مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره سوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۱ (۹۵-۸۵)

Crop Biotech.
Vol.2, No. 3, Autumn and Winter 2013

تغییر همزمان اسیدآمینه های Trp258 به Cys و His259 به Tyr در پروتئین ریبوزومی L3 در جهت افزایش تحمل به توکسین DON در گیاه تراریخت توتون

سمیرا شهبازی[1]*، ناصر صفایی[2]، امیر موسوی[3]، فروغ سنجریان[4] و عزیزاله علی‌زاده[5]

۱، عضو هیات علمی گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی، کرج، ایران، ۲، ۵، اعضای هیات علمی گروه بیماری‌شناسی‌گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳، ۴، اعضای هیات علمی بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۷ ـ تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۲۰)

Simultaneous Changes of Trp258 to Cys and His259 to Tyr in Ribosomal Protein L3 in order to Increase Tolerance to *Fusarium* Toxin DON in Transgenic Tobacco

S. SHAHBAZI[1]*, N. SAFAIE[2], A. MOUSAVI[3], F. SANJARIAN[4] AND A. ALIZADEH[5]

1, Ph. D. of Molecular Mycology- Plant Pathology, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran. 2,5, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.3,5 Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran,
(Received: April. 15, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

چکیده

یکی از مکانیسم‌هایی که در جهت کاهش تأثیرات توکسین‌داکسی نیوالنون DON شناسایی شده، دست‌ورزی جایگاه هدف آن پروتئین ریبوزومی L3 (RPL3) می‌باشد. در این پژوهش دو تغییر نقطه‌ای (اسیدآمینه شماره ۲۵۸ از تریپتوفان به سیستئین و شماره ۲۵۹ از هیستیدین به تیروزین) در توالی cDNA ژن *RPL3* گوجه‌فرنگی با استفاده از تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص (SDM) انجام پذیرفت. گیاه‌مدل توتون تراریخت با *LeRPL3*ی دست‌ورزی‌شده از نظر توانایی باززایی و تولید کالوس در حضور توکسین DON مورد آزمایش قرار گرفت. تفاوت‌های قابل توجهی از نظر توانایی تولید کالوس و باززایی در حضور DON در لاین‌های تراریخت در مقایسه با شاهد غیرتراریخت مشاهده گردید. در بین جهش‌های منفرد، در گیاهان حاوی $LeRPL3H^{259}Y$ پاسخ مقاومت به DON بهتری از خود نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که بیان *AYT1* و پروتئین RPL3 دست‌ورزی‌شده می‌توانند در القای تحمل به DON و به دنبال آن افزایش مقاومت به بیماری FHB در گیاهان میزبان مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: داکسی نیوالنول، پروتیین ریبوزومی L3

Abstract

Another mechanism for reduction the effects of deoxynivalenon toxin (DON) is target site (RPL3 protein) manipulation. In this study amino acid residue 258 is changed from tryptophan to cyctein and 259 from histidine to tyrosine in tomato ribosomal protein L3 (LeRPL3) cDNA through Site Directed Mutagenesis (SDM). Transgenic tobacco plants expressing these modified LeRPL3 cDNAs were tested for ability of leaf discs to regenerate and produce callus in the presence of DON. Significant differences in callus induction and ability to undergo regeneration was seen in transformed lines as compared to non-transformed tobacco plants in DON assays. Among the mutant types, marked difference with respect to resistance against DON was observed with regenerants expressing LeRPL3WC/HY; and plants expressing $LeRPL3H^{259}Y$ giving better response than transforments expressing $LeRPL3W^{258}C$. The results indicate the possibility of increase in DON tolerance (and Fusarium head blight resistance respectively) among the plants based on expression of engineered RPL3.

Keywords: Deoxynivalenol, Ribosomal protein L3

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

مقدمه

مکانیسم عمل تریکوتسین‌ها مهار سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها با اتصال به زیرواحد ۶۰S ریبوزومی و مهار فعالیت پپتیدیل ترانسفرازی آن است. L3 بزرگترین پروتئین ریبوزومی است که نقش اساسی در فعالیت پپتیدیل ترانسفرازی ریبوزوم دارد (Davis and Cundliffe, 1997; Cundliffe *et al*. 1974). در مخمرهای جهش‌یافته‌ای که مقاومت نسبی به تریکودرمین در آن‌ها مشاهده شده است، ماهیت جهش $W^{255}C$ تعیین شده که باعث افزایش مقاومت به تریکودرمین در اثر تغییر تریپتوفان ۲۵۵ به سیستئین می‌شود (Schultz and Friesen, 1983; Mitterbauer *et al*. 2004). این جهش را پس از واردکردن به cDNA ژن *RPL3* برنج به گیاه توتون منتقل کردند. در کشت سوسپانسیون سلولی و ریزنمونه‌های برگی، تفاوت قابل توجهی در سرعت رشد و توانایی تمایزیابی گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان واجد ژن طبیعی در حضور DON مشاهده شد (Harris and Gleddie. 2001). در مطالعه دیگری جهش $H^{259}Y$ در *RPL3* گوجه‌فرنگی وارد و سپس به گیاه توتون انتقال داده شد. در حضور DON پروتئین تغییریافته بیان شده و سبب ایجاد مقاومت در گیاهان توتون تراریخت گردید (Mitterbauer and Adam. 2002). در حالی‌که در مقایسه توالی ژن‌های *RPL3* گندم‌های مقاوم و حساس به FHB، تفاوتی در توالی نوکلئوتیدی آن‌ها مشاهده نشده است (Lucyshyn *et al*. 2006).

در این پژوهش با توجه به جهش‌های مخمرهای مقاوم به توکسین تغییرات $W^{258}C$ و $H^{259}Y$ با استفاده از روش جهش‌زایی با جایگاه مشخص[1] در cDNAی مربوط به *RPL3* گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum*) وارد و با کمک آگروباکتریوم به گیاه مدل توتون منتقل شد، تا تغییر در میزان مقاومت این گیاهان تراریخت به توکسین DON مورد بررسی قرار گیرد. شاید بتوان با ایجاد جهش‌های مصنوعی در *RPL3* و انتقال آن به واریته‌های حساس گندم مقاومت آن‌ها را نسبت به بیماری FHB افزایش داد.

مواد و روش‌ها

جهش‌زایی در ژن *LeRPL3* با تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص

پس از استخراج RNA کل از گیاه گوجه‌فرنگی (رقم Nun-hemz 6108) و به روش RT-PCR ژن *Le-RPL3* با جفت آغازگرهای طراحی‌شده براساس توالی این ژن در بانک‌ژن با شماره دسترسی AY456411 تکثیر گردید. cDNAی *Le RPL3* دارای یک ORF با ۱۱۷۰ جفت باز (۳۸۹ اسیدآمینه) است و همولوژی بالایی با ژن *RPL3* مخمری دارد که جهش‌های مذکور نخستین بار در آن‌ها شناسایی شد (Mitterbauer *et al*. 2004). همچنین با توجه به مشابهت تاکسونومیک دو گیاه گوجه‌فرنگی و توتون (هر دو از تیره سولاناسه[2] هستند)، به‌نظر می‌رسد که *LeRPL3* همولوژی بالایی با *RPL3* گیاه توتون داشته باشد لذا از *LeRPL3* برای القای جهش‌های موردنظر استفاده شد. با استفاده از تکنیک SDM و طراح آغازگرهای هم‌پوشانی که دارای جهش‌های نقطه‌ای موردنظر باشند دو قطعه حد واسط واجد هرکدام از جهش‌های $W^{258}C$ و $H^{259}Y$ ساخته و به یکدیگر اتصال داده شد. جهت دستیابی به ساختار ژنی $RPL3W^{258}C$ یک جفت آغازگر که در نوکلئوتید جایگاه ۷۷۲ جهش تریپتوفان به سیستئین را ایجاد می‌نمایند و مکمل هم هستند طراحی شدند. برای انجام جهش دیگری به شکل

1. Site-directed Mutagenesis (SDM)

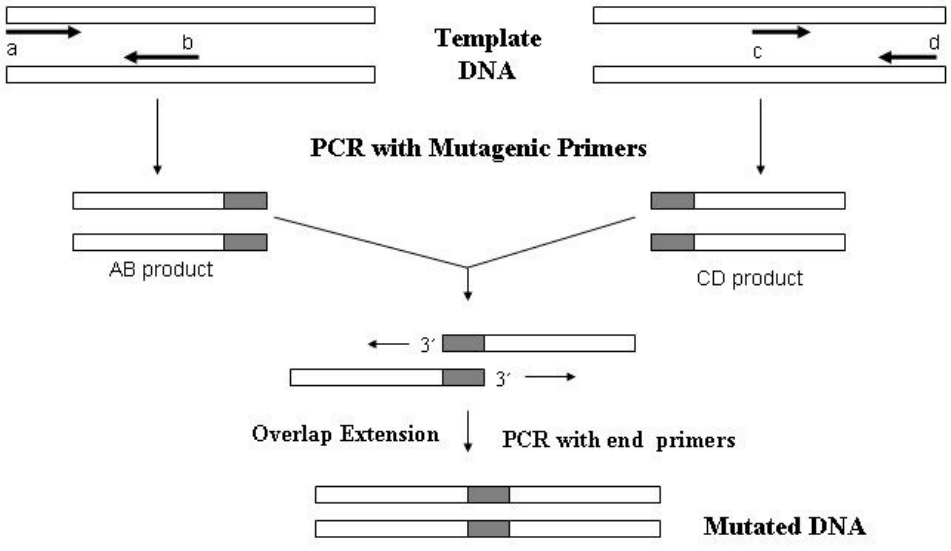
2. Solanaceae

$H^{259}Y$ مورد استفاده قرار گرفته است. جهش ($W^{258}C$) در نوکلئوتید شماره ۷۷۲ از G به C بوده و سبب تغییر اسیدآمینه شماره ۲۵۸ از تریپتوفان به سیستئین در توالی پروتئین Le-RPL3 می‌شد. جهش ($H^{259}Y$) در نوکلئوتید شماره ۷۷۵ از C به T بوده و سبب تغییر اسیدآمینه شماره ۲۵۹ هیستیدین به تیروزین می‌شود. انتخاب این دو جهش برای تولید *RPL3*های جهش‌یافته از آن جهت بود که هر دو جهش میزان بالایی از افزایش مقاومت به توکسین را در مطالعات قبلی بر روی مخمر و توتون نشان داده و از قدرت باززایی بالاتری نیز در مقایسه با سایر جهش‌یافته‌ها برخوردار بودند، لذا هدف ما در این پروژه تولید این جهش‌یافته‌ها به صورت انفرادی برای دستیابی به لاین‌هایی از گیاهان تراریخت با سطح بالاتری از مقاومت بوده است. جفت آغازگرهای جهش‌زا که برای ایجاد جهش $His^{259}Tyr$ (هیستیدین به تیروزین) طراحی شده‌اند نیز دارای یک نوکلئوتید غیرقابل جفت‌شدن[1] برای ایجاد جهش در نوکلئوتید جایگاه ۷۷۵ (تبدیل نوکلئوتید C به T) هستند که توالی آن‌ها را در شکل ۱ مشاهده می‌کنید.

1. Mismatch

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای ایجادجهش در ژن *Le-RPL3* با تکنیک SDM

نام آغازگر	توالی آغازگر
W258C (F)	GCTTGTATTGGTGCCCGGCATCCTGCTAGAGTTTCGG
W258RC (R)	ATGCCGGGCACCAATACAAGCAA
$H^{259}Y$ (F)	GCTTGTATTGGTGCCTGGTATCCTGCTAGAGTTTCGGA
$H^{259}Y$ (R)	TACCAGGCACCAATACAAGCAA



شکل ۱- طرح شماتیکی از مراحل انجام جهش با جایگاه مشخص با استفاده از واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای جهش‌زایی و تکثیر ژن *$RPL3W^{258}C$*

تکثیر قطعات حدواسط: برای تکثیر قطعات حدواسط توسط آنزیم *Expand* پلیمراز، از قطعه Le-*RPL3* است به‌عنوان الگو استفاده شد و دو واکنش پلیمراز برای ساخت دو قطعه که هر دو دارای جهش

$W^{258}C$ و $H^{259}Y$ بوده و مکمل هم باشند، انجام شد. ترکیبات مورد نیاز برای این دو واکنش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- ترکیبات مورد نیاز برای سنتز قطعات دارای جهش

ترکیبات	حجم (µl) ویال اول	حجم (µl) ویال دوم
ddH_2O	۱۷/۳	۱۷/۳
۱۰X ،PCR Buffer	۱/۵	۱/۵
$MgCl_2$ (50 mM)	۱	۱
dNTP (10 mM)	۱	۱
TL3-ATG1	۱	–
$W^{258}C$ (F) or $H^{259}Y$ (F)	–	۱
$W^{258}RC$ (R) or $H^{259}Y$ (R)	۱	–
TomMyc-Rv	–	۱
Expand polymerase	۰/۷	۰/۷
RPL3	۱	۱

جدول ۲- شرایط دمائی وزمانی مراحل مختلف واکنش PCR برای تکثیر قطعات حدواسط

تعداد سیکل‌ها	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	فاز
۱	۳	۹۵	واسرشته‌سازی اولیه
	۱	۹۵	واسرشته‌سازی
۳۰	۱	۶۲	اتصال آغازگر
	۱	۷۲	تکثیر
۱	۱۰	۷۲	تکثیر نهائی

اتصال قطعات حدواسط: جهت اتصال قطعات حدواسط و به‌دست‌آوردن قطعه کامل PCR دوم انجام شد. در این مرحله هر کدام از قطعات حدواسط به‌عنوان آغازگرهای بزرگ Mega primer عمل می‌نماید. در این واکنش سه ترکیب اصلی به نام‌های mix1، mix2 و mix3 ساخته شد. mix1: حاوی قطعات حدواسط به‌دست‌آمده از PCRهای مرحله قبل به‌عنوان الگو به نسبت ۱:۲(ویال اول: ویال دوم)، ۲/۳ بافر PCR، Mg^{2+} و dNTP است که به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود تا مرحله واسرشت‌سازی مگا آغازگرها کامل شود. mix2: حاوی ۱/۳ بافر PCR، یون Mg^{2+} و آنزیم *Expand* است که به mix1 افزوده شده و در واکنشی مطابق جدول ۳ قرار می‌گیرد.

جدول ۳- شرایط دمائی و زمانی واکنش PCR اول برای اتصال قطعات حدواسط

تعداد سیکل‌ها	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	فاز
	۱	۹۵	واسرشته‌سازی
۱۰	۱	۶۲	اتصال آغازگر
	۳	۷۲	تکثیر

در مرحله نهایی واکنش اتصال mix3: حاوی آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن*Le-RPL3* و آنزیم *Expand* برای تکثیر نهایی قطعه ۱۲۰۰bp به ترکیبات قبلی افزوده شده و در واکنشی مطابق جدول ۴ قرار می‌گیرد.

جدول ۴- شرایط دمائی و زمانی واکنش PCR دوم برای اتصال قطعات حدواسط

تعداد سیکل‌ها	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	فاز
	۱	۹۵	واسرشته‌سازی
۲۰	۱	۶۲	اتصال آغازگر
	۱	۷۲	تکثیر

علاوه بر آن یک نسخه واجد هر دو جهش نیز تهیه گردید تا تأثیر هر یک از این جهش‌ها در ژن موردنظر با تأثیر جهش همزمان دوگانه مورد مقایسه قرار گیرد. در نهایت محصولات PCR در پلاسمید pBluescript SK (Strategene) همسانه‌سازی و به سلول‌های مستعد *E. coli* (DH5α) انتقال‌یافته و کلنی‌های حاوی وکتورهای نوترکیب در

محیط انتخابی غربالگری و برای توالی‌یابی ارسال گردیدند.

تراریختی گیاهان توتون با نسخه‌های دست‌ورزی‌شده *LeRPL3*

نسخه‌های ژنی مذکور در ناقل دوگانه گیاهی pBI121 تحت پیش‌برنده CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS همسانه‌سازی گردیدند. سپس به روش انجماد و ذوب‌کردن به سویه LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* منتقل و برای تراریختی قطعات برگی[1] گیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) استفاده شدند. گیاهان تراریخت با ژن گزارشگر GUS به‌عنوان کنترل منفی تولید شدند. تراریختی گیاهچه‌های باززایی شده مقاوم به کانامایسین (۱۰۰ mg/l) با استفاده از آنالیزهای مولکولی بررسی شد.

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت

انتقال تراژن به لاین‌های باززایی شده با استفاده از DNAی ژنومی استخراج‌شده از گیاهان و آغازگرهای اختصاصی ژن مورد بررسی قرار گرفت. RNA کل نیز با کیت RNX-Plus ™ (Cat. No. RN7713C) از گیاهان استخراج و سپس cDNA ساخته شد. با استفاده از آغازگرها و شرایط واکنش RT-PCR مشابه با PCR، نسخه‌برداری از تراژن بررسی شد. انتظار می‌رود که این دو آغازگر قطعه‌ای معادل ۱/۲ kb را تکثیر نمایند.

ارزیابی مقاومت به توکسین از طریق آزمون باززایی و کالوس‌زایی

قطعات برگی به قطر ۲-۱ سانتی‌متر از گیاهان تراریخت، غیرتراریخت و کنترل منفی بر روی محیط شاخه‌زایی (MS+0.1mg/ml NAA+1mg/ml BA) و کالوس‌زایی (MS+0.1mg/ml NAA+10mg/ml Kinetin) که حاوی ۱۰ ppm توکسین DON بود قرار گرفتند. تعداد جوانه‌ها و کالوس‌های جنین‌زای تشکیل‌شده بر روی قطعات برگی پس از سه هفته مورد شمارش قرار گرفت.

نتایج و بحث

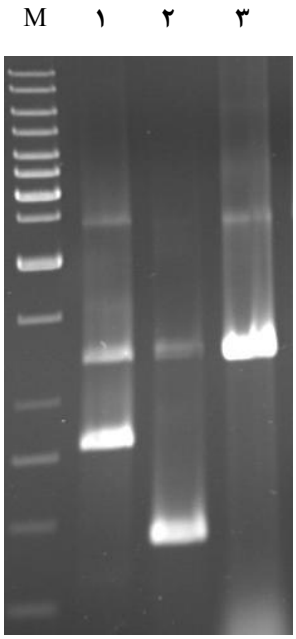
جهش‌زایی در ژن *LeRPL3* با تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص

ژن *Le-RPL3* و قطعات حدواسط واجد هریک از جهش‌ها و ژن دارای جهش دوگانه پس از تکثیر به صورت باند منفرد و در اندازه مورد انتظار، (۱/۲ kb) بر روی ژل الکتروفورز ظاهر گردید (شکل ۲ و ۳). صحت توالی‌های همسانه‌سازی‌شده با مقایسه با توالی موجود در بانک‌ژن بوسیله توالی‌یابی تأیید شد و نشان داد که در توالی‌های همسانه‌سازی‌شده تنها جهش‌های مورد نظر 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 (شکل ۴).

تراریختی گیاهان توتون با نسخه‌های دست‌ورزی‌شده *LeRPL3* و آنالیز مولکولی آن‌ها

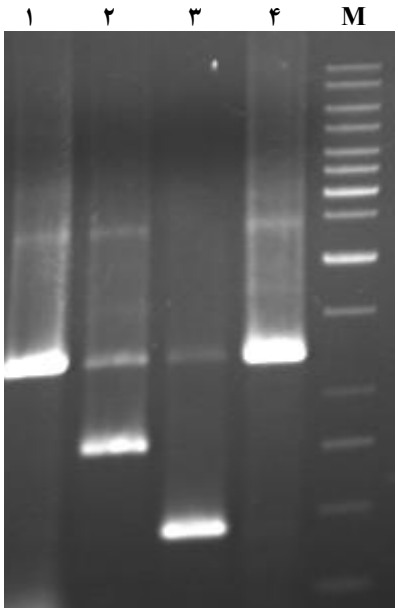
سازه‌های ژنی *RPL3H^{259}Y-cmyc* و *RPL3W^{258}C-cmyc* که در پلاسمید pSK+ کلون شده بودند، با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Sac*I و *Bam*HI خارج شده و در پلاسمید pBI121 تحت پیش‌برنده CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS همسانه‌سازی‌شده و برای تراریختی *A. tumefaciens* سویه LBA4404 به روش ذوب و انجماد به کار برده شدند. انتقال جهش‌یافته‌های ژن *RPL3-cmyc* به ریزنمونه‌های برگی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) به کمک آگروباکتریوم تراریخت با دو سازه *RPL3H^{259}Y* و

1. Leaf disk



M: نشانگر وزنی ۱ kb (Fermentas)
۱: محصولPCR قطعه ۸۰۰ bp با آغازگرهای TL3-ATG1, WCR
۲: محصولPCR قطعه ۴۰۰ bp با آغازگرهای WCF, TomMycRv
۳: (قطعه ۱۲۰۰ bp) محصولPCR برای اتصال دوقطعه با آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن

شکل ۲- الکتروفورز محصولات حدواسط و نهائی در طی ایجاد جهش $W^{258}C$
بر روی ژن *RPL3* با استفاده از SDM



M: نشانگر وزنی ۱ kb (Fermentas)
۱: محصول PCR برای اتصال دوقطعه با آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن
۲: محصول PCR قطعه ۸۰۰ bp با آغازگرهای TL3-ATG1, HYR
۳: محصول PCR قطعه ۴۰۰ bp با آغازگرهای HYF, TomMycRv
۴: (قطعه ۱۲۰۰ bp) محصول PCR نهایی *RPL3H259Y* با آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن

شکل ۳- الکتروفورز محصولات حدواسط و نهائی در طی ایجاد جهش $H^{259}Y$
بر روی ژن $RPL3W^{258}C$ با استفاده از SDM

RPL3 $W^{258}C$ به روش ذوب و انجماد[1] انجام و انتقال موفق ژن‌ها و بیان آن‌ها در گیاهان تراریخت انجام شد (شکل ۵ و ۶). تیمار شاهد، باکتری‌های حامل پلاسمید بدون قطعه ورودی (pBI121-بودند. برای باززایی گیاهچه‌های تراریخت، محیط بهینه‌سازی‌شده القای شاخه‌زایی (حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۱۰۰mg/L) استفاده شد. همچنین جلوگیری از رشد آگروباکتریوم با استفاده از

1. Freeze and thaw method

آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ mg/L به عمل آمد. قطعات برگی غیرتراریخت در محیط انتخابی به سرعت زرد شدند اما تعداد بسیار زیادی گیاهچه‌های سبز در محیط باززایی در مدت ۱۰–۵ روز رشد نمودند. از بین گیاهان باززایی‌شده در محیط انتخابی ۱۵ لاین (از هر نسخه ژن جهش‌یافته پنج گیاه) که انتقال و نسخه‌برداری تراژن در آن‌ها با آنالیزهای مولکولی به اثبات رسیده بود، در ارزیابی‌های مقاومت مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است در هیچ‌یک از گیاهان غیرتراریخت و گیاهان تراریخت واجد ژن گزارشگر GUS هیچ‌گونه باندی با دو آغازگر اختصاصی ژن مشاهده نشد.

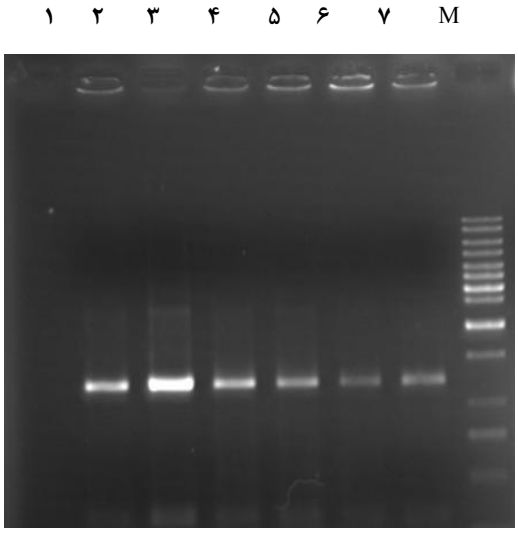
ارزیابی مقاومت به توکسین از طریق آزمون باززایی و کالوس‌زایی

ناحیه بین اسیدهای آمینه ۲۶۳–۲۴۰ در پروتئین ریبوزومی L3 تقریباً در همه یوکاریوت‌ها به شدت حفاظت‌شده است و ایجاد جهش بر روی این ناحیه از پروتئین حساسیت ویژه‌ای خواهد داشت. جهش‌هایی که در این پژوهش با روش جهش‌زایی با جایگاه مشخص[1] انجام شد نیز در درون ناحیه مذکور قرار می‌گیرند (موقعیت ۲۵۸ و ۲۵۹). از سوی دیگر، فرآیند تراریختی خود ممکن است باعث بروز جهش‌های ناخواسته در گیاهان گردد، اما در لاین‌های تراریخت به‌دست آمده در این مطالعه تقریباً هیچ‌گونه ناهنجاری فنوتیپی یا ژنتیکی مشاهده نگردید و گیاهان تراریخت همانند گیاهان غیرتراریخت رشد و نمو طبیعی از خود به‌نمایش گذاشتند. نتایج حاصل از آزمون مقایسه باززایی شاخه گیاهان تراریخت در محیط حاوی توکسین پس از یادداشت‌برداری با نرم‌افزار MSTAT-C Ver.1.42

1. Site-directed Mutagenesis(SDM)

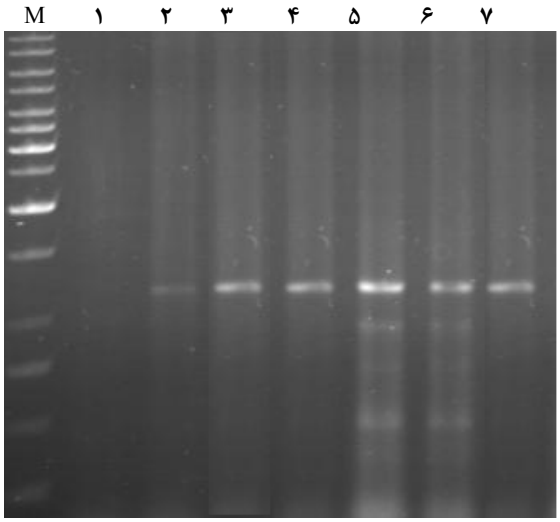
```
RPL3:     PGSKLHKKETCEAVTIVETPPMVIVGVVGYVKTPRGLRCLNTVWAQHLSEDIKRRFYKNWCK : 124
RPL3WCmyc:.............................................................. : 124
RPL3HYmyc:.............................................................. : 124
               *       140         *       160         *       180
RPL3:     SKKKAFLKYSKKYETDEGKKDIQAQLEKLKKYACVIRVLAHTQIRKMKGLKQKKAHLMEIQV : 186
RPL3WCmyc:.............................................................. : 186
RPL3HYmyc:.............................................................. : 186
            *       200         *       220         *       240
RPL3      :NGGSIAQKVDFAYGFFEKQVPVDAVFQKDEMIDIIGVTKGKGYEGVVTRWGVTRLPRKTHRG : 248
RPL3WCmyc:.............................................................. : 248
RPL3HYmyc:.............................................................. : 248
          *       260         *       280         *       300         *
RPL3      :LRKVACIGAWHPARVSFTVARAGQNGYHHRTEMNKKVYKLGKVGQESHTALTEFDRTEKDIT : 310
RPL3WCmyc:.........C.................................................... : 310
RPL3HYmyc:.........Y.................................................... : 310
               320         *       340         *       360         *
RPL3      :PIGGFPHYGVVKEDYLLIKGCCVGTKKRVVTLRQSLLNQTSRVALEEIKLKFIDTSSKFGHG : 372
RPL3WCmyc:.............................................................. : 372
RPL3HYmyc:.............................................................. : 372
               380
RPL3      :GGFPHY           : 388
RPL3WCmyc:......EQKLISEEDL : 388
RPL3HYmyc:................ : 388
```

شکل ۴– هم ردیفی توالی اسیدهای آمینه پروتئین RPL3 جهش دار با RPL3 طبیعی نشان‌دهنده ایجاد تغییر در اسید آمینه ۲۵۸ (تغییر W به C) در $RPL3W^{258}C$ و تغییر در نوکلئوتید ۲۵۹ (تغییر H به Y) در $RPL3H^{259}Y$ است و توالی اپی توپ نیز به انتهای ژن افزوده شده است. توالی های مشابه به صورت نقطه چین نشان داده شده است.



۱: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)
۲: کنترل مثبت (*RPL3* همسانه سازی شده در pBI121)
۳: لاین‌های مختلف تراریخت با *RPL3- HY*
۴: لاین‌های مختلف تراریخت با *RPL3-WC*
۵: لاین‌های مختلف تراریخت با جهش دوگانه
M: نشانگر وزنی 1Kb Ladder (Fermentas)

شکل ۵- الکتروفورز محصولات حاصل از gPCR برای تأیید تراریختی گیاهان توتون



M: نشانگر 1Kb Ladder (Fermentas)
۱: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)
۲ و ۳: لاین‌های مختلف تراریخت با *RPL3- HY*
۴: لاین‌های مختلف تراریخت با *RPL3-WC*
۵ و ۶: لاین‌های مختلف تراریخت با جهش دوگانه
۷: کنترل مثبت (*WC/HY*) *RPL3* همسانه‌سازی شده در pBI121

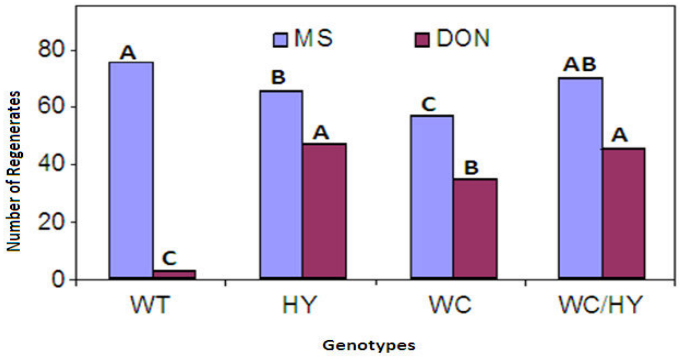
شکل ۶- الکتروفورز محصولات RT-PCR برای تأیید نسخه برداری از تراژن در گیاهان تراریخت

آنالیز و تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ میان گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت (عنوان کنترل منفی) مشاهده شد (شکل ۷). مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD نشان دادند که تعداد شاخه‌های باززایی‌شده در لاین‌های تراریخت دارای جهش دوگانه و لاین‌های تراریخت با سازه $RPL3H^{259}Y$ بالاتر از لاین‌های تراریخت با سازه‌ژنی $RPL3W^{258}C$ بود (شکل ۸). نتایج مشابهی نیز در آزمون کالوس‌زایی بدست آمد. بطور کلی جهش $RPL3H^{259}Y$ در مقایسه با $RPL3W^{258}C$ سطح بالاتری از مقاومت را در گیاهان تراریخت القا می‌نماید. هرچند در لاین‌های دارای جهش دوگانه مقاومت بالاتری مشاده شده اما با توجه به نزدیکی میزان مقاومت در آن‌ها با گیاهان واجد جهش $RPL3H^{259}Y$ به‌نظر می‌رسد این جایگزینی در کاهش باندشدن توکسین با جایگاه

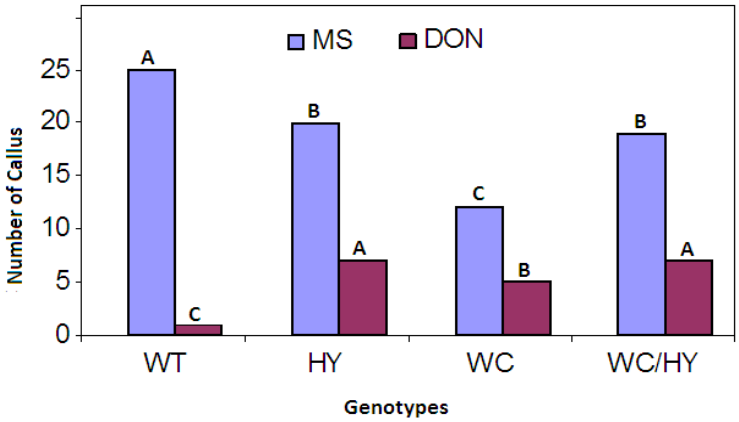
اثرش (پروتئین RPL3) از تأثیر بالاتری برخوردار باشد.

تریکوتسین‌ها برای اتصال به جایگاه‌های یکسانی با هم رقابت می‌کنند و مکانیسم‌های بازدارندگی متفاوتی براساس اثرات آن‌ها بر سیستم‌های ترجمه در *in vitro* شناسائی شده است (Cundliffe and Davies. 1977). توکسین T-2 و نیوالنول فقط به ریبوزوم‌های آزاد متصل‌شده و مرحله آغاز[1] ترجمه را مهار می‌کنند (مهار نوع I). در غلظت‌های کاملاً بازدارنده مهارکننده‌های نوع I، شکستن پلی‌زوم‌ها رخ می‌دهد. مهارکننده‌های مرحله پایان (نوع T) در هیچ غلظتی سبب شکسته‌شدن پلی‌زوم‌ها نمی‌شوند. حتی اگر mRNA در زمان اضافه‌کردن توکسین کاملاً توسط ریبوزوم‌ها پوشیده نشده باشد، اندازه پلی‌زوم‌ها افزایش خواهد یافت. مهارکننده‌های مرحله طویل‌شدن (نوع E) حرکت ریبوزوم‌ها را در طول mRNA مهار می‌کنند. در این حالت نیز پلی‌زوم‌ها کاملاً از بین نخواهند رفت. از سوی دیگر نوع مهارکنندگی بعضی تریکوتسین‌ها نتیجه عملکرد

1. Initiation



شکل ۷- مقایسه توانایی باززایی (Regeneration) در گیاهان تراریخت با نسخه های جهش‌یافته ژن *Le-RPL3* در محیط MS و درحضور 10 ppm DON. (WT، گیاه غیرتراریخت؛ HY، گیاهان تراریخت با جهش $RPL3H^{259}Y$؛ WC، گیاهان تراریخت با جهش $RPL3W^{258}C$ و WC/HY گیاهان تراریخت با جهش دوگانه)



شکل ۸- مقایسه توانایی تولید کالوس (Callus induction) در گیاهان تراریخت با نسخه‌های جهش‌یافته ژن *Le-RPL3* در محیط MS و درحضور 10 ppm DON. (WT، گیاه غیرتراریخت؛ HY، گیاهان تراریخت با جهش $RPL3H^{259}Y$؛ WC، گیاهان تراریخت با جهش $RPL3W^{258}C$ و WC/HY گیاهان تراریخت با جهش دوگانه)

غلظت آن‌ها است و این سبب پیچیده‌شدن تعیین اثر آن‌ها می‌شود (Cundliffe and Davies. 1977). نتایج بررسی‌ها حاکی از آن است که DON در غلظت‌های پایین به‌عنوان مهارکننده نوع T و در غلظت‌های بالا به‌عنوان مهارکننده نوع E عمل می‌کند (Cundliffe and Davies. 1977). بنابراین در حضور DON حرکت ریبوزوم‌های حاوی RPL3 نوع طبیعی، متوقف‌شده یا به‌دلیل مهار مرحله پایان بر روی mRNA باقی می‌مانند. در واقع تجمع RPL3 تغییریافته ایجادکننده مقاومت در حضور توکسین می‌تواند یا به دلیل فروپاشی انتخابی و تجزیه ریبوزوم‌های مهارشده یا به‌دلیل تجمع تسهیل‌شده RPL3 مقاوم باشد و بیان RPL3 تغییریافته وابسته به حضور توکسین در محیط است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که RPL3 تغییریافته ناپایدار بوده و یا در رقابت با RPL3 طبیعی برای تجمع در ریبوزوم بازنده است. به‌علاوه غلظت توکسین مصرفی در این آزمایشات نیز ppm ۱۰ بوده که با توجه به غلظت توکسین تولیدشده در غلات آلوده (بیش از ppm۲۰۰)، به‌نظر می‌رسد استفاده از RPL3 تغییر یافته به‌تنهایی از کارایی کافی برای افزایش مقاومت به توکسین برخوردار نباشد. لذا، در مطالعات بعدی خاموش‌کردن ژن‌های *RPL3* درونی گیاه و بررسی میزان مقاومت در حضور ژن‌های جهش‌یافته برای بررسی پتانسیل این مکانیسم در تقویت مقاومت پیشنهاد می‌شود.

با توجه به مزایا و معایبی که برای هریک از مکانیسم‌های مولکولی متداول افزایش مقاومت به توکسین‌ها اشاره شد، دست‌یابی به سطوح مقاومت بالاتر با توسعه لاین‌های تراریختی که مکانیسم‌های متعدد مقاومت از قبیل *RPL3* جهش‌یافته، سم‌زدایی توسط آنزیم‌ها و سایر راهکارها در آن مجتمع شده باشد قابل دسترس خواهد بود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، طرح ۲۵۹ و گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس بدلیل فراهم‌آوری امکانات انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Cundliffe E, Davis JE. (1997) Inhibition of initiation, elongation and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecens fungal toxin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 11(3): 491-99.

Cundliffe E, Cannon M, Davies J (1974) Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 30-34.

Harris LJ, 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.

Lucyshyn D, Bush BL, Abolmaali Sh, Steiner B, Chandler E, Sanjarian F, Mousavi A, Nicholson P, Bursmayr H, G Adam (2006) Cloning and Characterization of ribosomal protein L3(RPL3) gene family from *Triticum aestivum*. Mol. Genet. Genomics. 2: 122-134

Schultz LD, Friesen JD (1983) Nucleotide sequence of the *tcml* gene (Ribosomal protein L3) of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. Jul. 155 (1): 8–14.

Mitterbauer R and Adam G (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidospsis 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, Gloss and Adam G (2004) Toxin-dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. J. Plant Biotechnol. 2: 329-340.