

ساخت پیشبر مصنوعی (SynP1) القا شونده با بیماریگرهای گیاهی و آنالیز عملکرد آن در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه کلزا\*

CONSTRUCTION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A PATHOGEN INDUCIBLE SYNTHETIC PROMOTER IN RESPONSE TO SOME BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES IN CANOLA

فرهاد شکوهی‌فر، محمدرضا زمانی\*\*، مصطفی مطلبی، امیر موسوی و محمدعلی ملبویی<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

پیشبرهای مصنوعی تأثیر بسزایی در کاهش پیچیدگی‌های پیشبرهای طبیعی و موفقیت برنامه‌های اصلاحی دارند. در این مطالعه دو پیشبر مصنوعی SynP1 و MinP در ترکیب با ژن گزارشگر بتا گلوکونیداز (GUS) ساخته شد. آنالیز عملکرد این پیشبرها در گیاه کلزا در واکنش به تیمارهای مختلف به صورت کمی و کیفی بررسی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که پیشبر SynP1 در واکنش به تیمار سالیسیلیک اسید، کیتین، مواد آزاد شده از دیواره قارچ‌های *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizoctonia solani* و *Fusarium graminearum* به‌طور معنی‌داری پاسخ داده و القا می‌گردد. بیان ژن GUS حاصل از القای این پیشبر در واکنش به تیمارهای متیل جاسمونات، شرایط محیطی (شامل سرما، گرما و UV) و تیمار زخم شدگی قابل تشخیص نبود. سطح بیان پایه این پیشبر نسبت به گیاه شاهد و پیشبر MinP اختلاف معنی‌داری نداشت. براساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد پیشبر SynP1 نسبت به مسیر پیام‌رسانی مرتبط با سالیسیلیک اسید حساس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پیشبر مصنوعی، پیشبر القایی، گیاه کلزا، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizoctonia solani* و *Fusarium graminearum*

\*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

\*\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zamani@nigeb.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استادان، استادیار و دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

## مقدمه

(Karali 2009, Jones &amp; Sparks 2009)

در استراتژی ساخت پیشبرهای مصنوعی، از عناصر (Elements) مختلف شناسایی شده در پیشبرهای طبیعی در ترکیب با توالی‌های حداقل پیشبری (Minimal promoter) استفاده می‌شود (Gurr & Rushton 2005). با این روش می‌توان ژن تحت کنترل پیشبر را تنها در شرایط مورد نظر بیان نمود. طرح این ایده تلاش جهت شناسایی و جداسازی عناصر (Elements) القا شونده با بیمارگرها و بررسی عملکرد آنها را در شرایط مختلف افزایش داده است.

عناصر القا شونده با بیمارگرها براساس واکنش آنها به عوامل القایی سیستم‌های دفاعی گیاه مانند سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و یا اتیلن و یا بر اساس توالی هسته‌ای آنها گروه‌بندی می‌گردند (Mazarei et al. 2008). در میان عناصر شناسایی شده، GCC Box (به‌عنوان یک عنصر پاسخ دهنده به تیمار اتیلن) و W Box (دسته‌ای از عناصر حاضر در پیشبر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenicity related proteins) که با محل اتصال با فاکتورهای دخیل در نسخه‌برداری به نام عوامل رونویسی WRKY در ارتباط هستند) به دلیل الگوی واکنش آنها در برابر بیمارگرهای مختلف، عدم وجود بیان پایه، قدرت بیان و القاپذیری بالا بیشتر مورد توجه بوده‌اند (Rushton & Somssich 1998).

با این حال تعداد محدودی از این عناصر تا حدودی ویژگی‌های مورد انتظار را جهت ساخت پیشبرهای مصنوعی دارا بوده‌اند و در بیشتر موارد یک عنصر (Element) در پاسخ به چند مسیر پیام‌رسانی واکنش نشان داده است. یکی از عناصر مناسب (E17) با آنالیز پیشبر یکی از ژن‌هایی که با بیمارگرها بسیار سریع القا می‌شوند، در گیاه جعفری پس از تیمار با یک محرک قارچی به نام

انتخاب پیشبر مناسب به‌منظور تنظیم بیان تراژن در کسب موفقیت در تولید و تجاری‌سازی یک رقم مقاوم گیاهی به بیماری‌ها اهمیت بالایی دارد. پیشبرها به‌عنوان یکی از عوامل تنظیمی نقش بارزی در زمان، مکان و شدت بیان ژن در سلول به‌عهده دارند (Venter & Botha 2004). یک پیشبر مناسب جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی تولید ارقام مقاوم باید دارای ویژگی‌هایی باشد که از جمله می‌توان به عملکرد در زمان مناسب و به میزان مناسب در پاسخ به طیف وسیعی از بیمارگرها اشاره کرد. به‌علاوه عدم فعالیت آن در شرایط عادی و بیان پایه کم نیز از دیگر خصوصیات مهم پیشبر به‌شمار می‌رود. هم‌چنین بیان موضعی تراژن تنها در سلول‌های محل حمله بیمارگر و نیز غیر فعال شدن آن در فاصله زمانی کمی پس از حذف بیمارگر مورد توجه می‌باشد (Gurr & Rushton 2005).

تاکنون پیشبرهای مختلفی در تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از این بین می‌توان به پیشبرهای دائمی (Constitutive promoters)، پیشبرهای اختصاصی بافت (Tissue-specific promoters) و پیشبرهای القایی (Inducible promoters) اشاره نمود (Gurr & Rushton 2005). هریک از این پیشبرها دارای مزایا و معایبی می‌باشند (Venter 2007, Corrado & Karali 2009). لذا به‌کارگیری آنها بسته به نوع پروژه اصلاحی قابل بررسی خواهد بود. با این حال با توجه به ویژگی‌های مورد انتظار از یک پیشبر مناسب و ضرورت مدیریت هرچه بالاتر بیان تراژن، پیشبرهای طبیعی جواب‌گوی نیاز برنامه‌های انتقال ژن نیستند و به این دلیل در سال‌های اخیر استراتژی جدید ساخت پیشبرهای مصنوعی مورد توجه قرار گرفته است (Gurr & Rushton 2005, Venter 2007, Corrado & )

متیل جاسمونات و محرک‌های عمومی مانند کیتین اطلاعاتی وجود ندارد. به علاوه تاکنون تنها عملکرد آن در گیاه جعفری به‌عنوان یک سیستم همولوگ و در گیاه مدل آرابیدوپسیس (هترولوگ) مطالعه شده است.

در این تحقیق با توجه به نیاز پروژه‌های تحقیقاتی جاری جهت تولید ارقام مقاوم کلزا نسبت به بیماری‌های قارچی با استفاده از انتقال ژن‌های مقاومت و نیز ضرورت القایی بودن بیان این ژن‌ها، ساخت پیشبرهای مصنوعی القا شونده با بیمارگرها مورد توجه قرار گرفت. بدین منظور القاپذیری عنصر E در مقابل عوامل مختلف در گیاه کلزا مطالعه شد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و سویه‌های قارچی و باکتریایی

بذرهای کلزارقم R line Hyola 308 از شرکت دانه‌های روغنی تهیه گردیده و تا زمان استفاده در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. قارچ‌های *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه ۲۳۱۰ (اهدایی آقای دکتر همایون افشاری آزاد، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی)، جدایه R2 قارچ *Rhizoctonia solani* (اهدایی آقای دکتر بهرام شریف نبی، دانشگاه صنعتی اصفهان) و جدایه 9 Fgsh قارچ *Fusarium graminearum* (اهدایی خانم دکتر فروغ سنجریان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) تهیه و استفاده شد. باکتری *Escherichia coli* (سویه DH5 $\alpha$ ) و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه گردید.

Pep25 جدا شده از قارچ *Phytophthora sojae* شناسایی شد (Nürnberg *et al.* 1994). این عنصر از یک توالی ۲۱ نوکلئوتیدی شامل دو نسخه از توالی هسته‌ای TGAC تشکیل شده است و به گروه W Box مربوط می‌شود (Kirsch *et al.* 2001). پیشبر حامل این عنصر در فاصله زمانی کمتر از ۲۰ دقیقه پس از القا واکنش نشان داده و از نظر سرعت واکنش در حد پیشبر پروتئین WRKY1 عمل می‌نماید، به گونه‌ای که در گروه پیشبرهای بسیار سریع فعال شونده (Immediate-early activated promoter) قرار گرفته است. هم‌چنین بیان موضعی ژن تحت کنترل این پیشبر در محل آلودگی برگ گیاه جعفری به‌خوبی مشاهده شده است. عملکرد این عنصر در گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت در واکنش به محرک Fig22، صدمات فیزیکی یا زخم شدگی و حمله چند بیمارگر مورد مطالعه قرار گرفته است (Kirsch *et al.* 2001).

ویژگی‌های عنصر E17 آن را به‌عنوان یک عنصر بالقوه برای ساخت پیشبرهای مصنوعی القا شونده با بیمارگرها (Pathogen inducible synthetic promoter) مورد توجه قرار داده است. با توجه به ماهیت حفاظت شده پروتئین‌های مسئول فعال‌سازی نسخه‌برداری در میان گونه‌های مختلف انتظار می‌رود این عنصر عملکرد مشابهی در دیگر گونه‌های گیاهی نشان دهد (Singh *et al.* 2002). با این حال قبل از استفاده از این عنصر در یک سیستم هترولوگ ضروری است عملکرد آن در گیاه میزبان کاملاً مورد بررسی قرار گیرد. از سوی دیگر عملکرد این عنصر تنها در مقابل چند بیمارگر ناسازگار بررسی شده است و از چگونگی عملکرد آن در مواجهه با دیگر انواع بیمارگرها بخصوص از نوع سازگار و هم‌چنین در مقابل تیمارهای دخیل در سیستم‌های دفاعی گیاه چون سالیسیلیک اسید،

## پلاسمیدها و مواد مورد استفاده

پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت از pMPPGi و pEEMPGi بودند. برای انجام واکنش PCR از آنزیم *Taq-polymerase* و *pfu-polymerase* (از شرکت Fermentas) استفاده گردید. تمامی آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت سیناژن ایران سنتز شد. کلیه توالی‌یابی‌ها توسط شرکت biolab از کشور کره انجام شد. آنزیم‌های مورد استفاده برای هضم آنزیمی DNA و آنزیم لیگاز از شرکت Fermentas تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بیولوژی ملکولی و نیز کیت خالص سازی DNA از شرکت Roche تهیه شد. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت گیاهی و باکتریایی و نیز تنظیم‌کننده رشد گیاهی (BAP) از شرکت Sigma تهیه گردید.

## آماده‌سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه

به منظور انتقال ژن از روش مولونی و همکاران استفاده شد (Moloney *et al.* 1989). در این روش بذرهای کلزا (*Brassica napus*) رقم R line Hyola-308 ضد عفونی شدند و برای جوانه زدن روی محیط کشت جوانه زنی (1X MS organic, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت گردیدند. بذرهای کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برگ‌های لپه‌ای گیاهان پنج روزه که طول دم برگ آنها حدود دو میلی متر بود، جدا شدند و پس از حذف جوانه انتهایی دم‌برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی محیط پیش کشت (1X MS organic, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت گردیدند. ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم بودند. از کشت شبانه آگروباکتریوم ترانسفورم شده

(Jyothishwaran *et al.* 2007) ( $OD_{650}=1$ ) رسوب تهیه شد (با سرعت 2500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه) سپس باکتری‌های رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون درآورده شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل برگ‌های لپه‌ای بودند که ۲۴ ساعت روی محیط کشت القای نوساقه (پیش کشت) قرار گرفته بودند. دم‌برگ برگ‌های لپه‌ای به مدت ۹۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار گرفتند. این برگ‌های لپه‌ای روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا نسبتاً خشک گردند. سپس در محیط همکشتی (1X MS organic, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت داده شدند و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی القا نوساقه (1X MS organic, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) حاوی 15 mg/l کانامایسین و 200 mg/l سفوتاکسیم، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار در محیط مشابه واگشت شدند. در هفته سوم نوساقه‌های متعددی در سطح فوقانی بعضی از ریزنمونه‌ها به وجود آمدند.

نوساقه‌های سبز باززایی شده در محیط گزینشگر، جدا شده و به محیط طویل شدن نوساقه (1X MS organic, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) حاوی 25 mg/l کانامایسین و 200 mg/l سفوتاکسیم منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مریستم فعال، نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی (1X MS organic, sucrose 30 g/l, IBA 2 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) به علاوه آنتی بیوتیک‌های کانامایسین (25 mg/l) و سفوتاکسیم (200 mg/l) انتقال داده شدند. لازم به ذکر است بعضی از نمونه‌ها در همان محیط طویل شدن نوساقه ریشه دار می‌شدند و احتیاجی به انتقال به محیط ریشه‌زایی نداشتند.

(ساخت شرکت Corbett Research کشور استرالیا) انجام گردید.

### آماده سازی مواد قارچی جهت تیمار دیسک‌های برگ گیاهی

از کشت‌های تازه قارچ‌های مورد مطالعه روی محیط PDA، به ابعاد 1×1 میلی‌متر به منظور تلقیح دیسک‌های برگی استفاده گردید. میسلیم‌های حاصل از 100 میلی‌لیتر کشت مایع 14 روزه این قارچ‌ها پس از شستشو با آب مقطر به مدت سه ساعت در 50 میلی‌لیتر آب مقطر در شرایط به هم خوردن (Shaking) قرار داده شدند و پس از یک دقیقه ورتکس مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت 5000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاصل (حاوی عوامل آزاد شده از دیواره سلولی قارچ) پس از عبور از فیلتر 0/22 میکرون جهت تلقیح دیسک‌های برگی مورد استفاده قرار گرفت.

### اعمال تیمارهای القایی

در هر آزمایش به منظور اعمال تیمارها، ابتدا از هر سازه (SynP1 و MinP) سه گیاه در مرحله پنج برگی انتخاب و از سه برگ باز شده جوان آنها دیسک‌هایی به قطر یک و نیم سانتی‌متر تهیه شد. اثر فاکتورهای مورد مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای مورد مطالعه شامل فاکتور ژنوتیپ (با سه سطح: گیاهان حامل پیشبرهای SynP1 و MinP و گیاهان کلزا غیر تراریخت عنوان شاهد)، فاکتور شرایط آزمایشی (با دو سطح: نوع تیمار اعمالی در هر مرحله و بدون تیمار به عنوان کنترل) با در نظر گرفتن سه تکرار اعمال گردید. دیسک‌های برگی

گیاهان پس از حدود 4 هفته و پس از مشاهده ریشه‌های کافی به گلدان حاوی خاک استریل (به نسبت مساوی از پیت، پرلیت و ورمی کولیت) منتقل شدند و روی آنها نایلون کشیده شد سپس با ایجاد منافذ تدریجی کم‌کم به محیط سازگار شدند و تا اتمای بذرگیری به طور مرتب آبیاری شدند.

### استخراج DNA ژنومی گیاه و PCR

DNA ژنومی از برگ گیاه کلزا به روش CTAB (Doyle & Doyle 1991) استخراج گردید. DNA به دست آمده در دمای 20- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. کیفیت DNA استخراجی به وسیله یک جفت آغازگر اختصاصی کلزا (Hernandez et al. 2001) به نام ACC-f&r (جدول 1) با دمای اتصال 58 درجه سلسیوس بررسی شد.

جهت تأیید گیاهان تراریخت از روش ارزیابی مبتنی بر PCR استفاده شد (Worrall 1998). به منظور تأیید گیاهان تراریخت از آغازگرهای اختصاصی pGEE-f/r با دمای اتصال 56 درجه سلسیوس استفاده گردید. هم‌چنین به منظور کنترل آلودگی DNA مربوط به اگروباکتریوم جفت آغازگر pVirG-f/r (جدول 1) با دمای اتصال 54 درجه سلسیوس طراحی و استفاده شد.

واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر حاوی 100 نانوگرم DNA ژنومی، 2/5 میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، 200 میکرومول dNTPs (سیناژن) و 2/5 میکرولیتر بافر PCR 10X (سیناژن)، پنج پیکومول از آغازگرهای ACC-f&r، یک واحد آنزیم تک پلیمراز (سیناژن) و با برنامه حرارتی سه دقیقه در 94 درجه سلسیوس و 40 چرخه با 45 ثانیه در 92 درجه سلسیوس، 30 ثانیه دمای اتصال، یک دقیقه در 72 درجه سلسیوس و مرحله تکثیر نهایی با پنج دقیقه در 72 درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر

## جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. The oligonucleotids (primers) used in this study.

| آغازگر Name | توالی Sequence                                     |
|-------------|--|
| Sense       | 5'-GACTAGTTGTCAATGGTCAACATTCAACTCTAGAGCCCTTCCC-3'  |
| Anti sense  | 5'-GGGCTCTAGAGTTGAATGTTGACCATTGACAACACTAGTCTGCA-3' |
| pAE-f       | 5'-AGCATCTTACGGATGGCATG-3'                         |
| pAE-r       | 5'-CACCTATCTCAGCGATCTGTC-3'                        |
| pGEE-f      | 5'-CTGGCTTTCTACGTGTTCCGC-3'                        |
| pGEE-r      | 5'-GGGTTTCTACAGGACGGACG-3'                         |
| ACC-f       | 5'-CTATAGCTGGGGTCAATGACAACG-3'                     |
| ACC-r       | 5'-GTCGACAGAAGAATGATCGCGAAC-3'                     |
| VirG-f      | 5'-ATGATTGTACATCCTTCACG-3'                         |
| VirG-r      | 5'-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG-3'                         |

## مطالعه هیستوشیمیایی و فلوریمتری فعالیت آنزیمی

## GUS

دیسک‌های برگ‌ی ۲۴ ساعت پس از آلودگی به لوله‌های اپندورف منتقل شد و به وسیله روش سنجش هیستوشیمیایی، فعالیت GUS مورد بررسی قرار گرفت (Cervera 2004). با استفاده از سیستم تصویر برداری میکروسکوپی بیان و فعالیت آنزیم بتا-گلوکونیداز در بافت برگ‌های تیمار شده مشاهده و از عملکرد موضعی و سیستمیک توالی تنظیمی در مواجهه با تیمارهای مختلف تصویربرداری شد. به منظور مقایسه کمی میزان فعالیت آنزیمی GUS، از روش فلوریمتری استفاده گردید (Cervera 2004). بدین منظور از دستگاه فلوریمتر (FluoStar از شرکت BMG اتریش) استفاده شد. مقدار پروتئین کل (Total protein) موجود در عصاره گیاهی نمونه‌ها به منظور نرمال‌سازی داده‌های فلوریمتری مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین کل به روش برادفورد (Bradford 1976) و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Analytica jena ساخت شرکت Analytica jena) در طول موج جذبی ۵۹۵ نانومتر تعیین شد.

به منظور اعمال هر تیمار در محلول مربوط غوطه‌ور شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه دسیکاتور تحت فشار منفی قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت درون تشتک‌پتری حاوی محیط کشت پایه MS فاقد هورمون، نگهداری شدند. نمونه‌های شاهد در هر آزمایش پس از برش و بدون تیمار تا زمان تعیین فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این آزمایش از سالیسیلیک اسید (با غلظت دو میلی مولار) و متیل جاسمونات (۵۰ میکرومولار) به عنوان دو فاکتور مهم فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی و کیتین کلونیدی (با غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نیز به عنوان یک محرک عمومی سیستم دفاعی گیاه استفاده گردید. هم‌چنین تأثیر عوامل محیطی مانند گرما (دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت) (Storozhenko *et al.* 1998)، سرما (دمای چهار درجه سلسیوس به مدت سه ساعت) (Yang *et al.* 2000) و تابش اشعه UV (با استفاده از لامپ‌های UV-B با طول موج دامنه ۲۸۰ تا ۳۱۵ نانومتر به مدت زمان سه ساعت) (Bolle 2009) در میزان بیان و القای پذیری سازه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## آنالیز داده‌ها

مراحل نرمال‌سازی داده‌ها و رسم گراف‌ها به وسیله برنامه Excel 2007 و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS 16 انجام شد.

## نتایج و بحث

در این تحقیق از عنصر E17 جهت ساخت یک پیشبر القاشونده با بیمارگرها (Pathogen-inducible promoter) استفاده گردید. به منظور تعیین قدرت بیان و القاپذیری پیشبر (SynP1) حاوی عنصر E از ژن گزارشگر *GUS* اینترون‌دار استفاده شد. اینترون‌دار کردن ژن *GUS* به منظور ممانعت از بیان باکتریائی این ژن و ایجاد تداخل در نتایج آنالیز بیان ژن در نسل T0 انجام شد. نقش عوامل شیمیایی، بیولوژیک و محیطی در القاپذیری پیشبر در گیاهانی که حاوی پیشبرهای SynP1 و MinP بودند مورد ارزیابی قرار گرفت.

سازه‌های ساخته شده در این مطالعه شامل pGEE و pGMP تنها از نظر محل کلونینگ *cis-acting elements* با یکدیگر متفاوت بودند. در این سازه‌ها توالی پایه به وکتور pGPTV مربوط بود و در هر دو سازه کاملاً مشابه بود. در سازه pGEE دو نسخه از توالی عنصر E17 در بالادست توالی *minimal promoter* قرار گرفت (شکل ۱).

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود دو کاست SynP1 و MinP تنها از نظر حضور توالی عنصر E17 با یکدیگر اختلاف دارند. از آنجا که هدف آزمایش بررسی عملکرد عنصر E17 در شرایط مختلف است، لذا تمام اجزای دیگر دو سازه کاملاً یکسان هستند. در سازه‌های ساخته شده ژن گزارشگر *gus* اینترون‌دار در سمت

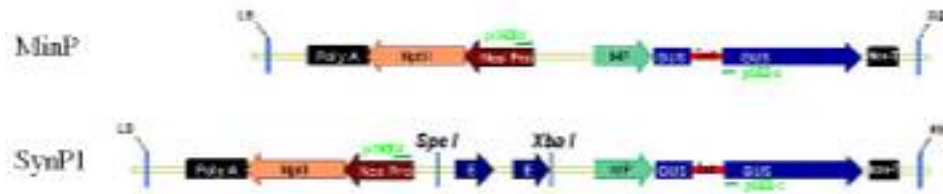
راست T-DNA و ژن مقاومت به کانامایسین در سمت چپ آن قرار دارند. از آنجا که در هنگام انتقال، T-DNA از سمت راست از سلول باکتری به گیاه منتقل می‌شود. گیاهان مقاوم به کانامایسین که ژن *NptII* را دریافت داشته‌اند حتماً ژن *gus* و پیشبر مربوط به آن را نیز دریافت نموده‌اند.

## تراریختی گیاه کلزا

دو پلاسمید ژنی تأیید شده حاوی SynP1 و MinP به‌طور جداگانه به آگروباکتریوم منتقل گردیدند. انتخاب باکتری‌های ترانسفورم شده با استفاده از محیط حاوی کانامایسین و نیز مطالعه الگوی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *pGEE-f / r* انتقال پلاسمیدهای مذکور به آگروباکتریوم را تأیید نمود.

سلول‌های زخمی قاعده دم‌برگ کوتیلدونی که با دریافت T-DNA، ژن مقاومت به کانامایسین (*NptII*) در آنها بیان شده بود در مقابل کانامایسین محیط مقاومت کرده و سبز باقی ماندند. گیاهچه‌های ریشه دار شده طی مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت با شرایط گلخانه سازگار شدند. در هفته دوازدهم گیاهچه‌ها به‌خوبی در گلدان استقرار یافته و برگ‌های جدید روی آنها تشکیل شد (شکل ۲).

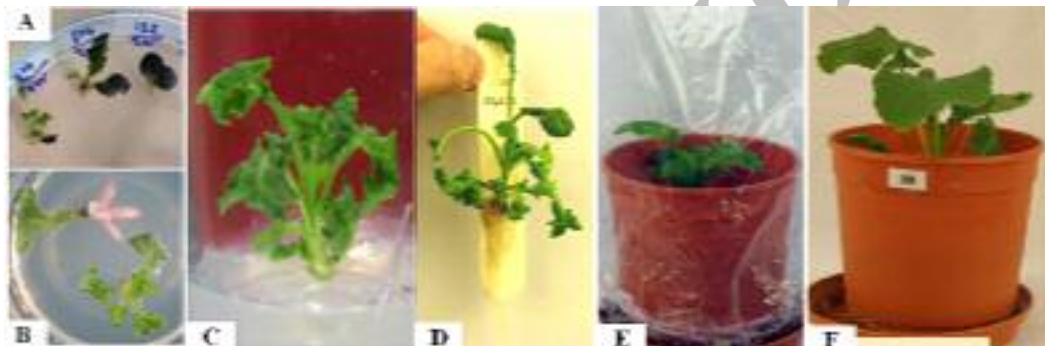
گیاهچه‌های تراریخت به‌دست آمده به روش PCR با استفاده از آغازگرهای *pGXX-f/r* مورد تأیید قرار گرفت. اندازه قطعات مورد انتظار مربوط به گیاهان تراریخت حامل پروموتور SynP1 و MinP به ترتیب به اندازه‌های ۴۶۰ و ۴۱۰ جفت باز بود که با الگوی الکتروفورزی مشاهده شده انطباق داشت (شکل ۳).



شکل ۱. نمای شماتیک کاست‌های T-DNA حامل پیشبرهای SynP1 و MinP ساخته شده در این تحقیق.

Fig. 1. Schematic representation of SynP1 and MinP synthetic promoters constructed in this research.

LB: left border, NOS-ter: nopaline synthase terminator, NptII: neomycin phosphotransferase, NOS-pro: nopaline synthase promoter, E: a pathogen inducible cis-acting element, MP: minimal promoter (the sequence -46 to +8 from CaMV35S promoter), GUS:  $\beta$ -glucuronidase gene containing an intron, NOS-ter: nopaline synthase terminator, int: intron, RB: right border,



شکل ۲. فرایند انتقال ژن و باززایی گیاه کلزا.

A. باززایی نوساقه‌ها از انتهای دم‌برگ‌های کوتیلدونونی روی محیط القا نوساقه، B. نوساقه‌های تراریخت و غیر تراریخت روی محیط حاوی کانامایسین، C- نوساقه مقاوم به کانامایسین در مرحله طول شدن ساقه و ریشه‌زایی، D. گیاهچه تراریخت ریشه‌دار شده با برگ‌های توسعه یافته هنگام انتقال به خاک، E. گیاهچه‌های تراریخت پس از انتقال به گلدان و در مرحله سازگاری، F- گیاه کلزای تراریخت استقرار یافته در شرایط گلخانه

Fig. 2. Transformation and regeneration of transgenic canola plants in this study.

A. Regeneration of new shoots from end of cotyledonary petioles in shoot induction medium, B. transgenic and non-transgenic shoots in medium containing 15 mg/l kanamycin, C. elongated transgenic shoot in root-induction medium, D: Regenerated plantlet with well developed roots and leaves, E. Regenerated plantlet in pot and acclimated to non-aseptic environment, F. Transgenic canola plants in greenhouse conditions.

به‌علاوه اثر تعامل پیشبرهای به‌کارگرفته شده با تیمارهای القائی اعمال شده بسیار معنی‌دار بود (جدول ۲).

#### الف - تیمار ترکیبات شیمیایی

اختلاف سطح فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در نمونه‌های حامل پیشبرهای مصنوعی پس از تیمار با ترکیبات شیمیایی

#### مطالعه کمی و هیستوشیمیایی عملکرد پیشبر مصنوعی

##### SynP1

نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اثر تیمارهای القایی در سطح فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز سنجش شده معنی‌دار است. هم‌چنین این نتایج اختلاف میانگین فعالیت ژن *GUS* در نمونه‌های حامل پیشبرهای مختلف را تأیید نمود.

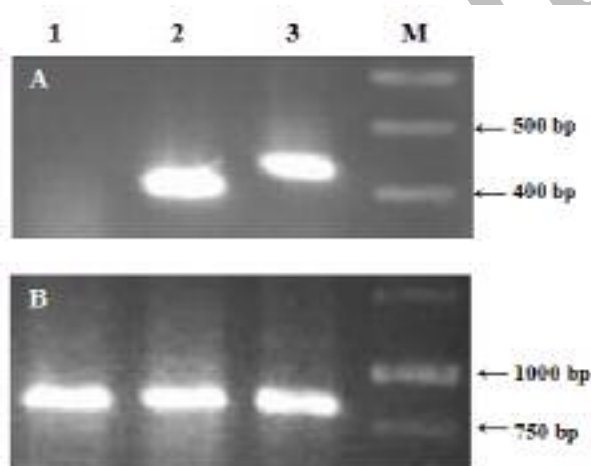


جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس نشان‌دهنده اثر پیشبر، تیمار القایی و تعامل پیشبر-تیمار القایی در فعالیت آنزیم بتاگلوکونیداز بر اساس داده‌های فلوریمتری.

**Table 2. Results of Analysis of variance (ANOVA), showing influence of promoters, treatments and promoter-treatment interactions in GUS activities based on fluorometric GUS assay data.**

| Source منبع                          | Df درجه آزادی | Mean of Square میانگین مربعات | F       | Sig.  |
|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|---------|-------|
| Treatments تیمارها                   | 5             | 4526446.113                   | 172.298 | 0.000 |
| Genotypes ژنوتیپ‌ها                  | 2             | 18000000.000                  | 685.076 | 0.000 |
| Treatment × Genotypes تیمار × ژنوتیپ | 10            | 5063297.644                   | 192.733 | 0.000 |
| Error خطا                            | 11            | 26271.095                     |         |       |
| Total مجموع                          | 28            |                               |         |       |

R Squared = 0.98 (Adjusted R Squared = 0.96)



شکل ۳. تأیید تراریخت شدن گیاهان مقاوم به کانامایسین توسط PCR  
 A. الگوی الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pGEE-f/r مربوط به مناطق در برگرفته توالی پیشبرهای مصنوعی در ژل آگارز ۱،۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. M: نشانگر وزنی 100 bp شرکت فرمتاز کانادا. محل اتصال آغازگرها در شکل ۱ نشان داده شده است.  
 B. الگوی الکتروفورزی محصول PCR ژن اختصاصی کلزا به نام استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز (۸۳۱ جفت باز) با استفاده از آغازگرهای ACC-f/r در ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. M: نشانگر وزنی 100 bp شرکت فرمتاز کانادا  
 چاهک ۱: گیاه غیر تراریخت، چاهک‌های ۲ و ۳ به ترتیب گیاهان تراریخت حامل پیشبرهای SynP1 (۴۶۰ جفت باز) و MinP (۴۱۰ جفت باز).

**Fig. 3. PCR analysis of kanamycin resistant transgenic canola.**

**A.** PCR products using specific primers (pGEE-f/r) for flanking regions of synthetic promoter sequences. Electrophoresed in agarose 1.2 % and stained by etidium bromide. M: 1 Kb DNA ladder (Fermentas, Canada) Primer positions were indicated in Fig1.  
**B.** PCR products of canola specific Acetyl-CoA carboxylase gene (ACC) (831 bp) as DNA quality control using ACC-f/r primers. Electrophoresed in agarose 1% and stained by etidium bromide.  
 Lane 1: non transgenic plant, Lanes 2 and 3: Transgenic plants harboring SynP1 (460 bp) and MinP (410 bp) promoter cassettes, respectively. M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada)

بیمارگرهای بیوتروف نیز واکنش القایی بالایی نشان دهد. پیشبر SynP1 در پاسخ به تیمار کیتین نیز به طور معنی داری واکنش نشان داد. القاپذیری این پیشبر در مقابل تیمار کیتین نشان دهنده ارتباط این پیشبر با مسیر پیام رسانی مرتبط با کیتین است که مستقل از مسیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات باعث بروز پاسخهای دفاعی گیاه می شود. مطالعات نشان داده است کیتین از طریق گیرنده های LysMRLK1 موجود در غشای سیتوپلاسمی می تواند سیستم دفاعی گیاه را فعال سازد (Eckardt 2008).

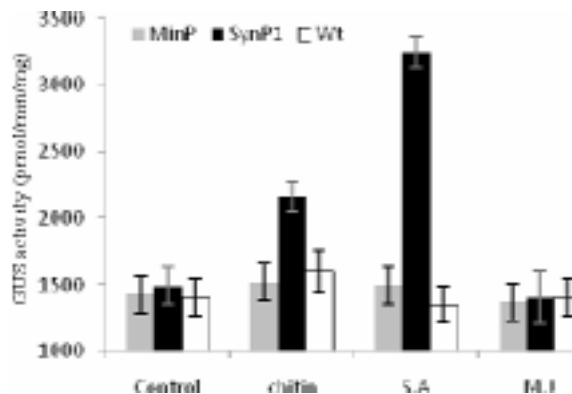
#### ب - تیمار با مواد آزاد شده از دیواره قارچهای مختلف

نتایج آنالیز داده ها، اثر تیمارهای قارچی به کارگرفته شده را معنی دار نشان داد (شکل ۵). در شرایط قبل از تیمار، تفاوت معنی داری در میزان فعالیت آنزیم GUS در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده نگردید. در گیاهان حامل توالی پیشبر MinP و شاهد (Wt) پس از تیمار با مواد آزاد شده از دیواره قارچها تفاوت معنی داری در سطح بیان آنزیم GUS مشاهده نشد. میزان فعالیت آنزیم بتا گلوکونیداز در گیاهان حامل پیشبر SynP1 پس از تیمار با هر سه قارچ افزایش یافت. این افزایش بیان در مورد قارچهای *F. graminearum*، *R. solani* و *S. sclerotiorum* متفاوت بود، به نحوی که در مقایسه با گیاهان تراریخت حاوی پیشبر MinP و گیاه شاهد (Wt) پس از اعمال تیمارهای قارچی مذکور سطح فعالیت این آنزیم به ترتیب ۳/۳، ۳ و ۱/۵ برابر افزایش یافت.

عدم واکنش پیشبر MinP به تیمارهای مواد ترشحی قارچهای مورد مطالعه نشان داد که عناصر حساس به این تیمارها نیز در توالی به کارگرفته شده در این پیشبر وجود ندارد. مقایسه واکنش پیشبر SynP1 به تیمارهای قارچی

بسیار معنی دارد بود (شکل ۴). در این بین پیشبر SynP1 در برابر تیمار سالیسیلیک اسید در مقایسه با دیگر ترکیبات شیمیایی اعمال شده بالاترین سطح فعالیت آنزیمی را از خود نشان داد. در مقایسه با سطح بیان پایه، این پیشبر بیش از دو برابر افزایش بیان داشت و در مقایسه با میزان بیان گیاهان حامل MinP تیمار شده با سالیسیلیک اسید نیز تفاوت بسیار معنی دار بود ( $\alpha=0.01$ ). عملکرد پیشبر SynP1 در مقابل تیمار کیتین نیز اختلاف معنی داری با شرایط بدون تیمار نشان داد و در مقایسه با پیشبر MinP بیش از ۱/۵ برابر القاپذیری نشان داد. تیمار متیل جاسمونات برخلاف دو تیمار دیگر تأثیر معنی داری در فعالیت آنزیمی پیشبر SynP1 در مقایسه با شرایط کنترل و پیشبر MinP نداشت. پیشبر MinP در شرایط تیماری مختلف عملکرد مشابهی از خود نشان داد و اختلاف سطح فعالیت آنزیمی تعیین شده با شرایط کنترل و هم چنین گیاهان شاهد (Wt) معنی دار نبود.

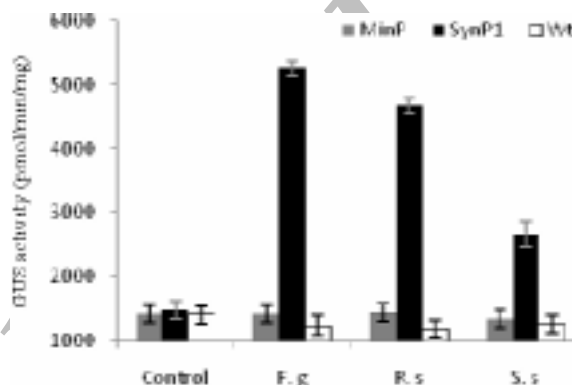
واکنش متفاوت پیشبر SynP1 به تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به خوبی متمایز کننده مسیرهای پیام رسانی مرتبط با این دو عامل در گیاه کلزاست. مسیر پیام رسانی مرتبط با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات متفاوت بوده (Dong 1998) و برخلاف سالیسیلیک اسید که بیشتر با مسیر پیام رسانی دخیل در سیستمهای دفاعی منتهی به مرگ برنامه ریزی شده سلولی و پاسخ فوق حساسیت منجر به مقاومت می شود (Garcion & Métraux 2006)، متیل جاسمونات بیشتر با افزایش سطح دفاعی عمومی گیاه در مقابل بیمارگرهای نکروتروف در سلول تجمع یافته و منجر به بروز مقاومت می شود (Pozo et al. 2004). بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می رسد پیشبر SynP1 با مسیر پیام رسانی سالیسیلیک اسید ارتباط مشخصی دارد. لذا انتظار می رود این پیشبر در مقابل



شکل ۴. تأثیر محرک‌های شیمیایی بر بیان پیشبرهای SynP1 و MinP در ترکیب با ژن *GUS* در گیاهان کلزا. فعالیت آنزیم *GUS* پس از اعمال تیمارهای کیتین ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار و متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد است با سه تکرار می‌باشد.

Fig. 4. Effect of chemical inducers on expression of the SynP1 and MinP promoter: *GUS* gene in canola plants.

*GUS* activity was detected after treatment with chitin (600  $\mu$ g/ml), salicylic acid (2 mM) and methyl Jasmonate (50  $\mu$ M). Data are expressed as the means  $\pm$  Standard Error of 3 independent experiments.



شکل ۵. تأثیر قارچ‌های مختلف بر بیان پیشبرهای SynP1 و MinP در ترکیب با ژن *GUS* در گیاهان کلزا. فعالیت آنزیم *GUS* پس از تیمار با قارچ‌های *Rhizoctonia solani* (*R.s*), *Sclerotinia sclerotiorum* (*S.s*) و *Fusarium graminearum* (*F.g*). داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد است با سه تکرار می‌باشد.

Fig. 5. Effect of different fungi on expression of the SynP1 and MinP promoter- *GUS* gene in canola plants.

*GUS* activity was detected after treatment with *Sclerotinia sclerotiorum* (*S.s*), *Rhizoctonia solani* (*R.s*) and *Fusarium graminearum* (*F.g*). Data are expressed as the means  $\pm$  Standard Error of 3 independent experiments.

گیاه در پاسخ به بیمارگرهای نکروتروف و بیوتروف (Glazebrook 2005) اختلاف مشاهده شده در سطح فعالیت آنزیمی این پیشبر در پاسخ به *S. sclerotiorum* و *R. solani* مورد انتظار است. الگوی پاسخ این پیشبر در

مختلف نشان داد. این پیشبر نسبت به بیمارگرهای غیر میزبان (*F. graminearum*) و بیوتروف (*R. solani*) در مقایسه با بیمارگر نکروتروف (*S. sclerotiorum*) حساس‌تر بود. با توجه به تفاوت عمده مسیر پیام‌رسانی

فضای بین سلولی و یا با مقاومت فیزیکی در برابر نفوذ بیمارگرها مقاومت می‌کند (Mysore & Ryu 2004). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد گیاه کلزا در واکنش به قارچ *F. graminearum* از طریق مسیر اول پاسخ می‌دهد و بدین طریق در القای پیشبر SynP1 نقش دارد. از سوی دیگر ممکن است فعالیت این پیشبر در نتیجه حضور ترکیبات عمومی دیگری در مواد ترشحاتی این قارچ باشد. عنصر به کار گرفته شده در این پیشبر در گیاه جعفری نیز در واکنش به محرک Pep25 جداشده از *Phytophthora sojae* (قارچ غیر بیماری‌زای جعفری) (Nürnberg et al. 1994) القاپذیری نشان داده است (Heise et al. 2002). در واقع از آنجا که برهمکنش از نوع مقاومت غیر میزبان بوده است با برهمکنش میان کلزا و قارچ *F. graminearum* (غیر میزبان) شباهت دارد، لذا به نظر می‌رسد مسیر دفاعی این دو گیاه در برابر بیمارگرهای غیر میزبان تا حدی مشابه باشد.

### ج- تیمار شرایط محیطی

آنالیز داده‌های کمی حاصل از فلوریمتری فعالیت آنزیم بتا گلوکونیداز نشان داد که پروموتورهای مورد بررسی به تیمارهای اعمال شده واکنش نشان ندادند و اختلافات جزئی مشاهده شده در سطح فعالیت آنزیمی مربوط به گیاهان شاهد و گیاهان تراریخت حاوی پیشبرهای SynP1 و MinP از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (نتایج ارائه نشده است).

عملکرد چندگانه ژن‌های دخیل در مسیرهای دفاعی گیاه سبب می‌شود تا در بیشتر پیشبرهای القایی عناصر حساس به عوامل بیمارگری در کنار عناصر حساس به تنش‌های محیطی چون سرما، گرما قرار گیرند

واکنش به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نیز به خوبی نشان‌دهنده فعالیت بیشتر این پیشبر در پاسخ به مسیر پیام‌رسانی مرتبط با سالیسیلیک اسید است. با توجه به نقش عمده سالیسیلیک اسید در مسیر پیام‌رسانی مقاومت به بیمارگرهای بیوتروف (Garcion & Métraux 2006) عملکرد این پیشبر در واکنش همسو به قارچ رایزوکتونیا و تیمار سالیسیلیک اسید مورد انتظار خواهد بود.

پیشبر SynP1 برخلاف تیمار متیل جاسمونات به تیمار مواد ترشحاتی قارچ *S. sclerotiorum* واکنش نشان داد. با توجه به ارتباط میان متیل جاسمونات و مسیر پیام‌رسانی مسئول مقاومت در برابر بیمارگرهای نکروتروف انتظار می‌رفت واکنش مشابهی نسبت به این دو تیمار مشاهده شود. با این حال با توجه به تفاوت سطح بیان پیشبر SynP1 در برابر *S. sclerotiorum* نسبت به *R. solani* که نشان‌دهنده حساسیت کمتر این پیشبر به *S. sclerotiorum* است به نظر می‌رسد حضور مواد القایی در مواد ترشحاتی قارچ *S. sclerotiorum* قادرند از مسیری غیر از مسیر متیل جاسمونات پیشبر SynP1 را القا نمایند. احتمال دیگری نیز وجود دارد که فاکتور القاکننده پیشبر SynP1 در بالادست مسیر متیل جاسمونات قرار داشته است و این هورمون قادر به القا آن نیست.

مقایسه واکنش پیشبر SynP1 در پاسخ به قارچ غیر بیماری‌زا در کلزا *F. graminearum* در مقایسه با بیمارگر بیوتروف *R. solani* نشان‌دهنده حساسیت بالا و القاپذیری این پیشبر در برابر این بیمارگر بود. گیاهان معمولاً به دو طریق در واکنش به قارچ‌های غیر بیماری‌زا مقاومت نشان می‌دهند. در روش اول گیاه از طریق پاسخ فوق حساسیت و بروز مرگ سلولی در محل آلودگی که با مسیر مقاومت سالیسیلیک اسید مشابهت دارد واکنش نشان می‌دهند. در روش دوم گیاه با ترشح فیتوالکسین‌ها و نامساعد نمودن

گسترش یافته و تا حدود زیادی بافت برگ را تخریب نموده بود. در صورتی که در نمونه‌های آلوده شده به *R. solani* و *F. graminearum*، ضمن این‌که میسلیم‌های قارچ به خوبی رشد کرده بودند ولی خسارت زیادی به بافت برگ نمونه وارد نشده بود.

در نتایج مطالعه هیستوشیمیایی، تنها در محل آلوده شده برگ گیاهان حامل پیشبر SynP1 رنگ آبی بسیار محدودی در نمونه‌های تیمار شده با *R. solani* و *F. graminearum* مشاهده شد، در صورتی که در نمونه‌های تیمار شده با *S. sclerotiorum* هیچ‌گونه واکنش ماکروسکوپی از فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز مشاهده نشد (شکل ۶). هم‌چنین در دیسک‌های برگ‌ی مربوط به پیشبر SynP1 در شرایط بدون تیمار و نمونه حامل پیشبر MinP و گیاه (Wt) در شرایط قبل و بعد از تیمار هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی ژن *GUS* به صورت ماکروسکوپی مشاهده نگردید (شکل ۶).

عدم مشاهده رنگ آبی ناشی از فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در محل بریده شدن دیسک‌های برگ‌ی مورد استفاده نشان داد که پیشبرهای SynP1 و MinP واکنش القایی قابل مشاهده‌ای در اثر زخم شدگی از خود نشان ندادند.

از آنجا که سنجش فلوریمتری فعالیت ژن *GUS* در نمونه‌های القا شده با عصاره می‌سلیم مربوط به قارچ‌های *F. graminearum*، *R. solani* و *S. sclerotiorum* حاکی از القاپذیری پیشبر SynP1 توسط عوامل ترشحی قارچ‌ها بوده ولی بیان ژن *GUS* در دیسک‌های برگ‌ی القا شده توسط قارچ *S. sclerotiorum* در مطالعه هیستوشیمیایی در سطح ماکروسکوپی قابل مشاهده نمی‌باشد، لذا در این بخش اقدام به مطالعه میکروسکوپی دیسک‌های برگ‌ی القا شده توسط قارچ *S. sclerotiorum* گردید. نتایج به دست

(Lee et al. 2007). عملکرد پیشبر SynP1 عدم القاپذیری این پیشبر را به تیمارهای محیطی مورد آزمایش نشان داد. عدم واکنش پیشبر SynP1 به تیماری‌های محیطی، ویژگی بسیار مطلوبی برای این پیشبر به‌شمار می‌رود.

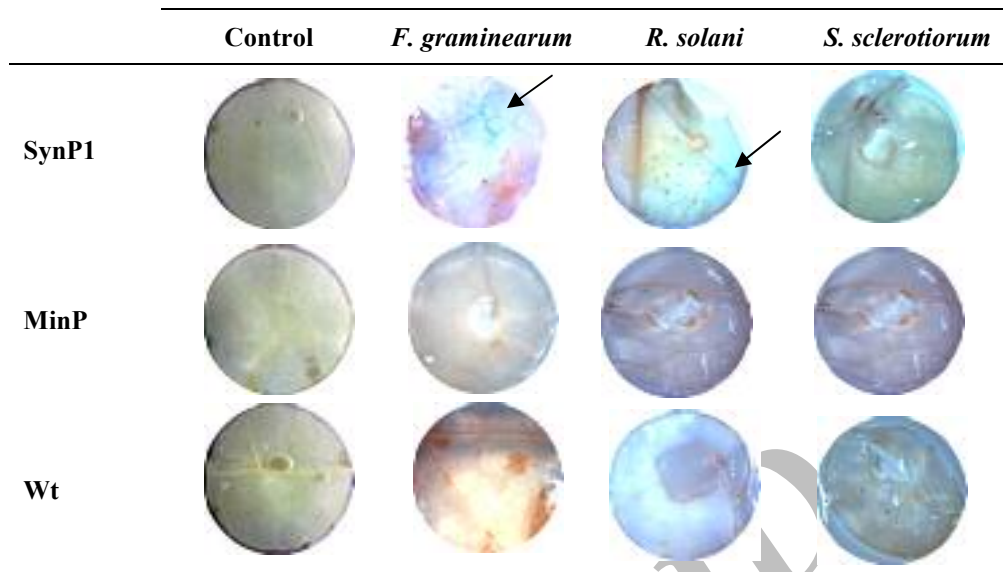
#### د- تیمار زخم شدگی

نتایج به دست آمده از آزمایشات کمی سنجی آنزیم بتا گلوکورونیداز نشان داد که پیشبرهای SynP1 و MinP از خود واکنش القایی در برابر برش‌های اعمال شده نشان ندادند (داده‌ها ارائه نشده است). عدم مشاهده فعالیت آنزیمی در حاشیه دیسک‌های برگ‌ی در شرایط کنترل (شکل ۶) این مطلب را تأیید نمود.

گزارش‌های موجود در خصوص عملکرد عنصر E17 در گیاه جعفری نشان‌دهنده عدم القاشدن آن در محله‌ای صدمه دیده و بریده شده بوده است (Kirsch et al. 2001). نتایج تحقیق حاضر نشان داد پیشبر SynP1 قادر است بدون پاسخ به خسارت‌های فیزیکی مانند بریدگی و شکستگی واکنش بسیار مناسبی به بیمارگرهای مختلف نشان دهد. عدم واکنش این پیشبر به برش‌های ایجاد شده در بافت برگ به‌عنوان یک ویژگی بسیار مهم برای ساخت پرومتر مصنوعی اختصاصی جهت پاسخ به بیمارگرها به‌شمار می‌رود. این نتایج نشان می‌دهد این عنصر عملکرد مشابهی در گیاه کلزا در واکنش به صدمات فیزیکی بروز می‌دهد.

#### آزمایش های هیستوشیمیایی

سرعت رشد میسلیم قارچ‌های مختلف و میزان خسارت وارد شده به بافت برگ نمونه‌های مورد بررسی بسیار متفاوت بود. قارچ *S. sclerotiorum* پس از ۱۲ ساعت کاملاً روی سطح دیسک‌های برگ‌ی



شکل ۶. آنالیز هیستوشیمیایی بیان GUS در گیاهان کلزای تراریخت. سنجش هیستوشیمیایی GUS در گیاهان تراریخت حامل پیشبرهای SynP1, MinP و گیاهان شاهد (Wt), ۱۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ‌های *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* و *Fusarium graminearum* در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده (شاهد). فلش‌ها نشان‌دهنده فعالیت آنزیم GUS می‌باشد.

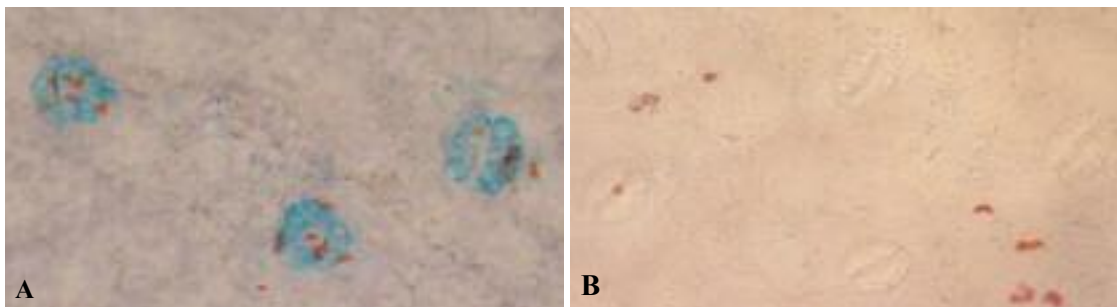
Fig. 6. Histochemical analysis of GUS expression in transgenic canola plants.

Histochemical GUS staining in transgenic plants harboring SynP1, MinP promoters and wild type plants 12 hours after infection by *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in comparison with untreated samples (Control). The arrows indicate GUS activity.

تیمار مواد ترش‌چی قارچ *S. sclerotiorum* مشاهده کرد. گزارش‌های ارائه شده نشان می‌دهد که قارچ *S. sclerotiorum* علاوه بر تولید پروتئازهای مختلف با تولید اسید اگزالیک خسارت بالایی به بافت گیاه وارد می‌سازد (Kyoung et al. 2008). هم‌چنین مشخص شده است این بیمارگر قادر است با ترشح پروتئین‌های بازدارنده از فعالیت ترانس‌کریپشن فاکتورهای مرتبط با سیستم دفاعی جلوگیری نماید (Yang et al. 2009). اخیراً نشان داده شده است که نشان دادند که در گیاهان کلزای آلوده شده به *S. sclerotiorum* سطح بیان آنزیم‌های دخیل در سنتز سالیسیلیک اسید کاهش می‌یابد (Jianwei et al. 2009). لذا به نظر می‌رسد کاهش فعالیت آنزیم بتا گلوکرونیداز در آزمایش‌های هیستوشیمیایی

آمده نشان داد که قارچ *S. sclerotiorum* قادر به القای پیشبر SynP1 بوده و بیان ژن GUS به صورت محدود در سلول‌های محافظ روزه قابل مشاهده می‌باشد، در حالی که در دیسک‌های برگ‌گی بدون تیمار علائمی از فعالیت ژن GUS قابل مشاهده نمی‌باشد (شکل ۷).

نتایج هیستوشیمیایی نیز نتایج به دست آمده از فلوریمتری را تأیید نمود. در این بررسی عملکرد پیشبر SynP1 در نمونه‌های آلوده شده به *F. graminearum* و *R. solani* بیشتر از آلودگی با *S. sclerotiorum* بود که در آزمایش‌های فلوریمتری نیز این تفاوت مشاهده شد. با مقایسه نتایج مشاهدات هیستوشیمیایی از اثر مستقیم آلودگی قارچ و تیمار مواد ترش‌چی آن به خوبی می‌توان پاسخ پیشبر SynP1 را به



شکل ۷. تصویر میکروسکوپی (40X) از مطالعه هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم GUS در برگ گیاهان تراریخت حامل پیشبر SynP1 پانزده ساعت پس از تیمار با مواد آزاد شده از دیواره سلولی قارچ *S. sclerotiorum* در (a) در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده (b).

**Fig. 7. (40 X) Light micrograph of histochemical GUS staining of treated leaf samples from transgenic plants harboring SynP1 and MinP promoters, 15 hours after treatment by cell wall released elicitors of *S. sclerotiorum* (A) in comparison with untreated samples (B).**

بیان پایه و یا سطح بیان محدود، یکی از ویژگی‌های مهم در پیشبر مصنوعی القا شونده با بیمارگرها به‌شمار می‌رود (Rushton *et al.* 2002, Gurr & Rushton 2005, Venter 2007).

### سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به‌دلیل تأمین بودجه پژوهشی این تحقیق (طرح ۳۲۸) تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورد. هم‌چنین از مساعدت پژوهشکده غلذد فوق کلیوی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و آقای دکتر هدایتی جهت همکاری در انجام آزمایش‌های فلوریمتری و سنجش فعالیت آنزیمی سپاسگزاری می‌شود.

### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (49-51) متن انگلیسی مراجعه شود.

به‌دلیل اثر تخریبی قارچ بوده هرچند احتمال مهار شدن مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به سیستم دفاعی نیز وجود دارد.

در مجموع تحقیق حاضر نشان داد که عدم واکنش پیشبر MinP به تیمارهای مختلف و مشابه بودن سطح فعالیت آن با گیاهان شاهد نشان‌دهنده عدم وجود عناصر حساس به تیمارهای اعمال شده در این توالی است، لذا تفاوت‌های مشاهده شده بین این پیشبر و پیشبر SynP1 را می‌توان به حضور عناصر القایی به‌کارگرفته شده در پیشبر SynP1 مرتبط دانست. لذا حضور عنصر E در پیشبر SynP1 عامل اصلی القاپذیری در مقابل عوامل بیمارگر و تیمارهای اعمال شده به‌شمار می‌رود.

عدم القاپذیری این عنصر در برابر عوامل محیطی مانند سرما، گرما، زخم و UV از ویژگی‌های مهم این عنصر به‌شمار می‌رود. هم‌چنین مشابه بودن سطح فعالیت آنزیمی در گیاهان حامل پیشبر SynP1 در شرایط بدون تیمار (کنترل) با گیاهان حامل پیشبر MinP نشان می‌دهد که سطح بیان پایه پیشبر SynP1 بسیار ناچیز است. عدم وجود