

استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* جهت ارزیابی توانایی پروتئین ریبوزومی L3 جهش یافته (RPL3W²⁵⁸C/H²⁵⁹Y) در مقاومت به میکوتوکسین قارچ *Fusarium graminearum*

مر ترضی آبکار^{۱،۲}، فروغ سنجریان^{۱*} و امیر موسوی^۱
 ۱، بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
 ۲، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 (تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۷ - تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۲۰)

Asses Ability of Mutant Variety of Ribosomal Protein L3 (RPL3W²⁵⁸C/H²⁵⁹Y) in Resistance to Mycotoxin of *Fusarium graminearum* by Using *Saccharomyces cerevisiae*

M. ABKAR^{1,2}, F. SANJARIAN^{1*} AND AMIR MOUSAVI¹

1, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, 2, Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

(Received: April. 26, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is a disease that causes major economic losses in wheat and the other cereal crops production worldwide. Moreover, contamination of food with the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (DON) produced by *Fusarium graminearum* is a major health concern for humans and animals because trichothecenes are potent cytotoxins of eukaryotic cells. Trichothecene mycotoxins inhibit translation by targeting ribosomal protein L3 at the peptidyl transferase center. In this study, we modified a Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cDNA encoding the ribosomal protein RPL3 so that the amino acid residue 258 was changed from tryptophan to cysteine and the amino acid residue 259 was change from histidine to tyrosine. All version of the tomato RPL3 were introduced to DON-sensitive *pdr5* and *ayt1* mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. When transgenic yeast were compared for growth in presence of DON, differences in growth rate and survival were observed among the yeasts expressing the modified versions of the tomato RPL3 genes, compared to those expressing the wild-type yeast RPL3 gene. These results could create a new field in developing FHB resistance varieties of wheat through genetic manipulation.

Keywords: Deoxynivalenol, *Fusarium* Head Blight, Ribosomal Protein L3

چکیده

بلایت فوزاریومی سنبله بیماری است که باعث خسارت شدید اقتصادی در مزارع گندم و سایر غلات دانه‌ریز در نقاط مختلف دنیا می‌شود. آلودگی غذاهای حاصل از غلات آلوده با میکوتوکسین تریکوئستنی دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) که توسط قارچ *Fusarium graminearum* تولید می‌شود، خطر شدیدی برای سلامت انسان‌ها و حیوانات است زیرا تریکوئستن‌ها می‌توانند باعث مرگ سلول‌های یوکاریوتی شوند. تریکوئستن‌ها با هدف قراردادن پروتئین ریبوزومی L3 در مرکز پپتیدیل‌ترانسفراز از ترجمه پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. در این مطالعه، ما cDNA کدکننده پروتئین ریبوزومی RPL3 از گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) را تغییر دادیم به طوری که اسید آمینه ۲۵۸ از تریپتوفان به سیستئین و اسید آمینه ۲۵۹ از هیستیدین به تیروزین تغییر کند. ژن دارای جهش دوگانه و ژن طبیعی پروتئین ریبوزومی L3 به سویه حساس به DON (فاقد ژن‌های *pdr5* و *ayt1*) مخمر *Saccharomyces cerevisiae* منتقل شدند. مخمرهای دارای RPL3 جهش‌یافته نسبت به مخمرهای دارای ژن طبیعی همین پروتئین در محیط کشت دارای DON از قدرت زنده‌مانی و سرعت رشد بیشتری برخوردار بودند. یافته‌های فوق می‌تواند زمینه‌های نوینی را در راستای توسعه ارقام مقاوم گندم به بلایت فوزاریومی سنبله از طریق دست‌ورزی‌های ژنتیکی ایجاد نماید.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله گندم، پروتئین ریبوزومی L3،

دی‌اکسی‌نیوالنول

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB)، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های غلات دانه‌ریز از جمله گندم و جو در نواحی مرطوب و نیمه‌مرطوب جهان است (Goswami and Kistler, 2004). در اکثریت نقاط دنیا عامل مولد این بیماری قارچ آسکومیست هموتالیک *Fusarium graminearum* گزارش شده است (Brown et al. 2012). این بیماری به وسیله عقیم‌کردن گلچه‌ها و تشکیل دانه های بی‌رنگ، سبک و پژمرده باعث کاهش کمیت غلات می‌شود، همچنین قارچ مولد بیماری میکوتوکسین‌هایی تولید می‌کند که محصولات تولید شده از غله آلوده را برای استفاده انسان و حیوان ناسالم کرده و باعث ایجاد مشکلاتی در استفاده، فروش و صادرات این محصولات می‌شود (Desjardins, 2006; Wagacha et al. 2007). یکی از میکوتوکسین‌های مهم در این ارتباط، سم دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) است که به خانواده تریکوتسین‌ها تعلق دارد که یکی از عوامل توسعه بیماری به حساب می‌آید (Mitterbauer et al. 2004).

تغذیه با غلات آلوده به DON در جانوران مصرف‌کننده می‌تواند موجب بی‌اشتهایی، اسهال، تشنج و حتی مرگ شود (Petska et al. 2005). در انسان نیز اثرات وسیعی از جمله بیماری‌های عصبی، سرکوب ایمنی و حتی در برخی موارد سرطان‌های دستگاه گوارش را بر جای می‌گذارد (Rizzo et al. 1992).

تریکوتسین‌ها با اتصال به مرکز پپتیدیل ترانسفراز ریبوزوم‌های یوکاریوتی از پروتئین‌سازی جلوگیری می‌کنند (Fried and Warner, 1981) در مخمر نانوبی *Saccharomyces cerevisiae* گزارش گردید ژن جهش‌یافته‌ای به نام *tcm1* مسئول ایجاد مقاومت به تریکوتسین هاست. در مطالعات بعدی مشخص شد که این ژن کدکننده پروتئین ریبوزومی

L3، RPL3، در مخمر است (Fernandez et al. 1990). این پروتئین، یکی از اولین پروتئین‌هایی است که در ساختار ریبوزوم قرار می‌گیرد و یکی از سه پروتئین موردنیاز جهت فعالیت پپتیدیل ترانسفرازی است (Noller, 1993; Green and Noller, 1997; Wagacha, 2007).

در بین موجودات زنده مطالعه‌شده پروتئین ریبوزومی L3 (RPL3)، در ناحیه بین اسیدآمین‌های ۲۴۰ تا ۲۶۰ دارای یک دومین بسیار حفاظت‌شده است که وجودش جهت عملکرد طبیعی ریبوزوم، ضروری است. این دومین، در اتصال به سم DON و توسعه بیماری نقش اساسی دارد که در صورت تغییر جایگاه‌های اتصال، گیاه در مقابل اثرات سم و انتشار قارچ *F. graminearum* متحمل‌تر می‌شود (Harris and Gleddie, 2001).

بررسی‌ها در سیستم مدل مخمری نشان داد که دلیل تحمل سویه مقاوم به میکوتوکسین، ایجاد جهشی در ژن *tcm-1* است، به طوری که در موقعیت ۲۵۵ پروتئین آن، سیستئین جایگزین تریپتوفان (W225C) شده است (Schindler et al. 1974; Jimenez et al. 1975; Grant et al. 1976).

برای به‌دست‌آوردن گیاهان مقاوم به DON بیان بالای جهش‌یافته‌های معادل مخمری از ژن‌های *RPL3* در گیاهان تراریخت موردنظر بوده است. ژن جهش‌یافته *RPL3* دارای همین جهش به گیاه توتون منتقل شده و مشاهده شده است که کالوس‌ها و پروتوپلاست‌های تراریخت در حضور DON راندمان باززایی و قدرت زنده‌مانی بالاتری در مقایسه با غیرتراریخت‌ها نشان می‌دهند (Harris and Gleddie, 2001). انتقال *RPL3* گوجه‌فرنگی که دارای جهشی معادل همین جهش (W228C) بود، به گیاه کامل توتون سازگاری گیاه را به DON افزایش داد اما به دلیل عدم تجمع پروتئین موتانت در گیاهان تراریخت، مقاومت دائمی در آن‌ها به وجود نیامد (Mitterbauer et al. 2004). با بیان پروتئین

استفاده جهت تکثیر ژن *Le-RPL3* به همراه جایگاه آنزیمی ابتدا و انتهای ژن برای *EcoR I* و *Xho I* به صورت زیر است:

Eco 603 (F):
AGAATTCACAACATGTCTCACAGGA
AGTTTGA
Xho 603 (R):
TTCTCGAGAAAGATCTTCTTCAGA
ATAAAGCTTTTGTTC

سپس cDNA، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و آنزیم High Fidelity Expand Polymerase تکثیر گردید.

جهت دستیابی به ساختار ژنی *RPL3* $W^{258}C/H^{259}Y$ از تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص (Site-directed mutagenesis) استفاده گردید. به این منظور دو جفت آغازگر که دارای جهش‌های $His^{259}Tyr$ و $Trp^{258}Cys$ بوده و مکمل هم هستند، طراحی شدند.

WC/HY (F):
GCTTGTATTGGTGCCTGCTATCCTG
CTAGAGTTTC
WC/HY (R):
GGATAGCAGGCACCAATACAAGCA

این آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که در نوکلئوتید ۷۷۴ آن‌ها G به C و در نوکلئوتید ۷۷۵ آن‌ها C به T تغییر یافته بود و در نهایت پروتئینی با جهش دوگانه $W^{258}C/H^{259}Y$ تولید می‌شد.

برای ایجاد این جهش‌ها از cDNA تکثیرشده از مرحله قبل به‌عنوان الگو استفاده شد. در دو واکنش پلیمرز یکی با استفاده از آغازگرهای Eco 603 (F) و WC/HY (R) و دیگری با آغازگرهای WC/HY (F) و Xho 603 (R) دو قطعه حدواسط به‌دست آمد. این قطعات حدواسط هر کدام به‌عنوان آغازگرهای بزرگ (Mega primer) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی مورد استفاده قرار گرفت که منجر به تولید قطعه کامل از ژن *RPL3* دارای جهش دوگانه شد. این قطعه در شرکت MWG و با

دم‌بریده *RPL3* در گندم افزایش مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی گندم گزارش شده است (Di et al. 2010).

جهش‌های دیگری در همین ژن در مخمر گزارش شده‌اند که باعث افزایش مقاومت مخمر به DON می‌شوند. از جمله این جهش‌ها، جهش H259Y (هیستیدین به تیروزین) است (Mitterbauer and Adam. 2002). اما تاکنون گزارشی مبنی بر انتقال ژن *RPL3* دارای این جهش به همراه جهش معروف W258C به مخمر و بررسی اثرات هم‌افزایی احتمالی دو جهش با هم ارائه نشده است. در این مطالعه، با ایجاد این جهش دوگانه در *RPL3* گیاه گوجه‌فرنگی و انتقال به مخمر مقاومت حاصله به DON در مقایسه با دو جهش دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه زمینه ساز انتخاب ژن مناسب جهت انتقال به گیاهان هدف است.

مواد و روش‌ها

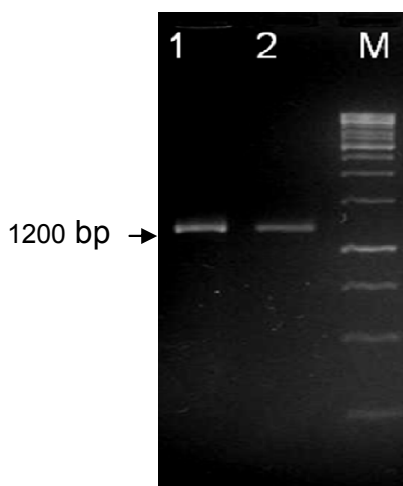
در ابتدا با استفاده از کیت RNX-Plus (Cinagen, Iran)، RNA کل از برگ گیاه گوجه‌فرنگی رقم Nun-hemz6108 استخراج شد. این RNA جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگر Oligo dT و آنزیم رونویسی معکوس M-Mul V (Fermentas) به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

از توالی ژن *Le-RPL3* گوجه‌فرنگی موجود در بانک ژن با شماره دسترسی AY456411 برای طراحی آغازگرهای Eco 603 و Xho 603 استفاده گردید. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo (National Biosciences Inc., Ver. 5) انجام شد. آغازگر Eco 603 واجد جایگاه برش برای آنزیم *EcoR I* و آغازگر Xho 603 واجد جایگاه برش برای آنزیم *Xho I* جهت همسانه‌سازی کردن ژن در ناقل pTK2 می‌باشند. توالی آغازگرهای مورد

خشک‌شدن لکه‌ها، پلیت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از ظهور لکه‌ها، میزان رشد هر کلنی تراریخت مورد بررسی و غلظت‌هایی که در آن جهش یافته‌های مختلف به‌طور یکسان رشد می‌کردند، به‌دست آمد. به این ترتیب آهنگ رشد مخمرهای تراریخت‌شده با ساختارهای مختلف *RPL3* یکنواخت‌سازی شد. جهت بررسی میزان مقاومت سویه‌های تراریخت *RPL3* از محیط‌های SC_{Glu}-Leu که حاوی ۴۰ ppm و ۶۰ ppm DON بودند، استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن رشد سویه‌های مختلف *RPL3* در محیط دارای DON با یکدیگر مقایسه گردید. برای کنترل، از پلیت فاقد DON استفاده شد.

نتایج و بحث

RNA کل استخراجی از گیاه گوجه‌فرنگی جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت و قطعه موردانتظار 1200 bp به‌دست آمد (شکل ۱).

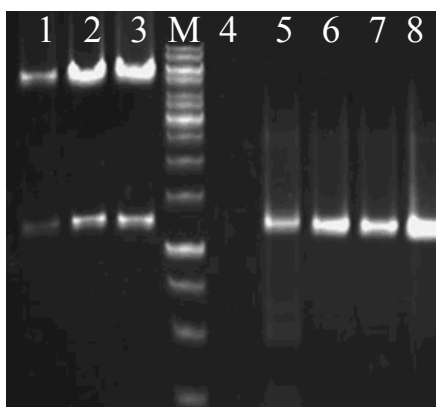


شکل ۱- تکثیر ژن *Le-RPL3* از گیاه گوجه‌فرنگی. ۱ و ۲: قطعه حاصل از تکثیر cDNA توسط آغازگرهای اختصاصی. M: مارکر 1Kb (Fermentas).

برای ایجاد جهش $W^{258}C/H^{259}Y$ از تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص و نوکلئوتید تغییریافته

روش Di-deoxy chain termination با دستگاه‌های ABI اتوماتیک تعیین توالی شد و با هم‌ردیفی با توالی *LeRPL3* موجود در بانک ژن، صحت توالی و وجود جهش‌های موردنظر در آن تایید شد. ژن جهش‌یافته توسط آنزیم‌های *Xho* I و *Eco*R I وارد ناقل بیانی pTK2 مخمری شد. این پلاسمید دارای ژن‌های β -lactamase و *Leu2* به‌عنوان نشانگرهای انتخابی به‌ترتیب در *E. coli* مخمر است و قطعه موردنظر بین پروموتور و خاتمه‌دهنده ژن *ADHI* وارد می‌شود (Sanjarian *et al.* 2009). سازه به‌دست‌آمده ابتدا به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α منتقل شد. جهت اطمینان از ورود پلاسمیدهای نو ترکیب به داخل سلول‌های مستعد از دو روش کلنی PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. سازه موردنظر از باکتری‌های تراریخت استخراج شده و در تراریختی مخمر استفاده شد. تراریخت‌کردن مخمر با استفاده از استات لیتیم و شوک حرارتی انجام پذیرفت (Gietz and Wood.2002). انتخاب مخمرهای تراریخت و اطمینان از رونویسی و ترجمه ژن خارجی در مخمر به روش سنجریان و همکاران صورت پذیرفت (Sanjarian *et al.* 2009). برای همزمان‌سازی رشد مخمرها جهت بررسی تحمل به میکوتوکسین DON از روش لکه‌گذاری بر روی پلیت جامد استفاده گردید. در ابتدا غلظت‌های مختلف مخمرهای تراریخت‌شده با ساختارهای متفاوت *RPL3* جهت هماهنگی رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار از کلنی‌های مخمر، پیش‌کشت شبانه در ۵ ml محیط YPD مایع تهیه گردید و روز بعد ۲۰ ml محیط کشت YPD مایع توسط ۰/۵ ml از این پیش‌کشت تلقیح شد. کلنی‌ها تا رسیدن به OD_{۶۰۰} = ۰/۷ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. از این کشت رقت‌های مختلف شامل ۱۰۰٪، ۲۰٪، ۴٪ و ۰/۸٪ تهیه گردید. ۵ μ l از هر رقت در یک نقطه از محیط‌کشت SC-Leu جامد لکه‌گذاری شد. پس از

که شدت باند بیشتری داشتند، انتخاب و پس از استخراج پلاسمید، جهت تایید تکمیلی عمل هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های *EcoR I* و *Xho I* انجام شد (شکل ۳).

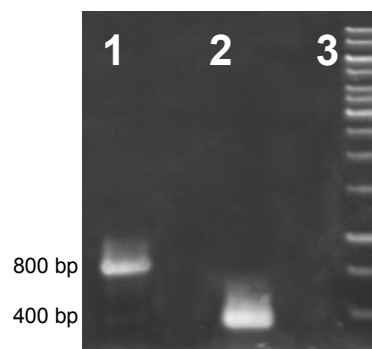


شکل ۳- غربالگری کلنی‌های تراریخت (*DH5α*) *E. coli* با جهش‌یافته‌های ژن *RPL3* با استفاده از کلنی PCR و تایید با هضم آنزیمی. ۱-۳: هضم آنزیمی سازه‌های استخراج‌شده از *E. coli*. M: مارکر 1Kb (*Fermentas*), ۴: کنترل منفی، ۵-۸: کلنی PCR از باکتری‌های نوترکیب.

سازه‌های تراریخت استخراج‌شده از باکتری جهت تراریختی مخمر به کار رفت. سویه و ناقل مخمری مورد استفاده در این آزمایش با ظرافت خاصی طراحی گردیده‌اند، به طوری که سویه مخمری دارای جهش در ژن‌های *ade2*, *ara3*, *his3*, *trp1* و *leu2* بوده که هر کدام از این‌ها می‌توانند به‌عنوان مارکر انتخابی به کار روند. ژن‌های *ayt1*, *pdr5* و *rpl3* سه ژن دخیل در مقاومت مخمر به تریکوتسین‌ها در این سویه حذف شده‌اند که باعث حساسیت فوق‌العاده آن به تریکوتسین‌ها، از جمله DON می‌شود. از آنجا که *RPL3* برای رشد و تکثیر مخمر ضروری است، ژن آن در مجاورت توالی ساترومیری و تحت راه‌انداز GAL در ناقل pZGA196 که بر اساس حامل‌های (Yeast Replicative Plasmid) YRP طراحی شده است، همسانه‌سازی گردیده و

در توالی دو آغازگر WC/HY(F) و WC/HY(R) استفاده گردید.

در مرحله اول با استفاده از رشته الگو *Le-RPL3* (تکثیرشده در مرحله قبل)، دو قطعه حدواسط مکمل ۴۰۰bp و ۸۰۰bp دارای جهش $His^{259}Tyr$ و $Trp^{258}Cyc$ تولید شدند. محصولات این مرحله از واکنش PCR، پس از تخلیص از روی ژل آگارز، به‌عنوان آغازگر بزرگ، برای انجام واکنش PCR اتصال مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).



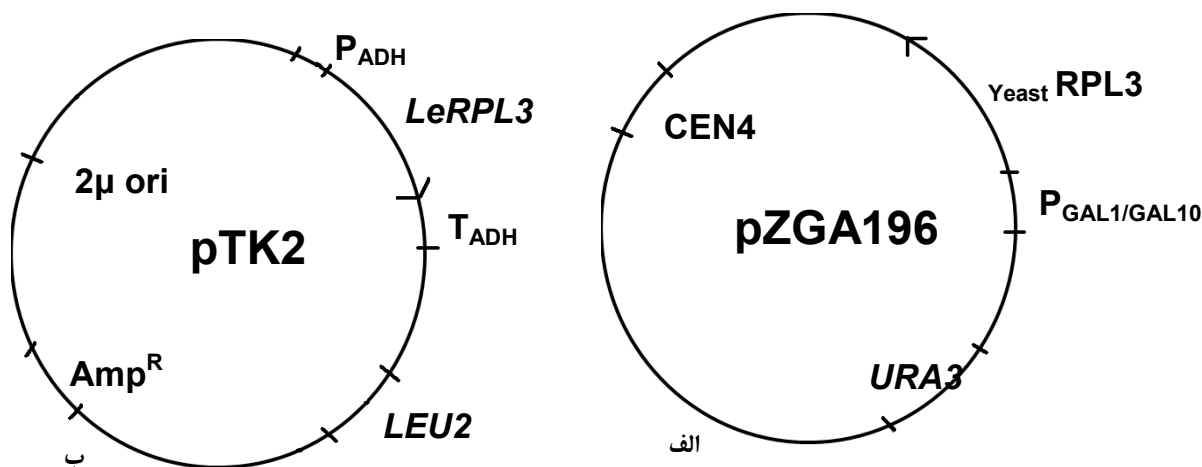
شکل ۲- ایجاد جهش $W^{258}C/H^{259}Y$ بر روی ژن *Le-RPL3* با استفاده از SDM. ۱: محصول PCR قطعه ۸۰۰ bp با آغازگرهای WC/HY(R) و *Eco 603*. ۲: کنترل منفی برای ۱. ۳: محصول PCR قطعه ۴۰۰ bp با آغازگرهای WC/HY(F) و *Xho 603*. ۴: کنترل منفی برای ۳. M: مارکر 1Kb (*Fermentas*)

صحت توالی‌ها با مقایسه با توالی موجود در بانک ژن به‌وسیله توالی‌یابی تایید شد و نشان داد که در توالی‌های به‌دست‌آمده تنها جهش‌های موردنظر رخ داده است (تغییر کدون TGG به کدون TGC در جهش WC و تغییر کدون CAT به کدون TAT در جهش HY) و بقیه توالی ژن حفظ شده است.

پس از همسانه‌سازی ژن جهش‌یافته در ناقل بیانی pTK2، سازه به‌دست‌آمده ابتدا در میزبان *E. Coli* همسانه‌سازی شد. با کمک کلنی PCR، تراریختی چندکلنی نوترکیب با سازه $RPL3W^{258}C/H^{259}Y$ تایید شد. سه کلنی از پلیت

ناقل pTK2 (شکل ۴-ب) دارای مارکر انتخابگر *Leu2* است که برای انتخاب مخمرهای تراریخت با این ناقل استفاده می‌شود. *RPL3* خارجی تحت راه‌انداز *ADH* (الکل دهیدروژناز) همسانه‌سازی گردید که این امکان بیان ژن را هم در محیط دارای گالاکتوز و هم دارای گلوکز فراهم می‌آورد. از توالی خاتمه‌دهنده همین ژن نیز برای اختتام رونویسی استفاده می‌شود. تفاوت مارکر انتخابگر pTK2 با pZGA196 امکان اثبات از دست‌رفتن ناقل pZGA196 و انتخاب کلنی‌های دارای ناقل pTK2، طی انتقال مخمرهای تراریخت به محیط‌های دارای مارکر انتخابگر اختصاصی را فراهم می‌کند.

این پروتئین را برای مخمر فراهم می‌آورد. این ناقل دارای *Ura3* به‌عنوان مارکر انتخابی است (شکل ۴-الف). کشت مخمر در محیط دارای گالاکتوز باعث رونویسی از ژن *RPL3* تحت راه‌انداز *GAL* می‌شود اما فاقد خاتمه‌دهنده رونویسی است و رونویسی از آن تا توالی سانترومری *CEN4* ادامه پیدا می‌کند و همین باعث از کار افتادن سانترومر می‌شود و در تقسیمات میتوزی متعدد ناقل از دست می‌رود (Barbour et al. 2000). مارکر *Ura3* این ناقل، امکان تفریق بین مخمرهای دارای ناقل و فاقد آن را در محیط واجد 5-FOA نیز فراهم می‌کند (Mc Cusker and Davis. 1991).



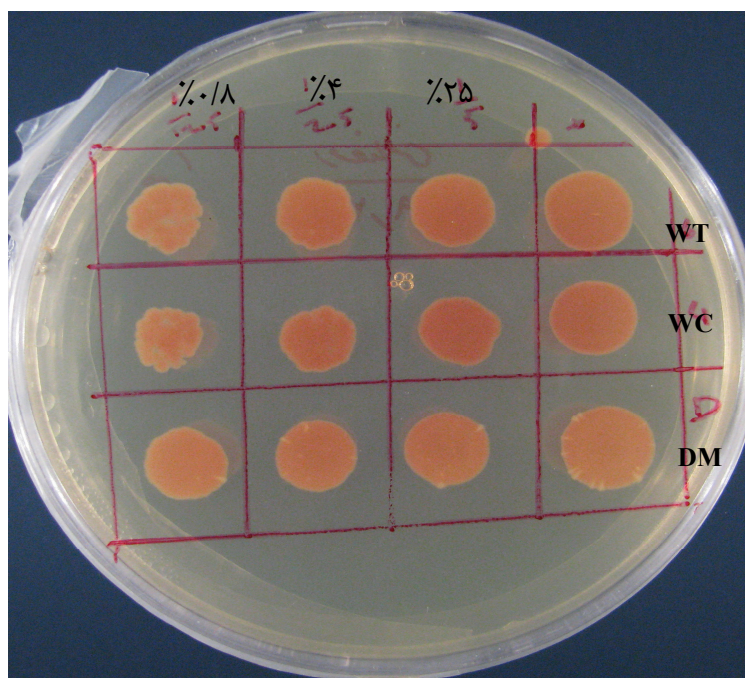
شکل ۴- پلاسمیدهای مخمری به کار رفته در این پژوهش. الف) پلاسمید pZGA196 که در سویه مخمری موجود است و تامین‌کننده ژن *RPL3* برای آن است. ژن انتخابگر آن برای مخمر *URA3* است. ب) پلاسمید pTK2 که ژن خارجی (*LeRPL3*) در آن کلون شده و دارای ژن انتخابگر *LEU2* است.

تراریخت از محیط SC-Leu به SC-Ura منتقل شدند که نتایج حاصله، عدم وجود این ناقل را در تنها یکی از کلنی‌ها نشان داد. عدم رشد روی محیط SC-Ura نشان‌دهنده عدم وجود ناقل pZGA196 است. در مرحله بعد جهت اثبات عدم وجود پلاسمید pZGA196، کلنی مخمری که روی محیط YPD+FOA رشد نکرده بود، به محیط SC-Ura

از کلنی‌های رشد کرده روی محیط SC-GAL-*Leu* ۸ کلنی به محیط کشت SC-GLU-*Leu* بردند. ۵ تا از آن‌ها روی محیط SC-GLU-*Leu* رشد کردند. رشد مخمرها در محیط دارای گلوکز بیانگر استفاده از راه‌انداز *ADH1* جهت بیان ژن *LeRPL3* در مخمر بود. جهت اطمینان از عدم وجود ناقل pZGA196 (دارای *RPL3* مخمر)، مخمرهای

دلیل جهش زابودن این ماده استفاده نشد و از کلنی‌های همسان در محیط SC-Leu استفاده شد. روش‌های مختلفی برای سنجش قدرت ممانعت‌کنندگی تریکوتسین از رشد مخمر ابداع شده است که از آن جمله می‌توان به اندازه‌گیری پارامترهایی مانند وزن خشک، رشد نسبی، تغییر رفتار در محیط کشت (Boeira *et al.* 2000)، سنجش تعداد سلول‌ها با جذب نوری اشاره کرد (Engler *et al.* 1999) در پژوهش حاضر رشد نسبی مخمر بر روی محیط کشت جامد، مورد بررسی قرار گرفت. جهت هماهنگی آهنگ رشد تراریخت‌های مختلف مخمری (شکل ۵) از رقت‌های مختلف کشت مایع با $OD_{600}=1$ برای مخمرهای تراریخت شده با *LeRPL3* نوع طبیعی و نیز جهش یافته‌های $W^{258}C$ و $W^{258}C/H^{259}Y$ استفاده گردید (شکل ۵).

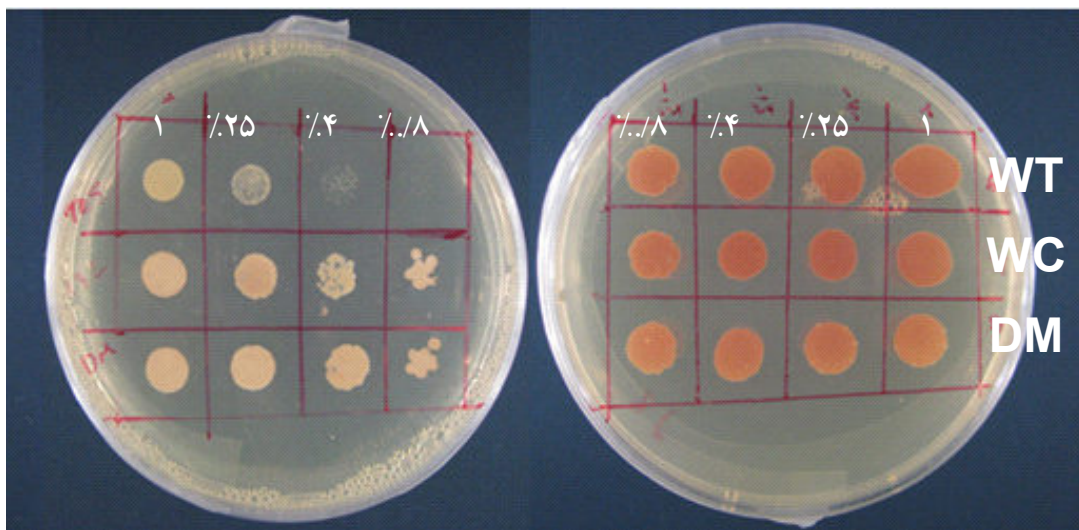
منتقل شد. 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) ماده‌ای است که جهت تعیین بیان ژن *Ura3* در مخمر به کار می‌رود. مخمر دارای ژن *Ura3* می‌تواند FOA را به فلوروداکسی‌یوریدین تبدیل کند که یک ترکیب سمی برای سلول می‌باشد (McCusker and Davis. 1991). همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، تنها پلاسمید pZGA196 دارای ژن *Ura3* است. بنابراین، اگر کلنی موردنظر این پلاسمید را داشته باشد، نمی‌تواند در حضور FOA رشد کند ولی رشد در حضور FOA نشان‌دهنده عدم بیان ژن *Ura3* و در نتیجه از دست‌دادن پلاسمید pZGA196 می‌باشد. بنابراین در آزمون تحمل به DON از کلنی‌هایی از مخمرهای تراریخت استفاده شد که در محیط SC-Ura رشد نکرده در عین حال که رشد آن‌ها در محیط YPD+FOA نیز مثبت بود. البته از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط FOA به



شکل ۵- همزمان‌سازی آهنگ رشد مخمرها جهت انتقال به محیط حاوی DON. WC: مخمر تراریخت شده با *LeRPL3* دارای جهش $W^{258}C$; DM: مخمر تراریخت شده با *LeRPL3* دارای جهش مضاعف $W^{258}C/H^{259}Y$; WT: مخمر تراریخت شده با Wild type *LeRPL3*.

DON که توسط رقت‌های مختلف مخمرهای تراریخت لکه‌گذاری شده بودند (شکل ۶)، مشخص گردید که مخمرهای تراریخت شده با جهش‌یافته‌های DM ($W^{258}C/H^{259}Y$)، $W^{258}C$ و $LeRPL3$ نوع طبیعی به ترتیب بیشترین مقاومت را به DON نشان می‌دهند.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون، از مخمر تراریخت شده با $LeRPL3$ نوع طبیعی و جهش‌یافته $W^{258}C/H^{259}Y$ رقت ۲۵٪ و از جهش‌یافته $W^{258}C$ رقت ۱۰۰٪ جهت انتقال به محیط حاوی DON انتخاب شدند. با مقایسه پلیت‌های YPD فاقد DON و دارای



شکل ۶- محیط‌های کشت لکه‌گذاری شده با رقت‌های مختلف مخمرهای تراریخت شده با سوبه‌های مختلف $LeRPL3$. محیط بدون DON (سمت راست) محیط حاوی YPD+ 30 ppm DON (سمت چپ)؛ WC: مخمر تراریخت شده با $LeRPL3$ دارای جهش $W^{258}C$ ؛ DM: مخمر تراریخت شده با $LeRPL3$ دارای جهش مضاعف $W^{258}C/H^{259}Y$ ؛ WT: مخمر تراریخت شده با Wild type $LeRPL3$.

جهش‌یافته واجد جهش $W^{258}R$ نسبت به دو مورد دیگر، به‌شدت کند رشد بوده که دلیل این مسئله می‌تواند، عدم کارایی این پروتئین در مرکز پپتیدیل‌ترانسفراز یا عدم توانایی آن در تجمع در ریوزوم و یا تخریب شدن سریع آن باشد. این مخمر فاقد مقاومت مطلوب در محیط حاوی DON بود. ضمن اینکه تراریخت واجد جهش‌یافته $H^{259}Y$ مقاومت کمتری نسبت به $W^{258}C$ نشان داد. جالب توجه است که نتایج مربوط به اندازه‌گیری مقاومت نسبی توتون‌های تراریخت شده با $RPL3$ جهش‌یافته (Harris and Gleddie. 2001؛ $W^{258}C$ Mitterbauer et al. 2004) و نیز جهش‌یافته‌های $W^{258}R$ و $H^{259}Y$ (Afshar et al. 2007)

چندین تغییر در اسیدآمینوهای $RPL3$ مخمر شناسایی شده‌اند که می‌توانند باعث ایجاد فنوتیپ مقاومت به تریکوتسین‌ها شوند. این جهش‌ها در منطقه بسیار حفاظت‌شده بین اسیدآمینوهای ۲۴۰ تا ۲۶۳ بوده‌اند (Mitterbauer et al. 2004)، که در این پژوهش معادل آن‌ها در $RPL3$ گوجه‌فرنگی القا گردیده و به ارگانیزم مدل مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) منتقل شدند. Sanjarian et al. (2009)، نشان دادند که از میان مخمرهای تراریخت، تراریخت‌های دارای جهش $W^{258}C$ در $RPL3$ ، مقاومت بیشتری نسبت به جهش‌یافته واجد جهش $W^{258}R$ و $W^{258}R/H^{259}Y$ به DON نشان می‌دهند.

افزایشی این دو جهش در پروتئین ریوزومی به DON نسبت به سایر نسخه‌های جهش‌یافته باشد. این مشاهدات، جهش‌یافته $W^{258}C/H^{259}Y$ را به‌عنوان کاندید مناسبی برای القای مقاومت در ارقام حساس گندم، معرفی می‌نماید. البته تفاوت‌های بسیار کارآمد تنها به‌دلیل تغییر در یک یا دو اسیدآمینو رخ نمی‌دهد که این موضوع می‌تواند در مطالعات آینده مدنظر قرار گیرد.

احتمالاً ایزوفرم‌های مختلف RPL3 می‌توانند خصوصیات متفاوتی از لحاظ مقاومت به تریکوتسین‌ها ایجاد کنند. به‌همین دلیل، بررسی‌های ابتدایی در مورد انتخاب کاراترین و مفیدترین جهش در موجودات مدل مانند مخمر و توتون مورد نیاز است تا پس از آن، اقدام به تراریختی گندم شود.

سپاسگزاری

این پایان‌نامه قسمتی از رساله کارشناسی‌ارشد نگارنده اول است. نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (طرح ۱۵۹) و دفتر همکاری‌های فناوری نهاد ریاست جمهوری برای تامین هزینه‌های اجرایی این پروژه و در اختیار گذاردن کلیه امکانات قدردانی می‌نمایند. همچنین از پروفیسور گرهارد آدام از مرکز تحقیقات کشاورزی وین، برای در اختیار گذاردن سوبه مخمری و ناقل پلاسمیدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Afshar AS, Mousavi A, Majd A, Renu, Adam G (2007) Double mutation in tomato ribosomal protein L3 cDNA confers tolerance to deoxynivalenol (DON) in transgenic tobacco. *Pak J Biol Sci.* Jul 15; 10(14): 2327-33.

Barbour L, Zhu Y and Xiao W (2000) Improving synthetic lethal screen by regulating the yeast centromere sequence. *Genome.* 43: 910-917.

Boeira LS, Bryce JH, Stewart GG and Flannigan B (2000) The effect

داده‌های مربوط به بررسی مقاومت حاصله در مخمر که توسط Sanjarian *et al.* (2009) به‌دست‌آمده بود را تایید می‌کرد. ضمن اینکه بیان بالای RPL3 طبیعی، موجب افزایش تحمل به DON نمی‌شد که نشانگر این نکته است که مسئول مستقیم ایجاد تحمل، جهش موجود در پروتئین RPL3 است. این موضوع در بررسی‌های انجام گرفته قبلی نیز مورد تاکید قرار گرفته است (Harris and Gleddie. 2001). البته گزارشاتمی نیز وجود دارد که بیان قطعه ۹۹ اسیدآمینوای از انتهای N پروتئین RPL3 مخمر در گیاهان تراریخت باعث ایجاد مقاومت به DON می‌شود که این موضوع را به بیان بالای این ژن نسبت داده‌اند (Di *et al.* 2010).

از آن‌جا که هدف، دستیابی به بیشترین سطح مقاومت بود و در بین مخمرهای مقاوم طبیعی، فراوانی جهش‌های نوع $W^{255}C$ و یا $H^{256}Y$ بالاتر بود، به‌نظر می‌رسید که جهش‌یافته $W^{258}C/H^{259}Y$ دارای مقاومت بیشتری باشد. به‌همین منظور در مطالعه حاضر، میزان مقاومت جهش‌یافته مضاعف $W^{258}C/H^{259}Y$ نسبت به نوع طبیعی و جهش‌یافته $W^{258}C$ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده جهش‌یافته مذکور بالاترین میزان مقاومت به میکوتوکسین DON را نسبت به نوع طبیعی و جهش‌یافته نوع $W^{255}C$ نشان داد. بروز مقاومت در سلول‌های مخمر می‌تواند حاکی از اثر

combination of *Fusarium* mycotoxins (deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B) on growth of brewing yeast. *Appl. Microbiol.* 88: 388-403.

Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE (2012) The Predicted Secretome of the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*: A Refined Comparative Analysis *PLoS ONE* 7 (4): 1.

Desjardins AE (2006) *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and

- biology. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Di R, Blechl A, Dill-Macky R, Tortora A, Tumer NE (2010) Expression of a truncated form of yeast ribosomal protein L3 in transgenic wheat improves resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Science* 178: 374–380
- Engler KH, Coker R and Evans I H (1999) A novel colorimetric yeast bio assay for detecting trichothecen mycotoxins. *J. Microbiol. Methods*.
- Fernandez-Lobato M, Cannon M, Mitlin JA, Mount RC, Jimenez A (1990) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying high-level or low-level resistance to trichothecene antibiotics, *Biochem. J.* 267: 709–713.
- Fried HM, Warner JR (1981) Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(1981), 238–242.
- Gietz RD and Wood RA (2002) Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods. Enzymol.* 305:87-96.
- Goswami RS, and Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5 (6): 515–525.
- Grant PE, Schindler D and Davies JE (1976) Mapping of trichodermin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: A genetic locus for a component of the 60S ribosomal subunit. *Genetics.* 83: 667-673.
- Green R, Noller HF (1997) Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry* 66: 679-716.
- Harris LJ and Gleddie SC (2001) A modified *Rpl3* gene from rice confers tolerance of the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 58: 173-181.
- Jimenez A, Sanchez L, and Vazquez D (1975) Simultaneous ribosomal resistance to trichodermin and anisomycin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 383: 427-434.
- McCusker JH and Davis RW (1991) The use of prolin as a nitrogen source causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5FoA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 607-608.
- Mitterbauer R and Adam G (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 699-703.
- Mitterbauer R, Poppenberger B, Raditschnig A, Lucyshyn D, Lemmens M, Glossl and Adam G (2004) Toxin-dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. *J. Plant Biotechnol.* 2: 329-340.
- Noller HF (1993) Peptidyl transferase: protein, ribonucleoprotein, or RNA? *J. Bacteriol.* 175: 5297–5300.
- Pestka JJ, and Smolinski AT (2005) Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8: 39–69.
- Rizzo AF, Atroshi F, Hirvi T, and Saloniemi H (1992) The hemolytic activity of deoxynivalenol and T2 toxin. *Nat. Toxin.* 1: 106-110.
- Sanjarian F, Mousavi A, Safipour Afshar A (2009) Site-directed mutagenesis and functional analysis of tomato Ribosomal Protein L3 (RPL3) in yeast towards conferring tolerance to deoxynivalenol. *Modern Genetics Journal.* 4: 33-37.
- Schindler D, Grant P, and Davies J (1974) Trichodermin resistance-mutation affecting eukaryotic ribosomes. *Nature.* 248: 535-536.

Wagacha JM and Muthomi JW (2007)
Fusarium culmorum: Infection
process, mechanisms of mycotoxin
production and their role in
pathogenesis in wheat. Crop
Protection. 26: 877–885.