Crop Biotech.
Vol.2, No. 2, Spring and Summer 2012

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره دوم، بهار و تابستان ۱۳۹۱ (۸۵-۷۳)

بررسی ایمنوشیمی و عملکرد استیل ترانسفراز مخمری (*AYT1*) در سم‌زدایی مایکوتوکسین دی‌اکسی نیوالنول در گیاهان توتون تراریخت

سمیرا شهبازی[۱]*، ناصر صفایی[۲]، امیر موسوی[۳]، فروغ سنجریان[۳] و عزیزاله علیزاده[۲]
۱، گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی ایران، کرج
۲، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳، دانشیار و استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی‌ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

Immunochemical and Functional Analysis of Yeast Acetyltransferase Gene (*AYT1*) in Detoxification of DON in Transformed Tobacco Plants

S. SHAHBAZI[1]*, N. SAFAIE[2], A. MOUSAVI[3], F. SANJARIAN[3] AND A. ALIZADEH[2]
1, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, 2, Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, 3, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran
(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

Abstract

Fusarium Head Blight (FHB), which is caused commonly by *Fusarium graminearum*, has ability to result significant reduce in yield and also cause indirect losses due to the accumulation of potent mycotoxins (trichothecenes) in harvested grain as secondary metabolites; which are hazardous for human and animal health. Trichothecene mycotoxins (such as deoxynivalenol, DON) are potent protein synthesis inhibitors for eukaryotic organisms. Trans expression of *AYT1* gene from *S. cerevisiae* is capable of trichothecene 3-*O*-acetylation and converts DON to a less toxic acetylated form. One of the detoxification and resistance to mycotoxins is acetylation. The main goal of this study is to evaluate tolerant of tobacoo, transgenic tobacco model plants to DON. In order to detect expression of the *AYT1* transgene, we added *cMyc* tag via PCR-Tagging method and introduced it into tobacco plants through Agrobacterium-mediated transformation in an attempt to detoxify DON. Then integration of *AYT1-cMyc* gene into the tobacco genome confirmed by molecular analyses, Immuno-blotting and serological protein studies and trichothecene acetyl transferase activity analysis confirmed the expression of *AYT1* and tolerance to 10 ppm concentration of DON in transgenic lines was observed.

Keywords: Fusarium head blight, DON, Acetyltransferase, Immunoblotting, ELISA

چکیده

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (Fusarium Head Blight, FHB) که به‌وسیله قارچ *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود، قادر است علاوه بر کاهش چشمگیر عملکرد، خسارت غیرمستقیمی را نیز از طریق تجمع مایکوتوکسین‌ها (تریکوتسین‌ها) در دانه‌های برداشت‌شده وارد سازد که محصول را برای تغذیه انسان و دام نامناسب می‌نماید. تریکوتسین‌ها (مانند دی‌اکسی نیوالنول یا DON) ممانعت‌کنندگان سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها می‌باشند. محصول ژن *AYT1* در مخمر *S. cerevisiae* توانایی ۳-*O*- استیلاسیون تریکوتسین‌ها را داراست و می‌تواند DON را به فرم استیله که از سمیت پایین‌تری برخوردار است تبدیل کند. استیلاسیون یکی از مکانیسم‌های سم‌زدایی و ایجاد مقاومت به مایکوتوکسین‌هاست، در این مطالعه ژن *AYT1* (استیل ترانس فراز مخمری) با استفاده از آگروباکتریوم به گیاه مدل توتون انتقال داده شد تا امکان ایجاد مقاومت نسبی به این بیماری مورد بررسی قرار گیرد. به‌منظور سهولت پیگیری بیان تراژن مذکور اپی‌توپ *c-Myc* با استفاده از تکنیک PCR-Tagging به آن افزوده شد. پس از آنالیزهای مولکولی و تایید تراریختی، مطالعات ایمنولوژیک با روش‌های لکه‌گذاری و الیزا بر روی لاین‌های تراریخت برای بررسی بیان *AYT1-cMyc1* انجام شد. علاوه بر آن فعالیت استیل ترانسفرازی تراژن مذکور بر روی DON با تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک مشاهده شد. گیاهان تراریخت تحمل نسبی به غلظت ۱۰ppm مایکوتوکسین در ارزیابی‌های درون‌شیشه‌ای نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله گندم، دی‌اکسی نیوالنول، استیل ترانسفراز، ایمونوبلاتینگ، الیزای غیرمستقیم

* نویسنده مسئول: سمیرا شهبازی
E-mail: sshahbazi@nrcam.org

مقدمه

مایکوتوکسین داکسی نیوالنو[1] که به وسیله *Fusarium graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی خوشه گندم[2] تولید می‌شود، از دسته تریکوتسن[3] هاست (Bai *et al*. 2002) که مصرف دانه‌های آلوده با آن آثار نامطلوبی بر سلامتی انسان و حیوانات بر جای می‌گذارد (Chen *et al*. 2000). DON یک ممانعت‌کننده سنتز پروتیین در یوکاریوت‌هاست که در مراحل بیماری‌زایی قارچ با ایجاد اختلال و یا به تأخیر انداختن بیان پروتئین‌های مرتبط با مقاومت در گیاه باعث تشدید بیماری می‌شود (Eudes *et al*. 2000). فرم‌های شیمیایی مختلف یک مولکول تریکوتسنی (مانند DON و 3A-DON) سمیت متفاوتی بر روی سلول‌های گیاهی دارند. نتایج مطالعات انجام‌شده نشان داده است که استیلاسیون گروه هیدروکسیل C3 تریکوتسن‌ها از سمیت آن‌ها به میزان قابل توجهی می‌کاهد (Kimura *et al*. 1998). لذا، این تئوری قوت گرفت که از طریق تبدیل DON به ترکیب کمتر سمی 3A-DON می‌توان مقاومت گیاهان به DON و به دنبال آن تحمل به بیماری FHB را در غلات افزایش داد. یکی از ژن‌های ضروری در بیوسنتز تریکوتسن‌ها، ژن *Tri*101 است که از جمله مکانیسم‌های خود ایمنی قارچ *F. graminearum* نیز می‌باشد و از طریق استیله‌کردن مایکوتوکسین‌های تریکوتسنی به ترکیباتی با درجه سمیت پایین‌تر، از قارچ در برابر توکسین‌های خودش محافظت می‌نماید (Manoharan *et al*. 2006). کلنی‌های *Schizosaccharomyces pombe* تراریخت با *Tri*101 تحمل به سطوح مختلف T2 توکسین (از دسته تریکوتسن‌ها) را بروز دادند (Kimura *et al*. 1998)، و گزارشاتی نیز مبنی بر تشدید تحمل به DAS[4] (یکی دیگر از تریکوتسن‌ها) در توتون‌های تراریخت با ژن *Tri101* وجود دارد (Muhitch *et al*. 2000). بیان تراژن *Tri101* در گیاه برنج سبب بروز مقاومت به ۴۰ ug/ml DON در ارزیابی‌های درون‌شیشه‌ای شده‌اند (Ohsato *et al*. 2007) و اسپورپاشی سنبله‌های برنج نسل سوم تراریخت با *Tri101* با اسپورهای قارچ *F. graminearum* نیز سطوحی از مقاومت را در بررسی‌های گلخانه‌ای نشان دادند (Kimura *et al*. 2006). نسخه‌ای از استیل ترانسفراز بر روی کروموزوم شماره ۷ مخمر *Saccharomyces cerevisiae* (ORF-Y1106Bc) شناسایی شده که *AYT1* نامگذاری شده است و محصول آن از لحاظ ساختمانی و عملکردی شبیه به TRI101 است (Alexander *et al*. 2002). نتایج تحقیقات انجام یافته در بررسی عملکرد *AYT1* نشان داده است که این ژن در افزایش مقاومت مخمر در برابر تریکوتسن ها نقش دارد (Alexander *et al*. 2002).

از آن‌جایی‌که بررسی عملکرد این ژن در گیاه و بیان پروتئینی آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است و بررسی‌های ایمنولوژیک نیز با دشواری‌هایی روبروست، در این مطالعه، اپی‌توپ *cMyc*[5] به ژن استیل ترانسفراز (*AYT1*) با استفاده از PCR-Tagging افزوده شد تا بیان تراژن در لاین‌های تراریخت توتون با سازه‌ژنی *AYT1-cMyc* با استفاده از آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ *cMyc* بررسی شود. تحمل نسبی مشاهده شده در گیاهان تراریخت به مایکوتوکسین DON در ارزیابی‌های درون‌شیشه‌ای، به فعالیت استیل ترانسفرازی تراژن *AYT1-cMyc* بر روی DON در عصاره به‌دست‌آمده از این گیاهان نسبت داده شد.

1. (DON) Deoxynivalenol
2. Fusarium haed blight(FHB)
3. Trichothecene

4. 4,15-diacetoxyscirpenol
5. با توالی ده‌تایی EQKLISEEDL

مواد و روش‌ها

همسانه‌سازی ژن *AYT1*

پس از استخراج DNA ژنومی مخمر [از کلنی منفرد حاصل از کشت مایه خمیر (ایران مایه، تهران، ایران) بر روی محیط YPD] با روش Hoffman and Winston (1987)، ژن *AYT*1 با انجام واکنش PCR بر روی ۵۰ng از DNA ژنومی به‌عنوان رشته الگو و جفت آغازگرهای AYT1Fw و AYT1Re (طراحی‌شده با استفاده از توالی ژن *AYT*1 مخمر موجود در بانک‌ژن NCBI با شماره دسترسی NC-001144، جدول ۱) و unit ۱ از آنزیم Expand DNA polymerase (Roche, Manheim, Germany) تکثیر گردید. شرایط دمایی واکنش شامل، دمای واسرشت‌شدن ۹۳ºC (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال ۵۶°C (۶۰ ثانیه)، دمای طویل‌شدن ۷۲ºC (۶۰ ثانیه) بود که برای ۳۰ چرخه تکرار و مرحله طویل‌شدن نهایی ۷۲ºC به مدت ده دقیقه بود. محصولات PCR در ناقل پلاسمیدی pBluescript SK (Strategen) همسانه‌سازی شدند تا در مرحله افزودن اپی‌توپ به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گیرند.

افزودن اپی‌توپ به ژن *AYT1* با استفاده از PCR Tagging

واکنش PCR به‌منظور افزودن اپی‌توپ، طی سه مرحله و با طراحی آغازگر AYT1MYC-FW (انتهای '3 ژن *AYT*1 بدون کدون پایان و ابتدای توالی اپی‌توپ) و آغازگر برگشتی MYC-RV (انتهای توالی اپی‌توپ) که در جدول ۱ نشان داده شده‌اند، انجام پذیرفت. در مرحله اول ۰/۵ µM از هر یک از آغازگرهای AYT1MYC-FW و MYC-RV با استفاده از ۰/۵unit از آنزیم Expand DNA polymerase (Roche,Manheim, Germany) و دمای اتصال ۴۷°C (۶۰ ثانیه و ۱۰ چرخه) مگاپرایمری را تکثیر کردند که شامل انتهای ژن و کل توالی اپی‌توپ می‌شد. سپس با جفت آغازگرهای AYT1Fw و محصول PCR مرحله قبل (مگا پرایمر) و ژن *AYT*1 همسانه‌سازی‌شده در pSK به‌عنوان الگو، سازه ژنی *AYT1-cMyc* به‌دست آمد. در شرایط دمایی و زمانی شامل دمای واسرشت‌شدن ۹۳ºC (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال ۴۷°C (۶۰ ثانیه)، دمای طویل‌شدن ۷۲ºC (۶۰ ثانیه)، با ۲۰ چرخه تکرار و مرحله طویل‌شدن نهایی ۷۲ºC (ده دقیقه) بود. برای بالابردن تعداد نسخه‌های تکثیرشده یک واکنش PCR نهایی با ۰/۵µM آغازگرهای انتهایی AYT1ATG1 و MYC-RV و unit ۱ از آنزیم Expand DNA polymerase با همان شرایط دمایی و زمانی و این بار با ۳۰ چرخه بر روی محصول مرحله دوم PCR تکرار گردید. سپس سازه‌ژنی *AYT1-cMyc* در ناقل پلاسمیدی pBluescript SK (Strategen) همسانه‌سازی‌شده و به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد. توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی‌شده توسط شرکت MWG -Biotech (Ebersburg, Germany) انجام گرفت. صحت توالی قطعه *AYT1-cMyc* همسانه‌سازی‌شده با مقایسه با توالی ژن *AYT1* موجود در بانک‌ژن تایید شد. هم‌ردیفی توالی‌ها (نوکئوتیدی و آمینواسیدی) با جستجوگر BLASTn Ver. 2.2.10 [Oct-19-2004] موجود در بانک‌ژن NCBI انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای به‌کار گرفته شده در همسانه‌سازی سازه ژنی *AYT1-cMyc*

AYT1-Fw	5'–ATCGAATTCGAAGGTAGATGGATGTTTAGAG- 3'
AYT1-Re	5'–TAGTCGACATATCATCATCCTATATGTGTAG- 3'
AYT1MYC-FW	5'–TATGGACGCCTGAAGGCTGAACAAAAGCTTATTTCTGAA-3
MYC-RV	5' –TTGAGCTCAAAGATCTTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTC- 3

تراریختی گیاهان توتون با سازه‌ژنی *AYT1-cMyc*

قطعه *AYT1-cMyc* با دو آنزیم محدودگر *Bam*HI, *Sac*I از ناقل همسانه‌سازی خارج (شکل۱) و در ناقل دوگانه pBI121 (CLONTECH) همسانه‌سازی گردید؛ سپس با روش انجماد و ذوب به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال داده شد. برای تراریختی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) از برگ‌های جوان و بالغ، قطعات ۲۰ تا ۲۵ میلی‌متری بریده و به‌مدت ۱ دقیقه در سوسپانسیون سلولی باکتری تراریخت حاوی ساختار موردنظر غوطه‌ور شدند. سپس مرحله هم‌کشتی به‌مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵°C در محیط هم‌کشتی (CoC) سپری شد (جدول ۲). پس از این مرحله، ریزنمونه‌ها پس از شستشو با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ mg/L به محیط القاء شاخه‌زایی (SIM) منتقل شدند تا شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین رشد و تمایز یابند. آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰mg/L برای مهار رشد آگروباکتریوم به‌کار گرفته شد. پس از رشد مناسب، شاخه‌ها جدا گردیدند و به محیط طویل‌شدن شاخه (SEM) منتقل شدند. پس از ۱۴ روز شاخه‌های سبز به محیط القاء ریشه‌زایی (RIM) واکشت شدند. گیاهچه‌های تراریخت‌شده‌ای که در محیط ریشه‌زایی به اندازه کافی رشد یافته بودند پس از شستشوی کامل ریشه‌ها با جریان ملایم آب به نحوی که محیط کشت از ریشه‌ها به‌طور کامل زدوده شده باشد به گلدان‌های پلاستیکی استریل (قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی خاک (نسبت ۱:۱:۱ از پرلیت، پیت و ورمیکولیت) اتوکلاوشده منتقل شدند و با سرپوش‌های شفاف پلاستیکی (برای حفظ رطوبت گیاهان و گذر از مرحله انطباق با محیط گلخانه) پوشانده شدند و در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. آبیاری هر ۴۸ ساعت یک‌بار با محیط مایع ۱/۲MS انجام و پس از یک هفته سرپوش‌ها به تدریج سوراخ‌دار شدند تا انطباق با شرایط گلخانه به‌طور کامل انجام پذیرد. این گیاهان تا مرحله بذردهی نگه‌داری شدند. گیاهان توتون تراریخت با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 دارای ژن گزارشگر GUS نیز با همین روش باززایی و گیاهان تراریخت حاصله به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بذرهای حاصل خودلقاحی نسل T0 جمع‌آوری گردیده و برای ارزیابی مقاومت به توکسین استفاده گردیدند.

جدول ۲- ترکیب محیط های کشت مورد استفاده در تراریختی گیاهان توتون

Components	CoC	SIM	SEM	RIM
MS Salt	1X	1X	1X	1/2X
Agar (gl/L)	7	7	7	7
Sucrose	3%	3%	3%	3%
BAP(mgl/L)	0	1	1	0
NAA(mg/L)	0.1	0.1	0.1	1
Kanamycin	0	100	100	100
Cefotaxim	0	500	500	200
pH	5.5	6	5.7	5.7

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت

برای این منظور ابتدا DNAی ژنومی، از برگ‌های جوان و سبز گیاهان توتون تراریخت استخراج گردید (Bai and Shaner. 2004) و سپس با استفاده از آغازگر AYT1-ATG1 و MYC-RV و شرایط مشابه با شرایط تکثیر ژن *AYT1*، انتقال تراژن به لاین‌های باززایی‌شده مورد بررسی قرار گرفت. برای اثبات نسخه‌برداری از تراژن *AYT1*، ابتدا RNA کل با کیت RNX-Plus™ (Cinna Gen, Iran) استخراج و سپس cDNA ساخته شد. از آغازگرهای AYT1-ATG1 و MYC-RV جهت تکثیر cDNA مربوطه با همان شرایط واکنش تکثیر ژن *AYT1* استفاده شد. این دو آغازگر قطعه‌ای معادل ۱/۴ kb را تکثیر می‌نمایند.

بررسی ایمنولوژیک پروتئین *AYTI-cMyc* با استفاده از روش لکه‌گذاری

غشاء PVDF (Roche, Germany) پس از این‌که به‌مدت ۳۰ ثانیه در متانول و ۳۰ ثانیه درTBS شامل (۱۰۰mM Tris pH = ۷–۹، ٪۹ NaCl) قرار داده شد، در کاست دستگاه نقطه‌گذار[1] قرار گرفته و معادل ۵ میلی‌گرم از نمونه‌های پروتئین کل استخراج‌شده از گیاهان تراریخت و غیرتراریخت (به‌عنوان کنترل منفی) که با روش Ohsato *et al.* (2007) استخراج پروتئین شده بود، در هر چاهک ریخته و با هواگیری بر روی غشاء تثبیت شد. این غشاء به‌مدت دو ساعت در محلول آنتی‌بادی *cMyc* با رقت ۱/۵۰۰ و ۰/۳ گرم Skim Milk و ۶ml محلول TBS روی شیکر با سرعت ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت و سپس سه مرتبه و هر بار به‌مدت پنج دقیقه با محلول TTBS شامل ٪۲۰ TWEEN TBS+۰/۱ شستشو گردید. غشاء سپس در ۶ml محلول TBS و آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱/۱۰۰۰ به‌مدت دو ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. شستشوی مجدد سه مرتبه و هر بار به‌مدت پنج دقیقه با محلول TTBS انجام شد. در پایان در محلول سوبسترا (شامل ۱۰ µl آب‌اکسیژنه، ml ۱۰ TBS و ml ۱ کلرونفتول) بر روی شیکر قرار داده تا شد تا مرحله آشکارسازی به‌کمک کیت (BIORAD, Germany) انجام پذیرد. پس از ۱۰–۵ دقیقه لکه‌های بنفش رنگ ظاهر شدند که برای تثبیت آن‌ها، غشاء در داخل آب مقطر قرار گرفت.

بررسی ایمنولوژیک پروتئین AYTI-cMyc با استفاده از آزمون الیزا

ابتدا ۳۰ میکرولیتر (معادل ۵ میلی‌گرم) از پروتئین کل استخراج‌شده از برگ‌های گیاهان تراریخت و غیرتراریخت (به‌عنوان کنترل منفی) را با ۸۰ میکرولیتر بافر پوشش‌دهنده (شامل ۱۰/۶ گرم کربنات سدیم، ۸/۴ گرم بی‌کربنات سدیم و ۰/۲ گرم سدیم آزاید در یک لیتر آب مقطر، pH=۹–۶) مخلوط کرده و به‌مدت یک شب در دمای 4^oC در پلیت الیزا پوشش داده شد. آنتی‌بادی اولیه را به نسبت ۱/۵۰۰ با بافر توئین/ کازئین ۱۰X (pH=۸) رقیق کرده و ۵۰ میکرولیتر از محلول حاصل به هر چاهک افزوده شد. پلیت به‌مدت دو ساعت در 37^oC نگه‌داری و سپس با بافر توئین/کازئین X ۱ سه مرتبه شستشو گردید. آنتی‌بادی ثانویه را در سه رقت۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰ با بافر توئین/کازئین X ۱ تهیه نموده و ۵۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد و به‌مدت ۱ تا ۲ ساعت دردمای 37^oC نگه‌داری گردید. پس از سه بار شستشو با بافر توئین/کازئین X ۱ با افزودن سوبسترای OPD (Dak, Cytomation)[2] دارای آنزیم پراکسیداز به چاهک‌ها آشکارسازی انجام و جذب نور در طول موج ۴۹۹ نانومتر و ده دقیقه پس از افزودن سوبسترا ثبت گردید.

بررسی فعالیت آنزیم استیل ترانسفراز تراژن *AYTI-cMyc* با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک[3]

برای حصول اطمینان از فعالیت آنزیمی محصول تراژن *AYTI-c-myc*، براساس روش Ohsato *et al.* (2007) ابتدا پروتئین کل از هفت لاین گیاه تراریخت استخراج شده و سپس با استفاده از سیستم کروماتوگرافی لایه نازک (Ridel-de Haen™, Germany) فعالیت استیله‌کردن پروتئین تراژن مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. محلول اتیل استات/ تولوئن (۱/۳) به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد.

1. Blloter

2. O- Phenyl enediamine di hydrochloride
3. Thin Layer Chromatography (TLC)

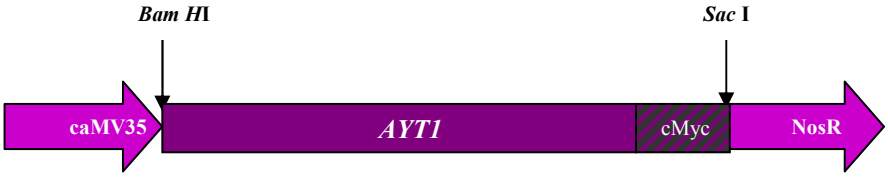
بررسی مقاومت دانه‌رست‌های گیاهان تراریخت به توکسین DON

بذرهای گیاهان تراریخت با هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی و بر روی مش (با قطر منافذ ۱/۱۰ میلی‌متر) در محیط MS کشت شدند. گیاهچه‌ها پس از رسیدن به مرحله دوبرگی به محیط MS مایع حاوی ۵ ppm توکسین DON و یا 3A-DON درون ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند و به‌مدت یک هفته در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر (۱۲۰rpm) قرار داده شدند. در این مرحله، دانه‌رست‌ها به شرایط حضور توکسین سازگاری پیدا می‌کنند. پس از یک هفته دانه‌رست‌ها به محیط حاوی ۱۰ ppm DON و یا 3A-DON منتقل شدند. پس از سه هفته، گیاهان تراریخت و غیرتراریخت از نظر میزان رشد (طول شاخه و ریشه) و وزن‌خشک و تر مورد اندازه‌گیری قرار گرفته و آنالیزهای آماری با نرم‌افزار MSTAT-C Ver.1.42 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد. از گیاهان غیرتراریخت و گیاهان تراریخت دارای پلاسمید pBI121 واجد ژن گزارشگر GUS به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

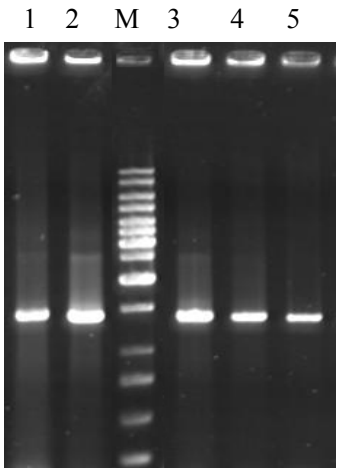
نتایج

همسانه‌سازی سازه‌ژنی *AYT1-cMyc*

محصول PCR از DNA ژنومی مخمر با جفت آغازگرهای AYT1Fw و AYT1Re تکثیر ژن *AYT*1 به‌صورت باند منفرد و در اندازه مورد انتظار (۱/۴Kb) بود که بر روی ژل الکتروفورز ظاهر شد (شکل ۲). محصولات PCR Tagging مرحله دوم و سوم نیز باند منفرد موردانتظار (۱/۴Kb) را نشان دادند که البته شدت باند مرحله سوم بیشتر بوده که ناشی از بالارفتن تعداد نسخه‌های همانندسازی‌شده از رشته الگو حاصل از مرحله دوم با استفاده از آغازگرهای AYT1ATG1 و MYC-RV بود (شکل ۲). صحت توالی قطعه همسانه‌سازی‌شده پس از هم‌ردیفی با توالی موجود در بانک‌ژن مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳).



شکل ۱– طرح شماتیک سازه‌ژنی *AYT1-cMyc* همسانه‌سازی‌شده در ناقل pBI121

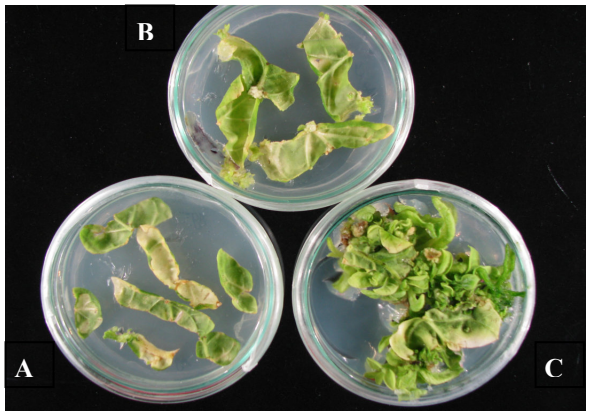


۱) محصول تکثیر ژن *AYT1* از ژنوم مخمری
۲) محصول تکثیر ژن *AYT1* از وکتور نوترکیب pSK$^+$
M) نشانگر 1Kb Ladder (Fermentas)
۳) محصول مرحله سوم PCR -Tagging *AYT1-c-myc*
۴) محصول مرحله دوم PCR -Tagging *AYT1-c-myc*
۵) از وکتورنوترکیب pBluescript SK *AYT1-c-myc*

شکل ۲– افزودن اپی‌توپ به ژن *AYT1* با استفاده از PCR –Tagging

```
AYT1      :MFRVKIISQKRTKSVQMLENDQLDILGQQPSLYKLYTQICSIYRVPDPSAHDHIVNTLTRGLETLAKNFQ  :84
AYT1cMyc:.............................................................................  :84

AYT1      :WLAGNVVNEGADEGNTGTYRIVPSDKIPLIVQDLREDLSAPTMDSLEKADFPIYMLDEKTFAPCMTINPP  :168
AYT1cMyc:.............................................................................  :168

AYT1      :GNTIGMAAKSGPVFAVQANFISGGLVLTIVGQHNIMDITGQESIINLLNKSCHQKPFSDEELLIGNIDKS  :252
AYT1cMyc:.............................................................................  :252

AYT1       :KSIPLFDETWEPDTTLVHEIVETSRNTSGEEKEQSCSSNSTWAYVEFSAISLQNLRILAMQTCTSGT   :336
AYT1cMyc:.............................................................................  :336

AYT1       :STDDIVTAFIWKSVSRARLSRLKPETKSNLGRAVDVRKRLGLPETYPGLLVNMTFNTGSLKSLDHKSL  :420
AYT1cMyc:.............................................................................  :420

AYT1       :LASQIRRKLDPKVFDLAYNTCALATLLSRCPDKTKVSIPQPIDTLSGIMVSSWAKVSLYDVDFNLGLG  :504
AYT1cMyc:.............................................................................  :504

AYT1      :KSVRRPRFISLESLIYFMPRSSRGEMVVALCLRDKDWECLNADKEWTNYATHIG              :  588
AYT1cMyc:.....................................................EQKLISEEDL  :  588
```

شکل ۳- هم‌ردیفی اسیدهای آمینه پروتئین AYT1CMYC با توالی موجود در بانک‌ژن که نشان‌دهنده عدم‌تغییر در توالی و افزوده‌شدن اپی‌توپ به پروتئین موردنظر می‌باشد.



شکل ۴- مراحل تراریختی توتون با سازه‌ژنی *AYT1-cMyc*:(A) تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و قراردادن در محیط هم‌کشتی (CoC)، (B) باززایی گیاهچه های تراریخت در محیط القاء شاخه‌زایی (SIM)، (C) تشکیل گیاهچه سبز بر روی محیط انتخابی طویل شدن شاخه (SEM).

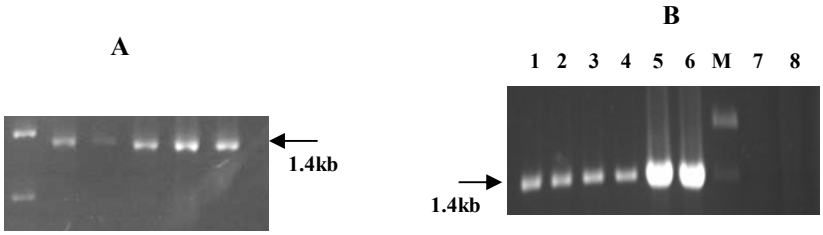
تراریختی گیاهان توتون با سازه‌ژنی *AYT1-cMyc*

پس از طی مراحل باززایی ۳۵ لاین توتون تراریخت با سازه‌ژنی *AYT1-cMyc* به‌دست آمد که از نظر موفولوژیکی تفاوتی با لاین‌های تراریخت‌شده با ناقل دارای ژن گزارشگر GUS و گیاهان غیرتراریخت از خود نشان ندادند (شکل ۴). همچنین با استفاده از روش باززایی مستقیم که در این مطالعه از آن استفاده شد، مرحله کالوس‌زایی به‌طور کامل حذف شد که به نوبه خود از بروز تنوع سوماکلونالی در اثر باززایی از کالوس جلوگیری به‌عمل می‌آورد.

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت

نتایج PCR بر روی DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان تراریخت که بر روی محیط حاوی کانامایسین رشد یافته بودند، با دو آغازگر AYT1ATG1 و MYC-RV قطعه‌ای معادل ۱/۴kb معادل باند به‌دست‌آمده از ناقل pBI121 حاوی ساختار ژنی *AYT1-cMyc* مشاهده شد که

نشان‌دهنده آن است که همگی آن‌ها دارای تراژن موردنظر می‌باشند (شکل ۵). در عین حال، انجام PCR بر روی DNAی ژنومی استخراج‌شده از گیاهان غیرتراریخت و گیاهان تراریخت با پلاسمید pBI121 دارای ژن گزارشگر GUS هیچ‌گونه باندی را با دو آغازگر مزبور نشان نداد. پس از استخراج RNA کل استخراج‌شده از ۲۰ لاینی که تلفیق تراژن در آن‌ها اثبات شده بود، cDNA مربوطه ساخته شد و در نهایت قطعه‌ای با همان اندازه ۱/۴kb با استفاده از دو آغازگر AYT1FW و MYC-RV در لاین‌های تراریخت حاصل تکثیر شد (شکل ۵) که نشان‌دهنده نسخه‌برداری کامل از تراژن مذکور در گیاهان تراریخت حاصله است.



شکل ۵- آنالیز مولکولی لاین‌های تراریخت با gPCR (A) ۱، کنترل مثبت (*AYT1-cMyc* درpBluescript)؛ ۲، کنترل مثبت (*AYT1-cMyc* در pBI121)؛ ۳-۸، گیاهان تراریخت با *AYT1-cMyc*؛ ۹، کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)؛ M، نشانگر 1Kb Ladder (Fermentas) و RT-PCR (B) برای تایید نسخه‌برداری تراژن *AYT1-cMyc*؛ ۱، کنترل مثبت (*AYT1-cMyc* در pBI121)؛ ۲-۶، گیاهان تراریخت با *AYT1-cMyc*؛ ۷، کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)؛ ۸، کنترل منفی (RT-PCR بدون Reverse transcriptase) و M، نشانگر Kb Ladder (Fermentas) ۱.

بررسی ایمنولوژیک بیان تراژن در گیاهان تراریخت با استفاده از روش لکه‌گذاری و آزمون الیزا

بیان تراژن *AYTI-cMyc* با هر دو آزمون ایمنولوژیک لکه‌گذاری پروتئینی و الیزا به اثبات رسید. در پنج لاین توتون تراریخت، لکه‌های مربوط به بیان تراژن موردنظر بر روی غشاء مشاهده شد، درحالی‌که گیاه غیرتراریخت فاقد این لکه بود (شکل۶،۷). نتایج مشابهی نیز از بیان تراژن در آزمون الیزا به‌دست آمد. به‌طوری‌که، میزان جذب نوری در چاهک‌های حاوی پروتئین لاین‌های تراریخت حتی در رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه به‌صورت معنی‌داری بالاتر از چاهک‌های کنترل بود (شکل ۸).

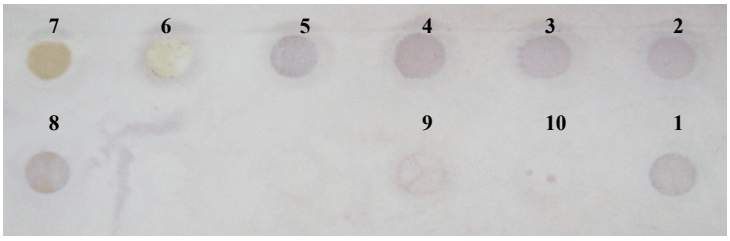
بررسی فعالیت آنزیم استیل ترانسفراز تراژن *AYTI-cMyc*

محصول تراژن *AYT1-cMyc* موجود در پروتئین استخراج‌شده از لاین‌های تراریخت بر روی توکسین DON، فعالیت استیل ترانسفرازی از خود نشان داده و لکه‌های مربوط به حضور 3A-DON در آزمون TLC مشاهده گردید (شکل ۹).

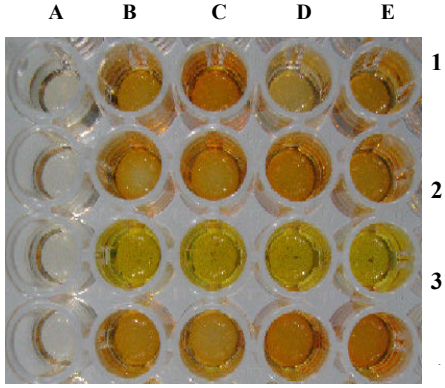
بررسی مقاومت دانه‌رست‌های گیاهان تراریخت به توکسین DON

شاخص‌های طول گیاهچه و ریشه و وزن‌تر و خشک سی دانه‌رست به‌دست آمده از بذور حاصل از خود تلقیحی لاین‌های تراریخت در محیط MS مایع حاوی ppm ۱۰ توکسین DON و یا 3A-DON پس از سه هفته یادداشت‌برداری شد. آنالیزهای آماری نشان دادکه اثر وجود توکسین در محیط کشت و ژنوتیپ گیاه (تراریخت و غیرتراریخت) و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح ۱٪ برای تمام شاخص‌ها معنی‌دار بوده است که نشان‌دهنده رشد طبیعی گیاهان تراریخت در حضور توکسین در مقایسه با

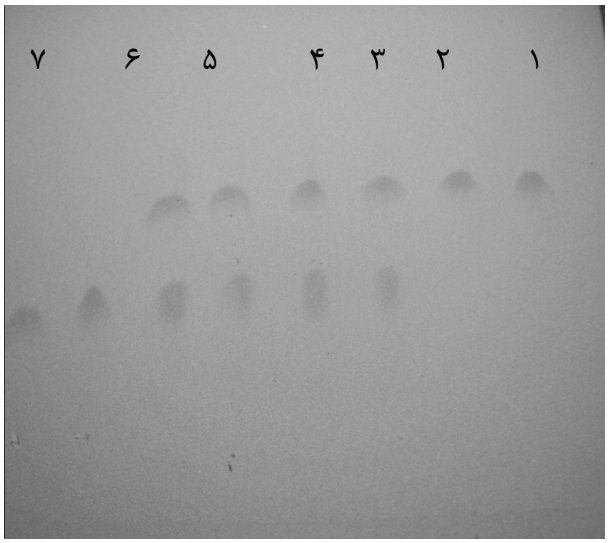
گیاهان غیرتراریخت (شاهد) می‌باشد. همچنین وجود توکسین DON به‌طور معنی‌داری از رشد گیاهان شاهد ممانعت به‌عمل آورده است درحالی‌که تأثیر 3A-DON از آن کمتر بوده است (شکل ۱۰).



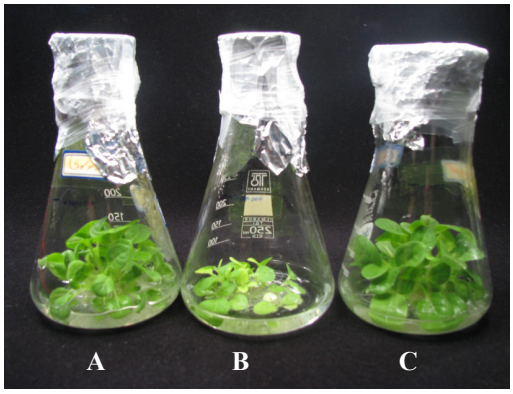
شکل ۶- ردیابی بیان تراژن *AYT1-cMyc* با استفاده از آزمون لکه‌گذاری؛ ۱-۶، لاین های تراریخت T2، T4، T6، T8، T11 و T14؛ ۷، گیاه غیرتراریخت (شاهد)؛ ۸، آنتی بادی؛ ۹، آب مقطر؛ ۱۰، کنترل مثبت



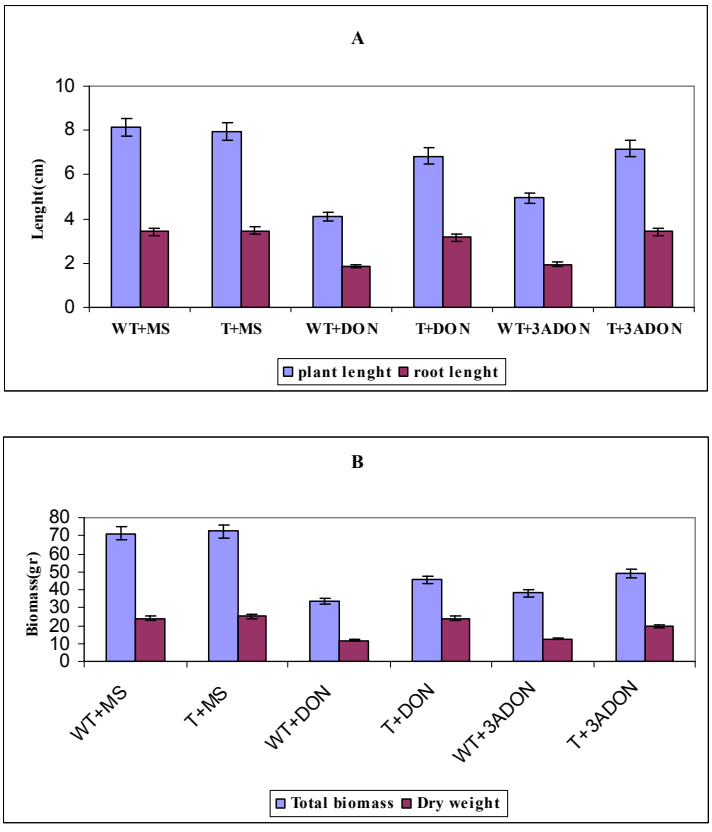
شکل ۷- بررسی میزان بیان تراژن *AYT1-cMyc* با استفاده از آزمون الیزا؛ A، گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی)؛ B-E، لاین‌های تراریخت T2، T4، T6 و T8 با سه رقت آنتی‌بادی ثانویه (1: 1/500, 2: 1/1000, 3: 1/2000)؛ ۴، پروتئین دارای اپی‌توپ (کنترل مثبت)



شکل ۸- فعالیت استیل‌ترانسفرازی پروتئین AYT1-CMYC در گیاهان تراریخت با *AYT1-cMyc*؛ ۱، DON خالص (مارکر)؛ ۲، گیاه غیرتراریخت + DON (کنترل منفی)؛ ۳-۶، گیاه تراریخت + DON؛ ۷، گیاه غیرتراریخت + 3A-DON (کنترل منفی)؛ ۸، 3A-DON خالص (مارکر)



شکل ۹- بررسی میزان تحمل دانه‌رست‌های تراریخت (*AYT1-cMyc*) به توکسین؛ A، گیاهان تراریخت (*AYT1-cMyc*) در حضور DON۱۰ppm ؛ B، گیاهان غیرتراریخت در حضور DON۱۰ppm؛ C، گیاهان تراریخت (*AYT1-cMyc*) در محیط MS فاقد توکسین



شکل ۱۰- گروه‌بندی تأثیر توکسین DON و 3A-DON بر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری‌شده در گیاهان تراریخت با *AYT1-cMyc* (T) و گیاهان شاهد (WT)؛ A، مقایسه رشد طولی و ریشه؛ B، مقایسه وزن‌تر و خشک

بحث

با توجه به محدودیت‌های روش‌های مدیریت کنترل بیماری FHB و عدم‌معرفی ارقامی که سطح قابل قبولی از مقاومت به این بیماری را دارا باشند (Bai and Shaner. 2004)، استفاده از تکنیک‌های دست‌ورزی ژنتیکی به‌منظور انتقال ژن‌های مقاومت از منابع گوناگون (از جمله پاتوژن)، به گیاه میزبان یکی از راهکارهای دست‌یابی به ارقام مقاوم در این بیماری به‌شمار می‌رود. از جمله ژن‌های منتخب برای مقابله با FHB که برای تشدید مقاومت از طریق

کاهش تجمع DON مورد استفاده قرار گرفته است، ژن *Tri*101 از قارچ *Fusarium sporotrichioides* است (Kimura *et al*. 1998) که محصول آن نوعی استیل ترانسفراز می‌باشد که تریکوتسن را به ترکیباتی با سمیت کمتر تبدیل می‌کند. از لحاظ توالی، بین ژن *Tri*101 و سایر O-استیل ترانسفرازهای فوزاریومی شباهت چندانی وجود ندارد و این ژن از لحاظ اندازه و برخی از موتیف‌های مجزا، به استیل ترانسفرازهای گیاهی شبیه است (Kimura *et al*. 1998).

در مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، ژن *AYT*1 شناسایی شده است (Alexander *et al*. 2002)، که محصول آن از لحاظ توالی و عملکرد شباهت بالایی به *TRI*101 دارد و به‌نظر می‌رسد در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسن‌ها نقش دارد (Alexander *et al*. 2002). در جدایه‌های مخمر *Saccharomyces cerevisiae* که ژن *pdr5* آن‌ها با جهش‌دار غیرفعال شده بود (این ژن یک پمپ سیتوپلاسمی است که با پمپ‌نمودن توکسین به فضای بین‌سلولی مقاومت مخمر در حضور توکسین را افزایش می‌دهد) بیان *AYT*1 توانسته است حساسیت به DON را سرکوب نماید (Abolmaali *et al*. 2008). به‌علاوه، گزارشاتی از افزایش تحمل به تریکوتسن‌ها در اثر بیان ژن *Tri*101 در گیاه مدل توتون وجود دارد (Muhitch *et al*. 2000). در این مطالعه بیان ژن *AYT1* در گیاه مدل توتون با استفاده از آنتی‌بادی *cMyc* که توالی آن با روش PCR-Tagging به انتهای این ژن افزوده شده بود، مورد بررسی‌های ایمنولوژیک قرار گرفت. در فن‌آوری اضافه‌کردن اپی‌توپ با استفاده از روش DNAی نوترکیب، اپی‌توپ‌های پپتیدی کوچک به پروتئین‌های متعدد اضافه و توسط آنتی‌بادی ویژه آن اپی‌توپ مورد مطالعه قرار می‌گیرند که با توجه به مزایای متعدد آن از جمله صرفه‌جویی چشمگیر در هزینه و زمان در مقایسه با روش‌های معمول تهیه آنتی‌بادی، مطالعه چندین پروتئین با استفاده از یک اپی‌توپ و عدم‌تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین در اثر افزودن اپی‌توپ، امروزه مورد توجه محققان واقع شده است.

آنالیزهای مولکولی انجام‌شده با استفاده از PCR ژنومی و RT-PCR نشان دادند که از تعداد ۳۵ لاین باززایی‌شده پس از تراریختی با آگروباکتریوم، تراژن به ۲۰ لاین با موفقیت انتقال داده شده و نسخه‌برداری از آن نیز به‌طور کامل صورت گرفته است. آزمون‌های الیزای غیرمستقیم و ایمنوبلاتینگ نیز ثابت نمودند که بیان تراژن در گیاهان تراریخت با استفاده از آنتی‌بادی *cMyc* قابل ردیابی است. برای بررسی فعالیت استیل ترانسفرازی پروتئین AYT1-CMYC، محصولات انکوباسیون DON و پروتئین استخراج‌شده از پنج گیاه تراریخت با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک و در مقایسه با ترکیبات استاندارد DON و 3A-DON تفکیک شدند و حضور 3A-DON در همه آن‌ها مشاهده شد. هرچند این استیله‌شدن همراه با حضور لکه‌های مربوط به DON در همه لاین‌های تراریخت بود، ولی چنین واکنشی در عصاره استخراج‌شده از گیاه غیرتراریخت دیده نشد. بنابراین می‌توان وجود فعالیت استیل ترانسفرازی در گیاهان تراریخت را در ارتباط با بیان تراژن *AYT1-cMyc* دانست. همچنین عدم وجود لکه DON در واکنش پروتئین استخراج‌شده از گیاه غیرتراریخت بر روی 3A-DON بر ناچیزبودن واکنش داستیله‌شدن در گیاه دلالت می‌کند.

DON با ممانعت از فرآیند ترجمه در سلول‌های یوکاریوتی و با به تأخیرانداختن بیان پروتیئن‌های مرتبط با مقاومت در آن‌ها، به همراه سایر تریکوتسن‌ها در افزایش قدرت تهاجمی *F. graminearum* بر میزبان خود نقش دارد (Eudes *et al*. 2000). تیمار سنبله‌های گندم با محلول DON (بدون تلقیح با قارچ) نیز کاهش عملکرد را که نتیجه فیتوتوکسیک‌بودن این ترکیب است نشان

داده است (Ittu *et al*. 1995). سایر تأثیرات فنوتیپیک تریکوتسن‌ها شامل کاهش تندش بذر، تاخیر رشد، کاهش وزن‌تر گیاه و تغییررنگ برخی بخش‌های گیاهان است (Bottalico *et al*. 1989). همچنین در ارزیابی‌های درون‌شیشه‌ای نیز تأثیراتی مانند جلوگیری از رشد کالوس، دانه‌رست‌ها و رشد ریشه مشاهده شده است (Snijder. 2004). با توجه به این موارد، شاخص‌هایی مانند رشد طولی گیاه و ریشه و مقدار بیومس تولیدشده در غلظت 10ppm DON برای گیاهان تراریخت با *AYT1-cMyc* مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همان‌طور که انتظار می‌رفت، قرارگرفتن در معرض DON در گیاهان غیرتراریخت (شاهد) سبب کاهش قابل توجه شاخص‌های رشد مورد اندازه‌گیری شد. اما در گیاهان تراریخت، میزان رشد تفاوت معنی‌داری با شرایط رشد در محیط فاقد توکسین نداشت. علاوه بر این، شاخص‌های رشد در گیاهان تراریخت و شاهد در محیط فاقد توکسین تفاوت معنی‌داری نداشته است که تأثیر تنش ناشی از کشت در محیط مایع را منتفی می‌کند و نشان می‌دهد که تفاوت رشد در محیط دارای توکسین در بین گیاهان تراریخت و شاهد ناشی از بیان تراژن در آن‌ها می‌باشد.

سپاسگزاری

امکانات انجام این پژوهش از بودجه تحقیقاتی دریافت‌شده از بنیاد بین‌المللی علوم[1] و طرح ۲۵۹ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تأمین شده است. همچنین از همکاری جناب دکتر کمال‌الدین حق‌بین و دکتر گرگانی در انجام کروماتوگرافی لایه نازک تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. International Fundation of Science (IFS)

REFERENCES

Bai GH, Desjardins AE and Plattner RD (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection but does not cause disease spread in wheat spikes. Mycopathologia. 153: 91–98.

Chen L, McCormick SP, Hohn TM (2000) Altered Regulation of 15-Acetyldeoxynivalenol Production in *Fusarium graminearum.* Appl Environ Microbiol. 66(5): 2062–2065.

Eudes F, Comeau A, Rioux S, Collin J (2000) Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé. Can. J. Plant Pathol. 22: 286–292.

Kimura M, Kaneko I, Komiyama M, Takatsuki A, Koshino H, Yoneyama K, Yamaguchi I (1998) Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. J Biol Chem 273: 1654–1661.

Manoharan M, Dahleen LS, Hohn TM, Neate SM, Yu X, Alexander NJ, McCormick SP, Bregitzer P, Schwarz PB, Horsley RD (2006) Expression of 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and effects on deoxynivalenol. Plant Science. 171: 699–706.

Muhitch MJ, McCormick SP, Alexander NJ, Hohn TM (2000) Transgenic expression of the *TRI101* or *PDR5* gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol. Plant Sci. 157: 201 – 207.

Ohsato Sh , Ochiai-Fukuda T,· Nishiuchi T, Takahashi-Ando N,· Koizumi Sh, Hamamoto H, Kudo T, Yamaguchi I, Kimura M (2007) Transgenic rice plants expressing trichothecene3-*O*-acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. Plant Cell Rep. 26: 531–538.

Kimura M, Takahashi-Ando N, Nishiuchi T, Ohsato S, Tokai T, Ochiai N, Fujimura M, Kudo T, Hamamoto H, Yamaguchi I (2006) Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. Pesticide Biochemistry and Physiology. 86: 117–123.

Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM (2002) The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1*(ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. Yeast (19): 1425-1430.

Hoffman CS, Winston FA (1987) Ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmid for transformation of *Escherichia coli*. Gene. 57(2-3): 267-72.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bulletin. 19: 11 – 15.

Bai GH, Shaner G (2004) Management and Resistance in Whaet and Barely to Fusarium Head Blight. Annul. Rev. Phytopathol. 42: 135 – 161.

Abolmaali SH, Mitterbauer R, Adam G (2008) Engineered bakers yeast as a sensitive bioassay indicator organism for the trichothecene toxin deoxynivalenol. J Microbiol Methods. 72(3): 306 – 12.

Ittu M, Hagima I, Moraru I, Raducanu F (1995) Reaction of some wheat and triticale genotypes to toxins, culture filtrates and cultures of Fusarium. In vivo screening and the relation between results obtained in vivo and in vitro. Theor. Appl. Genetics. 27: 1–13.

Bottalico A, Logrieco A, Visconti A (1989) *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia. 107: 85 – 92.

Snijder CHA (2004) Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. Toxicology Letters. 153: 37 – 46.