Crop Biotech.
Vol. 2, No. 3, Autumn and Winter 2012-2013

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره سوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۱ (۲۳-۱۳)

استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* جهت ارزیابی توانایی پروتئین ریبوزومی L3 جهش‌یافته ($RPL3W^{258}C/H^{259}Y$) در مقاومت به میکوتوکسین قارچ *Fusarium graminearum*

مرتضی آبکار[۱و۲]، 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 ($RPL3W^{258}C/H^{259}Y$) in Resistance to Mycotoxin of *Fusarium graminearum* by Using *Saccharomyces cerevisiae*

M. ABKAR[1, 2], F. SANJARIAN[1] AND AMIR MOUSAVI[1]
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)

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 تریکوتسنی دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) که توسط قارچ *Fusarium graminearum* تولید می‌شود، خطر شدیدی برای سلامت انسان‌ها و حیوانات است زیرا تریکوتسن‌ها می‌توانند باعث مرگ سلول‌های یوکاریوتی شوند. تریکوتسن‌ها 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 به‌طوری که اسیدآمینه ۲۵۸ از تریپتوفان به سیستئین و اسیدآمینه 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

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

نویسنده مسئول: فروغ سنجریان
E-mail: fsanjarian@nigeb.ac.ir

Archive
www.SID.ir

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB)، یکی از مخرب‌ترین بیمارهای 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 آسکومایست‌هموتالیک *Fusarium graminearum* گزارش شده است (Brown *et al*. 2012). این بیماری به‌وسیله 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 به‌حساب می‌آید (Mitterbauer *et al*. 2004).

تغذیه با غلات آلوده به DON در جانوران مصرف‌کننده می‌تواند موجب بی‌اشتهائی، 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).

تریکوتسن‌ها با اتصال به مرکز پپتیدیل‌ترانسفراز ریبوزوم‌های یوکاریوتی از پروتئین‌سازی جلوگیری می‌کنند (Fried and Warner. 1981) در مخمر نانوایی *Saccharomyces cerevisiae* گزارش گردید ژن جهش‌یافته‌ای به‌نام *tcm1* مسئول ایجاد مقاومت به تریکوتسن 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 اسیدآمینه‌های 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، به‌طوری‌که در موقعیت ۲۵۵ پروتئین آن، سیستئین جایگزین تریپتوفان (W225C) شده است (Schindler *et al*. 1974; Jimenz *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 به‌دلیل عدم‌تجمع پروتئین موتانت در گیاهان تراریخت، مقاومت دائمی در آن‌ها به‌وجود نیامد (Mitterbauer *et al*. 2004). با بیان پروتئین

Archive of SID

www.SID.ir

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 به‌همراه 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 RPL3ی گیاه گوجه‌فرنگی و انتقال به مخمر مقاومت حاصله به DON در مقایسه با دوجهش 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 بانک‌ژن 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 استفاده جهت تکثیر ژن *Le-RPL3* به‌همراه جایگاه آنزیمی ابتدا و انتهای ژن برای *EcoR* I و *Xho* I به‌صورت زیر است:

Eco 603 (F):
AGAATTCAACAATGTCTCACAGGA
AGTTTGA
Xho 603 (R):
TTCTCGAGAAAGATCTTCTTCAGA
AATAAGCTTTTGTTC

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

جهت دست‌یابی به ساختارژنی *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 $Trp^{258}Cys$ و $His^{259}Tyr$ 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 پلیمراز 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

Archive of SID

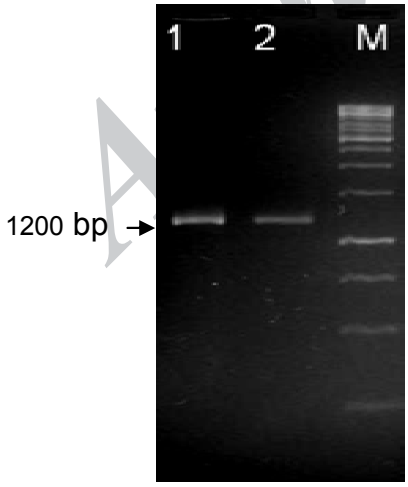
www.SID.ir

روش Di-deoxy chain termination با دستگاه‌های ABI اتوماتیک تعیین توالی شد و با هم‌ردیفی با توالی *LeRPL3* موجود در بانک‌ژن، صحت توالی و وجود جهش‌های موردنظر در آن تایید شد. ژن جهش‌یافته توسط آنزیم‌های *Xho* I و *EcoR* I وارد ناقل بیانی pTK2 مخمری شد. این پلاسمید دارای ژن‌های ß- lactamase و Leu2 به‌عنوان نشانگرهای انتخابی به‌ترتیب در *E. coli* و مخمر است و قطعه موردنظر بین پروموتور و خاتمه‌دهنده ژن *ADH1* وارد می‌شود (Sanjarian *et al.* 2009). سازه به‌دست‌آمده ابتدا به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5α منتقل شد. جهت اطمینان از ورود پلاسمیدهای نوترکیب 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 پیش کشت 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 µl از هر رقت در یک نقطه از محیط‌کشت SC-Leu جامد لکه‌گذاری شد. پس از خشک‌شدن لکه‌ها، پلیت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 ppm ۴۰ و ppm ۶۰ از سم DON بودند، استفاده شد. پلیت‌ها به‌مدت 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).

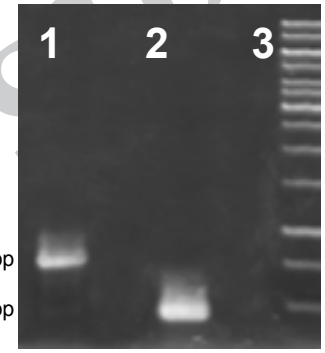
برای ایجاد جهش $W^{258}C/H^{259}Y$ از تکنیک جهش‌زایی با جایگاه مشخص و نوکلئوتید تغییریافته

Archive of SID

www.SID.ir

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

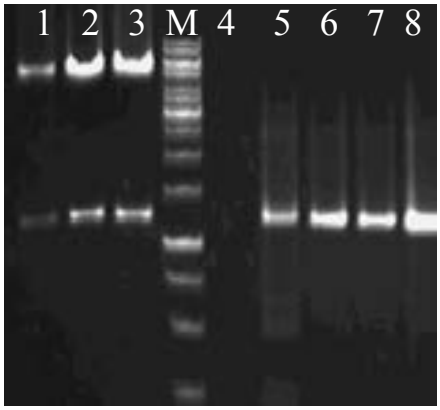
در مرحله اول با استفاده از رشته الگو *Le-RPL3* (تکثیرشده در مرحله قبل)، دو قطعه حدواسط مکمل ۴۰۰bp و ۸۰۰bp دارای جهش $Trp^{258}Cyc$ و $His^{259}Tyr$ تولید شدند. محصولات این مرحله از واکنش PCR، پس از تخلیص از روی ژل آگارز، به‌عنوان آغازگر بزرگ، برای انجام واکنش PCR اتصال مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).



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 بانک‌ژن به‌وسیله توالی‌یابی تأیید 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 $RPL3W^{258}C/H^{259}Y$ تأیید شد. سه کلنی از پلیت 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 تائید با هضم آنزیمی. ۳-۱: هضم آنزیمی سازه‌های استخراج‌شده از *E. coli*. M: مارکر 1Kb (Fermentas)، ۴: کنترل منفی، ۸-۵: کلنی PCR از باکتری‌های نوترکیب.

سازه‌های تراریخت استخراج‌شده از باکتری جهت تراریختی مخمر به‌کار رفت. سویه و ناقل مخمری مورد استفاده در این آزمایش با ظرافت خاصی طراحی گردیده‌اند، به‌طوری‌که سویه مخمری دارای جهش در ژن‌های *ade2*، *ura3*، *his3*، *trp1* و *leu2* بوده که هر کدام از این‌ها می‌توانند به‌عنوان مارکر انتخابی به‌کار 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 سانترومری و تحت راه‌انداز GAL در ناقل pZGA196 که بر اساس حامل‌های (Yeast Replicative Plasmid) YRP طراحی شده است، همسانه‌سازی گردیده و

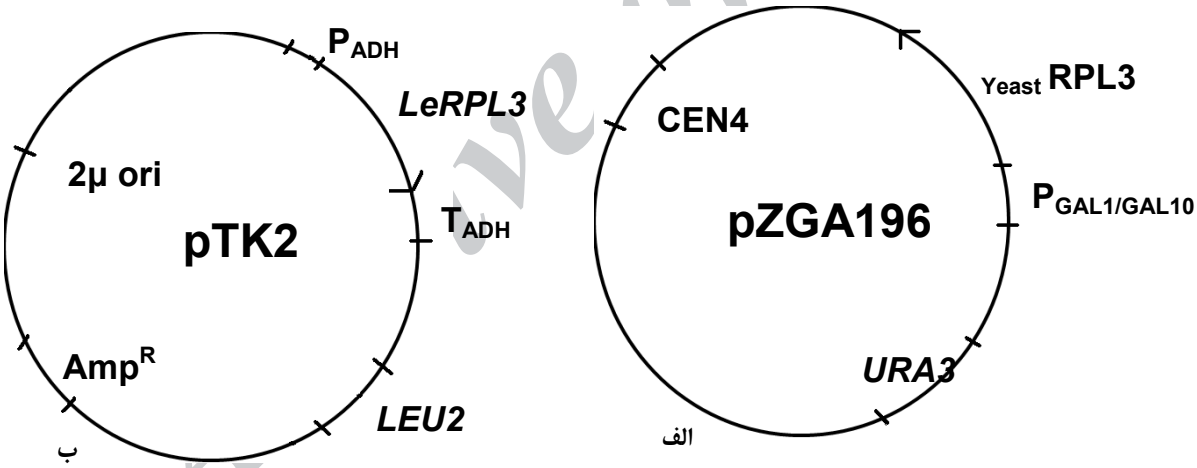
Archive of SID

www.SID.ir

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).

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.



شکل ۴- پلاسمیدهای مخمری به‌کار 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.

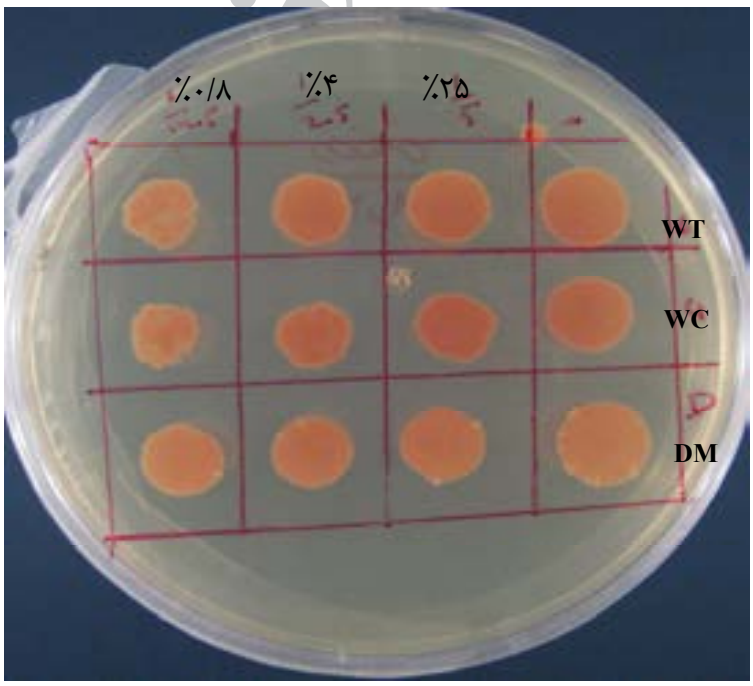
از کلنی‌های رشد کرده روی محیط SC_{GAL}-Leu، ۸ کلنی به محیط کشت SC_{GLU}-Leu برده شدند. ۵ تا از آن‌ها روی محیط SC_{GLU}-Leu رشدکردند. رشد مخمرها در محیط دارای گلوکز بیانگر استفاده از راه‌انداز ADH1 جهت بیان‌ژن *LeRPL3* در مخمر بود. جهت اطمینان از عدم‌وجود ناقل pZGA196 (دارای *RPL3* مخمر)، مخمرهای تراریخت از محیط SC-Leu به SC-Ura منتقل شدند که نتایج حاصله، عدم‌وجود این ناقل را در تنها یکی از کلنی‌ها نشان داد. عدم‌رشد روی محیط SC-Ura نشان‌دهنده عدم وجود ناقل pZGA196 است. در مرحله بعد جهت اثبات عدم‌وجود پلاسمید pZGA196، کلنی مخمری که روی محیط SC-Ura رشد نکرده بود، به محیط YPD+FOA

www.SID.ir

منتقل شد. 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) ماده‌ای است که جهت تعیین بیان ژن *Ura3* در مخمر به‌کار 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 عدم‌بیان 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 دلیل جهش‌زابودن 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 وزن‌خشک، 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}=۱ برای مخمرهای تراریخت‌شده با *LeRPL3* نوع طبیعی و نیز جهش یافته‌های $W^{258}C$ و $W^{258}C/H^{259}Y$ (DM) استفاده گردید (شکل ۵).

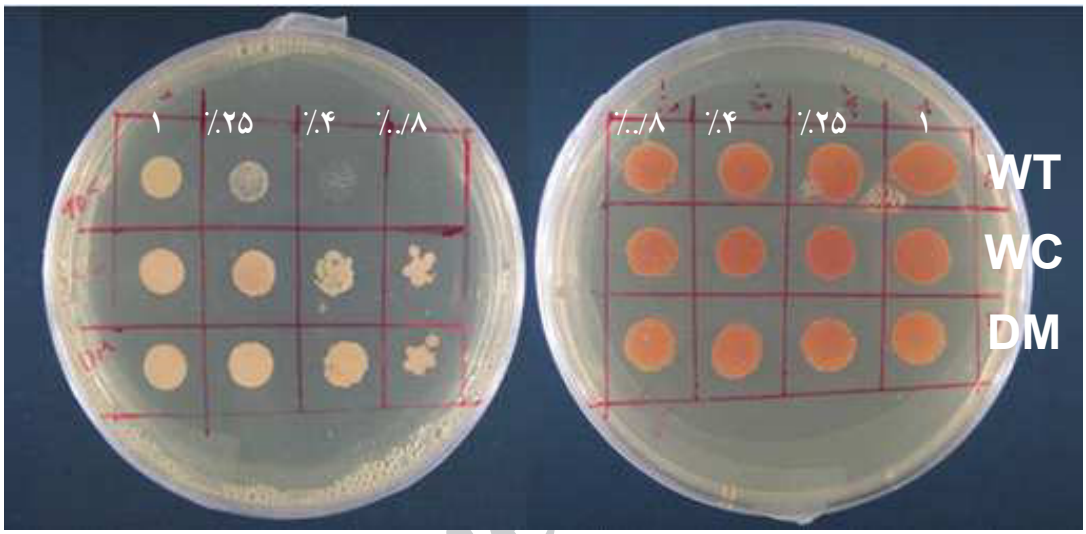


شکل ۵- همزمان‌سازی آهنگ رشد مخمرها جهت انتقال به محیط حاوی DON. WC: مخمر تراریخت‌شده با *LeRPL3* دارای جهش $W^{258}C$؛ DM: مخمر تراریخت‌شده با *LeRPL3* دارای جهش مضاعف $W^{258}C/H^{259}Y$؛ WT: مخمر تراریخت‌شده با Wild type *LeRPL3*.

www.SID.ir

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون، از مخمر تراریخت‌شده 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 DON که توسط رقت‌های مختلف مخمرهای تراریخت لکه‌گذاری شده بودند (شکل ۶)، مشخص گردید که مخمرهای تراریخت‌شده با جهش‌یافته‌های DM ($W^{258}C/H^{259}Y$)، $W^{258}C$ و *LeRPL3* نوع طبیعی به‌ترتیب بیشترین مقاومت را به DON نشان می‌دهند.



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

چندین تغییر در اسیدآمینه‌های RPL3 مخمر شناسایی شده‌اند که می‌توانند باعث ایجاد فنوتیپ مقاومت به تریکوتسین‌ها شوند. این جهش‌ها در منطقه بسیار حفاظت‌شده بین اسیدآمینه‌های ۲۴۰ تا ۲۶۳ بوده‌اند (Mitterbauer *et al.* 2004)، که در این پژوهش معادل آن‌ها در *RPL3* گوجه‌فرنگی القا گردیده و به ارگانیسم مدل مخمر (*Saccharomyces cervisiae*) 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. جهش‌یافته واجد جهش $W^{258}R$ نسبت به دو مورد دیگر، به‌شدت کند رشد بوده که دلیل این مسئله می‌تواند، عدم‌کارایی این پروتئین در مرکز پپتیدیل‌ترانسفراز یا عدم توانایی آن در تجمع در ریبوزوم و یا تخریب‌شدن 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 تراریخت‌شده با *RPL3* جهش‌یافته $W^{258}C$، (Harris and Gleddie. 2001; Mitterbauer *et al.* 2004) و نیز جهش‌یافته‌های $W^{258}R$ و $H^{259}Y$ (Afshar *et al.* 2007)،

Archive
www.SID.ir

داده‌های مربوط به بررسی مقاومت حاصله در مخمر که توسط Sanjarian *et al.* (2009) به‌دست‌آمده بود را تأیید 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 گزارشاتی نیز وجود دارد که بیان قطعه ۹۹ اسیدآمینه‌ای 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 افزایشی این دو جهش در پروتئین ریبوزومی 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 اسیدآمینه 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 مهندسی‌ژنتیک 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 پروفسور گرهارد آدام از مرکز تحقیقات کشاورزی وین، برای در اختیار گذاردن سویه 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 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 cerevisae*: 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 *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, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir