Crop Biotech.
Spring and Summer (2014) 6: 11-20.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره ششم، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۲۰-۱۱)

آنالیز عملکرد پیش‌بر مصنوعی SP-DD با استفاده از روش اگرواینجکشن در گیاه توتون

مرجان بحرآبادی[۱]، فرهاد شکوهی‌فر[۲]*، محمدعلی ابراهیمی[۳]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران
۲. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۶)

Functional Analysis of SP-DD Synthetic Promoter Using Agroinjection Method in Tobacco Plant

M. BAHRABADI[1], F. SHOKOUHIFAR[2]*, M.A. EBRAHIMI[3]
1. M.Sc. Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
(Received: May. 10, 2014 - Accepted: Sep. 17, 2014)

Abstract

Synthetic pathogen-inducible promoters are suitable alternatives for native promoters in plant genetic manipulation to the purpose of resistant crop production. An ideal pathogen-inducible promoter would only be activated in response to target pathogens. Furthermore, it should express the transgene locally and temporarily. The absence of these characteristics in native promoters have drawn the attentions toward design and construction of synthetic promoters. Some components like *cis*-regulatory elements are used in construction of synthetic promoters and this provides high flexibility in determining the expression quantity and the inducibility type. One of the most common methods for a synthetic inducible promoter analysis is using *Agrobacterium*-mediated transient expression system. With this method, Functional analysis of the promoter can be performed in a short time by application of biotic and abiotic treatments and assaying the transgene expression. In this study, the SP-DD synthetic pathogen inducible promoter (containing of two copies of Box D *cis*-element derived from parsley *PR2* promoter) fused with an intron-containing ß-glucuronidase reporter gene was transferred to tobacco leaves (*Nicotiana benthamiana*) by agroinjection. The promoter function was evaluated in response to salicylic acid treatment and environmental stresses like heat, cold and UV radiation. The results showed that the SP-DD synthetic promoter induced the ß-glucuronidase gene expression in response to salicylic acid and the expression amount increased over time from 2 hours to 24 hours post applicaion. Besides, the promoter showed slight sensitivity in response to heat and cold stresses but the ultraviolet radiation stress had no effect on the promoter induction.

Keywords: Synthetic promoter, Inducible promoter, Promoter analysis, Agroinjection, ß-glucuronidase reporter gene

چکیده

پیش‌برهای مصنوعی القاپذیر با بیمارگرها (Synthetic pathogen-inducible promoters) جایگزین مناسبی برای پیش‌برهای طبیعی در دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان با هدف تولید ارقام مقاوم می‌باشند. یک پیش‌بر القاپذیر با بیمارگر در شرایط ایده‌آل باید تنها در پاسخ به بیمارگرهای هدف فعال شود و ژن مقاومت به بیمارگر را به صورت موضعی و موقتی بیان کند. فقدان این ویژگی‌ها در پیش‌برهای طبیعی، توجه را به سمت طراحی پیش‌برهای مصنوعی معطوف داشته است. در ساختار این پیش‌برها از اجزائی چون عناصر تنظیمی سیس استفاده می‌شود که این امر انعطاف‌پذیری بالایی را در تعیین میزان بیان و نوع القاپذیری یک پیش‌بر مهیا می‌نماید. یکی از متداول‌ترین روشهای آنالیز یک پیش‌بر مصنوعی القاپذیر با بیمارگر، استفاده از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم می‌باشد. با اعمال تیمارهای زیستی و غیرزیستی و مطالعه بیان تراژن، آنالیز عملکرد پیش‌بر در زمان کوتاهی قابل انجام است. در این تحقیق، پیش‌بر مصنوعی SP-DD (متشکل از دو نسخه از عنصر تنظیمی و القایی سیس Box D از منشاء پیش‌بر ژن *PR2* گیاه جعفری) در اتصال با ژن گزارشگر بتاگلوکرونیداز اینترون‌دار طبق روش اگرواینجکشن به برگ‌های گیاه توتون گونه بنتامیانا (*Nicotiana benthamiana*) منتقل شد و عملکرد آن در واکنش به تیمار سالیسیلیک اسید و تنش‌های محیطی بررسی گردید. نتایج نشان داد پیش‌بر مصنوعی SP-DD در پاسخ به سالیسیلیک اسید، ژن بتاگلوکرونیداز را بیان کرد و میزان بیان با گذشت زمان از ۲ ساعت به ۲۴ ساعت از اعمال تیمار، افزایش نشان داد. همچنین پیش‌بر فوق به تنش‌های گرما و سرما حساسیت اندکی نشان داد ولی تنش اشعه ماوراء بنفش بر القاء آن بی‌اثر بود.

واژه‌های کلیدی: پیش‌بر مصنوعی، پیش‌بر القاپذیر، آنالیز پیش‌بر، اگرواینجکشن، ژن گزارشگر بتاگلوکرونیداز

* نویسنده مسئول: فرهاد شکوهی‌فر
E-mail: shokouhifar@um.ac.ir

مقدمه

پیش‌برهای القایی به دلیل اینکه بیان ژن‌های تحت کنترل آنها می‌تواند در مراحل خاص توسعه یک موجود، بافت یا تحت شرایط مشخص بررسی و تنظیم شود، ابزار بسیار مهمی در مهندسی ژنتیک گیاهی به حساب می‌آیند (Gurr and Rushton, 2005). با تحریک بیمارگر، رونویسی ژن‌های گیاهی تحت کنترل پیش‌برهای القاپذیر با بیمارگر، فعال می‌شود. مولکول‌های ویژه بیمارگر که به عنوان محرک (Elicitor) شناخته می‌شوند شامل قطعات پروتئین، پپتید، لیپید یا پلی‌ساکارید ناشی از دیواره سلولی، غشا خارجی و یا حاصل یک واکنش ترشحی بیمارگر می‌باشند (Boller, 1995). در پی حمله بیمارگر، پاسخ‌های دفاعی سریعی در گیاه از طریق تعدادی از مسیرهای هدایت سیگنالی (Signaling pathways) به راه می‌افتد. در نهایت پیام‌ها به هسته سلول هدایت می‌شوند و در آنجا تعدادی از ژن های کدکننده عوامل فعال‌کننده نسخه‌برداری (transcription factors) بیان می‌شوند. این عوامل با هدف قرار دادن نواحی خاصی از پیش‌بر ژن‌ها، بیان پروتئین‌ها و ترکیبات ضد میکروبی را سبب می‌شوند. (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Yeri *et al.*, 2013).

بسیاری از پیش‌برهای طبیعی القاپذیر با بیمارگر، سطوح متفاوتی از بیان پایه را نشان می‌دهند که استفاده از آنها را در برنامه‌های دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان نامناسب و پیچیده می‌سازد. یک پیش‌بر القاپذیر با بیمارگر در شرایط ایده‌آل باید بسرعت در پاسخ به بیمارگرهای هدف فعال شود و ژن تحت کنترل خود را در مقدار مناسب بیان نماید، علاوه بر این باید در شرایط نبود عامل بیماری غیرفعال بوده و بیان پایه در آن بسیار اندک باشد. از ویژگی‌های دیگر اینکه تراژن تحت کنترل آن باید بصورت موضعی و تنها در سلولهای محل حمله بیمارگر بیان شود (Gurr and Rushton, 2005; Shokouhifar *et al.*, 2010). نبود این ویژگی‌ها در پیش‌برهای طبیعی، توجه را به سمت طراحی و ساخت پیش‌برهای مصنوعی معطوف داشته است. در ساختار این پیش‌برها از اجزائی چون توالی‌های حداقل پیش‌بری و عناصر تنظیمی سیس (*Cis* regulatory elements) استفاده می‌شود که انعطاف‌پذیری بالائی را در تعیین میزان بیان و نوع القاپذیری یک پیش‌بر مهیا می‌نمایند (Gurr and Rushton, 2005). خاصیت القاپذیری این عناصر سیس با جداشدن آنها از پیش‌بر طبیعی و ادغام آن به یک پیش‌بر حداقل حفظ می‌شود (Yeri *et al.*, 2013). تحقیقات نشان داده که وجود دو نسخه از یک عنصر در ساختار پیش‌برهای مصنوعی برای حصول بیشترین القاپذیری، ایده‌آل می‌باشد (Rushton *et al.*, 2002; Gurr and Rushton, 2005). با توجه به مطالعات Rushton و همکاران (۲۰۰۲)، در بین عناصر تنظیمی سیس، Box D از منشاء پیش‌بر *PR2* گیاه جعفری از ویژگی‌های منحصر بفردی برخوردار بوده و پیش‌برهای مصنوعی در بردارنده آن به طور محسوسی فاقد بیان پایه یا القاپذیری به وسیله زخم در گیاه می‌باشند و در عین حال القاپذیری متفاوتی را به بیمارگرها نشان می‌دهند.

پاسخ دفاعی گیاه به حمله بیمارگرها، به واسطه شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی، که مولکول‌های پیام‌رسان دفاعی سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) در آن نقش اصلی را به عهده دارند، تنظیم می‌گردد. سالیسیلیک اسید یک نقش مرکزی را در دفاع گیاه بر علیه آلودگی موضعی و همچنین سیستمیک به عهده دارد. در گیاهان دو مسیر پیام‌رسانی عمده دفاعی علیه بیمارگرها وجود دارد. این مسیرها عبارتند از مسیر وابسته به سالیسیلیک اسید و مسیر مستقل از سالیسیلیک اسید که شامل مسیر جاسمونیک اسید و مسیر اتیلن می‌شود. این مسیرها بصورت مستقل عمل نکرده بلکه از طریق یک شبکه پیچیده از

برهم‌کنش‌های تنظیمی عمل می‌کنند (Kunkel and Brooks, 2002). براساس آزمایش‌های انجام شده مسیر سالیسیلیک اسید با بیمارگرهای بیوتروف و مسیر جاسمونیک اسید و اتیلن با بیمارگرهای نکروتروف مرتبط می‌باشد (Shokouhifar *et al*., Yang *et al*., 2009;2010).

به منظور آنالیز پیش‌برهای مصنوعی القاپذیر با بیمارگرها، ضروری است مشخص شود پیش‌بر نسبت به کدامیک از مسیرهای پیام‌رسانی دفاعی گیاه حساس است و همچنین ضمن تعیین میزان بیان پایه، واکنش آن نسبت به تنش‌های محیطی مختلف از جمله گرما و سرما تعیین گردد. برای حصول به این اهداف دراین مطالعه، عملکرد پیش‌بر مصنوعی SP-DD متشکل از دو نسخه از عنصر تنظیمی و القایی Box D نسبت به مسیر پیام‌رسانی دفاعی وابسته به سالیسیلیک اسید، در قالب آزمایش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم در برگ‌های گیاه توتون گونه بنتامیانا بررسی شد. همزمان اثر برخی تنشهای محیطی بر القاء پیش‌بر مورد استفاده ارزیابی شد و استفاده از عنصر Box D در ساختار پیش‌برهای مصنوعی القایی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاهان توتون *Nicotiana benthamiana* در گلخانه در دمای ۲۲° C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد یافته و در سن ۸ هفتگی مورد استفاده قرار گرفتند. از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 که حاوی ناقل pSP-DD (Shokouhifar, 2009) (شکل ۱-الف) بود برای بررسی‌های آنالیز پیش‌بر القایی استفاده شد. پیش‌بر مصنوعی SP-DD شامل دو نسخه از عنصر Box D با توالی TACAATTCAAACATTGTTCAAACA AGGAACC متصل به توالی پیش‌بر حداقل CaMV 35S است که در بالادست ژن گزارشگر GUS واجد اینترون در ساختار ناقل دوگانه pSP-DD قرار دارد. از سویه GV3101 حاوی ناقل pGCGi (Shokouhifar *et al*., 2014) به عنوان کنترل مثبت، و از سویه GV3101 فاقد ناقل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سویه‌های اگروباکتریوم از آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

آماده‌سازی سلول‌های مستعد و تراریختی اگروباکتریوم سویه GV3101 به روش انجماد آنی انجام شد (Weigel and Glazebrook, 2005). کلنی‌های تراریخت با روش کلنی PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh4-F با توالی 5'-TCC TTT AGC AGC CCT TGC GC -3' و PSh4-R با توالی 5'-CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC A-3' (Shokouhifar *et al*., 2014) تایید شدند. آماده‌سازی سلول‌ها جهت تزریق بر اساس روش Yang و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. بدین منظور کلنی‌های تایید شده در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین کشت و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و در محیط القاء (یک گرم بر لیتر NH_4Cl، ۰.۳ گرم بر لیتر $MgSO_4$-$7H_2O$، ۰.۰۱۵ گرم بر لیتر KCl، ۰.۰۱ گرم بر لیتر $CaCl_2$، ۲.۵ میلی‌گرم بر لیتر $FeSO_4$-$7H_2O$، ۲ میلی‌مولار بافر فسفات، ۲۰ میلی‌مولار MES، ۱٪ ساکارز با اسیدیته ۵.۵) به مدت یک شب معلق شدند. سلول‌ها سپس با سانتریفیوژ مجدد رسوب داده شدند و در محلول تزریق شامل $MgSO_4$ و MES با اسیدیته ۵.۵ تا حصول OD600=0.8 رقیق شدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل به روش اگروانجکشن به گیاه تزریق شد. سلول‌های اگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی ناقل pGCGi

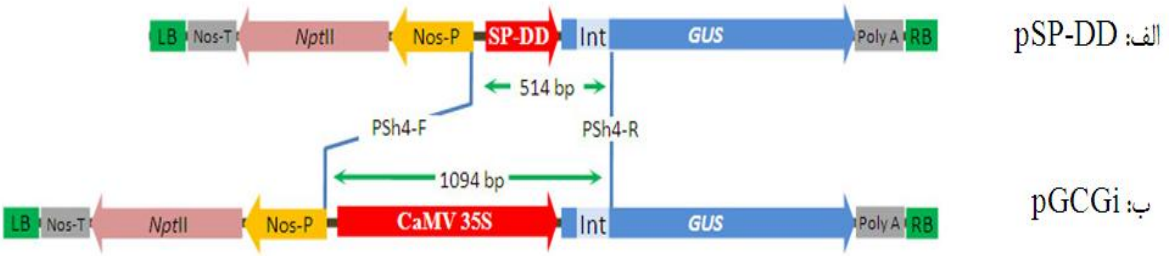
و فاقد ناقل نیز به صورت جداگانه جهت تزریق به روش ذکر شده آماده شدند.

عمل اگروایجکشن در برگ‌های کاملاً توسعه یافته گیاه توتون گونه بنتامیانا با سرنگ ۱ میلی‌لیتر بدون سوزن انجام گرفت. سوسپانسیون‌های باکتریایی به فضای بین سلولی برگ‌های متصل به گیاه تزریق شدند. به سه نقطه از پشت هر برگ تزریق صورت گرفت (به یک سوم فوقانی برگ GV3101 فاقد ناقل، به یک سوم سمت چپ باکتری‌های حاوی ناقل pGCGi و به یک سوم سمت راست باکتری‌های حاوی ناقل pSP-DD). از هر ناقل دو تکرار در هر برگ تزریق شد. سپس روی گیاهان با پوشش پلاستیکی پوشانده شد و در ژرمیناتور دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری شدند. پوشش پلاستیکی روز بعد حذف شده و گیاهان به مدت حداقل دو روز در همان محیط باقی ماندند (شکل ۳).

۴۸ ساعت پس از اگروایجکشن بر اساس منابع (Yang *et al*., 2000)، تیمارهای محیطی شامل سرما (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت)، گرما (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت) و اشعه ماوراء بنفش (اشعه UV-B با طول موج دامنه ۲۸۰ تا ۳۱۵ نانومتر به مدت نیم ساعت) اعمال شدند و دیسک‌های برگی برای بررسی هیستوشیمیایی در بافر سنجش قرار گرفتند. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید نیز ۴۸ ساعت پس از اگروایجکشن (Yang *et al*., 2000; Liu *et al*., 2011) با غلظت mM ۲ به صورت اسپری بر روی برگ‌های مورد بررسی با زمان‌بندی ۲ (تهیه دیسک‌های برگی ۲ ساعت پس از تیمار سالیسیلیک‌اسید)، و ۲۴ (تهیه دیسک‌های برگی ۲۴ ساعت پس از تیمار سالیسیلیک اسید) انجام شد و سپس دیسک‌های برگی مورد بررسی هیستوشیمیایی قرار گرفتند (Cervera, 2004). تصویربرداری از دیسک‌های برگی پس از تیمار در محلول سنجش و حذف کامل کلروفیل با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال (Dino-Lite مدل Am-313 T Plus ساخت کشور تایوان) انجام شد.

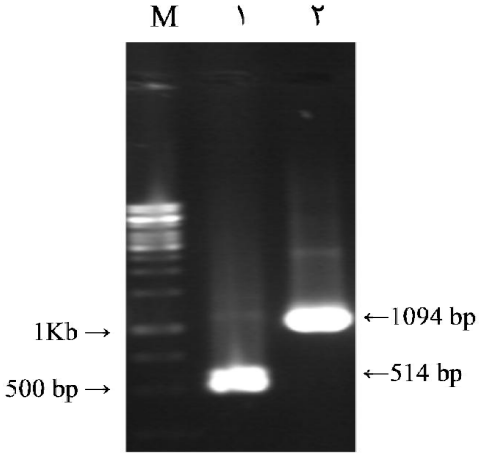
نتایج و بحث

در این مطالعه با استفاده از سیستم بیان موقت مبتنی بر اگروایجکشن، پاسخ پیش‌بر مصنوعی SP-DD در ساختار ناقل دوگانه pSP-DD در واکنش به هورمون دفاعی سالیسیلیک اسید و بعضی از تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ناقل pGCGi حامل پیش‌بر کامل CaMV 35S و ژن گزارشگر GUS اینترون‌دار بعنوان کنترل مثبت در مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- نمای شماتیک منطقه T-DNA ناقل‌های pSP-DD و pGCGi نشان‌دهنده مجموعه ژن گزارشگر، گزینش‌گر، موقعیت اتصال آغازگرهای اختصاصی و اندازه باندهای قابل تکثیر، به ترتیب از چپ به راست؛ LB: مرز چپ، Nos-T: پایان‌دهنده نوپالین سنتاز، *Npt*II : نئومایسین فسفوترانسفراز، Nos-P: پیش‌بر نوپالین سنتاز، SP-DD: پیش‌بر القاپذیر با بیمارگر، CaMV 35S: پیش‌بر 35S ویروس موزاییک گل کلم، Int: اینترون، GUS: ژن بتا گلوکرونیداز، Poly A: دنباله پلی آدنیلاسیون، RB: مرز راست.

دو پلاسمید ژنی تایید شده حاوی ناقل pSP-DD و ناقل pGCGi بطور جداگانه به اگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل گردیدند. انتخاب باکتری‌های ترانسفورم شده با استفاده از محیط حاوی کانامایسین و نیز مطالعه الگوی Colony-PCR با آغازگر اختصاصی PSh4-F/R، انتقال پلاسمیدهای مذکور به اگروباکتریوم را تایید نمود (شکل ۲).

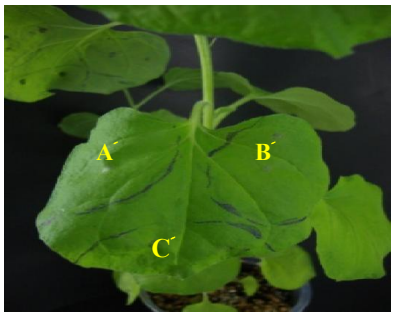


شکل ۲- تایید تراریختی کلنی‌های سویه GV3101 اگروباکتریوم با ناقل های pSP-DD و pGCGi . ۱ و ۲ به ترتیب الگوی باندی محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی PSh4-F/R مربوط به باکتری تراریخت حامل ناقل pSP-DD (۵۱۴ bp) و ناقل pGCGi (۱۰۹۴ bp)، M: نشانگر وزنی ۱ kb.

بیان موقت با استفاده از سویه GV3101 حامل ناقل‌های فوق در برگ گیاه توتون ۴۸ ساعت پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، سوسپانسیون سلول‌های GV3101 فاقد ناقل نیز به عنوان کنترل منفی لحاظ شد (شکل ۳).

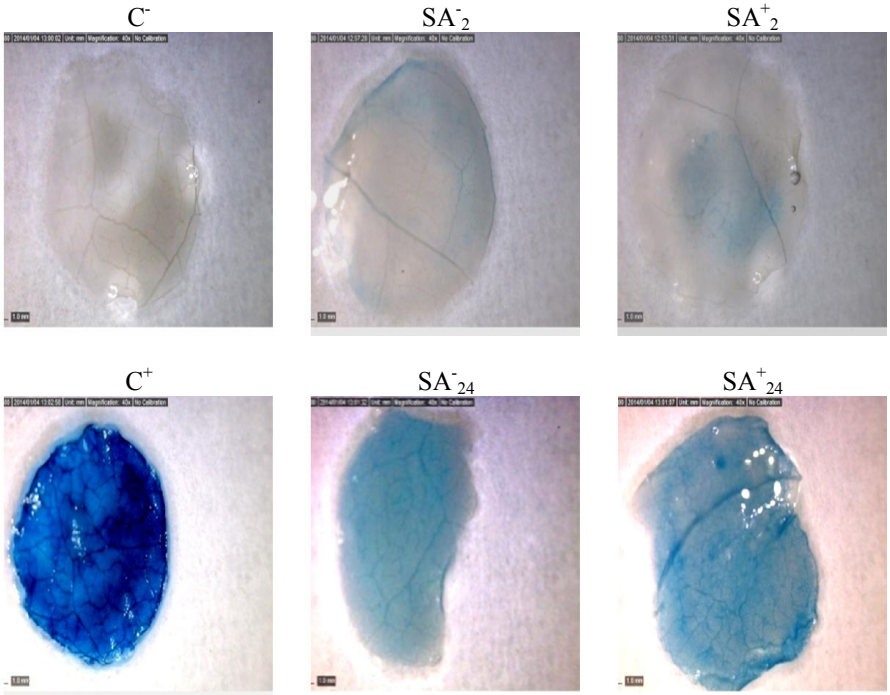
تیمار سالیسیلیک اسید

به منظور بررسی واکنش پیش‌بر مصنوعی SP-DD به مسیر پیام‌رسانی دفاعی وابسته به سالیسیلیک اسید در گیاه، تیمار سالیسیلیک اسید بر روی برگ‌های تزریق شده با ناقل‌های مورد بررسی اعمال گردید. بدین منظور تیمار مستقیم سالیسیلیک اسید به سطح رویی دو برگ تزریق شده در یکی از گیاهان توتون بنتامیانا اعمال گردید. تهیه دیسک‌های برگی در دو زمان قراردادی ۲h (دو ساعت پس از کاربرد سالیسیلیک اسید) و ۲۴h (بیست و چهار ساعت پس از تیمار سالیسیلیک اسید) انجام گرفت (SA^{+}_{2} و SA^{+}_{24}). از برگ‌های روبروی برگ‌های تیمار شده نیز برای بررسی اثر تیمار غیرمستقیم سالیسیلیک‌اسید (بررسی اثر سیستمیک تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه) در هر دو زمان نمونه‌گیری شد (SA^{-}_{2} و SA^{-}_{24}). پس از بررسی‌های هیستوشیمیایی، بیان پیش‌بر القایی SP-DD، ۲ ساعت پس از کاربرد سالیسیلیک اسید به صورت مستقیم و غیر مستقیم بسیار ضعیف بود. با این‌حال با گذشت ۲۴ ساعت پس از تیمار سالیسیلیک اسید بصورت مستقیم و غیرمستقیم، ژن GUS تحت کنترل این پیش‌بر بطور محسوسی بیان شد (شکل۴).



شکل ۳- برگ توتون ۴۸ ساعت پس از تزریق.
محل تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم حامل ناقل القایی pSP-DD (A)، ناقل pGCGi به عنوان کنترل مثبت (B) و سویه GV3101 بدون ناقل به عنوان کنترل منفی (C).

بیان اندک پیش‌بر SP-DD، ۲ساعت پس از تیمار موضعی سالیسیلیک‌اسید نشان‌دهنده این‌است که احتمالاً این زمان برای فعال شدن مسیر دفاعی مرتبط با سالیسیلیک‌اسید در این گیاه کافی نبوده است. از طرفی پیش‌بر القایی فوق، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار مستقیم و غیرمستقیم سالیسیلیک‌اسید، ژن GUS را در نمونه‌های مورد بررسی بطور بارزی



شکل ۴- اثر تیمار سالیسیلیک اسید ۲ و ۲۴ ساعت پس از کاربرد آن، بر القاء ناقل pSP-DD در مقایسه با کنترل‌های مثبت و منفی.

SA^+_2: تیمار مستقیم سالیسیلیک اسید در زمان ۲ h

SA^-_2: تیمار غیر مستقیم سالیسیلیک اسید در زمان ۲ h

SA^+_{24}: تیمار مستقیم سالیسیلیک اسید در زمان ۲۴ h

SA^-_{24}: تیمار غیرمستقیم سالیسیلیک اسید در زمان ۲۴ h

C^+: کنترل مثبت

C^-: کنترل منفی

بیان کرد. نحوه القاء ژن گزارشگر در زمان ۲h و ۲۴h پس از کاربرد سالیسیلیک اسید نشان‌دهنده این مساله است که اعمال موضعی و خارجی سالیسیلیک‌اسید روی یک برگ گیاه توتون بنتامیانا باعث فعال شدن مسیر پیام‌رسانی وابسته با سالیسیلیک‌اسید در موضع تیمار شده می‌شود و با گذشت زمان از اعمال تیمار از ۲ ساعت به ۲۴ ساعت، مقدار بیان ژن افزایش می‌یابد به‌طوریکه پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار مستقیم سالیسیلیک‌اسید، افزایش واضحی در بیان ژن GUS تحت کنترل این پیش‌بر مشاهده می‌شود (اثر موضعی سالیسیلیک‌اسید). همچنین استعمال خارجی سالیسیلیک اسید همانند اثر القاء بیمارگرها، باعث ظهور مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) در اندام‌های مختلف گیاه از جمله قسمت‌های سالم و تیمارنشده گیاه می‌شود (Ryals *et al*., 1996; Pieterse and van Loon, 1999; Grant and Lamb, 2006). با توجه به اینکه با گذشت زمان از القاء هورمون‌های دفاعی گیاهی یا حمله بیمارگر، تولید و انتقال مولکول‌های پیام‌رسان دفاعی به قسمت‌های مختلف گیاه افزایش می‌یابد (Heil and Ton, 2008)، در این مطالعه نیز انتشار سیستمیک سالیسیلیک‌اسید و مقاومت اکتسابی حاصل ۲۴ ساعت پس از القاء سالیسیلیک‌اسید باعث بیان ژن بتاگلوکرونیداز در برگ مستقیما تیمار نشده (SA^-_{24}) گردید.

اثرات تنظیم کننده رشد گیاهی سالیسیلیک اسید بر القاء پیش‌برهای مصنوعی حاوی عناصر تنظیمی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Yang *et al*., 2000; Liu *et al*., 2011; Shokouhifar *et al*., 2011; Yeri *et al*., 2013) ولی تأثیر این تیمار بر پیش‌بر حاوی دو نسخه از Box D تاکنون بررسی نشده است. با این‌حال تأثیر آلودگی بیمارگری بر القاء پیش‌برهای حاوی عنصر تنظیمی Box D در

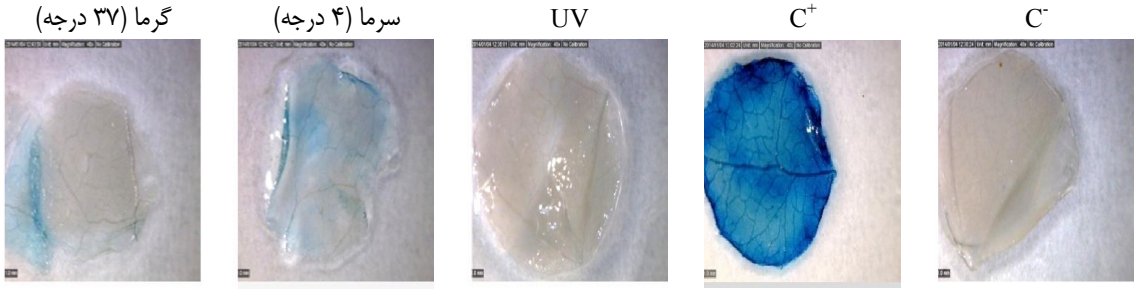
مطالعات بسیار اندکی مورد توجه قرار گرفته است. برای مثال در مطالعه انجام شده توسط Rushton و همکاران (۲۰۰۲) روی مقایسه پیش‌برهای مصنوعی شامل عناصر تنظیمی سیس متفاوت، قرار گرفتن چهار نسخه از عنصر Box D در یک پیش‌بر مصنوعی، با فقدان بیان پایه و القاپذیری به وسیله زخم در گیاه آرابیدوپسیس همراه بود. همچنین پیش‌بر مزبور با القاء قارچ بیمارگر گیاهی بیوترف *Peronospora parasitica* و قارچ بیمارگر گیاهی غیر میزبان *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*، تراژن خود را بیان نکرد. در حالیکه با القاء قارچ *Erysiphe cichoracearum* و باکتری بیمارگر گیاهی نکروترف *Pseudomonas syringae* تراژن به خوبی بیان شد. مقایسه قرار گرفتن تعداد نسخه‌های متفاوت از Box D در پیش‌برهای مصنوعی در همین تحقیق نشان‌دهنده این بود که اگرچه افزودن تعداد نسخه‌ها در یک پیش‌بر، قدرت پیش‌بر را افزایش می‌دهد، با این‌حال به دلیل اثرات سوء افزایش بیان پایه، وجود دو نسخه از این عنصر با بیشترین القاپذیری پیش‌برحاصل همراه می‌باشد (Rushton *et al*., 2002).

در این تحقیق، تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث القای پیش‌بر SP-DD حاوی دو نسخه از عنصر القایی Box D شد که این القاپذیری با گذشت ۲۴ ساعت از زمان القاء بطور محسوسی قابل مشاهده بود. همچنین قرار گرفتن دو نسخه از Box D با عدم وجود بیان پایه همراه بود که با مطالعه انجام شده توسط Rushton و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد.

اعمال تنش‌های محیطی گرما، سرما و اشعه ماوراء بنفش (UV)

بررسی اثر تنش‌های محیطی بر القاء پیش‌برهای مصنوعی حائز اهمیت بوده و در مطالعه آنالیز پیش‌برها در نظر گرفته می‌شود. عدم حساسیت پیش‌برهای مصنوعی القاپذیر با بیمارگر نسبت به عوامل محیطی امتیاز مثبتی برای این پیش‌برها محسوب شده و القاپذیری آنها را به نسبت به بیمارگر محدود می‌سازد (McDowell and Woffenden, 2003;2005 Gurr and Rushton). تاکنون پیش‌برهای متفاوت حاوی عناصر تنظیم‌کننده مختلفی به کار گرفته شده و تأثیر تنش‌های محیطی بر آنها بررسی شده است (Yang *et al*., 2000 ;Shokouhifar *et al*., 2011). بر اساس گزارش‌های ارائه شده، تعدادی از پیش‌برهای مصنوعی القاپذیر به بیمارگرها پاسخی به تنش‌های سرما، گرما و ماوراء بنفش نشان نداده‌اند که می‌توان به پیش‌برهای حامل توالی‌های تنظیمی E17 و F متعلق به گروه دیگری از عناصر تنظیمی یعنی W box اشاره نمود. این عناصر القاپذیری مناسبی را به برخی بیمارگرها نشان داده و در عین حال نسبت به تیمار تنش‌های محیطی فاقد حساسیت می‌باشند (Shokouhifar *et al*., 2011).

اثر القایی برخی تنش‌های محیطی بر تعدادی از عناصر تنظیمی نیز تاکنون به اثبات رسیده است (Rushton *et al*., 2002). با این‌حال تأثیر تنش‌های محیطی بر القاء پیش‌برهای مصنوعی حاوی دو نسخه از عنصر تنظیم‌کننده Box D مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این راستا اثر برخی تنش‌های محیطی مانند سرما، گرما و اشعه UV بر روی پیش‌بر مصنوعی مورد استفاده اعمال شد. بدین منظور بر اساس روش Yang و همکاران (۲۰۰۰)، دیسک‌های برگی از محل تزریق نمونه ها ۴۸ ساعت پس از اگروانیجکشن تحت تنش قرارگرفت. سپس فعالیت پیش‌بر با سنجش فعالیت ژن گزارشگر بتاگلوکرونیداز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد در نمونه‌های دریافت‌کننده پیش‌بر SP-DD در اثر تیمار گرما و سرما، فعالیت محدود آنزیم بتاگلوکرونیداز قابل مشاهده است. همچنین این ناقل در اثر القاء تیمار اشعه UV، ژن GUS را در هیچ یک از تکرارها بیان نکرد. ناقل pGCGi نیز به عنوان شاهد مثبت و GV3101 بدون ناقل به عنوان شاهد منفی استفاده شدند (شکل ۵).



شکل ۵- اثر تیمار گرما و سرما و اشعه UV در القاء پیش‌بر SP-DD در مقایسه با کنترلهای مثبت و منفی، ایجاد رنگ آبی نشان‌دهنده بیان اندک ژن GUS در اثر تنشهای سرما و گرما می باشد، تصاویر با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال Dino-Lite با بزرگنمائی ۴ برابر تهیه شده است.

بیان اندک ژن تحت کنترل پیش‌بر القایی SP-DD با تیمارهای سرما و گرما، ناشی از زخم شدن بافت برگی هنگام تهیه دیسک نمی‌باشد چرا که در اینصورت ژن بتاگلوکرونیداز موجود در این ناقل می‌باید با توجه به نحوه مشابه تهیه دیسک‌های برگی، در اثر القاء اشعه ماوراء بنفش نیز بیان شود که این حالت مشاهده نشد. همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شده که توالی‌های Box D، القاپذیری با زخم را نشان نمی‌دهند (Rushton *et al*., 2002).

در برخی تحقیقات نشان داده شده که فعالیت پیش‌برهای القاپذیر با بیمارگر علاوه بر خود بیمارگر، در اثر عوامل محیطی مانند سرما یا NaCl نیز القاء می‌شود که نشان‌دهنده عملکرد پیچیده ژن‌های مؤثر در مسیرهای دفاعی گیاه بوده که سبب در کنار هم قرار گرفتن عناصر حساس به عوامل بیماریزایی و عناصر حساس به تنش‌های محیطی مانند سرما و گرما در بسیاری از پیش‌برهای القایی می‌شود. این امر حساسیت همزمان پیش‌بر القاپذیر به بیمارگرها با عوامل متنوع محیطی را سبب می‌شود (Shokouhifar *et al*., 2010; Lee *et al*., 2007). با این حال اثر القایی اندک تنش‌های محیطی روی پیش‌بر القایی مورد مطالعه در این بررسی نشان دهنده حساسیت کم عناصر D به کار رفته در ساختار این پیش‌بر به تیمارهای سرما و گرما می‌باشد. از طرفی عدم حساسیت این پیش‌بر نسبت به تیمار اشعه UV یک ویژگی مناسب برای آن محسوب می‌شود.

پیش‌بر مصنوعی SP-DD مورد استفاده در این مطالعه به روش بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم به گیاه انتقال داده شد، نسبت به تنش‌های محیطی سرما و گرما اندکی القاء شد در حالی‌که تنش اشعه UV روی بیان ژن بتاگلوکرونیداز تحت کنترل این پیش‌بر بی‌اثر بود. همچنین پیش‌بر مورد آزمایش نسبت به تیمار خارجی سالیسیلیک اسید ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار به صورت مستقیم و غیرمستقیم به نحو بارزی القاء شد در حالی‌که تیمار سالیسیلیک‌اسید اندکی پس از استعمال آن (۲ ساعت)، روی القاء ناقل اثر اندکی داشت. در این مطالعه از روش بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم برای تراریختی ناقل به گیاه و آنالیز *in vivo* پیش‌برهای منتقل شده استفاده شد. کارایی استفاده از بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم در آنالیز پیش‌برهای مصنوعی در تحقیقات متعدد اثبات شده است (Yang *et al*., 2000; Liu *et al*., 2011). با استفاده از این روش، آنالیز عملکرد پیش‌برهای مصنوعی نسبت به روش بیان دایمی با سرعت و سهولت بیشتری همراه است. البته درمورد آنالیز پیش‌برهای مصنوعی بر پایه سیستم بیان موقت محدودیت‌هایی نیز وجود دارد برای مثال بررسی‌های بیان موقت بر پایه اگرواینفیلتراسیون (اگرواینجکشن) ممکن است برای

تشخیص فعالیت پیش‌برهای ویژه بافت یا ویژه مرحله نموی مناسب نباشند و احتمالاً بیان دایمی برای مطالعه این پیش‌برها مورد نیاز است. هم‌چنین ضروری است اثر القائی سلول‌های اگروباکتریوم تزریق شده بر پیش‌برها به ویژه پیش‌برهای القاپذیر مورد توجه قرار گیرد.

بر اساس مطالعات انجام شده، سالسیسلیک‌اسید توانایی فعال کردن پاسخ‌های دفاعی موضعی و سیستمیک در گیاه را دارا می‌باشد (Ryals *et al.*, 1996; Pieterse and van Loon, 1999). نتایج مطالعه حاضر نشان داد عنصر D نسبت به تیمار سالیسیلیک‌اسید حساس است و کاربرد خارجی این هورمون سبب فعال شدن پیش‌بر SP-DD و در نهایت بیان ژن گزارشگر به صورت موضعی و سیستمیک می‌شود. از طرفی پاسخ عنصر D به بیمارگرهای بیوتروف، نکروتروف و غیرمیزبان توسط دیگر محققان نیز گزارش شده بود (Rushton *et al.*, 2002). هرچند مطالعات نشان داده است که مسیر پیام‌رسانی سالیسیلیک‌اسید توسط گیاهان در مقابله با بیمارگرهای بیوتروف بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Glazebrook, 2005). بر این اساس، نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر و گزارش‌های قبلی تایید می‌کند که عنصر D بوسیله مسیر پیام‌رسانی مرتبط با سالیسیلیک اسید قابل القاء است.

با توجه به نقش سالیسیلیک‌اسید در مسیر پیام‌رسانی مقاومت به بیمارگرهای بیوتروف، طراحی آزمایش‌های بعدی در جهت ترسیم رابطه مشخص القاء بیمارگرها بخصوص بیمارگرهای بیوتروف بر این پیش‌بر و بررسی قدرت پاسخدهی نسبت به آنها می‌باشد. همچنین تعیین وضعیت القاپذیری پیش‌بر SP-DD نسبت به سایر مولکول‌های پیام‌رسان دفاعی گیاه از جمله جاسمونیک‌اسید (که با سالیسیلیک‌اسید رابطه آنتاگونیستیک دارد) و نیز اتیلن از اهمیت برخوردار می‌باشد. از طرفی، با توجه به نتایج بدست آمده در ارتباط با حساسیت اندک پیش‌بر مورد مطالعه با تنش‌های سرما و گرما، لزوم بررسی‌های تکمیلی در این زمینه احساس شده و پیشنهاد می‌شود اثر تنش‌های گرما، سرما و اشعه UV در فواصل زمانی مختلف بر روی ناقل بررسی شود و نیز در تعداد، ترکیب و یا فاصله عنصر Box D با سایر عناصر سیس تغییراتی اعمال گردد تا اثرات محیطی بر القاء پیش‌بر کاملاً حذف گردد.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه (زیستا) شرکت دانش‌بنیان زیست تروندآرین به جهت فراهم نمودن شرایط آزمایشگاهی انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

REFERENCES

Boller T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annual Review of Plant Biology. 46(1): 189-214.

Cervera M (2004) Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. In Transgenic Plants: Methods and Protocols. Springer. 286: 203-213.

Glazebrook J (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. Annual Review of Phytopathology. 43: 205-227.

Grant M, Lamb C (2006) Systemic immunity. Current Opinion in Plant Biology. 9(4): 414-420.

Gurr SJ, Rushton PJ (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? Trends in Biotechnology. 23(6): 275-282.

Hammond-Kosack KE, Jones J (1996) Resistance gene-dependent plant

defense responses. The Plant Cell. 8(10): 1773.

Heil M, Ton J (2008) Long-distance signalling in plant defence. Trends in Plant Science. 13(6): 264-272.

Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology. 5(4): 325-331.

Lee SC, Kim DS, Kim NH, Hwang BK (2007) Functional analysis of the promoter of the pepper pathogen-induced gene, *CAPIP2,* during bacterial infection and abiotic stresses. Plant Science. 172(2): 236-245.

Liu W, Mazarei M, Rudis MR, Fethe MH, Stewart CN Jr (2011) Rapid *in vivo* analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytosensing. BMC Biotechnology. 11(1): 108.

McDowell JM, Woffenden BJ (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends in Biotechnology. 21(4): 178-183.

Pieterse CMJ, van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends in Plant Science. 4(2): 52-58.

Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. The Plant Cell Online. 14(4): 749-762.

Ryals JA, Neuenschwande UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. The Plant Cell. 8(10): 1809.

Shokouhifar F, (2009) Construction and functional analysis of pathogen inducible promoters in canola. Dissertation, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

Shokouhifar F, Zamani MR, Motallebi M, Mousavi A, Malboobi MA (2010) Construction and functional analysis of a pathogen inducible synthetic promoter in response to some biotic and abiotic stresses in Canola. Iranian Journal of Plant Pathology. 45(3): 49-51.

Shokouhifar F, Zamani MR, Motallebi M, Mousavi A, Malboobi MA (2011) Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in *Brassica napus.* Biologia Plantarum. 55(4): 689-695.

Shokouhifar F, Mottalebi M, Zamani MR (2014) Construction of *pGCGi,* an expression vector carries intron containing GUS and analysis using micro-bombardment and agroinjection. Iranian Journal of Plant Biology: 97-110.

Weigel D, Glazebrook J (2005) Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. CSH Protocols. 2006(7): 1031-1036.

Yang Y, Li R, Qi M (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. The Plant Journal. 22(6): 543-551.

Yang B, Jiang Y, Rahman MH, Deyholos MK, Kav NN (2009) Identification and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in canola *(Brassica napus* L.*)* in response to fungal pathogens and hormone treatments. BMC Plant Biology. 9(1): 68.

Yeri SB (2009) Functional analysis of synthetic promoters and construction of expression cassettes with *xynA*. Dissertation, University of Agricultural Sciences, Dharwad.

Yeri SB, Bhat RS, Kuruvinashetti MS (2013) Functional analysis of synthetic promoters containing pathogen-responsive *cis*-elements. Molecular Plant Breeding. 4(34): 270-276.