حفظ توالی ژنوم در این ویروس‌ها، نتیجه گیری می شود که ناقل‌های بیانی منشائ گرفته از این ویروس‌ها برای رویارویی با تغییرات ناخواسته آمادگی لازم را دارند (Van Vloten-

Doting *et al*. 1985). بنابراین مطالعات زیادی روی بررسی میزان تغییرات ناخواسته ژنتیکی توالی ژن خارجی در ناقل بیانی ویروس‌های گیاهی صورت گرفته و نشان داده که تغییرات در توالی غیر ویروسی با پاساژ ناقل در گیاه به ندرت اتفاق می‌افتد (Kearney *et al*. 1999). نتایج پژوهش‌ها نشان داده که ناقل بیانی ویروس RNA دار گیاهی بصورت صحیح توالی غیر ویروسی را تکثیر کرده و جمعیت همگنی از پروتئین در گیاه تولید می‌کند. توانایی استفاده از سامانه ویروسی تحت شرایط نامساعد محیطی در مزرعه و گلخانه از دیگر فاکتورهای مهم است. ناقل ویروسی در شرایط مختلف اقلیمی پایدار بوده و قادر به تکثیر تحت هر شرایط اقلیمی است. رشد گیاه در مزرعه و گلخانه می‌تواند افزایش واکنش دفاعی گیاه را دربرداشته و این خود می‌تواند باعث تبدیل شدن حساسیت معمولی گیاه به مقاومت علیه ناقل ویروسی شود. این فشار انتخابی روی ناقل ویروسی می‌تواند روی پایداری ژنتیکی جمعیت ناقل و هدایت آن به سمت حذف یا کاهش تولید پروتئین هدف موثر باشد (Pogue *et al*. 2002). برای جلوگیری از ورود ناخواسته ناقل ویروسی ساخته شده به طبیعت از ناقل‌های نسل دوم استفاده شد و در این ناقل‌ها ژن‌های حرکتی ویروس توسط ناقل حذف شده و درنتیجه این ناقل‌ها قدرت انتقال توسط حشرات را از دست می دهند (Scholthof *et al*. 1996).

چالش‌ها و مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان

به‌رغم فوائد فراوان تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان هنوز استفاده از این تکنولوژی به خوبی توسعه نیافته است و پیشرفت آن بسیار کند است. در این قسمت از مقاله موانع توسعه تجاری سازی این فناوری را بررسی می‌کنیم.

یکی از چالش‌هایی که بر سر مسیر تجاری‌سازی این فناوری وجود دارد هزینه بالای تولید به مراحل و فرآیندهای پائین دستی تولید از جمله خالص سازی و افزایش کیفیت مربوط می‌شود. تلاش‌هایی برای ساده‌تر کردن و کاهش هزینه‌های خالص‌سازی و فرآیندهای استخراج انجام گرفته است. ازجمله با تعویض میزبان‌های تولید کننده پروتئین سبب کاهش مراحل خالص‌سازی و یا حتی حذف مواد سمی یا بازدارنده گیاهی شده‌است. به عنوان مثال یکی از موانع تولید پروتئین aprotinin در ذرت و استخراج آن از بذر وجود ترکیب بازدارنده ترپسین تولیدی در ذرت است که مراحل استخراج را پیچیده‌تر کرده و خلوص پروتئین استخراج شده از این گیاه تا ۷۵ درصد می‌رسد درحالی که تولید همین ترکیب در توتون و استخراج آن به دلیل عدم وجود این ترکیب بازدارنده تا خلوص ۹۹ درصد افزایش می‌یابد (Pogue *et al*. 2010).

شرکت Ventria Bioscience (FortCollins, USA) چندین واکسن و پروتئین مثل آلبومن انسانی ، transferrin, lactoferrin و lysozyme را در بذر برنج تولید کرده است. اما خالص سازی lysozyme به دلیل وجود phytic acid در بذر به دلیل بار منفی بالای این ترکیب و باند شدن آن با ترکیبات رزینی که بار مثبت دارند دچار مشکل شد و یک مرحله اختصاصی مثل هیدرولیز اسیدی و سپس رسوب آن برای خذف phytic acid لازم است و همین مرحله هزینه تولید را بالا برد (Wilken & Nikolov, 2010). بنابراین شرکت‌ها ترجیح می‌دهند فعلا" وارد مرحله تولید ترکیبات داروئی نشده و بیشتر به دنبال تصمیمات لازم و بهینه کردن روش‌هایی باشند تا تولید تجاری و به‌صرفه صورت گیرد. بطور مثال شرکت ORF Genetics هورمون رشد انسانی و cytokines را در بذر جو تولید می‌کند و این ترکیب درحال حاظر صرفا" برای کاربردهای تشخیصی و پژوهشی و هم‌چنین در مواد آرایشی استفاده می‌شود (Fischer *et al*. 2013).

یکی دیگر از فواید تولید دارو در گیاهان مصرف خوراکی اندامهای گیاه (برگها، بذور، و میوه ها) است که می‌توان واکسن‌های خوراکی و یا آنتی‌بادی‌های خوراکی را در این اندام‌ها تولید کرد. استفاده از واکسن‌های خوراکی می‌تواند سیستم ایمنی را از طریق بافت‌های لنفی همراه با دستگاه

گوارش که درگیر با بسیاری از بیماگرهای است را فعال کند (Yusibov *et al.* 2011). برای این منظور بذر یکی از مهمترین اندام‌ها است زیرا غیر از خوراکی بودن به دلیل دیر هضم بودن آن آنتی‌بادی یا واکسن به تدریج آزاد شده و همین دلیل خود باعث افزایش توانایی تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Fischer *et al.* 2013). هر چند می‌توان واکسن‌های خوراکی را برای آزاد شدن تدریجی کپسوله کرد اما با تولید و ذخیره این پروتئین‌ها در بذر این کار بصورت طبیعی انجام می‌شود، به‌ویژه در بذر گیاهانی مانند برنج که که بسیار دیر هضم هستند (Ogawa *et al.* 1987). همچنین یک فایده دیگر این سیستم کم هزینه بودن فرآیندهای استخراج پائین دستی آنها است به‌ویژه برای واکسن‌ها و آنتی بادی‌های تولیدی در بذر که بطور کلی برای آن هیچ فراوری لازم نیست (Fischer *et al.* 2013).

جمع بندی نهایی

استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای بیان پروتئین‌ها به‌سرعت در حال گسترش است و راه حل‌های تکنیکی فراوانی برای کاربرد صنعتی آنها ارائه شده است. توسعه این فرایند در سال‌های گذشته نشان می‌دهد که این ابزار جدید قابلیت تجاری سازی را دارند. استفاده از راهبرد ویروس کامل برای بیان ژن‌های غریبه محدودیت اندازه و نوع پروتئینی دارد که با این فناوری بیان می‌شود. مهمترین کاربرد امروزی آن در تولید واکسن است که می‌توان پپتید آنتی‌ژنی کوتاه، از طریق درج ژنتیکی یا اتصال شیمیایی پپتید ایمونوژنیک به پیکره ویروسی را برای تولید واکسن استفاده کرد. بنظر می‌رسد استفاده از روش Magnifection جایگزین مناسبی جهت کوتاه شدن زمان و بیان پروتئین در حجم وسیع است.

استفاده از ناقل‌های ویروسی یک راه حل مناسب برای تبدیل گیاهان به کارخانه تولید پروتئین برای مصارف صنعتی و پزشکی، به‌ویژه در حالتی که محدودیت زمانی وجود دارد، است. مهندسی گیاهان تراریخته به صورتی که آلودگی به ویروس با آزاد شدن ویروس از کرموزوم گیاه توسط مواد شیمیایی القاء می شود، نیز یک راهکار مناسب دیگر جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان است. به‌رغم تلاش‌هایی که در این زمینه انجام شده‌است، پژوهش‌های بیشتری لازم است تا این فناوری به پتانسیل نهایی خود برسد.

منابع

Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A. 2007. Stability of potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. Transgenic Research 16:587–597.

Azhakanandam K, Weissinger SM, Nicholson JS, QU R, Weissinger AK. 2007. Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. Plant Molecular Biology 63: 393-404.

Bagheri K, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A. Zebarjadi A. 2010. Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. African Journal of Biotechnology 9: 5066-5072.

Baneyx F.1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology 10:411–21.

Becker A, Lange M. 2010. VIGS-genomics goes functional. Trends in Plant Science 15:1–4.

Bustamante PI, Hull R. 1998. Plant virus gene expression strategies. Electronic Journal of Biotechnology 1(2): 65-82.

Cerovska N, Hoffmeisterova H, Moravec T, Plchova H, Folwarczna J, Synkova H, Ryslava H, Ludvikova V, Smahel M. 2012. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants. Journal of Biosciences 37: 125–133.

Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D. 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. The Plant Journal 2:549–57

Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant

baculovirus vector. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:127–32.

Dudreuil G, Magliano M, Dubrana MP, Lozano J, Lecomte P, Favery B, Abad P, Rosso MN. 2009. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. Journal of Experimental Botany 60:4041-4050.

Eckart MR, Bussineau CM. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. Current Opinion in Biotechnology 7:525–30.

Egelkrout E, Rajan V, Howard JA. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Science 184:83-101.

Fischer R, Schillberg S, Buyel JF, and Twyman RM. 2013. Commercial Aspects of Pharmaceutical Protein Production in Plants. Current Pharmaceutical Design, 19, 5471-5477.

Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfected with noncompeting viral vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:14701-14706.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2005. Magnifection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine 23:2042-2048.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. Current Opinion in Biotechnology 18:134–141.

Hagiwara Y, Peremyslov VV, Dolja VV. 1999. Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. Journal of Virology 73:7988–7993.

Hefferon KL, Fan Y. 2004. Expression of a vaccine protein in a plant cell line using a geminivirus-based replicon system. Vaccine 23:404-410.

Hesse F, and Wagner R. 2000. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. Trends in Biotechnology 18:173–180.

Huang C J, Zhang T, Li FF, Zhang XY, Zhou XP. 2011. Development and application of an efficient virus-induced gene silencing system in *Nicotiana tabacum* using geminivirus alphasatellite. Journal of Zhejiang University Science B 12: 83‑92.

Karg SR, Kallio PT. 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology Advances 27: 879-894.

Kearney CM, Thomson MJ, Roland KE. 1999. Genome evolution of tobacco mosaic virus populations during long-term passaging in a diverse range of hosts. Archives of Virology 144:1513–1526.

Kessans SA, Linhart MD, Matoba N, Mor T. 2013. Biological and biochemical characterization of HIV-1 Gag/dgp41 virus-like particles expressed *in Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnology Journal 11: 681–690.

Klimyuk V, Marillonnet S, Knaeblein J, McCaman M, Gleba Y. 2005. Production of recombinant proteins in plants. In Modern Biopharmaceuticals. In Knaeblein J (Ed.) WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA: 893-917.

Kumagai MH, Turpen TH, Weinzettl N, della-Cioppa G, Turpen AM. 1993. Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosan thin in transfected plants by an RNA viral vector. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:427–430.

Mallajosyula JK, Hiatt E, Hume S, Johnson A, Jeevan T, Chikwamba R, Pogue GP, Bratcher B, Haydon H, Webby RJ, McCormick AA. 2013. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. Human Vaccin and Immunotherapeutics 10:586–595.

Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nature Biotechnology 23:718-723.

Mason HS, Hong F, Bjorklund G. 2012. Methods of protein production and compositions thereof. US Patent Office Application 20140127749.

Mechtcheriakova A, Eldarov MA, Nicholson L, Shanks M, Skryabin KG, Lomonossoff GP. 2005. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. Journal of Virological Methods 131: 10-15.

Mirzaee M, Jalali-Javaran M, Moieni A, Zeinali S, Behdani M, Shams-Bakhsh M, Modarresi M. 2016. Rapid Recombinant Protein Production using a TuMV-Based Vector in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). International Journal of Advanced Biotechnology and Research 7(1): 118-124.

Nassaj Hosseini SM, Shams-Bakhsh M, Salamanian AH, Yeh SD. 2012. Expression and purification of human interferon gamma using a plant viral vector. Progress in Biological Sciences. 2(2): 104-115.

Nassaj Hosseini SM, Shams-Bakhsh M, AH. Salmania, Yeh, SD. 2013. Expression and purification of movement protein of *Cucumber green mottle mosaic virus* using a plant-virus expression system. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(3): 143-161. (In Farsi with English abstract).

Nuzzaci M, Vitti A, Condelli V, Lanorte MT, Tortorella C, Boscia D, Piazzolla P, Piazzolla G. 2010. In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine. Journal of Virological Methods 165:211–215.

Odum JN. 2001. Biotech manufacturing: Is the crisis real? Pharmaceutical Engineering 21:22–33.

Petukhova NV, Gasanova TV, Stepanova LA, Rusova OA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Skurat EV, Tsybalova LM, Kiselev OI, Ivanov PA, Atabekov JG. 2013. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors. Current Pharmaceutical Design 19: 5587–5600.

Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura Tm Kasai Z, and Tanaka K. 1987. Purification of protein body-i of rice seed and its polypeptide composition. Plant Cell Physiology 28: 1517-1527.

Phoolcharoen W, Bhoo SH, Lai H, MA J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS. 2011. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana*

benthamiana. Plant Biotechnology Journal 9: 807–816.

Pogue GP, Lindbo JA, Garger SJ, Fitzmaurice. 2002. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. Annual Review of Phytopathology 40:45–74.

Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE, Hiatt E, Hume S, Phelps J, Long L, Bohorova N, Kim D, Pauly M, Velasco J, Whaley K, Zeitlin L, Garger SJ, White E, Bai Y, Haydon H, Bratcher B. 2010. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. Plant Biotechnology 8: 638-654.

Rybicki EP, Martin DP. 2014. Virus-derived ssDNA vectors for the expression of foreign proteins in plants. Current Topics in Microbiology and Immunology 375: 19–45.

Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS. 2006. Protection conferred by recombinant Yersinia pestis antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:861-866.

Sanz AI, Serra MT, Garcia-Luque I. 2000. Altered local and systemic spread of movement deficient virus in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus 3a protein. Archives of Virology 145:2387-2401.

Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. Annual Review of Phytopathology 34:299– 323.

Schouten A, Roosien J, Vanengelen FA, Dejong GAM, Borstvrenssen AWM. 1996. The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology 30:781–93.

Shams-bakhsh M, Canto T, Palukaitis P. 2007. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing. Virus Research 130:103-109.

Shams-Bakhsh M. 2011. Silencing of RNA directed RNA polymerase 1 gene of tobacco leads to enhanced resistance to some plant viruses. Iranian journal of Plant Pathology. 47 (3): 85-87. (In Farsi with English abstract).

Shiboleth YM, Arazi T, Wang Y, Gal-On A. 2001. A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. Journal of Biotechnology 92:37–46.

Smith ML, Corbo TA, Bernales J, Lindbo JA, Pogue GP, Palmer KE, McCormick AA, 2006. Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from Tobacco mosaic virus and Semliki Forest virus and their evaluation as immunogens. Virology 358:321-333.

Tuttle JR, Idris AM, Brown JK, Haigler CH, Robertson D. 2008. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. Plant Physiology 148: 41–50.

Van Vloten-Doting L, Bol JF, Cornelissen B. 1985. Plant virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. Plant Molecular Biology 4:323–26.

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:11128-11133.

Varsani A, Williamson AL, Stewart D Rybicki EP. 2006. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in Nicotiana benthamiana using an infectious tobamovirus vector. Virus Research 120:91-96.

Verch T, Yusibov V, Koprowski H. 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. Journal of Immunological Methods 220:69-75.

Wardrop RM, Whitacre CC. 1999. Oral tolerance in the treatment of inflammatory autoimmune diseases. Inflammation Research 48:106–119.

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL. 2003. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. Journal of Virology 77(16): 8702–11.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411:834–42.

Werner S, Marillonnet S, Hause G, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:17678-17683.

Wilken LR, Nikolov ZL. 2010. Evaluation of alternatives for human lysozyme purification from transgenic rice: impact of phytic acid and buffer Biotechnology Progress 26: 1303-1311.

Yevtushenko DP, Misra S. 2012. Transgenic Expression of Antimicrobial Peptides in Plants: Strategies for Enhanced Disease Resistance, Improved Productivity, and Production of Therapeutics. Small Wonders: Peptides for Disease Control. pp. 445-458. American Chemical Society, Canada.

Young M, Willits D, Uchida M, Douglas T. 2008. Plant Viruses as Biotemplates for Materials and Their Use in Nanotechnology. Annual Review of Phytopathology 46: 361-384.

Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H. 2002. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. Vaccine 20:3155–3164.

Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N. 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. Vaccines, antibodies and beyond. Human Vaccines 7: 313-321.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۲۲٤-۲۱۱

کاربرد ویروس‌های گیاهی در بیونانوتکنولوژی

Applications of plant viruses in bionanotechnology

سعیده ابراهیمی [۱] و امید عینی گندمانی [۲*]

Saeideh Ebrahimi[1] and Omid Eini Gandomani* [2]

۱- کارشناسی ارشد ۲- عضو هیئت علمی گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه زنجان

1. M.Sc., 2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, University of Zanjan, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/٤ – تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/٦)

چکیده

مطالعه ویروس‌های گیاهی تنها از منظر بیماری‌زایی باعث کم شدن توجه و درک دانشمندان از سایر جنبه‌های ویروس‌ها شده است. در سال‌های اخیر مطالعات ویروس‌ها در راستای استفاده مفید از آن‌ها، و فارغ از فنوتیپ بیماری‌زایی صورت گرفته است. کپسید ویروس‌های گیاهی به عنوان قالب‌های زیستی، حامل‌های دارو و نیز نانودستگاه در علوم کاربردی مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. با شناسایی ویژگی‌های ظاهری، ژنتیکی، شکل فضایی، نحوه تکثیر و استراتژی مونتاژ پروتئین پوششی ویروس‌ها، می‌توان با دستکاری در ژنوم و پروتئین‌های ویروسی در زمینه‌های مختلف از آن‌ها بهره برد. مهمترین کاربرد ویروس‌های گیاهی در علم نانوپزشکی است که در روش‌های تشخیص و درمان بیماری‌ها موثر است. یکی از مهمترین مزایای استفاده از نانوذرات ویروس گیاهی، سمیت کم برای انسان و تاثیر اختصاصی آن‌ها می‌باشد. در این مقاله به بررسی کاربرد ویروس های گیاهی در حوزه بیونانوتکنولوژی پرداخته شده است.

واژه‌های کلیدی

بیونانوتکنولوژی،
قالب زیستی،
نانوپزشکی،
نانوذرات ویروسی،
ویروس‌های گیاهی

مقدمه

به ذراتی که ابعادی کمتر از ۱۰۰ نانومتر داشته باشند، نانومواد گفته می‌شود. توسعهٔ فناوری نانو در رابطه با بیوتکنولوژی به طور قابل توجهی دامنهٔ کاربرد نانومواد را در زمینه‌های مختلف گسترش داده است (Khot *et al.* 2012).

بیونانوتکنولوژی و یا نانوبیوتکنولوژی (مترادف هستند) زیربخشی از فناوری نانو است. نانوبیوتکنولوژی شامل بهره‌برداری از نانومواد، دستگاه‌ها وروش‌ها درمقیاس نانو می‌باشد که به دلیل ویژگی چندشاخه‌ای آن باعلوم مختلف از قبیل شیمی، زیست شناسی، فیزیک، علم مواد، مهندسی و پزشکی در ارتباط است. نانوبیوتکنولوژی را می‌توان به دو بخش اصلی تقسیم کرد. اول استفاده از دستگاه‌های نانوفناوری برای بررسی و درک سیستم‌های بیولوژیکی و دوم بهره‌برداری از مواد زیستی در ساخت نانومواد جدید، که در رابطه با دومین بخش می‌توان به استفاده از ویروس-های گیاهی به منظور نانومواد اشاره کرد (Steinmetz and Evans 2007).

مطالعه سیستماتیک بیماری‌زایی ویروس‌های گیاهی قدمتی ۱۳۳ ساله داشته و در تمام این سال‌ها تاکید بیشتر بر مواردی شامل درک و کنترل بیماری‌های ناشی از ویروس ها، مکانیسم بیماری‌زایی و مطالعه چگونگی تعامل آن‌ها با میزبان گیاهی بوده است (Eini *et al.* 2009; García and Pallás 2015; Nicaise 2014). نگرش به ویروس‌های گیاهی تنها از منظر بیماری‌زایی باعث دور شدن توجه و درک دانشمندان از سایر جنبه‌های آن‌ها شد. در سال‌های اخیر مطالعات ویروس‌ها در راستای استفاده مفید از آن‌ها، مستقل از فنوتیپ بیماری‌زایشان صورت گرفته که این تغییر همزمان با ارتباط بین ویروس‌شناسی با سایر علوم و پیشرفت ابزارهای زیستی مولکولی در ۳۸ سال اخیر همراه شده است. بررسی‌های وسیعی در مورد کاربرد ویروس-های گیاهی در بیوتکنولوژی از قبیل بهبود محصولات کشاورزی و سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب انجام شده است (Young *et al.* 2008; Eini and Behjatnia 2016).

ویروس‌ها به عنوان قالب‌های زیستی

ویروس‌ها به عنوان قالب‌هایی جهت دستکاری مصنوعی مواد از قبیل داروها به کار برده می‌شوند. مهمترین مزیت ویروس‌ها در این مورد اندازه آن‌ها است. ویروس‌ها در اندازه‌های ۱۸ تا ۵۰۰ نانومتر با ساختارهای چندوجهی و طول کمتر از دو میکرومتر با ساختار میله‌ای و رشته‌ای وجود دارند. ذرات ویروسی درواقع قالب‌های پروتئینی قوی با اندازه‌های نانومتری هستند که دارای یکنواختی قابل توجهی برای ساخت مواد در مقیاس نانو می‌باشند (Young *et al.* 2008).

ساختار، اندازه، خواص فیزیکی و استراتژی‌های تولید بسیاری از ویروس‌های گیاهی، آن‌ها را به نانوداربست، ظروف نانو و نانوبلوک‌هایی ایده‌آل بر پایهٔ پروتئین تبدیل نموده که برای استفاده در زمینه کاربردی علوم مختلف از جمله زیست‌پزشکی، شیمی دارویی، علوم تجزیه‌ای، شیمی کاتالیزوری، کنترل آفات زراعی و تولید زیست‌مواد مناسب ساخته است (Grasso *et al.* 2013).

کپسید ویروس‌های گیاهی در گروه نانوقالب‌ها قرار می گیرد زیرا معمولا ابعاد آن‌ها از ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر متغیر می باشد. ویژگی‌های بارز تمام ویروس‌ها شامل توانایی آلوده-سازی سلول میزبان، تکثیر، بسته‌بندی اسید نوکلئیک آن و خروج از سلول می‌باشد. در این فرآیند، ویروس‌ها به گونه‌ای تکامل یافته‌اند تا در طیف گسترده‌ای از محیط‌های شیمیایی پایدار بمانند. ویروس‌ها در تکثیرشان، انعطاف-پذیری قابل‌توجهی را نشان می‌دهند، ازجمله ساختار نیمه پایدار ویریون‌ها، که در شرایط سخت خارج سلولی زنده می‌مانند درحالی که اسید نوکلئیک‌های ژنوم خود را در داخل سلول آزاد می‌کنند، همچنین حرکت درحال تکثیر و توانایی تحویل نوکلئیک اسید به مکان‌های اختصاصی از

دیگر ویژگی‌های تکثیرویروس‌ها می‌باشند (Young *et al.* 2008).

تنوع در کپسیدها ایجاد مجموعه قالب‌هایی می‌کند که با توجه به کاربردهای مختلف بر اساس اندازه، شکل و ثبات قابل انتخاب هستند. همه ویروس‌ها ماده ژنتیکی ویروسی را تولید، بسته‌بندی و منتقل می‌کنند، با این حال بسیاری به پیکره‌های غیربیماری‌زای عاری از ماده ژنتیکی، چه به صورت طبیعی و چه به صورت دستکاری ژنتیکی، تبدیل می گردند. این امر اجازه جابجایی ماده طبیعی ویروسی را با طیف وسیعی از محموله‌های مصنوعی به ویروس می-دهد. ساختار زیرواحدها می‌تواند به صورت شیمیایی، ژنتیکی و یا هردو حالت دستکاری شده، بدون اینکه کل ساختار تحت تاثیر قرار گیرد. با توجه به خواص ویروس-ها و امکان ایجاد عملکرد جدید برپایهٔ کپسید پروتئینی با تغییرات شیمیایی و ژنتیکی، دستاوردهای این نانومواد توسعه یافته است (Young *et al.* 2008).

به طور معمول کپسیدها مجتمع از زیرواحدهای تکرارشونده هستند که ساختار بسیار متقارنی را تشکیل می‌دهند. از نقطه نظر مصنوعی، کپسیدها می‌توانند به عنوان مجموعه‌ای از قطعات مولکولی تطبیق‌پذیر توصیف شوند، که ساختار بسیار همگنی دارند. ساختار دقیق اتمی برای چندین ویروس گیاهی موجود است که اطلاعات لازم برای تغییر ساختار کپسید و ایجاد عملکرد جدید را فراهم می‌سازد. اگر کپسیدهای ویروسی را به عنوان ظروف مولکولی درنظر بگیریم سه محل اتصال خارجی، داخلی و میانی زیرواحدهای پروتئینی تشکیل‌دهنده این ظروف وجود خواهد داشت (شکل۱) (Douglas and Young 2006).

پوشش ویروسی توسط سطح خارجی با محیط خارج ارتباط برقرار می‌کند. با ایجاد تغییر در سطوح خارجی ویروس‌ها توسط مولکول‌های کوچک می‌توان آن‌ها را به سمت ارتباط اختصاصی با سطوح زنده و یا غیر زنده هدایت کرد. سطوح خارجی تکرارشونده کپسیدها به عنوان قالب‌های چندظرفیتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مزیت‌های قالب چندظرفیتی نسبت به تک ظرفیتی، افزایش تمایل و امکان ارتباط‌های ممکن است. با استفاده از روش زیست تقلید، سلول‌های ویروسی به سمت کاربردهای درمانی هدایت شده‌اند، در همین راستا تغییرات فراوانی در مکان‌های اتصال سطح خارجی ویروس‌ها از نظر ژنتیکی یا مصنوعی صورت گرفته است. به این ترتیب که با تلفیق پادتن‌ها و پپتیدهای هدف با سطح خارجی کپسید ویروسی می‌توان موجب هدف‌گیری یک سلول خاص برای تحویل ماده دارویی و یا عکس‌برداری شد (Suci *et al.* 2007).

شکل۱- سه سطح از ساختار کپسید ویروس‌های گیاهی که جهت بارگذاری نانومواد استفاده می شود. کپی شده با اجازه از (Douglas and Young 2006).

Figure 1. Three surfaces of plant viral capsid architectures, which can be used for uploading nanomaterials . Reprinted with permission from (Douglas and Young 2006).

ابزار زیست‌شناسی مولکولی امکان مهندسی زیرواحدهای پروتئین پوششی ویروس‌ها را فراهم کرده است به طوری که این تغییرات آمینواسیدها را به نقاط تعیین شده درون این ساختار قفس مانند هدایت می‌کند.

همچنین به گروه‌های عملکردی با اشکال فضایی مشخص امکان اتصال شیمیایی لیگاندها را می‌دهد. آمینواسیدهای موجود در سطح برای اتصال اختصاصی مولکول‌های کوچک مانند، نانوذرات طلا، مواد فلورسنت، کربوهیدرات، نوکلوئیک‌اسید و پپتیدها به کار می‌روند. با کمک سنتزهای شیمیایی می‌توان سطوح وسیعی برای اتصال این مولکول-های کوچک ایجاد کرد (Young *et al.* 2008). سطح داخلی کپسیدهای ویروسی نیز مکان مناسبی ازنظر اندازه برای اتصال نانومواد می‌باشد. ویروس‌ها ماده ژنتیکی خود را داخل این ساختار پوششی بسته‌بندی می‌کنند، دانش ما نسبت به این روند باعث استفاده از ویروس‌ها در راستای هدایت محموله‌های غیرویروسی به داخل این پوشش می-شود (Douglas and Young 1998).

به طور کلی دو روش برای وارد کردن مولکول‌های مهمان به داخل کپسید ویروسی وجود دارد. اولین حالت به دام افتادن این مولکول‌ها در طی فرایند مونتاژ شدن کپسید ویروسی در اطراف ژنوم و دومین حالت وارد شدن مولکول‌های مهمان در کپسید تازه مونتاژ شده است. ساختار اتمی ویروس‌ها امکان شناسایی یا تغییر اسیدهای آمینه در کپسید ویروس جهت اتصال زیستی را به محققان می‌دهد. با دستکاری ژنتیکی به راحتی می‌توان ویروس‌های جهش یافته‌ای را تولید کرد که لیزین، تیروزین یا سیستئین را در مناطق قابل دسترس کپسید ویروس قرار داده و امکان اتصال شیمیایی مولکول‌ها به اسیدهای آمینه در داخل و خارج کپسید را فراهم نمایند (Singh *et al.* 2006). ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی (*Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV) و ویروس موزاییک جارو (*Brome mosaic virus*) هر دو از اعضای جنس *Bromovirus* و *Tobacco mosaic virus* از *Tobamovirus* نمونه‌هایی هستند که برای انتقال مواد در درون کپسید مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در اولین مطالعاتی که با CCMV صورت گرفت ثابت شد که می‌توان از این ویروس‌ها به عنوان ظروف واکنش جهت تولید نانومواد استفاده کرد (Douglas and Young 1998).

نانوذرات ویروسی

در طول سال‌های اخیر مجموعه‌ای از نانوذرات زیستی طبیعی مانند قالب‌های پروتئینی و طیف گسترده‌ای از نانوذرات ویروسی (Virus nanoparticles; VNP) به عنوان قالب برای ساخت نانومواد مورد استفاده قرار گرفته است. به ذرات فاقد ژنوم، ذرات ویروس مانند (VLP; virus-like particles) گفته می‌شود که می‌توانند به عنوان یک زیر کلاس از نانوذرات ویروسی درنظر گرفته شوند. نانوذرات ویروسی گیاهی و باکتریایی با ارزش هستند زیرا آن‌ها نه تنها زیست‌سازگار و قابل تجزیه هستند، بلکه برای انسان و سایر پستانداران، غیر بیماری‌زا و بی خطر می-باشند (Kaiser *et al.* 2007). نانوذرات ویروسی ساختارهای با اندازه‌های یکسان هستند که می‌توانند در مقادیر زیاد تولید شوند. این‌ها بر اساس ساختارهای بسیار متقارن‌شان، می‌توانند به عنوان یکی از پیشرفته‌ترین نانومواد‌طبیعی با قابلیت حرکت محسوب شوند به طوری که حفره‌های داخلی آن‌ها را می‌توان با مولکول‌های دارویی، مواد تصویربرداری و نانوذرات دیگر پرکرد، در حالی که سطح خارجی را می‌توان با مکان‌های اتصال هدف طراحی کرد تا به سلول‌های خاص متصل شوند (شکل۲). نانوذرات ویروسی را علاوه بر سیستم‌های بیان هترولوگ می‌توان در غلظت‌های بالا در میزبان طبیعی آن‌ها تولید کرد. نانوذرات ویروس گیاهی مانند ویروس موزاییک جارو (BMV)، ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی (CCMV)، ویروس موزاییک لوبیا چشم‌بلبلی، ویروس ایکس سیب‌زمینی و ویروس موزائیک توتون و تنباکو را می‌توان در مقادیر بالا در حد گرم در گیاهان میزبان تولید کرد (Schneemann and Young 2003).

شکل ۲- نحوه آراسته شدن کپسید ویروسی توسط مولکول‌های کوچک و لیگاندها. اتصال متنوع مواد به ذرات ویروسی بیانگر قابلیت بالای این ذرات در کاربردهای متفاوت است. کپی شده با اجازه از (Singh *et al.* 2006).

Figure 2. The arrangement of small molecules and ligands on the viral capsids. Attachment of a wide range of molecules to the VNP indicates their potential in various applications. Reprinted with permission from (Singh *et al.* 2006).

تمایل به خودمونتاژی ویروس‌ها به نانوذراتی با شکل و اندازه مشخص و با درجهٔ بالایی از تقارن و حالت چند-ظرفیتی، آن‌ها را تبدیل به نانوذرات منحصربه‌فردی کرده است. در بسیاری از ویروس‌ها، در شرایط آزمایشگاهی عملکرد خودمونتاژی از زیرواحدهای پروتئین پوششی (CP)، در حضور و عدم حضور اسیدنوکلئیک، به تشکیل ذرات شبه ویروسی پایدار و سالم منجر شده است (Steinmetz and Evans 2007). ویروس‌ها دارای استراتژی‌های مونتاژ مختلفی هستند. فعل و انفعالات مختلفی که درزیرواحدهای کپسید ویروسی رخ می‌دهد، زمینهٔ مناسبی را برای دستکاری ساختار و ثبات قفس ویروسی فراهم می‌آورد. کپسید ویروس‌های گیاهی با یکدیگر تفاوت داشته که توانایی مونتاژ شدن به ساختارهای مختلف به صورت طبیعی و یا دستکاری شیمیایی و ژنتیکی را به ویروس می‌دهد (Young *et al.* 2008).

ویروس‌ها در واقع نشان‌دهنده گروه‌های ابرمولکولی با معماری سه‌بعدی هستند، که می‌توانند در بازده و خلوص بالا جداسازی شوند. ویروس‌های مهندسی شده می‌توانند نانوداربست‌های دو بعدی و سه بعدی تشکیل دهند که عملکردهای مختلفی از سلول‌ها را تنظیم کنند. به طور مثال از نانوداربست‌های ویروسی در تمایز هدفمند سلول های بنیادی استفاده شده است (Zhao, *et al.* 2015).

از کپسیدهای ویروسی به عنوان نانوراکتورها نیز استفاده می‌شود. اخیرا مطالعه آنزیم‌ها در سطح مولکولی، خصوصیات جدیدی از آن‌ها را مشخص ساخته است. برای این منظور آنزیم‌ها باید به شیوه فیزیکی یا شیمیایی به سطوح مختلفی متصل باشند که این امر به دلیل احتمال واسرشتگی آن‌ها مناسب نیست. بنابراین از کپسیدهای ویروسی به عنوان نانوراکتورهای تک آنزیمی استفاده می-شود که امکان انجام آزمون‌های تک آنزیمی دریک محیط فضایی بسته را ایجاد می‌کند(Comella-Aragones et al, 2007)،

از مزایای بیوشیمیایی نانوذرات ویروسی، تنوع در روش-های اصلاح قالب پروتئینی به منظور ایجاد یک عملکرد جدید می‌باشد. در سال‌های اخیر تمایل به استفاده‌های مفید از ویروس‌های گیاهی به عنوان قالب‌های زیستی افزایش یافته و انواع کاربردهای مختلف از واکسن‌سازی تا محصولات الکترونیک را شامل شده است. این پیشرفت‌ها به دلیل ویژگی‌های ویروس‌های گیاهی از قبیل اصلاح ژنتیکی و شیمیایی ویروس جهت طراحی یک عملکرد جدید، سیستم بیان هترولوگ که امکان تولید بالا و بادوام این نانوذرات را می‌دهد و همچنین امکان تفکیک توانایی بیماری‌زایی و حرکت ویروس از مونتاژ کپسید در حین تکثیر وجود دارد (Young *et al.* 2008).

نانوذرات ویروسی میله‌ای شکل در تهیه نانوسیم، نانولوله و نانوباتری

۱. ویروس موزاییک توتون *Tobacco mosaic virus* (TMV)

ویروس موزاییک توتون یک ویروس گیاهی میله‌ای شکل است. این ویروس در بیش از ۳۵۰ گونهٔ گیاهی ایجاد بیماری می‌کند. علایم بیماری بسته به میزبان شامل موزاییکی شدن، لکه‌لکه شدن، کوتولگی و پیچیدگی برگی می‌باشد. ساختار ویروس موزاییک توتون با اشعهٔ ایکس مشخص شده است. پیکره این ویروس متشکل از ۲۱۳۰ زیر واحد پروتئینی یکسان است که در یک الگوی مارپیچ در اطراف یک مولکول تک رشته RNA مرتب شده‌اند. ویژگی‌های مختلف سطوح داخلی و خارجی این ویروس، به علت داشتن اسیدآمینه‌های مختلف، امکان وجود فضای کنترل شده و مختلف را برای نانومواد مختلف ایجاد می-کند (Steinmetz and Evans 2007). سطح داخلی کپسید میله‌ای شکل ویروس موزاییک توتون در سنتز نانوسیم مفید بوده است که این امر به دلیل شکل منحصربه‌فرد و ثبات پیکره‌های ویروسی می‌باشد. همچنین تنوع ویروس موزاییک توتون به عنوان یک قالب زیستی برای ساخت طیف وسیعی از مواد معدنی نانولوله‌ای اثبات شده است (Klug 1999; Shenton *et al*, 1999).

علاوه براستفاده از ویروس موزاییک توتون به عنوان قالبی برای کانی‌سازی، این ویروس به عنوان یک داربست برای اتصال انتخابی رنگ‌های فلورسنت و دیگر مولکول‌های کوچک استفاده شده است (Schlick *et al.* 2005; Yi *et al*, 2005). همچنین مطالعاتی بر خواص جذب ویروس موزاییک توتون در سطوح مختلف طلا، میکا (طلق) ، شیشه و سیلیکون انجام شده است (Knez *et al.* 2004). استفاده از TMV به عنوان یک قالب برای فناوری نانو به سرعت در حال رشد است، و برنامه‌های کاربردی درجهت ساخت دستگاه‌های الکترونیکی نانو بر پایهٔ این ویروس در حال مطالعه است. به طور مثال می توان به تولید یک دستگاه حافظه دیجیتال بر اساس ویروس موزاییک توتون متالیزه شده با نانوذرات پلاتین اشاره کرد (Tseng *et al.* 2006). از کاربردهای دیگر این ویروس تهیه باتری‌های میکروالکترومکانیکی (نانوباتری یا نیکل-روی میکروباتری) است که به دلیل ساختار استوانه‌ای ویروس جهت افزایش ناحیه الکترود فعال است (Gerasopoulos *et al.* 2008).

نانوذرات ویروسی کروی شکل در نانوبیوتکنولوژی

۱- ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV)

ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی دارای ژنوم RNA تک رشته ای و از خانواده *Bromoviridae* است. مطالعه ساختار این ویروس توسط اشعه ایکس نشان می‌دهد که ذرات آن دارای تقارنی ۲۰ وجهی و با قطر ۲۸ نانومتر هستند. کپسید این ویروس از ۱۸۰ زیر واحد پروتئین پوششی یکسان تشکیل شده که به شکل یک پوستهٔ کروی بسته ۲۰ وجهی با تقارن سه طرفه ($T = 3$) می‌باشد. قطر حفره داخلی آن حدود ۲۰ نانومتر تعیین شده است (Steinmetz and Evans 2007). ذرات ویروسی در میزبان طبیعی، گیاه ماش (*Vigna unguiculata*) در غلظت‌های

بالایی تولید می‌شوند، معمولا یک تا دو میلی‌گرم از ذرات ویروسی در هر گرم از بافت آلوده برگ را می‌توان به دست آورد. همچنین این ویروس در سیستم‌های بیان هترولوگ، با بازده بالایی به دست می‌آید، به عنوان مثال، تولید ذرات شبه ویروسی در ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی در مخمر (*Pichia pastoris*) نیم میلی‌گرم در هر گرم از توده سلولی مرطوب می‌باشد. جهش در سطح داخلی کپسید ویروسی، به علت تغییر زیرواحد پوشش پروتئینی، تولید ذرات ویروسی در گیاه را مختل می‌کند، اما با استفاده از سیستم بیان مخمر در مقادیر زیاد تولید می‌شوند(Brumfield *et al.* 2004). علاوه بر آن، مشخص شده که مونومرهای پوشش پروتئینی می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی خودرا به ذرات خالی و دست نخورده ویروس مونتاژ کنند (Zhao, Xiaoxia *et al.* 1995).

در این ویروس، کپسیدهای خالی (عاری از RNA ویروسی) در آلودگی‌های طبیعی یافت نمی‌شوند. در مقابل، در شرایط آزمایشگاهی مونتاژ پروتئین پوششی خالص و یا بیان پروتئین پوششی این ویروس در سیستم‌های بیان هترولوگ می‌تواند منجربه تولید کپسیدهای عاری از RNA ویروسی شود. نانوذرات در اندازه و شکل، تابع ابعاد داخلی ساختار پروتئین پوششی ویروس هستند. سطح خارجی کپسید این ویروس دارای تعداد زیادی اسید آمینهٔ انتخابی می‌باشد که امکان آرایش و اتصال مختلف مولکول‌ها را به آن می‌دهد (Brumfield *et al.* 2004).

کانی‌سازی درون کپسیدهای ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی با قرار دادن ذرات خالی ویروس به همراه یون‌های پیش‌ساز در اسیدیته معمولی توسط مواد یونی که به فرم پلی‌اوکسومتالیت (Polyoxometalate) درآمده‌اند، انجام شده است. در اسیدیته‌های بالای شش ونیم، ذرات به فرم متورم باز هستند که باعث انتشار آزاد یون‌ها به درون محفظه ویروسی می‌شود. با پایین آمدن اسیدیته به عدد پنج الیگومرهای وابسته به اسیدیته گونه‌های معدنی به شکل پلی‌اکسومتالیت‌هایی درمی‌آیند که به راحتی به نمک آمونیوم متبلور می‌شوند، همچنین ساختار قفس ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی از حالت متورم به غیرمتورم تغییر می‌کند که در نتیجه باعث به دام انداختن مواد معدنی درفضای داخلی ویروس می‌شوند (شکل۳) (Douglas and Young 1999). ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی همچنین دارای نقش محل‌های اتصال فلزات در مجاورت زیرواحدهای پروتئین پوششی است. در محل‌های اتصال، یون‌های تربیومIII (Terbium) و گادولینیومGd^{3+} III (Gadolinium) به طور طبیعی متصل می‌شوند. ویژگی‌های مغناطیسی گادولینیومIII کپسید ویروس مورد مطالعه قرار گرفته است که انتظار می‌رود بتوان از این ذرات پارامغناطیس ویروس در کاربردهای پزشکی چون ام‌آرآی (Magnetic resonance imaging) بهره برد (Allen *et al.* 2005; Liepold *et al*, 2007).

ذرات ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی به طور طبیعی دارای لیزین، کربوکسیلات مشتق شده از آسپارتیک و گلوتامیک اسید در کپسید خود می‌باشند که این آمینواسیدها و کربوکسیل به صورت انتخابی برای اتصال رنگ‌های فلورسنت استفاده می‌شوند (Gillitzer *et al.* 2002). همچنین می‌توان از VLPها به عنوان داربستی برای اتصال اپی‌توپ‌ها (شاخص آنتی ژنیک) به منظور استفاده در واکسن‌ها بهره برد. برای مثال از شبه ذرات CCMV در ساخت داربست‌هایی برای اتصال اپی‌توپ انتخابی از ویروس آنفولانزا A، ویروس بیماری‌های دهان و پا استفاده شده است (Hassani-Mehraban *et al.* 2015).

۲- ویروس موزاییک جارو Brome mosaic virus (BMV)

ویروس موزاییک جارو دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای مثبت از خانواده *Bromoviridae* است. پیکره این ویروس در وضوح اتمی شناخته شده است. کپسید این ویروس دارای یک تقارن ۲۰ وجهی با قطر ۲۸ نانومتر است. کپسید توسط ۱۸۰ کپی مشابه از زیرواحدهای پروئین پوششی با تقارن سه بعدی تشکیل شده است. ذرات ویروس

موزاییک جارو را می‌توان در گیاهان یا در یک سیستم بیان هترولوگ مخمری (*Saccharomyces cerevisiae*) تولید کرد. علاوه بر این، مونومرهای پروتئین پوششی در شرایط آزمایشگاهی به ذرات شبه ویروسی دست نخورده مونتاژ می‌شوند (Cuillel *et al.* 1983). تلفیق نانوذرات طلا و نانوکریستال‌های نیمه رسانا با کاربرد صنعتی به داخل ذرات BMV مطالعه شده است. این روند در شرایط آزمایشگاهی توسط خودمونتاژی کپسید BMV درحضور نانوذرات انجام می‌گیرد. درواقع اگر به اندازه کافی ذرات کوچک (۵/۳ نانومتر) طلا یا نقاط کوانتومی موجود باشند با ذرات شبه ویروسی ملحق می‌شوند. ذراتی با اندازه حداکثر ۱٦ نانومتر می‌توانند به کپسید BMV ملحق شوند که تقریبا هم اندازه قطر داخلی کپسید ویروس (۱۷-۱۸نانومتر) هستند (Chen *et al.* 2006).

۳- ویروس موزاییک نکروتیک شبدرقرمز *Red clover necrotic mosaic virus (*RCNMV*)*

ویروس موزاییک نکروتیک شبدرقرمز دارای ژنوم RNA تک رشته ای و از خانواده *Tombusviridae* است. پیکره ویروس دارای تقارن ۲۰ وجهی و قطر حدود ۳٦ نانومتر است. فرآیند خودمونتاژی کپسید ویروس به خوبی شناخته شده است، با استفاده از استراتژی مونتاژ کپسید این ویروس می‌توان با ایجاد یک منبع مصنوعی از نانوذرات طلا در محل مونتاژ، نانوذرات ویروسی طلایی را در شرایط آزمایشگاهی به دست آورد. با استفاده از این استراتژی، پوشش پروتئینی این ویروس می‌تواند طیفی از اندازه‌های ذرات طلا را پوشش‌دار کند. نانوذرات ویروسی که ذرات طلا را پوشش‌دار کرده‌اند دارای اندازه ای بین پنج تا ۱۵ نانومتر می باشند (Loo *et al.* 2006).

٤- ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی *(Cowpea mosaic virus (*CPMV

ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی عضو جنس *Comovirus* وخانواده *Secoviridae*است. همچنین این ویروس به دلیل وجود شباهت در ساختار، سازمان ژنوم و استراتژی تکثیر با ویروس پیکورنای حیوانات(Picorna viruses) به عنوان ویروس پیکورنای گیاهی، شناخته شده است (Lin and Johnson 2003). ساختار CPMV در سطح نزدیک به اتمی بررسی شده است.

شکل ۳- تصویر بازسازی شده میکروسکوپی از کپسید ویروس لکه کلروتیک لوبیا چشم‌بلبلی که به فرم غیرمتورم در شرایط اسیدیته پایین(سمت چپ)و به فرم متورم باز در شرایط اسیدیته بالا(سمت راست). کپی شده با اجازه از (Douglas and Young 1998).

Figure 3. Reconstructed microscopic images for capsid of *cowpea chlorotic mottle virus* in normal and swollen forms in low (left image) and high (right panel) pH, respectively. Reprinted with permission from (Douglas and Young 1998).

ویریون‌ها تقارن ۲۰ وجهی دارند و قطر ذرات ۲۸ نانومتر می‌باشد. این ویروس در لوبیاچشم‌بلبلی ایجاد بیماری می کند، که به راحتی می‌توان آن را به میزان ۰/۸ الی یک میلی گرم به ازای هر گرم از برگ گیاه خالص سازی کرد (Porta *et al.* 2003). ژنوم ویروس دوبخشی است که هر بخش یک RNA تک رشتهٔ مثبت را پوشش‌دار کرده است. این ویروس در طیف گسترده‌ای از دما، pH، و بافر پایدار است که این قالب را برای روش‌های مختلف اتصال زیستی و کاربردهای نانوفناوری ایده‌آل می‌سازد (Wang *et al.* 2002).

جدول ۱- خلاصه ای از مشخصات ویروس‌های گیاهی مورد استفاده در نانوبیوتکنولوژی نشان می‌دهد.

Table 1. A brief description of some plant viruses used in nanotechnology

نام ویروس	ساختار ژنوم	ساختار اتمی	تولید VNP / VLP	کاربرد در بیونانوتکنولوژی
Tobacco mosaic virus	ssRNA	میله‌ای شکل ۲۱۳۰زیر واحد پروتئینی یکسان		نانومیله- نانوسیم دستگاه‌های الکترونیکی نانو قالب کانی‌سازی
Cowpea chlorotic mottle virus	ssRNA سه جزئی	تقارن ۲۰ وجهی قطر۲۸ نانومتر کپسید متشکل از۱۸۰زیر واحد پروتئین پوششی یکسان	میزبان طبیعی سیستم بیان هترولوگ مخمر *Pichia pastoris* خودمونتاژی گیاهان	تولید ذرات پارامغناطیس عکسبرداری بازآوایی مغناطیسی محل اتصال رنگ های فلورسنت
Brome mosaic virus	ssRNA	تقارن ۲۰ وجهی قطر ۲۸ نانومتر کپسید متشکل از۱۸۰زیر واحد پروتئین پوششی یکسان	سیستم بیان هترولوگ *Saccharomyces cerevisiae*	نانوذرات طلا نقاط کوانتومی روشن
clover Red necrotic mosaic virus	ssRNA دو بخشی	تقارن ۲۰ وجهی قطر حدود ۳٦ نانومتر	خودمونتاژی	نانوذرات طلا
Cowpea mosaic virus	ssRNA دو بخشی	تقارن ۲۰ وجهی قطر ۲۸ نانومتر پایدار در طیف گسترده ای از دما، pH و بافر	میزبان طبیعی	دستگاه های نانو نانوذرات طلا ساختارهای دو و سه بعدی

سطح خارجی این ویروس به طور گسترده به عنوان داربستی جهت سنتز مواد استفاده می‌شود. با تغییرات در محل سیستئین سطح کپسید می‌توان دستگاه‌های نانو مانند حسگرها و یا مدارهای الکترونیک را روی آن طراحی کرد. سیستئین و یا هیستیدین موجود در سطح کپسید ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی می‌تواند زنجیره S-Au و یا ترکیب Ni-nitrilotriacetic acid را ایجاد کند که برای اتصال نانوذرات به محل‌های خاص مناسب می‌باشند (Chatterji *et al.* 2005). همچنین ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی تغییر یافته به عنوان بلوک‌های ساختمانی مولکولی برای ساختارهای جهت‌دار سه بعدی و دو بعدی استفاده شده‌اند که ما را به سمت استفاده کاربردی از نانوابزار سوق می‌دهند (Young et al. 2008).

استفاده از نانوذرات ویروسی در پزشکی

از مهمترین کاربردهای نانوذرات ویروسی استفاده آن در زمینه نانوپزشکی می‌باشد. نانوپزشکی به استفاده پزشکی از نانوتکنولوژی، به ویژه توسعهٔ نانومواد جدیدی که می‌تواند برای تشخیص و درمان بیماری موثر باشد، گفته می‌شود. بنابراین ویروس‌ها می‌توانند به صورت ایده‌آلی جهت حمل داروهای مختلف به نقطهٔ هدف و یا مواد تصویربرداری از بافت خاص مورد استفاده قرار گیرند (Yildiz *et al.* 2011).

از مزایای استفاده از نانوذرات در درمان هدف‌گیری دقیق نقطه اثر دارو، رها شدن دقیق و کنترل شده دارو، افزایش قابلیت حل شدن داروها، کاهش عوارض جانبی و سمیت دارویی، جذب بهتر دارو، افزایش هدف‌گیری اختصاصی بافت‌ها، طولانی بودن مدت زمان تاثیرداروها، کاهش

دفعات تجویز دارو، کاهش سمیت دارویی به دلیل نیاز کمتر به مصرف دارو و کاهش هزینه‌های درمانی می باشد (Douglas and Young 2006)

درمیان نانوذرات کاربردی در علم پزشکی، نانوذرات زیستی نسبت به نانوذرات شیمیایی از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. در این میان نانوذرات مشتق شده از گیاهان احتمال بیماری‌زایی کمتری برای انسان داشته، عوارض جانبی آن‌ها نسبت به نانوذرات مشتق شده از حیوانات کمتر است. از مزایای استفاده از نانوذرات ویروسی به جای نانوذرات شیمیایی در پزشکی و درمان، امکان اتصال مولکول‌ها با دقت بالا و مقیاس کم با پروتئین کپسید این ذرات است. استفاده از نانوذرات ویروسی میله-ای شکل به دلیل دارا بودن سطح محیطی بیشترنسبت به ذرات چندوجهی و همچنین ظرفیت بالا برای جایگاه اتصال از توجه ویژه‌ای برخوردار بوده و بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. در این دسته از ویروس‌ها به علت شکل ظاهری و مسطح پیکره ویروسی، پیوندها به روش موثرتری صورت می‌گیرد ودر نتیجه حساسیت اتصال اختصاصی بیشتر می‌شود (Singh *et al.* 2006).

۱- تولید واکسن بر پایهٔ نانوذرات ویروسی

ویروس‌ها منبع خوبی را برای تهیه واکسن‌های جدید فراهم کرده‌اند. آن‌ها به دلیل داشتن ساختار پروتئینی تکرارشونده، طبیعت ذره‌ای و الگوی مولکولی مرتبط با بیمارگر (PAMPs)، ایمن‌زایی را افزایش می‌دهند. چندین واکسن برای بیماری‌های عفونی پستانداران بر پایه ذرات شبه ویروسی موجود و در حال حاضر نیز در کلینیک‌ها استفاده می‌شود. برای مثال نانوذرات ویروسی در تهیه واکسنهای هپاتیت بی و آنفلوانزا بکار رفته اند (Peek *et al.* 2008). همینطور کارهای مشابه در رابطه با پیشگیری از سرطان نیز در حال توسعه است (McKee 2013). استفاده از سیستم انتقال ژن ابتدا با ناقل‌های ویروسی انسانی شناخته شد ولی امروزه به دلیل بی خطر بودن باکتریوفاژها و ویروس‌های گیاهی نانوذرات ویروسی و شبه ویروسی مورد توجه قرار گرفته است. این ادعا با ارزیابی سمیت احتمالی نانوذرات CPMV، CCMV، Qb و M13 در موش و در نتیجه عدم ایجاد سمیت، تایید شده است (Yildiz *et al.* 2011).

سه استراتژی اصلی جهت تهیه واکسن با استفاده از نانوذرات ویروسی به کار گرفته شده است که عبارتند از، ۱)نانوذرات ویروسی که توسط مواد شیمیایی غیر عفونی شده‌اند.۲) نانوذرات شبه ویروسی فاقد ژنوم و غیرعفونی که در سیستم بیان هترولوگ تولید شده‌اند. ۳) نانوذرات شبه ویروسی نوترکیب که توسط مهندسی ژنتیک ساخته شده‌اند. در دو نوع اول ساختار ویروس اصلی شکل می گیرد اما در نوع سوم فقط پپتیدهای ایمونوژنیک ویروس بیماریزا به سطح خارجی ویروس گیاهی اتصال داده می شود (Plummer and Manchester 2011). اگرچه ایجاد ایمنی در میزبان، پایه و اساس کاربرد واکسن است، اما این امر روی نانومواد به کاربرده شده در عکس‌برداری و داروها اثر منفی می‌گذارد. بنابراین تلاش‌هایی جهت محافظت از نانوذرات در برابر سیستم ایمنی بدن صورت گرفته است. از مهمترین اقدامات صورت گرفته در این راستا، اتصال زنجیره پلی اتیلن گلیکول (Polyethylene glycol) به سطح خارجی نانوذرات می‌باشد که باعث کاهش اثرمتقابل اختصاصی و ایمنی در برابر این نانوذرات می‌شود (Steinmetz and Manchester 2009).

۲- تحویل هدفمند دارو

نانوذرات هدفمند شده برای روش‌های تشخیص و درمان بسیار مناسب می‌باشند. آن‌ها با ارسال دقیق دارو به نقطهٔ اثر، تاثیر داروها را افزایش و اثرات جانبی و مضر را کاهش می‌دهند. در چند سال گذشته، چندین فرمولاسیون از نانوذرات ویروسی هدفمند شده برای سلول‌های سرطانی مهندسی شده است. به طور مثال می‌توان به استفاده از CPMV، HCSRV وRCNMV در این زمینه اشاره کرد (Ruoslahti *et al.* 2010). از ذرات ویروس موزاییک لوبیاچشم بلبلی همراه شده با لیگاندهای پپتید

برای هدف قرار دادن تومور در داخل بدن در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است. این کار با مهندسی ذرات ویروسی که پپتید F56 در سطحشان قرار گرفته انجام شده است. این پپتید به طور اختصاصی به گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR-1) متصل می‌شود. فرمولاسیون این ویروس قادر به عبور از لایهٔ اندوتلیال بوده و در داخل تومور متمرکز می‌شود (Brunel *et al.* 2010).

از فرمولاسیون ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی که با رنگ فروسرخ و پپتیدهای بومبسین (Bombesin) به صورت کووالانسی اصلاح شده نیز برای هدف قرار دادن گیرنده‌های پپتید گاسترین آزاد که در سلول‌های سرطان پروستات افزایش بیان دارند، استفاده می‌شود (Steinmetz *et al.* 2011). این تحقیقات نشان می‌دهد که نانوذرات ویروسی بافت‌های بیمار را به صورت موثر و دقیقی هدف‌گیری می‌کنند و راه را برای توسعهٔ عکس‌برداری از بافت های خاص و دارورسانی اختصاصی فراهم می‌کنند.

۳- نانوذرات ویروسی درمانی و حامل‌های ارسال ژن

نقش طبیعی ویروس‌ها در انتقال اسیدهای نوکلئیک به سلول‌ها، آن‌ها را به عنوان ناقلین ژن درمانی مناسبی تبدیل کرده است. بدین منظور چندین ویروس جانوری در مطالعات بالینی بررسی شده است که به دلیل خطرات ایمنی، تمایل به استفاده از ویروس‌های گیاهی در مقایسه با آن‌ها رو به افزایش است (Yildiz *et al.* 2011). داروهایی مانند دوکسوروبیسین (Doxorubicin)، پاکلیتاکسل (Paclitaxel)، هیگرومایسین و سایر سیتوتوکسین‌ها که داروهایی ضدسرطانی بوده و با مهار فاکتور رشد از تقسیم سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند، با فرمولاسیون‌های هدفمند شده RCNMV، HCRSV، MS2 و M13 بارگیری شده‌اند. در همه موارد سلول‌های سرطانی تیمار شده به طور اختصاصی کشته شده‌اند (Acosta-Ramírez *et al.* 2008).

٤- نانوذرات ویروسی در تصویربرداری

نانوذرات ویروسی می‌توانند از طریق پیوند کوالانسی به مواد عکس‌برداری مختلفی متصل شوند، و در عکس-برداری‌های پزشکی به کار روند. به عنوان مثال، حسگر فلورسنت تهیه شده با ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی امکان تصویربرداری از رگ‌ها و جریان خون موش زنده و جنین جوجه تا عمق ۵۰۰ میلی متر به مدت ۷۲ ساعت را می‌دهد (Lewis *et al.* 2006). حسگرهای ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی به طور اختصاصی به سلول‌های اندوتلیال به دلیل وجود ویمنتین (Vimentin) در سطح این سلول‌ها متصل می‌شود و باعث افزایش جذب اندوتلیوم تومور می‌شود (Koudelka *et al.* 2009). از این ویژگی خاص CPMV جهت عکس‌برداری عروقی تومور استفاده می‌کنند (Leong *et al.* 2010). توانایی عکس‌برداری از تومور و سلول‌های سرطانی در مطالعات نشان می‌دهد که این نانوذرات می‌توانند با انواع لایه‌های سلول‌های سرطانی انسان تعامل داشته باشند و در شرایط محیطی بر روی تومورها مستقر شوند (SteinmetzCho *et al.* 2011).

همچنین نانوذرات ویروسی در تکنیک‌های عکس‌برداری پیش رفته از قبیل MRI و برش‌نگاری (Pet scan) به کار برده شده‌اند. مواد هم‌سنجی MRI از ذرات ویروسی از قبیل CPMV، CCMV و MS2 متصل به گادولینیوم تشکیل شده است (Datta *et al.* 2008). در این دستاورد مفید، سطح وسیع نانوذرات بسته به تعداد زیر واحد پروتئینی و تعداد سایت‌های باند شونده در هر زیر واحد، بارگذاری صدها یون گادولینیوم را امکان پذیر می‌سازد.

جمع بندی نهایی

فناوری نانو اصطلاحی کلی برای طیف گسترده‌ای از فناوری‌های نسبتا تازه و نو است. ویروس‌های گیاهی ابزارهای ارزشمندی هستند که به بیونانوتکنولوژی امکان سنتز مواد جدید، حسگرها و دستگاه‌ها را در مقیاس نانو

داده، در برنامه‌های کاربردی پزشکی، از تصویربرداری تا تحویل داروها مورد استفاده قرار می‌گیرند. ویروس‌های گیاهی مختلفی در این راستا مورد مطالعه قرار گرفته، براساس ساختار و عملکردشان، کاربردهای گوناگونی داشته اند. مهمترین موفقیت استفاده از نانوذرات ویروسی در علم نانوپزشکی و درمان بیماری‌ها می‌باشد.

امروزه داروهای فراوانی بر پایهٔ نانوذرات ویروسی تولید و به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور کلی می‌توان گفت حوزه نوین علم بیونانوتکنولوژی به سرعت در حال پیشرفت بوده و علمی میان رشته‌ای است که شامل همکاری میان ویروس‌شناسان، شیمی‌دانان، فیزیک‌دانان، دانشمندان علوم مواد و پزشکان می‌باشد.

منابع

Acosta-Ramírez E, Pérez-Flores R, Majeau N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Ramírez-Saldaña M, Manjarrez-Orduño N, Cervantes-Barragán L, Santos-Argumedo L, Flores-Romo L. 2008. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. Immunology 124: 186-197.

Allen M, Bulte JW, Liepold L, Basu G, Zywicke HA, Frank JA, Young M, Douglas T. 2005. Paramagnetic viral nanoparticles as potential high-relaxivity magnetic resonance contrast agents. Magnetic Resonance in Medicine 54: 807-812.

Brumfield S, Willits D ,Tang L, Johnson JE, Douglas T, Young M. 2004. Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. Journal of General Virology. 85: 1049-1053

Brunel FM, Lewis JD, Destito G, Steinmetz NF, Manchester M, Stuhlmann H, Dawson PE. 2010. Hydrazone ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting. Nano Letters 10: 1093-1097.

Chatterji A ,Ochoa WF, Ueno T, Lin T, Johnson JE. 2005. A virus-based nanoblock with tunable electrostatic properties. Nano letters 5: 597-602.

Chen C, Daniel M-C, Quinkert ZT, De M, Stein B, Bowman VD, Chipman PR, Rotello VM, Kao CC, Dragnea B. 2006. Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. Nano letters 6: 611-615

Comellas-Aragonès M, Engelkamp H, Claessen VI, Sommerdijk NAJM, Rowan AE, Christianen PCM, Maan JC, Verduin BJM, Cornelissen JJLM, Nolte RJM. 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. Nature Nanotechnology 2: 635 – 639.

Cuillel M, Zulauf M, Jacrot B. 1983. Self-assembly of brome mosaic virus protein into capsids: Initial and final states of aggregation. Journal of Molecular Bbiology 164: 589-603.

Datta A, Hooker JM, Botta M, Francis MB, Aime S, Raymond KN. 2008. High Relaxivity Gadolinium Hydroxypyridonate-Viral Capsid Conjugates: Nanosized MRI Contrast Agents1. Journal of the American Chemical Society 130: 2546-2552.

Douglas T, Young M. 1998. Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. Nature 393: 152-155.

Douglas T, Young M. 1999. Virus particles as templates for materials synthesis. Advanced Materials 11: 679-681.

Douglas T, Young M. 2006. Viruses: making friends with old foes. Science 312: 873-875.

Eini O, Behjatnia SAA. 2016. The minimal sequence essential for replication and movement of Cotton leaf curl Multan betasatellite DNA by a helper virus in plant cells. Virus Genes 52: 679-689.

Eini O, Dogra S, Selth LA, Dry IB, Randles JW, Rezaian MA. 2009. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA β satellite. Molecular Plant-Microbe Interactions 22: 737-746.

García JA, Pallás V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. Current Opinion in Virology 11: 21-30.

Gerasopoulos K, McCarthy M, Royston E, Culver JN, Ghodssi R. (2008). Nanostructured

nickel electrodes using the Tobacco mosaic virus for microbattery applications. Journal of Micromechanics and Microengineering 18: 104003-104012.

McKee S. 2013. RHDV VLP Mediated Delivery of α-Galactosylceramide for Immunotherapy (Doctoral dissertation, University of Otago).

Gillitzer E, Willits D, Young M, Douglas T. 2002. Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. Chemical Communications 20: 2390-2391.

Grasso S, Lico C, Imperatori F, Santi L. 2013. A plant derived multifunctional tool for nanobiotechnology based on Tomato bushy stunt virus. Transgenic Research 22: 519-535.

Hambly E, Suttle CA. 2005. The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. Current Opinion in Microbiology 8: 444-450.

Hassani-Mehraban A, Creutzburg S, Heereveld LV, Kormelink R. 2015. Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. BMC Biotechnology 15: 80-97.

Kaiser CR, Flenniken ML, Gillitzer E, Harmsen AL, Harmsen AG, Jutila MA, Douglas T, Young MJ. 2007. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. International Journal of Nanomedicine 2: 715.

Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. Crop Protection 35: 64-70.

Klug A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 354: 531-535.

Knez M, Sumser M, Bittner A, Wege C, Jeske H, Hoffmann D, Kuhnke K, Kern K. 2004. Binding the tobacco mosaic virus to inorganic surfaces. Langmuir 20: 441-447.

Koudelka KJ, Destito G, Plummer EM, Trauger SA, Siuzdak G, Manchester M. 2009. Endothelial targeting of *cowpea mosaic virus* (CPMV) via surface vimentin. Plos Pathogens 5: e1000417.

Leong HS, Steinmetz NF, Ablack A, Destito G, Zijlstra A, Stuhlmann H, Manchester M, Lewis JD. 2010. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. Nature Protocols 5: 1406 - 1417

Lewis JD, Destito G, Zijlstra A, Gonzalez MJ, Quigley JP, Manchester M, Stuhlmann H. 2006. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. Nature Medicine 12: 354-360.

Liepold L, Anderson S, Willits D, Oltrogge L, Frank J A, Douglas T, Young M. 2007. Viral capsids as MRI contrast agents. Magnetic Resonance in Medicine 58: 871-879.

Lin T, Johnson JE. 2003. Structures of picorna-like plant viruses: implications and applications. Advances in Virus Research 62: 167-239.

Loo L, Guenther RH, Basnayake VR, Lommel SA, Franzen S. 2006. Controlled encapsidation of gold nanoparticles by a viral protein shell. Journal of the American Chemical Society 128: 4502-4503.

Nicaise V. 2014. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Frontiers in Plant Science 5: 1-18.

Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. 2008. Nanotechnology in vaccine delivery. Advances in Drug Delivery Review 60:915-928.

Plummer EM, Manchester M. 2011. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 3: 174-196.

Porta C, Spall VE, Findlay KC ,Gergerich RC, Farrance CE, Lomonossoff GP. 2003. Cowpea mosaic virus-based chimaeras: effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. Virology 310: 50-63.

Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. 201 .٠ Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. The Journal of Cell Biology 188: 759-768.

Schlick TL, Ding Z, Kovacs EW, Francis MB. 2005. Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. Journal of the American Chemical Society 127: 3718-3723.

Schneemann A, Young MJ. 2003. Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts. Advances in Protein Chemistry 64: 1-36.

Shenton W, Douglas T, Young M, Stubbs G, Mann S. 1999. Inorganic–organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. Advanced Materials 11: 253-256**.**

Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. 2006. Viruses and their uses in nanotechnology. Drug Development Research 67: 23–41.

Steinmetz NF, Ablack AL, Hickey JL, Ablack J, Manocha B, Mymryk JS, Luyt LG, Lewis JD. 2011. Intravital imaging of human prostate cancer using viral nanoparticles targeted to gastrin-releasing peptide receptors. Small 7: 1664-1672.

Steinmetz NF, Cho C-F, Ablack A, Lewis JD, Manchester M. 2011. Cowpea mosaic virus nanoparticles target surface vimentin on cancer cells. Nanomedicine 6: 351-364.

Steinmetz NF, Evans DJ. 2007. Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. Organic and Biomolecular Chemistry 5: 2891-2902.

Steinmetz NF, Manchester M. 2009. Pegylated viral nanoparticles for biomedicine: the impact of PEG chain length on VNP cell interactions in vitro and ex vivo. Biomacromolecules 10: 784-792.

Suci PA, Varpness Z, Gillitzer E, Douglas T, Young M. 2007. Targeting and photodynamic killing of a microbial pathogen using protein cage architectures functionalized with a photosensitizer. Langmuir 23: 12280-12286.

Tseng RJ, Tsai C, Ma L, Ouyang J, Ozkan CS, Yang Y. 2006. Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. Nature Nanotechnology 1: 72-77.

Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, Johnson JE, Finn M. 2002. Natural supramolecular building blocks: wild-type cowpea mosaic virus. Chemistry and Biology 9: 805–811.

Yi H, Nisar S, Lee S-Y, Powers M A, Bentley W E, Payne G F, Ghodssi R, Rubloff G W, Harris M T, Culver J N. 2005. Patterned assembly of genetically modified viral nanotemplates via nucleic acid hybridization. Nano Letters 5: 1931-1936**.**

Yildiz I, Shukla S, Steinmetz NF. 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. Current Opinion in Biotechnology 22: 901-908.

Young M, Debbie W, Uchida M, Douglas T. 2008. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. Annual Review of Phytopathology 46: 361-384.

Zhao X, Fox JM, Olson NH, Baker TS, Young MJ. 1995. In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in Escherichia coli and in vitro-transcribed viral cdna. Virology 20: 486-494.

Zhao X, Lin Y, Wang Q. 2015. Virus-based scaffolds for tissue engineering applications. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 7: 534-547.

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۲۳۴-۲۲۵

پیشرفت همزمان اصلاح سنتی و بیوتکنولوژی در جهت بهبود محصول چغندرقند

The simultaneous progress of conventional breeding and biotechnology for sugar beet improvement

پرویز فصاحت*[۱]، پیمان نوروزی[۲]

Parviz Fasahat*[1], Peyman Norouzi[2]

[۱و۲]به ترتیب استادیار و دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1. Assistant Professor and 2. Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱)

چکیده

چغندر قند یکی از مهم ترین محصولات کشاورزی است که در حال حاضر حدود ۲۰ درصد از قند مصرفی در سراسر جهان را تامین می کند. استفاده از روش های سنتی اصلاح چغندرقند موجب انتقال صفات مورد انتظار می شود؛ اما در عین حال مدت زمان زیادی برای شناسایی تلاقی های مطلوب صرف می شود. مهندسی ژنتیک (اصلاح دقیق) پیشرفته ترین روش اصلاح گیاهی است که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرد. در دو دهه اخیر از این روش در اصلاح چغندرقند برای مقاومت به آفات و بیماری ها، تنش های غیر زیستی و نیز تولید محصولات جانبی استفاده شده است. کاربرد این روش نه تنها باعث تسریع در برنامه های اصلاحی شده بلکه در مواردی، مانند کاربرد چغندرهای مقاوم به علف کش، سبب صرفه جویی در هزینه ها نیز شده است. در این مقاله سعی شده است که به پیشرفت های صورت گرفته در زمینه کاربرد مهندسی ژنتیک در بهبود محصول چغندرقند پرداخته شود.

واژه‌های کلیدی

چغندرقند
اصلاح
مهندسی ژنتیک

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) یک گیاه مهم صنعتی و یکی از تنها دو منبع گیاهی تامین کننده شکر به صورت اقتصادی است. در سال ۲۰۰۷، نیشکر و چغندرقند به ترتیب ۷۵ و ۲۵ درصد از کل شکر دنیا را تامین کردند (Joersbo, 2007). اگر چه چغندرقند با سابقه کاشت نزدیک به ۲۰۰ سال یک گیاه به طور نسبی جدید نسبت به گیاهان دیگر در نظر گرفته می شود اما دستخوش پیشرفت های قابل توجهی بوده است (Draycott, 2006). میزان شکر چغندر وحشی از ٤ تا ٦ درصد متغیر است، اما چغندرقند از داخل گیاهان چغندر علوفه ای که میزان شکر آن ۱۲ درصد است انتخاب شد. این میزان شکر در ارقام تجاری به حدود ۲۰ درصد افزایش یافته است و روش های اصلاح سنتی نقش ویژه ای در این پیشرفت داشته اند. با این حال، در طول دو دهه گذشته، روش های پیشرفته بیوتکنولوژی با روش های اصلاحی سنتی در جهت تولید ارقام مقاوم به علف کش، بیماری و آفت ترکیب شده اند. تنش‌های زیستی و غیرزیستی از عوامل مهم در کاهش عملکرد و تولید محصولات کشاورزی می‌باشند به طوری که حشرات آفت حدود ١٤ درصد کل محصولات کشاورزی در جهان را از بین می برند (Hilder and Boulter, 1999). آفات پروانه‌ای (Lepidoptera) از جمله آفات مهم هستند که در اغلب مزارع چغندر وجود داشته و خسارات زیادی وارد می‌کنند (Ivic-Haymes and Smigocki, 2005). به دلیل وضعیت بیولوژیکی خاص چغندرقند از جمله دو ساله بودن، آلوگامی و خود ناسازگاری، بهبود بسیاری از صفات آگرونومیکی از جمله مقاومت به آفات حشره‌ای به دلیل محدود بودن منابع مقاومت و تنوع ژنتیکی در چغندرقند، سیستم چند ژنی مقاومت به این صفت، سبب عدم موفقیت در بهبود آن از طریق اصلاح کلاسیک شده و یا بسیار مشکل است (Ivic-Haymes and Smigocki, 2005). استفاده از روش های نوین مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به حشرات زیان‌آور در چغندرقند می‌تواند به عنوان راهکاری برای حل این مشکل مورد بررسی قرار گیرد. ژن های مختلفی برای ایجاد گیاهان چغندرقند مقاوم به آفات و امراض شامل ژن ALS برای مقاومت به علف‌کش کلروسولفورون (D'Halluin et al., 1992)، ژن *bar* برای مقاومت به علف‌کش گلوفسینات آمونیوم (D'Halluin et al., 1992; Kishchenko et al., 2005) و ژن‌های CP4 EPSPS و GOX جهت مقاومت به علف کش گلایفوسیت (Mannerlof et al., 1997)، ژن‌های رمزکننده اسموتین، پلی‌پپتید سکروپین تغییریافته MB39 و پلی‌پپتید آلفا تیونین برگ جو (Snyder et al. 1999)، ژن سازنده سیتوکینین باکتریایی موسوم به ipt که باعث مرگ و یا اختلال در رشد و تولید مثل مگس ریشه چغندرقند (root maggot) می‌گردد (Ivic et al. 2001)، بازدارنده‌های پروتئینازی (Proteinase inhibitors) که دارای اثر مهارکنندگی بر روی پروتئازهای مگس ریشه چغندر (Wilhite et al. 2000) می باشند، ژن پروتئین پوششی (Coat protein) ویروس ریزومانیا (Mannerlof et al. 1996) و ژن dsRNA ویروسی (Lennefors et al. 2006) برای ایجاد مقاومت به بیماری ریزومانیا به چغندرقند منتقل شده اند.

تولید دابل هاپلوئید از طریق کشت تخمک (Hosemans and Bossoutrot, 1983; Hansen et al., 1994; Gurel et al., 2000) و تولید پروتوپلاست های با خاصیت باززایی زیاد از سلول های محافظ نیز امکان پذیر شده است. با این حال، دستورالعمل های باززایی به طور معمول به تولید بسیار کم نمونه ها منجر می شود. همچنین تنوع بالای ژنتیکی که در درجه اول بدلیل ماهیت هتروزیگوسیتی بالای چغندرقند در اثر دگرگشنی است یک مشکل جدی برای باززایی مجدد (Gurel et al., 2001; Gurel et al., 2003) و تلاش های اصلاحی (Zakharchenko et al., 2000; Hisano et al., 2004) است. برای عمل انتقال ژن، از هر دو روش بر مبنای ناقل به عنوان مثال *Agrobacterium tumefaciens* و *A.*

rhizogenes و روش مستقیم به عنوان مثال بمباران ذره ای (تفنگ ژنی) پلی اتیلن گلیکول، الکتروپوریشن، فراصوت و هیبریداسیون سوماتیکی استفاده شده است. سلول های سالم و دست نخورده، عمدتاً برگ، لپه و بافت های پایه ساقه های رشد کرده در شرایط آزمایشگاهی مواد مطلوب برای روش های انتقال ژن به کمک آگروباکتری و تفنگ ژنی هستند (Gurel *et al.*, 2008). پروتوپلاست به دست آمده از مزوفیل یا سلول های محافظ روزنه به نظر می رسد که موثرترین بافت برای روش انتقال ژن به کمک ترکیب پلی اتیلن گلیکول است. با وجود توسعه استراتژی های جدید انتخاب، به مانند استفاده از ژن های انتخاب گر مانوز، کارایی این روش ها در مورد چغندرقند به طور نسبی پایین بوده و منجر به تعداد گیاهان تغییریافته ژنتیکی کمتری نسبت به دیگر گونه های دولپه مهم صنعتی می شود (Gurel *et al.*, 2008). در ادامه به پیشرفت های صورت گرفته در زمینه مهندسی ژنتیک مهمترین صفات پرداخته می شود.

مقاومت به علف کش

گیاه چغندرقند رقابت ضعیفی با علف های هرز، به ویژه در مراحل ابتدایی نمو، دارد و در نتیجه کاهش عملکرد آن به طور چشمگیری، در صورت عدم کنترل علف هرز، از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر است (May and Wilson, 2006). برای کاهش این تلفات، اقدامات مرسوم کنترل شامل سمپاشی علف کش در زمان و فواصل مختلف است که برنامه های کنترل علف های هرز را پیچیده و دشوار می سازد. بنابراین، توسعه چغندرقند تراریخته متحمل به علف کش یک جایگزین مهم است. تحمل به علف کش یکی از اولین صفاتی است که با موفقیت توسط مهندسی ژنتیک به چند گونه زراعی معرفی شده است؛ برخی از ارقام مقاوم به علف کش برای بیش از یک دهه است که وارد بازار شده اند (James, 2007). چغندرقندهای متحمل به علف کش هایی مانند گلایفوسیت، گلوفوسینات، ایمیدازولینون، کلرسولفورون و سولفونیل اوره از طریق انتقال به کمک آگروباکتریوم و انتخاب سلول های درون شیشه بدست آمده اند. استراتژی اولیه برای تولید ژنوتیپ متحمل به علفکش گلایفوسیت ، ایجاد تغییر در ژن های باکتریایی 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4- EPSPS) (Fry *et al.*, 1991) و یا گلایفوسیت اکسیدوردوکتاز بود. تحمل به گلوفوسینات با انتقال ژن های رمز کننده آنزیم های دخیل در سم زدایی فسفینوتریسین که ماده فعال گلوفوسینات بوده و مانع از سنتز گلوتامین می شود، امکان پذیر شد.

تولید چغندرقند مقاوم به ویروس

در میان بیماری های اصلی ویروسی چغندرقند، ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV)، ویروس زردی غربی چغندر (BWYV) و ویروس زردی چغندر (BYV) از مهمترین بیماری ها می باشند. از این تعداد، ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر در خاک توسط قارچ *Polymyxa betae* Keskin به طور گسترده ای توزیع شده و باعث بیماری مخرب ریزومانیا می شود که مشخصه آن گسترش انبوه ریشه چه های جانبی بر روی ریشه اصلی و اندازه کوتاه ریشه است. این وضعیت سبب کاهش عملکرد ریشه، عیار قند و کیفیت شربت شده، که در ارقام حساس می تواند به ۸۰ درصد برسد (Stevens *et al.*, 2006). واریته های مقاوم به ریزومانیا از طریق روش های معمول اصلاحی با استفاده از ژن های مقاوم به بیماری در چغندرقند و گونه وحشی نزدیک به آن مانند *Beta maritima* بدست آمدند (Mesbah *et al.*, 2007; Panella and Lewellen, 2007; Shahbazi *et al.*, 2015). تولید چغندرقند مقاوم به بیماری ریزومانیا از طریق تبدیل ژن پروتئین پوششی ویروس (Kallerhoff *et al.*, 1990; Ehlers *et al.*, 1991; Mannerlof *et al.*, 1996) و یا نسخه جهش یافته از پروتئین های خاصی که در انتقال سلول به سلول ویروس دخیل اند، امکان پذیر گردید. در سال گذشته، زارع و همکاران (Zare *et al.*, 2015)، توانایی ساختارهای مختلف سنجاق سری حامل توالی های منطقه بالادست RNA 2 یا توالی همپوشان رمزکننده پوشش پروتئینی p21 CP ویروس در اعطای مقاومت با

مکانیزم خاموشی RNA بر علیه ریزومانیا را بررسی کردند. نتایج نشان دهنده تولید مقاومت موثر در برابر ریزومانیا در ارتباط با انتقال ژن بود.

مقاومت به نماتد

نماتد *Heterodera schachtii* به عنوان مخرب ترین نماتد خاک زاد چغندرقند (Panella and Lewellen, 2007) برای بیش از یک قرن به طور گسترده مطالعه شده است (Dewar and Cooke, 2006). نماتد چغندرقند بر روی ریشه توسعه یافته و ساختارهای تغذیه ای بسیار تخصص یافته را درون سیستم آوندی فعال می سازد که باعث کاهش قابل توجه محصول می شود. از نماتدکش ها برای کنترل آن استفاده می شود، اما این مواد شیمیایی به علت سمیت زیست محیطی خود در بسیاری از کشورها ممنوع شده اند (Jung *et al*., 1998). در کنار استفاده از نماتدکش ها، تولید کنندگان از واریته های مقاوم چغندرقند و تناوب با گیاهان مقاوم تر (Dewar & Cooke, 2006) و یا گیاهان تله برای کاهش جمعیت نماتد در خاک استفاده کرده اند (Lathouwers *et al*., 2005). با این حال، تخم نماتد می تواند برای سالیان متمادی در شرایط نامطلوب زنده بماند. مقاومت کافی در برابر نماتد در چغندرقند وجود ندارد، اما مقاومت کامل در بخش پروکامبنتس جنس بتا یعنی *B. procumbens*، *B. patellaris*، و *B. webbiana* یافت شده است (Jung and Loptien, 1986; Paul *et al*., 1990; Heller *et al*., 1996; Sandal *et al*., 1997; Jung, 1998; Kleine *et al*., 1998). با این حال، این گونه ها در خارج از ذخیره ژنی اولیه چغندرقند قرار داشته و انتقال ژن به چغندرقند نیازمند انتقال از طریق یک قطعه کروموزومی حامل ژن مقاومت است (Panella and Lewellen, 2007). تولید چغندرقند مقاوم در برابر حمله نماتد از طریق همسانه سازی ژن $Hs1^{pro-1}$ که متعلق به یکی از گونه های چغندرقند وحشی (*Beta procumbens*) است و انتقال ژن بوسیله *A. rhizogenes* انجام شد (Kifle *et al*., 1999). مقاومت ۱۰۰ درصد در سطح ریشه های مویین بدست آمد. البته انتقال این ژن به گیاه کامل گزارش نشده است.

مقاومت به قارچ

سرکوسپورا بتیکولا (*Cercospora beticola*)، ریزوکتونیا سولانی، و اریزیف بتا از مهم ترین قارچ های بیماری زا در چغندرقند بوده که سبب کاهش قابل توجهی در عملکرد و کیفیت محصول می شوند (Asher and Hanson, 2006). کنترل در حال حاضر با استفاده از روش های تلفیقی مانند تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و قارچ کش انجام می شود. در میان استراتژی های ممکن بیوتکنولوژی، راه کار معرفی ژن رمز کننده پروتئین های ضد قارچ توصیه شده است. تلاش هایی در زمینه تولید چغندرقند مقاوم به قارچ ها صورت پذیرفته و نتایج امیدوار کننده ای بدست آمده است. کیتیناز های مختلف که ترکیبات سلول های دیواره قارچ های رشته ای را از بین می برند از برگ چغندرقند آلوده به *C. beticola* جدا شده و برای فعالیت ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی آزمون شد (Nielsen *et al*., 1994) که سطوح مهمی از تخریب سلول های هیدرولیتیک مشاهده شد. گودرزی و همکاران (Goudarzi *et al*., 2012) موفق به انتقال ژن کیتیناز لوبیا به کمک روش آگروباکتریوم به دو رقم دیپلوئید چغندرقند تحت نام های SBSI-2 و SBSI-4 شدند. این گیاهان اکنون در مرحله تکثیر در نسل T2 می باشند. پروتئین غنی از سیستئین ضد قارچ که از برگ چغندرقند آلوده بدست آمد نیز دارای اثرهای محافظتی در برابر قارچ است (Kragh *et al*., 1995). تلاش هایی در زمینه بهره برداری از منابع جدید مقاومت به قارچ در ژرم پلاسم چغندرقند با استفاده از نشانگرهای مولکولی (Francis and Asher, 2000) و به منظور تولید چغندرقند مقاوم در برابر *C. beticola* با معرفی ژن *cfp* صورت گرفت (Kuykendall *et al*., 2003; Kuykendall and Upchurch, 2004). به منظور افزایش مقاومت به قارچ *R. solani*، یک ژن کیتیناز از کدو تنبل به چغندرقند انتقال

یافت که سبب افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز و سرکوب علائم بیماری در برخی از گیاهان تراریخته گردید (Hashimoto and Shimamoto, 2001). در مطالعه ای دیگر، گودرزی و همکاران (Goudarzi *et al*., 2015)، ژن باکتریایی مانیتول ۱- فسفات دهیدروژناز (*mtlD*) تحت کنترل پیشبر rd29A آرابیدوپسیس القایی با تنش را به چغندرقند وارد و مقاومت لاین های چغندرقند تراریخته حامل ژن *mtlD* را در برابر قارچ های *Alternaria alternata*، *Botrytis cinerea* و *Cercospora beticola* بررسی کردند. تحت شرایط نرمال، لاین تراریخته mt-LS4-32 واکنش بهتری نسبت به *A. alternate* داشته و ظهور علائم قارچی به تاخیر افتاد. پس از مواجهه با دمای پائین (٤ درجه سانتی گراد)، لاین تراریخته بعد از ١٤ روز مایه زنی هیچ گونه علائم آلودگی را نشان نداد. همچنین لاین های تراریخته مایه زنی شده با *C. beticola* بطور معنی داری مقاومت بیشتری را نسبت به گیاهان غیرتراریخته نشان دادند.

مقاومت به حشرات

گیاهان تراریخته مقاوم در برابر حشرات در چندین گونه گیاهی از طریق معرفی ژن های رمزکننده ترکیبات سمی برای حشرات، از جمله کریستال های پروتئین حشره کش (ICPs) از باکتری *Bacillus thuringiensis* بدست آمده اند. چغندرقند با ژن ICP اصلاح شده است (Shimamoto and Domae, 1999; Kimoto and Shimamoto, 2000; Kimoto and Shimamoto, 2001). با استفاده از *A. tumefaciens* و و دو لاین اینبرد چغندرقند (NK150 و TK80)، گیاهان دارنده *cryIA*(*b*) (Shimamoto and Domae, 1999) یا *cryIC* (Kimoto and Shimamoto, 2000) شناسایی شده اند. تغذیه برگ های تراریخته توسط کرم برگ خوار کلم سبب بازدارندگی و یا تعویق رشد لاروها گردید. در برخی از گیاهان تراریخته، بیان *cryIC* سمیت بالاتری برای حشرات نسبت به *cryIA*(*b*) داشت (Kimoto and Shimamoto, 2001). جعفری و همکاران (Jafari *et al*., 2009) موفق به انتقال ژن *cry1Ab* به کمک آگروباکتریوم تومه‌فاسینس به دو رقم دیپلوئید ۷۲۳۳ و HM1990 شدند. نتایج آزمایش زیست سنجی، بیان ژن و مقاومت گیاهان تراریخته بر علیه کرم برگ خوار مصری (*Spodoptera littoralis* Bois) را نشان داد. صدیقی و همکاران (۱۳۸۸) کارایی ۲۱ لاین چغندرقند تراریخته حاوی ژن *Bt* در کنترل کرم برگ خوار مصری را به همراه یک لاین چغندرقند معمولی مورد بررسی قرار داد. نتایج حاکی از برتری چغندرهای تراریخته در کنترل آفت برگ خوار نسبت به تیمار شاهد بود. نوروزی و همکاران (Norouzi *et al*., 2009) به منظور بررسی وراثت ژن *Cry1Ab*، دو لاین چغندرقند تراریخته T موسوم به ۳-۷۲۳۳ و ۸-۷۲۳۳ را با یک سینگل کراس نرعقیم سیتوپلاسمی تلاقی دادند. تجزیه و تحلیل عملکردی در تعدادی از نتاج گیاهان تراریخته، مقاومت افزایش یافته این گیاهان در برابر آفت برگ خوار را نشان داد و تفاوت محسوسی بین گیاهان تراریخته و گیاهان غیرتراریخته از لحاظ مقاومت وجود داشت.

مقاومت به ساقه روی

در سال دوم رشد و به دنبال تیمار سرمایی در زمستان (بهاره سازی)، توسعه گل در چغندرقند با ساقه روی شروع می شود. اگر ساقه روی در سال اول رشد و به دلیل دمای پائین در بهار رخ دهد، کاهش قابل توجهی در عملکرد شکر رخ می دهد. ساقه روی همچنین باعث بروز خسارت در هنگام برداشت و استخراج قند می شود. مشکل ساقه روی مانع از کاشت زودهنگام در بهار می شود. کنترل ساقه روی توسط ژن های گلدهی، به خصوص آنهایی که مربوط به سنتز اسید جیبرلیک (GA) هستند صورت می گیرد. بر اساس مطالعات انجام شده در *A. thaliana* به نظر می رسد که مهار بیوسنتز اسید جیبرلیک از طریق مهندسی ژنتیک سبب تاخیر در ساقه روی در چغندرقند می شود (Van Roggen *et al*., 1997). تلاش های اولیه در این زمینه از طریق کاهش بیان GA1 و GA4 بوسیله بیان بالای GA20-اکسیداز کدو تنبل و یا با استفاده از سازه آنتی سنس برای GA20-

اکسیداز و β-GA3-هیدروکسیلاز (Van Roggen *et al.*, 1997) صورت گرفته است.

تحمل به خشکی

با توجه به پیامدهای گرمایش جهانی بر آب و هوا و پیش بینی های صورت پذیرفته در زمینه دسترسی به منابع محدود آب، توسعه محصولات مقاوم در برابر خشکسالی بسیار مهم است. اگر چه چغندرقند نسبت به بسیاری از گونه های زراعی دیگر به شرایط خشک مقاوم تر است، اما در صورت عدم وجود مقدار کافی آب، عملکرد آن کاهش می یابد (Rajabi *et al.*, 2008). گیاهان تراریخته مقاوم در برابر خشکسالی در چندین گونه از طریق افزایش محتوای سلولی osmolytes و osmoprotectants ایجاد شده اند. تحمل به خشکی در چغندرقند از طریق بیان ژن باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، *SacB* که رمز کننده fructans باکتریایی است به دست آمد (Pilon-Smits *et al.*, 1999). گیاهان تراریخته تحت تنش خشکی رشد بهتری داشته و مجموع وزن خشک بالاتری (۳۵-۲۵+ درصد) در مقایسه با چغندرهای غیرتراریخته داشتند.

تحمل به شوری

یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2005) از طریق معرفی ژن *AtNHX1* جدا شده از آرابیدوپسیس و رمزگذاری Na+/H+ antiport مورد هدف قرارگرفته به غشای واکوئلی، گیاهان چغندرقند تراریخته با مقاومت بهبود یافته نسبت به شوری به دست آوردند. همچنین، گیاهان چغندرقند متحمل به شوری از طریق انتخاب سلول در شرایط درون شیشه که سبب تنوع خود به خودی و یا ناشی از سوماکلونال بود به دست آمدند (Pua and Thorpe, 1986; Freytag *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2004).

سایر صفات

اقداماتی نیز در زمینه تولید چغندرقند های تولیدکننده فروکتان (به طور اصلی با تغییر سوخت و ساز کربوهیدرات)، بهبود عملکرد شکر و تولید پلاستیک انجام شده است (Sevenier *et al.*, 1998; Pilon-Smits *et al.*, 1999; Hashimoto and Shimamoto, 1999; Weyens *et al.*, 2004; Harms and Schulz, 2015; Rector, 2015).

جمع بندی نهایی

بیوتکنولوژی این قابلیت را دارد که صفات مفیدی را که در حال حاضر از طریق برنامه های اصلاح معمولی در دسترس نیستند به اصلاح گران معرفی کند. مهندسی ژنتیک چغندرقند می تواند سبب بهبود کارایی و انعطاف پذیری کنترل علف های هرز، افزایش مقاومت به بیماری ها و افزایش ظرفیت بیوسنتزی ریشه های چغندرقند جهت تولید ترکیبات دارای ارزش افزوده شود. فن آوری های ژنتیکی جدید، همراه با روش های سنتی اصلاح و پیشرفت های محتمل آینده در شناسایی ژن ها و عملکرد آنها می تواند به موفقیت های ویژه ای در زمینه تولید محصول چغندرقند پربارتر، متنوع تر، پایدارتر و با هزینه تولید مقرون به صرفه تر ختم شود. برای پی بردن به مزیت های مهندسی ژنتیک، روش های کارآمد برای کشت سلول نیازند و پیشرفت های چشمگیری در جهت بهبود روش های مورد نیاز انجام پذیرفته است. با این حال، محدودیت های مهمی در استفاده از برنامه های معمول تکثیر و اصلاح در شرایط آزمایشگاهی از قبیل وابستگی ژنوتیپی و تعداد کم باززایی وجود دارد. نشان داده شده است که استفاده از چغندرقند تراریخته مقاوم به علف کش برای انسان بی خطر بوده و اثرهای زیست محیطی آن را می توان از طریق انواع روش ها مانند حصر فیزیکی (رعایت فاصله ایزولاسیون بین مزارع تولید بذر چغندر تراریخت و کلاسیک)، آموزش زارعین به حذف گیاهان به ساقه رفته قبل از گلدهی در مزارع تولید ریشه، حذف چغندرهای وحشی یکساله در مزارع تولید بذر و در نهایت سم پاشی علف های هرز مقاوم شده با سایر

علف کش ها مدیریت کرد. با این حال، با وجود پیشرفت های انجام شده در این زمینه کشت تجاری واریته های چغندرقند تراریخته در تمامی کشورها در سطح وسیع انجام نمی پذیرد. به مثابه دیگر محصولات تراریخته، ملاحظات زیادی در مورد تجاری شدن واریته تراریخته چغندرقند از جمله ایمنی مواد غذایی، آسیب احتمالی به محیط زیست و پذیرش آن توسط صنعت و مصرف کننده وجود دارد. با افزایش فشار از سوی سازمان تجارت جهانی این وضعیت در حال تغییر است که نمونه بارز آن اجازه به کشت آزمایشی چغندر تراریخته در آلمان است (Gurel *et al.*, 2008). این علائم نشان دهنده تغییر وضعیت آینده کشت چغندرقند تراریخته است. در نهایت قبل از ورود فناوری چغندر تراریخته مقاوم به علفکش در سطح مزارع به صورت تجاری بایستی با مقایسه هزینه ها و فوائد این فناوری در مزارع آزمایشی و پایلوت، ذهن مردم و بویژه زارعین را برای پذیرش کشت چنین محصولی آماده ساخت.

منابع

Asher MJC, Hanson LE. (2006). Fungal and bacterial diseases. In: Draycott AP (Ed.) Sugar Beet, Blackwell, Oxford, 286–315.

Babaee B, Nourozi P. (2015). The possibility of bioethanol production from autumn sugar beet. *Journal of Sugar Beet*, 31(1),123-139.

Dewar AM, Cooke DA. (2006). Pests. In: Draycott AP (Ed.) Sugar Beet, Blackwell, Oxford, 316–358.

D'Halluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J. (1992). Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 10(3),309-314.

Draycott AP. (2006). Introduction. In: Draycott AP (Ed.) Sugar Beet, Oxford, Blackwell Publishing Ltd, UK, 1–8.

Ehlers U, Commandeur U, Frank R, Landsmann J, Koenig R, Burgermeister W. (1991). Cloning of the coat protein gene from Beet Necrotic Yellow Vein Virus and its expression in sugar-beet hairy roots. *Theoretical and Applied Genetics*, 81,777–782.

Francis SA, Asher MJC. (2000). Exploiting novel sources of disease resistance in *Beta* germplasm using molecular markers. *Journal of Sugar Beet Research*, 37,89–95.

Freytag AH, Wrather JA, Erichsen AW. (1990). Salt tolerant sugar beet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. *Plant Cell Reports*, 8,647–650.

Fry JE, Barnason AR, Hinchee M. (1991). Genotype-independent transformation of sugar beet using *Agrobacterium tumefaciens*. In: Proceedings of 3rd International Congress of the ISPMB. Tucson, Arizona, USA, 84.

Goudarzi A, Jafari M, Safaie N, Jafari SM. (2015). Transgenic sugar beet expressing a bacterial mannitol-1-phosphate dehydrogenase (mtlD) gene shows enhanced resistance to fungal pathogens. *Sugar Tech*, 1–12.

Goudarzi A, Safaie N, Jafari M, Mahmoudi SB. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using bean *chitinase* gene. In: Proceedings of 12th Iranian Genetics Congress, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract)

Gurel E, Gurel S, Lemaux PG. (2008). Biotechnology applications for sugar beet. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(2),108-140.

Gurel E, Topal E, Gurel S. (2003). The effect of pretreating seedlings with BAP on direct shoot regeneration from petiole explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17,89–96.

Gurel S, Gurel E, Kaya Z. (2001). Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. *Turkish Journal of Botany*, 25,25–33.

Gurel S, Gurel E, Kaya Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated

ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports*, 19,1155–1159.

Hansen AL, Plever C, Pedersen HC, Keimer B, Andersen SB. (1994). Efficient *in vitro* chromosome doubling during *Beta vulgaris* ovule culture. Plant Breeding, 112,89–95.

Harms K, Schulz B. (2015). Method for increasing sucrose yield in agricultural production of sugar beet and sugar cane. U.S. Patent 9,029,635, issued May 12, 2015.

Hashimoto R, Shimamoto Y. (1999). Growth of transgenic sugar beet plants with sucrose-phosphate synthase (SPS). *Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 41,85–89.

Hashimoto R, Shimamoto Y. (2001). Transgenic sugar beet plants harbouring a pumpkin chitinase gene demonstrating improved resistance to *Rhizoctonia solani. Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 43: 24–28.

Heller R, Schondelmaier J, Steinrucken G, Jung C. (1996). Genetic localization of four genes for nematode *(Heterodera schachtii* Schm.) resistance in sugar beet *(Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 991–997.

Hilder VA, Boulter D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*, 18,177–191.

Hisano H, Kimoto Y, Hayakawa H, Takeichi J, Domae T, Hashimoto R, Abe J, Asano S, Kanazawa A, Shimamoto Y. (2004). High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell Reports*, 22,910–918.

Hosemans D, Bossoutrot D. (1983). Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzuchtung*, 91,74–77.

Ivic S, Sicher R, Smigocki A. (2001). Growth habit and sugar accumulation in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) transformed with a cytokinin biosynthesis gene. *Plant Cell Reports*, 20(8),770-773.

Ivic-Haymes SD, Smigocki AC. (2005). Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41,483–488.

James C. (2007). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAA Brief, No: 37, Ithaca, New York.

Jafari M, Norouzi P, Malboobi MA, Ghareyazi B, Valizadeh M, Mohammadi SA. (2009). Transformation of *cry1Ab* gene to sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by Agrobacterium and development of resistant plants against *Spodoptera littoralis*. *Journal of sugar Beet*, 24(2),37-55. (In Farsi with English abstract)

Joersbo M. (2007). Sugar beet. In: Pua EC, Davey MR (Eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 59, Transgenic Crops IV, 355–379.

Jung C. (1998). Cloning and breeding utility of the gene *Hs1* for nematode resistance from *Beta procumbens*. In: Proceedings of IIRB Congress, 61,221–227.

Jung C, Loptien H. (1986). Breeding nematode-resistant sugar beets. In: Horn W, Jensen CJ, Odenbach W, & Schieder, O (Eds.) Genetic Manipulation in Plant Breeding, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 167–169.

Kallerhoff J, Perez P, Bouzoubaa S, Tahar SB, Perret J. (1990). Beet Necrotic Yellow Vein Virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Plant Cell Reports*, 9,224–228.

Kifle S, Shao M, Jung C, Cai DG. (1999). An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports*, 18,514–519.

Kimoto Y, Shimamoto Y. (2000). Resistance of transgenic sugarbeet with cryIC to larvae of cabbage armyworms. *Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 42,8–12.

Kimoto Y, Shimamoto Y. (2001). Differences in toxicity to larvae of cabbage armyworm between transgenic sugar beet lines with *crylA(b)* and *crylC*. *Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 43,20–23.

Kishchenko EM, Komarnitskii IK, Kuchuk NV. (2005). Production of transgenetic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin. *Cell biology international*, 29(1),15-19.

Kleine M, Voss H, Cai DG, Jung C. (1998). Evaluation of nematode resistant sugar beet *(Beta vulgaris* L) lines by molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 97,896–904.

Kragh KM, Nielsen JE, Nielsen KK, Dreboldt S, Mikkelsen JD. (1995). Characterization and

Panella L, Lewellen RT. (2007). Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica*, 154,383–400.

Paul H, Deelen JEM, Henken B. (1990). Expression *in vitro* of resistance to *Heterodera schachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris* L., transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Euphytica*, 48,153–157.

Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, van Dun K. (1999). Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37,313–317.

Pua EC, Thorpe TA. (1986). Differential response of non-selected and Na_2SO_4-selected callus cultures of *Beta vulgaris* L. to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 123,241–248.

Rajabi A, Griffiths H, Ober ES, Kromdijk W, Pidgeon JD. (2008). Genetic characteristics of water-use related traits in sugar beet. *Euphytica*, 160,175–187.

Rector R. (2015). Sugar beet has more to offer. WageningenWorld, 3,22-25.

Sandal NN, Salentijn EMJ, Kleine M, Cai DG, Arens-De Reuver M, van Druten M, de Bock TSM, Lange W, Steen P, Jung C, Marcker K, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM. (1997). Backcrossing of nematode resistant sugar beet: a second nematode resistance gene at the locus containing $Hs1^{pro-1}$?. *Molecular Breeding*, 3,471–480.

Sedighi L, Rezapanah M, Norouzi P. (2009). Efficiency evaluation of 21 lines *Bt* transgenic sugar beet on *Spodoptera littoralis* Bois (Noctuidae, Lepidoptera). In: Proceedings of 6th National Biotechnology Congress of Iran, Milad Tower Conference Hall, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract)

Sevenier R, Hall RD, van der Meer I, Hakkert HJ, van Tunen AJ, Koops AJ. (1998). High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology*, 16,843–846.

Shahbazi, H., Aghaeezadeh M, Sadeghian SY, Ahmadi M, Soltani J, Ghaemi A, Ashrafmansouri G, Bazrafshan M, Hasani M, Fotohi M, Pedram A, Orazizadeh MR, Fathei MR, Matloubi F, Vahedi S, Sadeghzadeh-Hemayati S, Babaee B, Kakoeinezhad M. (2015). Motahar, sugar beet multigerm variety resistant to rhizomania disease. *Journal of Management System*, 1(1),73-84.

Shimamoto Y, Domae T. (1999). Resistance to larvae of cabbage armyworm (*Mamestra brassicae* L.) in ICP gene transductant of

localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 8,424–434.

Kuykendall LD, Stockett TM, Saunders JW. (2003). *Rhizobium radiobacter* conjugation and callus-independent shoot regeneration used to introduce the cercosporin export gene *cfp* from *Cercospora* into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biotechnology Letters*, 25,739–744.

Kuykendall LD, Upchurch RG. (2004). Expression in sugar beet of the introduced cercosporin toxin export (CFP) gene from *Cercospora kikuchii*, the causative organism of purple seed stain in soybean. *Biotechnology Letters*, 26,723–727.

Lathouwers J, Weyens G, Lefebvre M. (2005). Transgenic research in sugar beet. In: Pidgeon J, Molard MR, Wevers JDA, & Beckers R (Eds.) Advances in Sugar Beet Research, Volume 6, Genetic Modification in Sugar Beet, IIRB, Belgium, 5–24.

Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuvesson S, Valkonen JPT, Gielen J. (2006). dsRNA-mediated resistance to *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Molecular Breeding*, 18,313–325.

Mannerlof M., Lennerfors BL, Tenning P. (1996). Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica*, 90,293–299.

Mannerlof M, Tuvesson S, Steen P, Tenning P. (1997). Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica*, 94,83–91.

May MJ, Wilson RG. (2006). Weeds and weed control. In: Draycott, AP (Ed.) Sugar Beet, Blackwell, Oxford, 359–386.

Mesbah M, Orazizadeh, MR, Rajabi A, Aghaeezadeh M. (2007). Introduction of the first Iranian rhizomania resistant sugar beet monogerm hybrid variety (Zarghan). *Sugar Beet Journal*, 23(1),109-110.

Norouzi P, Jafari M, Malboobi MA, Ghareyazie B. (2009). Expression of *cry1Ab* gene and resistance to prodenia pest in progenies of transgenic sugar beet plants. In: Proceedings of 6th National Biotechnology Congress of Iran, Milad Tower Conference Hall, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract)

Nielsen KK, Jorgensen P, Mikkelsen JD. (1994). Antifungal activity of sugar beet chitinase against *Cercospora beticola*: an autoradiographic study on cell wall degradation. *Plant Pathology*, 43,979–986.

tolerant plantlets in *Beta vulgaris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77,29–34.

Yang AF, Duan XG, Gu XF, Gao F, Zhang JR. (2005). Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83,259–70.

Zakharchenko NS, Kalyaeva MA, Buryanov YI. (2000). The method for genetic transformation of different sugar beet varieties. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47,70–75.

Zare B, Niazi A, Sattari R, Aghelpasand H, Zamani K, Sabet MS, Moshiri F, Darabie S, Daneshvar MH, Norouzi P, Kazemi-Tabar SK, Khoshnami M, Malboobi MA. (2015). Resistance against rhizomania disease via RNA silencing in sugar beet. *Plant Pathology*, 64,35–42.

Zhang CL, Xu DC, Jiang XC, Zhou Y, Cui J, Zhang CX, Chen DF, Fowler MR, Elliott MC, Scott NW, Dewar AM, Slater A. (2008). Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Applied Biology*, 152,143–156.

sugarbeet. *Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 41,90–98.

Stevens M, Liu HY, Lemaire O. (2006). Virus diseases. In: Draycott, AP, (Ed.) Sugar Beet, Blackwell, Oxford, 256–285.

Van Roggen PM, Thomas SG, Hedden P, Phillips AL, Debenham B, Scot RW, Mathews N. (1997). Genetic engineering for bolting resistance in sugar beet. *Proceedings of IIRB Congress*, 60,571–574.

Weyens G, Ritsema T, Van Dun K, Meyer D, Lommel M, Lathouwers J, Rosquin I, Denys P, Tossens A, Nijs M, Turk S, Gerrits N, Bink S, Walraven B, Lefebvre M, Smeekens S. (2004). Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. *Plant Biotechnology Journal*, 2,321–327.

Wilhite SE, Elden TC, Puizdar V, Armstrong S, Smigocki AC. (2000). Inhibition of aspartyl and serine proteinases in midgut of sugar beet root maggot with proteinase inhibitors. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97,229–233.

Yang A, Zhu L, Zhao S, Zhang J. (2004). Induction of multiple bud clumps from inflorescence tips and regeneration of salt-

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

1. **Cloning and Transformation of Bacteriophage T7RNA Polymerase in Tobacco**
Kobra Nalbandi[1], Asghar Mirzaie Asl[2]*, Leila Khodaei[3], Gholam Khodakaramian[4]

2. **Evaluation the *Beauveria bassiana* fungus efficiency on biological control of Rhizoctonia damping-off disease in cotton plants** Narges Azadi [1], Akbar Shirzad [2]* and Hamid Mohammadi [3]

3. **Imported infected cucurbit seeds provoked the establishment and spread of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin (Sothern Tehran, Iran)** Somayeh Gholizadeh-Roshanagh[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2]*, Heshmatolah Aminian[3], Majid Jafari[4] and Hossein Ramshini[5]

4. **Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants**
Gholami Ali Akbar [1] and Tarinejad Alireza*[2]

5. **Characterization and sequence of a hydrogen/sodium anti-porter gene in the plasma membrane of the plant *Kochia scoparia*** Nahid Nikkhah[1], Leila Fahmideh[2]* and Ziba Fooladvand [3]

6. **Evaluation of three reference genes for real-time PCR normalization in wheat roots under salt stress**
Fatemeh Maleki[1], Reza Fotovat[2]*, Mohamadreza Azimi[2], Farid Shekari[3] and Zahra Sadat Shobbar[4]

7. **Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Barley and Production of Fertile Transgenic Plants** Ebrahim Doranie Uliaie[1] and Vahid Mehrizadeh[2]

8. **Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)** Shima Rahmani[1*], Ali R. Bandani[2], Solmaz Azimi[3]

9. **Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame**
Shohreh Amanelahy[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*], Mitra Mohammadi Bazargani[3]

10. ***In vitro* regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun** Narges Pashmforosh[1], Mohammad Ahmadabadi[2]*

11. **Genetic analysis of the cytochrome b sequence in Khazak native chickens of Sistan**
Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad[1], Amin Shahabi[2], Zahra Pezeshkian[3]*

12. **Identification, isolation and sequence analysis of a β-Conglycinin seed-specific promoter**
Elham Saboori Robat[1], Ali Akbar Habashi*[2], Mahmood Solouki[1], Motahhareh Moshenpour[2] and Abbasali Emamjomeh[1]

13. **The application of plant viral vectors in biotechnology** Masoud Shams-bakhsh [1]*, Abdulbaset Azizi [1, 2]

14. **Applications of plant viruses in bionanotechnology** Saeideh Ebrahimi[1] and Omid Eini Gandomani* [2]

15. **The simultaneous progress of conventional breeding and biotechnology for sugar beet improvement**
Parviz Fasahat*[1], Peyman Norouzi[2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Cloning and Transformation of Bacteriophage T7RNA Polymerase in Tobacco

Kobra Nalbandi[1], Asghar Mirzaie Asl[2]*, Leila Khodaei[3], Gholam Khodakaramian[4]

[1,2]Department of Biotechnology, [4] Plant Protection Dept. College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
[3]Department of Agriculture, Payam Noor University, Hamedan, Iran
[4]Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

* Corresponding Author, Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

ABSTRACT

Molecular farming refers to the production of pharmaceutical proteins and industrial enzymes in plants by genetic engineering. T7RNA Polymerase is one of the most important enzymes which is used in various fields of biotechnology and molecular biology to produce RNA and study the structure and function of RNA *in vitro*. The *in vitro* synthesized RNA is employed in hybridization, microarray, anti-sense RNA and RNAi experiments. This enzyme has also applications in expression systems depending on the T7 promoter and terminator. T7RNA polymerase is a bacteriophage enzyme which acts mainly in the cytoplasm. This study aimed to clone and transform eukaryotic cells with the *T7RNA* Polymerase gene for production of T7 polymerase in tobacco plants. Specific primers with proper restriction enzyme sites were designed corresponding to the ends of the *T7RNA* polymerase gene and the gene was isolated and cloned into the plant expression vector, pCAMBIA1304. Successful of gene insertion was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain for tobacco transformation. The transgenic tobacco plants were regenerated on selective media containing hygromycin and cefotaxime antibiotics. The presence and expression of the *T7RNA* polymerase gene in the transgenic plants was confirmed by PCR and RT-PCR techniques.

Key Words

T7RNA polymerase, Cloning, Transformation, Tobacco, Molecular farming

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Evaluation the *Beauveria bassiana* fungus efficiency on biological control of Rhizoctonia damping-off disease in cotton plants

Narges Azadi [1], Akbar Shirzad [2]* and Hamid Mohammadi [3]

1. MSc of Plant Pathology, Department of Plant Protection,
2. Associated Prof. Department of Plant Protection,
3. Assistant Prof. Department of Agronomy and Plant Breeding,
College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* Corresponding Author, Email ashirzad@azaruniv.edu

ABSTRACT

Rhizoctonia rot disease is one of the most important diseases of crop plants and has a worldwide distribution. Despite the relative effects of certain chemicals to control the disease, it seems that biological control is one of the appropriate methods of control. *Beauveria bassiana* is an endophytic fungus that can colonize a wide range of plants in a systemic manner and enhance plant resistance. In this study the ability of three strains of *B. bassiana* fungus for control of cotton damping- off were investigated. Results showed that the isolates used, in addition to their endophytic activities, can significantly reduce the disease severity in plants. Based on the result of greenhouse studies and measurement of peroxidase activity and total plant protein, the KJ24 isolate at a concentration of 10^7 spores/ml was found to be the most suitable treatment to control the disease. It appears that this ability is due to the stimulation of plant growth. Moreover, concentrations of 10^7 spores/ml of isolates TS7 and TS12, were also able to significantly reduce the severity of the disease. Based on the observed increase of total protein in plants treated with these isolates, the reduction of disease could be due to the induction of plant resistance by these isolates.

Key Words

Biocontrol, *Beauveria bassiana*, cotton, peroxidase enzyme, *Rhizoctonia solani*

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Imported infected cucurbit seeds provoked the establishment and spread of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin (Sothern Tehran, Iran)

Somayeh Gholizadeh-Roshanagh[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2]*, Heshmatolah Aminian[3], Majid Jafari[4] and Hossein Ramshini[5]

[1] M.Sc., [2] Assistant Professor [3] Associate Professor
Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran
[4] Assistant Professor of Department of Plant Protection, College of Agriculture, Higher Educational Complex of Saravan
[5] Assistant Professor of Department of Agronomy, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

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

ABSTRACT

Z\

ucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is one of the most important viruses infecting cucurbits and the epidemiology of the virus is of considerable practical significance. The coat protein (CP) of Potyviruses is a phylogenetically informative sequence, but there is no ZYMV-CP sequence available from Varamin, an important cucurbit producing region. Therefore, the aim of this study was isolating the ZYMV-CP gene in Varamin isolates and studying its phylogenetic relationship(s) with previously reported ZYMV isolates. To this end, melon leaf samples were collected from Varamin, Pishva and Pakdasht (Southern Tehran) during the spring and summer of 2014-2015. ZYMV was detected in 34% of the collected samples. Sequencing data showed ZYMV-CP in the Varamin isolate was 840 nucleotides in length. Phylogenetic trees based on the entire ZYMV-CP gene showed all the ZYMV isolates cold be placed in three main groups A, B and C in which group A was further subdivided into 8 subgroups, A1-A8. Iranian isolates of ZYMV are placed in A1, A6 (including the Varamin isolate) and A8 subgroups. Subgroups A7 and A8 were detected for the first time in this study. However, in the N-terminal region of the CP, the most variable region, central Europe isolates harbor a landmark conserved motif of $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$. This motif was detected in the ZYMV-Varamin isolate but not in other Iranian isolates, suggesting that this isolate might have been imported from central Europe by means of infected cucurbits seeds.

Key Words

Melon, phylogeny, ELISA, taxonomy, aphid transmission *Tanacetum balsamita*

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants

Gholami Ali Akbar [1] and Tarinejad Alireza*[2]

1. MSc. in Biotechnology, 2. Associate Prof.
Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* Corresponding Author, Email: atarinejad@yahoo.com

A B S T R A C T

Optimization of wheat tissue culture is essential for any gene transfer process and for generation of cell suspension lines. To optimize tissue culture conditions for four bread wheat lines (C-D-4, C-D-6, C-D-8, and C-D-9), several factorial experiments based on completely randomized design with 3 replications were conducted. Callus induction potential and regeneration of lines under different hormone treatments were evaluated. For callus induction, ML1G1 medium containing three levels of 2, 4-D (2, 2.4 and 3 mg/l) and for regeneration, MS and N6 medium including different levels of NAA, BAP and Kin was used. With respect to the effect of hormones on the different wheat lines, the results showed that the highest callus induction rate was achieved with C-D-9(82%) and the highest rate of callus induction (60%) was recorded in 2.4 mg/l 2, 4-D for all lines. With respect to embryogenic callus production, ML1C2 media containing 250mg/l AgNO3 produced the highest embryogenic callus percentage in C-D-9 and C-D-8 lines. The highest regeneration rate (29.62%) for C-D-9 lines was obtained in N6 (6) medium containing 1 mg/l IAA + 1 mg/l BA.

Key Words

2,4-D, coleoptile segment, tissue culture and wheat

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Characterization and sequence of a hydrogen/sodium anti-porter gene in the plasma membrane of the plant *Kochia scoparia*

Nahid Nikkhah[1], Leila Fahmideh[2]* and Ziba Fooladvand [3]

1. M.Sc. 2, Assistant Professor of Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol,
3. Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol.

*Corresponding Author, Email: Leila.fahmideh@yahoo.com

ABSTRACT

Sodium efflux is one way to reducing of cytosolic sodium in plants. This prevents toxic effects of sodium on cytosol cellular processes. Sodium/hydrogen transporters in the plasma membrane (SOS_1) are one of the best known proteins in this process. In this study *Kochia scoparia*, a halophyte dicotyledonous plant was used as a source to gene isolation. Using designed primers based on conserved regions of other plants, a gene coding sequence of approximate 3600 nucleotides and 1200 amino acids was identified and sequenced. Analysis with BLAST verified that maximum nucleotide homology of the sequence with other SOS_1 proteins was 84%, and in amino acid homology 92%. Additional *in silico* analysis was performed to characterize the putative protein and its relation with other SOS_1 proteins, which contain a hydrophilic alpha helix region as passenger fragment through plasma membrane and in contrast to this, a sequence with less alpha helix and hydrophilic properties, is as protein intracellular fragment. These results support the role of sodium efflux for resistance response to salinity in Kochia using plasma membrane transporters.

Key Words

Gene isolation, *Kochia scoparia*, Plasma membrane Transporters, Salinity

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Evaluation of three reference genes for real-time PCR normalization in wheat roots under salt stress

Fatemeh Maleki[1], Reza Fotovat[2]*, Mohamadreza Azimi[2], Farid Shekari[2] and Zahra Sadat Shobbar[3]

1. M.Sc of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.
4. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

* Corresponding Author, Email: r_fotovat@znu.ac.ir

ABSTRACT

Gene expression studies by real-time PCR constitute a powerful tool to analyze the mechanisms underlying plant abiotic-stress tolerance. One of the crucial steps of this technique is the selection and validation of reference genes to normalize target gene expression under different stress conditions. In an attempt to find the best reference genes for wheat root salinity research, we evaluated the stability of the three most commonly used reference genes (*GAPDH*, *Actin* and *Ta.22845*) using the NormFinder, BestKeeper statistical algorithms and the comparative ΔCT method. The results indicated that *Actin* was the most suitable reference gene for gene expression normalization under salinity treatment in wheat root.

Key Words

Wheat, Salinity stress, Housekeeping genes, Internal control, Gene expression

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Barley and Production of Fertile Transgenic Plants

Ebrahim Doranie Uliaie[1] and Vahid Mehrizadeh[2]

1. Associate Professor, 2. Ph.D. Student
Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email uliaie@yahoo.com

ABSTRACT

In recent years, gene transfer to cereal crops has become an important tool for improving agronomic traits. Barley is one of the most important cereals and like other crops its modification by genetic transformation is an important method for increasing tolerance to biotic and abiotic stresses. Optimization of the various factors that can influence transformation and regeneration of the target plant is the first step in the gene transfer. In this research, some of the factors influencing transformation of barley with Agrobacterium such as the Agrobacterium strain, bacterial concentration, co-cultivation period and Agrobacterium infection medium were investigated. To confirm the presence of possible transferred genes in the transgenic plants, a PCR test was done and expression of the transferred gene was carried out using a GFP gene expression test. Regeneration of transgenic explants was carried out successfully and fertile transgenic plants were obtained. The results showed that in the transformation of immature embryo explants of barley, the LBA4404 and AGL1 Agrobacterium strains were the most effective strain and a concentration of OD600=1 was the optimal bacterial concentration. Also, the usage of LB as the inoculation medium and a 2-days co-cultivation period of explants with Agrobacterium resulted in maximum transformation of barley.

Key Words

Agrobacterium, Barley, GFP, Hygromycin, Transformation.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)

Shima Rahmani[1*], Ali R. Bandani[2], Solmaz Azimi[3]

1. Department of Entomology, Science and reaserch branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Plant Protection Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Department of Plant Protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz. Iran

*Corresponding Author, Email: shrahmani@srbiau.ac.ir

A B S T R A C T

In many organisms, detoxification enzymes play important roles in detoxification of xenobiotics and are considered as biomarkers of toxic effects of exposure to a variety of these agents. In the current study, the effects of thiamethoxam and pirimicarb in sublethal concentrations were evaluated on *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) detoxification enzymes. The median lethal concentrations for the female aphids exposed to thiamethoxam and pirimicarb were 113.85 (68.94-625.16) and 2.94 (1.71-3.99) mg (ai)/L, respectively. The activity of monooxygenases was measured as detoxification enzymes. The effects of both insecticides on *A. fabae* caused significant increase in monooxygenase ($P<0.0001$). Glutathione-s-transferase (GST) was likewise induced in *A. fabae* by increasing the sublethal concentrations of pirimicarb (df=5, 12, F= 18.17, P= 0.0001). Finally, thiamethoxam in higher concentrations (48.07, 75.06 and 113.85 mg (ai)/L) induced this enzyme (df=5, 12, F= 9.15, P= 0.0009). The results illustrate that two important aphicides, thiamethoxam and pirimicarb in sublethal concentrations can be detected by detoxification enzymes as biochemical markers. Consequently, prediction of poisonous effects on the aphid populations in the field will be possible.

Key Words

Aphis fabae, pirimicarb, thiamethoxam, detoxification enzymes, biomarkers

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame

Shohreh Amanelahy[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*], Mitra Mohammadi Bazrgani[3]

1. M.Sc. 2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3. Assistant Professor of Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: mitra_cb@yahoo.com

ABSTRACT

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is not only a source of manganese and copper, but is also rich in calcium, magnesium, iron, phosphorus, vitamin B1, zinc and dietary fiber. Sesame contains a group of fibers called Lignans, including Sesamin and Sesamolin, which are especially useful as they decrease cholesterol in the human body. Due to its use in medical treatments, especially in cancer cases, recent decades have seen numerous efforts aimed at a better understanding of Sesamin production and the genes underlying its biosynthesis, with the aim of enhancing expression of genes involved in this pathway. In this study, the effects of salicylic acid and phenylalanine on the expression level of two key genes, *CYP81Q1* and *C3H*, involved in the Sesamin biosynthesis pathway were evaluated using sesame cell suspension culture and qRT-PCR. For this purpose, sesame cell suspensions were treated using 0.1, 0.5 and 1 mg/l salicylic acid and 0.1 mg/l phenylalanine. Sampling was carried out 24, 48 and 72 hours after treatment. Gene expression analysis was performed by the qRT-PCR technique. The results showed that expression of genes involved in Sesamin biosynthesis increased in all the samples treated with salicylic acid and phenylalanine. The highest increase in expression level of *CYP81Q1* occurred in 1 mg/l of salicylic acid 72 h and 0.1 mg/l of phenylalanine 72 h after treatment. The highest increase in expression level of the *C3H* gene occurred in 0.1 mg/l of salicylic acid 24 h and 0.1 mg/l of phenylalanine 72 h after treatment.

Key Words

Sesame, Sesamin, salicylic acid, phenylalanine, qRT-PCR

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

In vitro regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun

Narges Pashmforosh[1], Mohammad Ahmadabadi[2]*

1. MSc. Student, 2. Associate Professor, Biotechnology Dept. Agriculture Fac. Azarbaijan Shahid Madani University, Km35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

*Corresponding Author, Email: m.ahmadabadi@azaruniv.edu

ABSTRACT

Red nightshade (*Solanum alatum* Moench.) is one of the important medicinal plants from the *Solanaceae* family. Tissue culture technology is a very useful application of biotechnology which can be used for plant preservation, rapid multiplication and in genetic engineering for molecular breeding or improving secondary metabolite production. In this study, plant regeneration from three different explant sources derived from young seedlings, including hypocotyl, coleoptile and leaf segments, was evaluated. In this research, efficient protocols for regeneration of red nightshade from all three explants are reported. The best shoot regeneration response (100%) was obtained at 0.5 mg/l BAP concentration for leaf explants. Regenerated plants adapted to greenhouse conditions with a high efficiency (100%) and produced normal flowers and seeds. Also, leaf explant was found to be the most efficient explants for plantlet regeneration, with a mean number of 29.93 shoots per explant. Finally, the potential of leaf explants for gene transfer and expression by means of a gene gun (at two rupture disk pressure of 1100 and 1350 psi), was evaluated using transient GUS expression, and leaf explants were found to be suitable for this purpose.

Key Words

Red nightshade, Micro-propagation, *in vitro* regeneration, *Solanum alatum*

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Genetic analysis of the cytochrome b sequence in Khazak native chickens of Sistan

Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad[1], Amin Shahabi[2], Zahra Pezeshkian[3]*

1. Master graduate of Animal breeding, Special livestock Institute, Research center of the University of Zabol
2. PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad , Iran
3. PhD Student, Animal Science Department, University of Guilan, Iran

*Corresponding Author, Email: Zahra_pezeshkian@yahoo.com

A B S T R A C T

For conservation of indigenous poultry genetic resources and their use as genetic material in poultry breeding programs, it is necessary to obtain accurate genetic knowledge about these animals. The aim of this study was to investigate the genetic and phylogenetic characteristics of Khazak native chicken of Sistan usingthe nucleotide sequence of mitochondrial cytochrome b. For this purpose, blood samples were collected from 20 Khazak native chickens of Sistan. After DNA extraction, an 864 bp fragment of cytochrome b of mitochondrial genome was amplified by primers. The amplified fragments were purified and sequenced. A total of five different haplotypes were determined based on three single nucleotide polymorphism sequences. The final sequences from each haplotype with 789 bp in length were obtained, including 26.37% of adenine, 13.31% of guanine, 36.50% of cytosine, and 23.82% of thymine. The results indicated that the Khazak native chicken of Sistan has the lowest genetic distance from Japanese and Chinese native chickens**.**

Key Words

Phylogeny, Cytochrome b, Khazak native chicken of Sistan, Genome Mitochondrial

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Identification, isolation and sequence analysis of a β-Conglycinin seed-specific promoter

Elham Saboori Robat[1], Ali Akbar Habashi*[2], Mahmood Solouki[1], Motahhareh Moshenpour[2] and Abbasali Emamjomeh[1]

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Department of Gene Transformtion, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

*Corresponding Author, Email: habashia@yahoo.com

A B S T R A C T

Promoter sequences are one of the key factors in directed gene expression. Different types of promoters can be used according to the type of tissue or expression levels desired. β-Conglycinin is one of the major storage proteins in soybean seed embryos and is produced in the seed development stage. The synthesis of storage proteins is primarily controlled at the transcriptional level and seed-specific expression has been shown to be conferred upon the promoter regions of many storage protein genes. In this research, a seed specific promoter (β-Conglycinin) of Iranian *Glycin max* was isolated from genomic DNA. Then, the promoter was cloned into pTZ57R/T and sequenced. Sequence analysis showed that the cloned promoter contained all of the typical conserved motifs such as TATA box, CAAT box as well as other previously identified seed-specific motifs such as SKn-1, RY repeats, G box. Finally, the β-Conglycinin promoter was cloned into pBI121 binary vector for further research.

Key Words

Promoter, Soybean, β-Conglycinin, Motif, Signal peptide

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Application of plant viral vectors in biotechnology

Masoud Shams-bakhsh [1]*, Abdulbaset Azizi [1, 2]

1. Department of plant pathology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of plant protection, University of Kurdestan, Sanandaj, Iran

*Corresponding Author, Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

ABSTRACT

Over the past 38 years, there has been a re-orientation of virology studies toward the beneficial use of viruses, and several plant viruses have been employed as expression vectors. The use of plant virus vectors for production of recombinant proteins has advantages such as speed of expression, high yield, reduced cost and duration of studies, and an extremely high throughput of recombinant proteins. Thus with such vectors large scale production of recombinant proteins required for pharmaceutical and industrial applications is accessible. Plant viruses can also also be used for improved vaccine efficacy. Such vaccines can be made by ligand conjugation of a non-immunogenic peptide to the outer surface of the virus coat protein. Finally, plant virus vectors can be employed as library construction tools for discovery of gene function in genomics studies. Here, we review the use of plant viruses in expression of recombinant proteins.

Key Words

Gene Functions, Plant Viruses, Recombinant Proteins

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

Applications of plant viruses in bionanotechnology

Saeideh Ebrahimi[1] and Omid Eini Gandomani* [2]

1. M.Sc., 2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, University of Zanjan, Iran

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

A B S T R A C T

The emphasis on viruses as disease-causing agents has skewed scientists' perception of other aspects of viruses. In recent years, there has been a re-orientation of virus studies toward the beneficial use of viruses, independent of their disease-causing phenotypes. For example, plant viral capsids have been utilized as biotemplates, drug vectors and nanodevices in many practical applications. By studying the morphology, genetics, spatial folding, replication and assembly strategy of viral capsids, we can manipulate the viral genome and viral proteins for in various fields. At present one of the most important uses of plant viruses is in nanomedicine, where they can be employed in diagnosis and therapy. Their low toxicity for humans and their specific effects are the main advantages of using plant viral nanoparticles. This review discusses applications of plant viruses in bionanotechnology.

Key Words

Bionanotechnology, biotemplate, capsid, nanomedicine, plant viruses, viral nanoparticles

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

The simultaneous progress of conventional breeding and biotechnology for sugar beet improvement

Parviz Fasahat*[1], Peyman Norouzi[2]

1. Assistant Professor and 2. Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*Corresponding Author, Email: parviz.fasahat@gmail.com

ABSTRACT

Sugar beet is one of the most important agricultural products which currently provides about 20% of the sugar around the world. With classical breeding methods, good traits can be introduced in sugar beet breeding programs but it can take years to find the perfect cross. Genetic engineering (precision breeding) is the most advanced plant breeding method that is currently used. In the last two decades, this method has been applied in sugar beet breeding for resistance to pests and disease, abiotic stress, and also by-product production. Genetic engineering has not only elevated the efficiency of breeding programs efficiency but also in some cases, such as introducing resistance in sugar beet to herbicide application, significantly reduced costs. The present study will describe recent progress in the application of genetic engineering in sugar beet improvement.

Key Words

Breeding, genetic engineering, sugar beet

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol 5, Number2, Fall 2016 and Winter 2017, Bi-seasonal

1. **Cloning and Transformation of Bacteriophage T7RNA Polymerase in Tobacco**
Kobra Nalbandi[1], Asghar Mirzaie Asl[2]*, Leila Khodaei[3], Gholam Khodakaramian[4]

2. **Evaluation the *Beauveria bassiana* fungus efficiency on biological control of Rhizoctonia damping-off disease in cotton plants** Narges Azadi [1], Akbar Shirzad [2]* and Hamid Mohammadi [3]

3. **Imported infected cucurbit seeds provoked the establishment and spread of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin (Sothern Tehran, Iran)** Somayeh Gholizadeh-Roshanagh[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2]*, Heshmatolah Aminian[3], Majid Jafari[4] and Hossein Ramshini[5]

4. **Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants**
Gholami Ali Akbar [1] and Tarinejad Alireza*[2]

5. **Characterization and sequence of a hydrogen/sodium anti-porter gene in the plasma membrane of the plant *Kochia scoparia*** Nahid Nikkhah[1], Leila Fahmideh[2]* and Ziba Fooladvand [3]

6. **Evaluation of three reference genes for real-time PCR normalization in wheat roots under salt stress**
Fatemeh Maleki[1], Reza Fotovat[2]*, Mohamadreza Azimi[2], Farid Shekari[3] and Zahra Sadat Shobbar[4]

7. **Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Barley and Production of Fertile Transgenic Plants** Ebrahim Doranie Uliaie[1] and Vahid Mehrizadeh[2]

8. **Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)** Shima Rahmani[1*], Ali R. Bandani[2], Solmaz Azimi[3]

9. **Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame**
Shohreh Amanelahy[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*], Mitra Mohammadi Bazargani[3]

10. ***In vitro* regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun** Narges Pashmforosh[1], Mohammad Ahmadabadi[2]*

11. **Genetic analysis of the cytochrome b sequence in Khazak native chickens of Sistan**
Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad[1], Amin Shahabi[2], Zahra Pezeshkian[3]*

12. **Identification, isolation and sequence analysis of a β-Conglycinin seed-specific promoter**
Elham Saboori Robat[1], Ali Akbar Habashi*[2], Mahmood Solouki[1], Motahhareh Moshenpour[2] and Abbasali Emamjomeh[1]

13. **The application of plant viral vectors in biotechnology** Masoud Shams-bakhsh [1]*, Abdulbaset Azizi [1, 2]

14. **Applications of plant viruses in bionanotechnology** Saeideh Ebrahimi[1] and Omid Eini Gandomani* [2]

15. **The simultaneous progress of conventional breeding and biotechnology for sugar beet improvement**
Parviz Fasahat*[1], Peyman Norouzi[2]