Archive of SID

بررسی مولکولی القای کلروز توسط ژنهای *rolC* و *trolC* در گیاه توتون

حسین گردونپر[۱]، هانیه محجل شجاء[۱*] و محمدعلی حسینپور فیضی[۲]

[۱] **تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی گیاهی**

[۲] **تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری**

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۵

چکیده

ژنهای (*rol*) rooting locus بر روی Transferred DNA (T-DNA) باکتری *Agrobacterium rhizogenes* قرار دارند که با انتقال به میزبان گیاهی باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک و رشد و نمو در گیاه می‌شوند. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر ژن *rolC* از این باکتری و هومولوگ گیاهی آن یعنی ژن *trolC* از گیاه توتون، بر رشد و نمو گیاه *Nicotiana tabacum cv.samsun* انجام گرفته است. در این تحقیق ابتدا DNA گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* استخراج و از حضور ژنهای مورد نظر اطمینان حاصل شد. با توجه به اینکه گیاهان تراژن با بیان ژنهای *rolC* و*trolC*، فنوتیپ کلروزه نشان می‌دهند انتظار می‌رفت که بیان ژنهای کلروپلاستی نیز با بیان تراژنها کاهش یابد. برای بررسی این موضوع، استخراج RNA از گیاهان تراژن، سنتز cDNA و در نهایت واکنش PCR بر روی نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی ژن *psbA* کلروپلاستی انجام گرفت. نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بیان ژن فوق که کد کننده یکی از پروتئینهای فتوسیستم II می باشد در گیاهان تراژن و کلروزه به شدت کاهش یافته یا متوقف می شود و به عبارت دیگر یکی از دلایل ایجاد کلروز ناشی از این تراژنها از نقطه نظر مولکولی می‌تواند نقص بیان ژن *psbA* در گیاهان بیان کننده ژنهای *rolC* و*trolC* باشد.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم، T-DNA، *rolC*، *trolC*، RT-PCR، کلروز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۹۷۶۲، پست الکترونیکی: h_mohajjel@tabrizu.ac.ir

مقدمه

آگروباکتریوم ریزوژنز(*Agrobacterium rhizogenes*) دارای ژنهای مورد نیاز برای همیوغی (tra, trb) و تولید مثل رویشی (rep or reproduction) بر روی ژنوم اصلی خود است. پلاسمید Ri (Root inducing) این باکتری نیز دارای ژنهای بیماریزایی (vir or virulence) و قسمتی موسوم به T-DNA (Transferred DNA) می باشد که بر روی آن انکوژنها و ژنهای سنتز اوپین (opine) وجود دارند (۱۲). انکوژنها رشد نئوپلاستیکی یا توموری سلولهای میزبان را موجب شده (۱۳) و با سنتز هورمونهای گیاهی موجب تکثیر سلولهای توموری می‌گردند (۳۰). اوپین ها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که حاصل تجمع یک اسیدآمینه با یک قند یا یک α-کتواسید می باشند و به عنوان منبع کربن و نیتروژن برای باکتری محسوب می شوند.

آگروباکتریوم جهت تراژن نمودن میزبان از ژنهای متعددی استفاده می‌کند که شامل: الف) ژنهای chv (chromosomal virulence) بر روی کروموزوم باکتری جهت شناسایی و اتصال باکتری به میزبان، ب) ژنهای vir جهت فرآیندهایی چون آماده سازی، انتقال و الحاق T-DNA در ژنوم میزبان و ج) برخی از ژنهای میزبان که برای انتقال T-DNA در سیتوپلاسم سلول گیاهی و الحاق آن در ژنوم به کار می-روند، می باشد (۳۳).

سندرم ریشه‌های موئین یا حصیری (root-mat disease)

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۳) که ناشی از انتقال T-DNA به ژنوم میزبان گیاهی می باشد با ایجاد ریشه‌های بسیار منشعب که عدم تمایل به جاذبه (ageotropic) را دارند مشخص می گردد. از لحاظ مورفولوژیک این ریشه‌ها بسیار مشابه انواع طبیعی هستند. ریشه‌های تراژن قابلیت باززایی گیاهان زایا را دارند که در بسیاری از گونه‌ها این گیاهان با ویژگیهایی چون کندی رشد، میان گره‌های کوتاه شده، برگهای چروکیده، کاهش غالبیت رأسی و ریشه‌های حجیم و آژئوتروپیک متمایز می‌شوند. به مجموع این صفات سندرم ریشه‌های موئین (hairy roots) گفته می‌شود (۳۱). مهم ترین ویژگی ریشه-های موئین قابلیت رشد سریع آنها در عدم حضور هورمونها است که به دلیل حضور ژنهای القاگر ریشه (*rol* genes) و ژنهای سنتز هورمون اکسین (*aux* genes) بر روی T-DNA می‌باشد (۲۲).

خانواده ژنهای *rol* مستقر برروی T-DNAی *آ. ریزوژنز* عامل اصلی ایجاد سندرم ریشه‌های موئین محسوب می-شوند. این ژنها شامل *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* است (۲۷). مهمترین تأثیرات ژنهای *rol* در گیاهان بالا بردن میزان حساسیت گیاه به هورمونها از جمله اکسین است (۶) که از طریق آزمایشهای انجام گرفته بر روی گیاهانی چون *N. tabacum* و *L. corniculotus* مورد تأیید قرار گرفته است (۲۵ و ۲۸). ژن *rolC* به لحاظ اهمیتی که در بهبود صفات تزئینی و باغبانی بر روی گیاه دارد بیشتر از ژنهای دیگر مورد بررسی و مطالعه محققین قرار گرفته است (۷). به لحاظ بیماریزایی بیان ژن *rolC* با ایجاد سندرم ریشه‌های موئین و تغییراتی همچون تولید ترکیبات ثانویه جدید، تغییر توازن هورمونی گیاه و ایجاد کلروز توأم است. افزایش شاخه‌های جانبی، ایجاد برگهای سوزنی شکل، گلدهی زودهنگام، کاهش اندازه گلها و ایجاد نر عقیمی با کاهش تولید دانه گرده از دیگر تغییرات مورفولوژیکی ناشی از بیان ژن *rolC* در گیاهان می باشد (۸، ۱۰، ۱۸ و ۲۴). یکی از مهم ترین تنظیم‌کننده‌های بیان ژن *rolC*، ساکارز است. طبق بررسیهای به عمل آمده ناحیه پاسخ به ساکارز در پروموتر این ژن در ناحیه ۹۴- تا ۱۳۵- قرار دارد. وجود منابع بالای ساکارز در بافتهای فلوئم منجر به بیان بالای ژن *rolC* در این بافتها شده است (۳۵).

از نقطه نظر تأثیر ژن *rolC* بر هورمونهای گیاهی باید اشاره نمود که این ژن بر میزان سایتوکینین‌ها، اکسین‌ها و جیبرلین‌ها (GA) تأثیر می‌گذارد. تغییراتی چون کاهش غالبیت رأسی و افزایش میزان شاخه‌های فرعی اشاره بر تغییر میزان هورمون سایتوکینین دارد (۲۴و ۳۶). Maurel و همکارانش (۱۹۹۱) با بررسی پروتوپلاست‌های تراژن *rolC* توتون افزایش هایپرپلاریزاسیون غشای این سلولها را در مواجهه با اکسین به اثبات رساندند. به عبارت دیگر تحریک‌پذیری غشای پروتوپلاستها در مواجهه با این هورمون افزایش می یابد (۱۹).

در گیاه سیب‌زمینی تراژن *rolC* کاهش اندازه گیاه همراه با تعداد جوانه‌های بیشتر مشاهده شده است (۱۴). همچنین Schmulling و همکارانش (۱۹۸۸) مشاهده نمودند که در گیاهان تراژن *rolC* به علت کاهش میزان کلروفیل، فتوسنتز کمتری انجام می‌گیرد و در مقایسه با انواع گیاهان طبیعی برگها به رنگ سبز متمایل به زرد (کلروزه) نمایان می‌شوند. گیاهان تراژن 35S-*rolC* (ژن *rolC* تحت کنترل پروموترقوی 35S ویروس CaMV) نیز دارای میزان بیان بالای این ژن در برگها بوده و در نتیجه چنین برگهایی کلروز بیشتری نشان می‌دهند (۲۴).

علاوه بر موارد ذکر شده در بالا تحریک تولید متابولیتهای ثانویه و پروتئینهای دفاعی در گیاهان تراژن و نیز رابطه آن با رادیکالهای آزاد اکسیژن و پروتئین کینازهای وابسته به سایکلین (CDPK) از دیگر نقشهای ژن *rolC* در گیاهان می باشد(۵ و۲۶).

برخی از گونه‌های گیاهی به طور طبیعی دارای توالیهای مشابه با قسمتهایی از توالی T-DNA آگروباکتریوم می باشند که به cT-DNA (cellular T-DNA) یا T-DNA سلولی موسوم است(۳۲) . آزمایشات متعددی شباهت

www.SID.ir

Archive of SID

عملکردی ژنهای T-DNA و cT-DNA را به اثبات رسانده اند (۳و ۲۹). توالی مشابه با ژن *rolC* در گیاه توتون، *trolC* (tobacco *rolC*) نامیده می شود (۲۰) که از نظر مورفولوژیک تغییرات مشابه ژن *rolC* را در گیاهان تراژن ایجاد میکند (۲۱). از نظر مولکولی شباهت عملکردی بین ژن *rolC* و *trolC* همچنان ناشناخته می‌باشد و لذا در این تحقیق تصمیم بر آن است تا گوشه‌ای از عملکرد مولکولی القای کلروز توسط ژن *rolC* و *trolC* با بررسی نحوه بیان ژنهای کلروپلاستی در گیاهان تراژن مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

مواد و روشها

گیاهان مورد استفاده: گیاهان توتون تراژن مورد استفاده در این تحقیق (*Nicotiana tabacum cv.samsun*) دارای ژن *rolC* و *trolC* در ژنوم خود می باشند که ژنها تحت کنترل پروموتر القا شونده با گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون (dexamethasone) می باشند. گیاهان در حضور دگزامتازون در شرایط تیمار و در غیاب آن در شرایط کنترل یا شاهد هستند. به علاوه از گیاهان غیر تراژن به عنوان شاهدین دیگر نیز استفاده شد. بذر گیاهان تراژن در تحقیق قبلی (۲۱) توسط نویسندگان در "انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی" شهر استراسبورگ فرانسه تهیه شدند.

استرلیزاسیون بذرها: بذرها به مدّت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدّت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (حاوی یک قطره Tween ۲۰) استریل سطحی شدند. سپس ۳ بار، هر یک به مدّت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در انتها بذرها بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا سطح بذرها خشک شود (حدود ۱ ساعت در هود لامینار). سپس بذرها روی محیط جوانه زنی MS (Murashig and Skoog) قرار داده شدند (حدود ۲۰-۳۰ بذر در هر ظرف کشت گیاه) و در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد، شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی رشد داده شدند. بعد از جوانه‌زنی بذرها جهت القای بیان ژن مورد نظر به محیط دگزامتازون افزوده شد.

آزمایشات مولکولی: - استخراج DNA (مطابق با متد CTAB) : حدود ۳۰۰ میلی‌گرم از برگ گیاه درون هاون چینی همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB به خوبی ساییده شد. در ادامه محتویّات هاون به مدّت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت ۱۳۵۰۰rpm انجام و فاز رویی به تیوب جدید منتقل شد. در انتها DNA به روش اتانول رسوب داده شد و بعد از خشک شدن ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب استریل اضافه و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

استخراج RNA : حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ گیاه درون هاون و در حضور ازت مایع ساییده شدند. در ادامه ۷۰۰ میکرولیتر تریزول اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید تا محلول یکنواختی ایجاد شود. سپس به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و پس از ورتکس کردن، سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰rpm به مدّت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و به میزان ۲ حجم ایزوپروپانول اضافه گردید. تیوبها به مدّت یک شب در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و روز بعد سانتریفیوژ به مدّت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۴۰۰۰rpm انجام شد. در ادامه رسوب‌دهی به روش اتانول انجام شد و بعد از خشک شدن، به میزان ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase به آن اضافه گردید. به منظور حذف مولکولهای DNA از RNA استخراج شده، واکنش DNase توسّط کیت Qiagen انجام گرفت و بررسی کمّی RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf) و محاسبه نسبت میزان جذب طول موج ۲۶۰ نانومتر بر طول موج ۲۸۰ نانومتر (A260/280) صورت پذیرفت.

سنتزcDNA و واکنش PCR: برای سنتز cDNA از کیت (

www.SID.ir

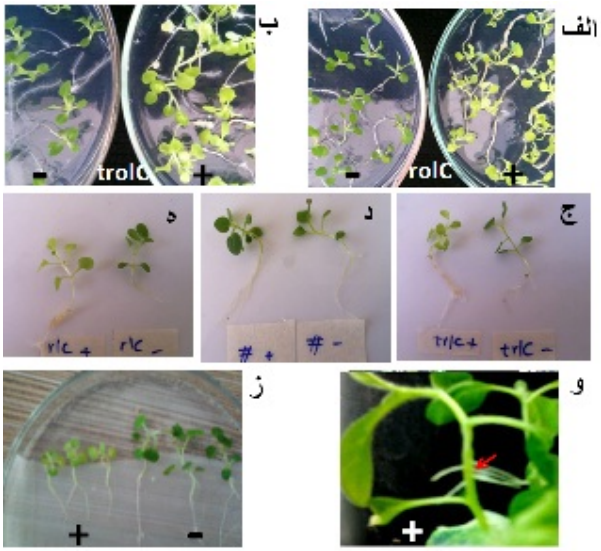
Archive of SID

Superscript IIIساخت شرکت Invitrogene) استفاده گردید. پرایمرهای ژن housekeeping به نام *rRNA 16s* برای سنجش کیفیّت cDNA سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت و جهت نرمالیزاسیون باندهای حاصل، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. بعد از نرمالیزاسیون، در واکنشهای PCR بعدی (با همان شرایط) از پرایمرهای اختصاصی قطعه ژنی، استفاده گردید.

نتایج

همان گونه که اشاره شد ژن *rolC* آگروباکتریوم و هومولوگ گیاهی آن- *trolC* – فنوتیپ کلروز را در گیاهان بیان کننده این ژنها اعمال میکنند (۲۱و ۲۳). در این تحقیق به منظور شناسایی عملکرد مولکولی این ژنها در ایجاد کلروز در گیاه توتون، مبنا بر این قرار گرفت تا با طراحی پرایمرهای گوناگون ژنوم کلروپلاستی، میزان بیان این ژنها در گیاهان تراژن القاء شده با دگزامتازون توسط تکنیک-RT PCR (Reversetranscription-PCR) بررسی گردد و آنها با گیاهان تراژن القاء نشده و نیز گیاهان غیر تراژن (#) که به عنوان شاهد به کار می روند مقایسه شود. در ابتدا بذر گیاهان طبق دستورالعمل ذکر شده در بخش مواد و روشها استریل شده و در محیط جوانه‌زنی قرار گرفتند تا اندازه گیاهچه‌ها به حدی برسد که برای انتقال به محیط حاوی dex (دگزامتازون) جهت القاء بیان ژنها مناسب باشد (حدود ۱۵ روز). پس از رسیدن گیاهچه‌ها به این مرحله، آنها در محیط کشت حاوی dex قرار گرفتند. البته برای هر نمونه نیمی از گیاهچه‌ها در محیط فاقد dex (به عنوان شاهدی دیگر) قرار داده شدند تا تغییرات فنوتیپی ایجاد شده در هر گروه به صورت واضحی مورد تشخیص قرار گیرد (تصویر۱، الف و ب).

در این مرحله صفات مورفولوژیکی همچون کلروزه شدن گیاه ، کوتولگی و تولید ریشه‌های منشعب و کوتاه‌تر از حد نرمال حتی ریشه‌های نابه جا در ساقه‌های گیاه و گاهاً با انتهای پیچ خورده مشاهده شدند (تصویر۱، ج تا ز). این صفات مربوط به گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* و پس از القاء بودند و در گیاهان تراژن بدون القاء و گیاهان غیر تراژن (# یا شاهد) مشاهده نشدند.

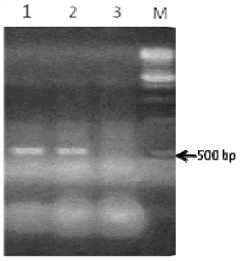


تصویر۱- الف و ب) گیاهچه‌های ۲۱ روزه تراژن *rolC* و *trolC* در محیط دارای دگزامتازون (+) یا فاقد آن (-). ج تا ه) هر کدام از گیاهچه‌ها را به صورت مجزا نشان داده شده است. تفاوتهای مورفولوژیک ناشی از ژنهای *rolC* و *trolC* به خوبی آشکار است. در گیاهچه‌های # تفاوتی بین حالت القاء (+) یا عدم آن (-) مشاهده نمی‌شود. و) تولید ریشه‌های نابه جا بر روی ساقه در گیاه القاء شده *rolC*. ز)رشد گیاهچه‌های *rolC* بر روی پارچه نازک. کاهش رشد کلی گیاه و فنوتیپ کلروزه در گیاهان القاء شده آشکار است.

www.SID.ir

Archive of SID

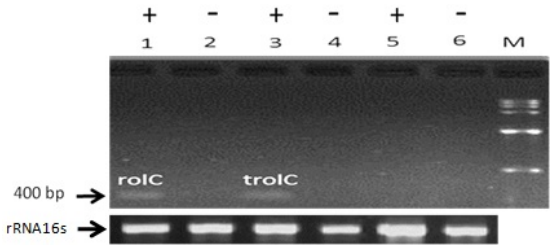
DNA ژنومی از بافت برگ گیاهچه‌های توتون *rolC* و *trolC*، شاهد استخراج گردید و برای اطمینان از تراژن بودن گیاهچه‌ها، واکنش PCR با پرایمر ژنهای *rolC* و *trolC* انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همان طوری که در تصویر۲ مشاهده می‌شود باند مربوط به ژنهای *rolC* و *trolC* در لاین ۱و ۲ کاملاً قابل مشاهده است (۵۰۰bp)، در حالی که در ستون مربوط به نمونه شاهد (لاین ۳) این باند مشاهده نمی‌شود. این آزمایش تراژن بودن گیاهان مورد بررسی را تأیید کرد.



تصویر ۲- PCR بر روی DNAهای استخراج شده از گیاهچه‌های *rolC* (لاین ۱)، *trolC* (لاین ۲) و شاهد # (لاین ۳). M معرف مارکر وزن مولکولی می‌باشد.

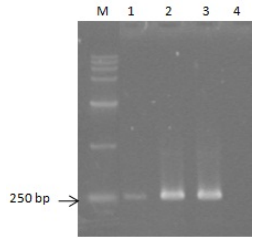
جهت سنجش کیفی RNAهای استخراج شده و اطمینان از عاری بودن DNA در آنها، واکنش PCR بر روی این RNAها با استفاده از پرایمرهای یک ژن house keeping به نام *16srRNA* انجام شد و نتیجه بر روی ژل آگارز الکتروفورز بررسی گردید (تصویر مربوطه آورده نشده است). مطابق انتظار در هیچ کدام از نمونه‌ها باند مربوط به *rRNA16s* مشاهده نشد و به عبارت دیگر RNAهای استخراجی به دلیل عملکرد خوب آنزیم DNase عاری از DNA بودند.

رونویسی معکوس از روی RNAها به کمک آنزیم ترانس-کریپتاز معکوس انجام گرفت و واکنش PCR بر روی DNA سنتز شده با استفاده از پرایمر ژنهای *rolC* و *trolC*، جهت اطمینان از بیان این ژنها در گیاهان تراژن القاء شده و عدم بیان آنها در صورت عدم القاء استفاده شد. PCR دیگری نیز با پرایمرهای ژن *rRNA16s* جهت نرمالیزه نمودن باندها انجام شد و نتیجه واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که این ژن به خوبی در همه گیاهان بیان می‌شود (تصویر ۳).



تصویر۳- RT-PCR توسّط پرایمرهای اختصاصی ژنهای *rolC* و *trolC*. M) مارکر وزن مولکولی، ۴-۱) گیاهان تراژن و۵ و ۶) گیاه تیپ وحشی #. باندهای مشاهده شده مربوط به ژنهای *rolC* و *trolC* همراه با القاء توسط dex (+) می‌باشند (۴۰۰bp) و در گیاهانی که القاء نشده اند (-) حضور ندارد . تصویر پایین مربوط به نتیجه واکنش PCR توسّط پرایمرهای ژن *rRNA16s* می باشد.

در مرحله بعد، بیان ژن *psbA* که یکی از مهم ترین ژنهای کلروپلاستی گیاه توتون می باشد بررسی گردید. این ژن، از ژنهای اصلی درگیر در مسیر فتوسنتز می‌باشد و اختلال در بیان آن می تواند موجب کاهش یا قطع تولید کلروفیل و در نتیجه ایجاد کلروز گردد.



تصویر ۴- RT-PCR توسّط پرایمرهای ژن کلروپلاستی *psbA*. M) مارکر وزن مولکولی، لاینهای ۱ و ۴ به ترتیب مربوط به گیاهان القاء شده *trolC* و *rolC* و لاینهای شماره ۲ و ۳ مربوط به گیاهان القاء نشده مذکور می باشد.

همان گونه که در تصویر۴ مشاهده می‌شود در گیاهان تراژن *trolC* و *rolC*ی بدون القاء، ژن *psbA* به خوبی بیان می‌شود (لاین ۲ و ۳)، در صورتی که در گیاهان *rolC* القاء شده بیانی از ژن *psbA* مشاهده نمی‌شود(لاین ۴) و

www.SID.ir

Archive of SID

در گیاهان *trolC* القاء شده نیز این بیان بسیار ضعیف است (لاین ۱). آزمایشات فوق مؤید این مطلب است که با بیان ژنهای *rolC* و *trolC*، بیان ژن کلروپلاستی *psbA* مختل شده که نتیجه آن می تواند اختلال در سنتز طبیعی متابولیتهای فتوسنتزی و در نهایت تولید طبیعی کلروفیل و در نتیجه ایجاد کلروز گردد. ژن *psbA* کد کننده یکی از پروتئینهای فتوسیستم II می‌باشد که عدم بیان آن با اختلال در تشکیل فتوسیستم II و سنتز نشدن کلروفیل و در نتیجه عاملی برای ایجاد کلروز است.

بحث و نتیجه گیری

یکی از دغدغه‌های بسیار مهم که امروزه ذهن بسیاری از محققان علوم گیاهی را به خود مشغول نموده است، رفع پدیده کلروز در بسیاری از گیاهان به ویژه انواع زینتی و خوراکی است. علت‌یابی این موضوع به خصوص از نقطه نظر ژنتیکی و مولکولی آن در عصر حاضر از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. کاهش محتوای کلروفیل در برگها می‌تواند به خاطر عواملی چون اختلال در مسیر تولید کلروفیل ویا تجزیه آن (۱ و ۴) ، کمبود مواد معدنی مانند آهن (۱۷)، به کارگیری ترکیبات سمی مانند تنتوکسین و افزایش رادیکالهای آزاد اکسیژن (۲ و ۱۶) باشد.

ژنهای بسیاری در ژنوم کلروپلاست گیاهان وجود دارند که بیان یا عدم بیان آنها مستقیم یا غیر مستقیم می‌تواند موجب بروز کلروز در گیاهان گردد. مطالعات گسترده‌ای در زمینه یافتن ارتباط میان این دسته از ژنها با پدیده کلروز در گیاهان مدل صورت گرفته است که نشان دهنده وجود ارتباط میان آنها است. Yoshida و همکارانش (۱۹۹۶) با بررسیهایی که بر روی گیاه برنج انجام دادند متوجه وجود ارتباط بین میزان بیان ژن *rpoB* کلروپلاستی (کدکننده زیرواحد β از RNA پلیمراز پلاستی) و ایجاد کلروز در این گیاه شدند (۳۴). در یک بررسی دیگر محققان با استفاده از گیاهان توتون جهش یافته در ژنهای کلروپلاستی *rpoA*، *rpoB* و *rpoC1* (rpo$^-$) فنوتیپ سفید رنگ (کلروزه) را در گیاهان مشاهده نمودند (۱۱). ژنهای *psbA* و *psbB* نیز دسته دیگری از ژنهای کلروپلاستی هستند که عدم بیانشان موجب ایجاد کلروز می‌گردد. این ژنها کد-کننده پروتئینهای مربوط به کمپلکس فتوسیستم II می-باشند. در گیاهان تراژن جو (Barley) به علت وجود جهش در ژنهای فوق الذکر، نقص عملکرد صحیح فتوسیستم II و عدم تکامل کلروپلاست و در نهایت فنوتیپ کلروزه مشاهده گردیده است (۱۵). Chen و همکارانش (۲۰۱۱) با مطالعه بر روی ژن کد کننده زیرواحد بزرگ آنزیم روبیسکو (*rbcL*) گزارش کردند که افزایش بیان این ژن تحت تأثیر برخی عوامل اگزوژن همچون سولفید هیدروژن (H2S) منجر به افزایش محتوای کلروفیل در گیاهان و سبز شدن هرچه بیشتر آنها می شود (۹).

پژوهش حاضر به یکی دیگر از ابعاد بسیار مهم و تأثیرگذار در ایجاد فنوتیپ کلروز در گیاهان، با به کارگیری گیاهان تراژن توتون پرداخته است. هدف از انتخاب این گیاه علاوه بر کشت آسان و راندمان بالای تراژن‌سازی، ساده بودن و آشنایی زیاد با ژنوم آن می‌باشد. در این تحقیق تأثیر و نقش ژنهای خارجی وارد شده به ژنوم گیاه – یعنی ژن *rolC* از باکتری *آ. ریزوژنز* و هومولوگ گیاهی آن در توتون یا ژن *trolC*– بر روی پدیده کلروز مورد توجه قرار گرفته شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که ژن کلروپلاستی *psbA* در گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* در صورت عدم القاء به خوبی بیان می شود، در حالی‌که با القای ژنهای *rolC* و *trolC*، بیان ژن *psbA* کاسته و حتی متوقف می گردد که در واقع با زردی گیاهان تراریخت نیز توأم است. این ژن کد کننده یکی از پروتئینهای سازنده فتوسیستم II می‌باشد که عدم بیان آن با اختلال در تشکیل فتوسیستم II و سنتز نشدن کلروفیل در این گیاهان و در نتیجه ایجاد کلروز در آنها می باشد. با توجه به هومولوژی توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژنهای *rolC* و *trolC* و پروتئینهای مربوطه و شباهتهای فیزیومورفولوژیک حاصل

www.SID.ir

Archive of SID

از گیاهان تراریخت *rolC* و *trolC* که شامل مواردی چون کاهش رشد کلی گیاه، ریشه‌های کوتاه و پیچ خورده و نیز افزایش جذب قند و نشاسته (۲۱) می‌باشد و نیز وجود پروتئینهای میانکنش کننده مشابه با پروتئینهای RolC و tRolC مثل پروتئین TCP13 (نتایج منتشر نشده محجل شجا و همکاران) تحقیق پیش رو شباهت عملکردی ژنهای *rolC* و *trolC* را در سطح مولکولی به اثبات می رساند که همراستا با مشاهدات فنوتیپی می‌باشند. به عبارت دیگر *rolC* و *trolC* با کاهش بیان یک ژن خاص (*psbA*) موجب تظاهر یک فنوتیپ خاص (کلروز) می‌گردند.

منابع

۱- زهره امینی و رحیم حداد.۱۳۹۲. نقش رنگیزه های فتوسنتزی و آنزیمهای آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهشهای سلولی مولکولی. شماره ۳. صفحه ۲۵۱-۲۶۵

۲-مریم السادات ذکری؛ پروین صالحی شانجانی؛ حمیده جوادی؛ محمد علی علیزاده.۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های سه گونه بابونه (Anthemis sp) با استفاده از فعالیت آنزیمی پراکسیداز. مجله پژوهشهای سلولی مولکولی. شماره ۱. صفحه ۳۵-۴۳.

3- Aoki, S. and Syono, K. 1999. Synergistic function of *rolB, rolC, ORF13* and *ORF14* of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum*. Plant Cell Physiol. 40, 252–256.

4- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, Sx., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. and Bornke, F. 2010. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase like proteins in a thiol-dependent manner: Evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell, 22, 1498–1515.

5- Bulgakov, V. P., Veselova, M. V., Tchernoded, G. K., Kiselev, K. V., Fedoreyev, S. A. and Zhuravlev, Y. N. 2005. Inhibitory effect of the Agrobacterium rhizogenes *rolC* gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. Planta, 221, 471–478.

6- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone, I. and Contantino, P. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Gene,* 209, 475-480.

7- Casanova, E., Trillas, M.I., Moysset, L.a. and Vainstein, A. 2005. Influence of *rol* genes in floriculture. Biotechnol Adv, 23, 3-39.

8- Casanova, E., Valdes, A. E., Zuker, A., Fernandez, B., Vainstein, A. and Trillas, M. I. 2004. *rolC*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. Plant Sci. 167, 551–560.

9- Chen, J., Wu, F.H., Wang, W.H., Zheng, C.J., Lin, G.H., Dong, X.J., He, J.X., Pei, Z.M. and Zheng, H.L. 2011. "Hydrogen Sulphide Enhances Photosynthesis Through Promoting Chloroplast Biogenesis, Photosynthetic Enzyme Expression, and Thiol Redox Modification in *Spinacia Oleracea* Seedlings." Journal of Experimental Botany, 62, 4481-4493.

10- Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M. and Müller, R. 2008. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with *rol*-genes is useful in molecular breeding towards compact growth. Plant Cell Rpt. 27, 1485–1495.

11- De Santis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R.M., Wanner, G., Rüdiger, W., Koop, H.U. and Herrmann, R.G. 1999. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA, B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultra structure. Plant J. 18, 477–489.

12- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K. and Murphy, P. J. 1998. Opines and opine-like molecules involved in plant/Rhizobiaceae interactions. In The Rhizobiaceae (eds H. P.Spaink, A. Kondorosi and P. J. Hooykaas), 173–197.

13- Draper J., Scott R., Armitage P. and Walden R. 1988. Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual .London. Blackwell Scientific Publications Ltd.

14- Fladung, M., Ballvora, A. and Schmülling, T. 1993. Constitutive or light regulated expression of the *rolC* gene in transgenic potato plants has different effects on yield attributes and tuber carbohydrate composition. Plant Molecular Biology, 23, 749-757.

15- Gamble, P. E. and Mullet, J. E. 1989. J. Biol. Chem. 264, 7236-7242

www.SID.ir

Archive of SID

16- Holland, N., Evron, Y., Jansen, A.k., Edelman, M. and Pick, U. 1997. lnvolvement of Thylakoid Overenergization in Tentoxin induced Chlorosis in Nicotiana spp. Plant Physiol. 114, 887-892.

17- Koenig, R. and M.R. Kuhns. 1996. Control of iron chlorosis in ornamental and crop plants. Utah StateUniv. AG-SO-01. Electronic publication.

18- Kurioka, Y., Suzuki, Y., Kamads, H. and Harada, H. 1992. Promotion of flowering and morphological alteration in *Atropa belladonna* transformed with CaMV 35S-*rolC* chimeric gene of the Ri plasmid. Plant Cell Rpt. 12, 1–6.

19- Maurel, S., Barbier-Bryqoo, H., Spena, A., Tempe, G. and Guern, G. 1991. Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tobacum*. Plant Physiol. 97, 212–216.

20- Meyer A. D., Ichikawa T. and Meins F. 1995. Horizontal gene transfer: regulated expression of tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. Mol. Gen. Genet, 249, 265–273.

21- Mohajjell shoja, H., Clement, B., Perot, J. and Otten. L. 2011. Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, *rolB* and *rolC*, and their homologs in *Nicotiana tabacum*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 24, 44-53.

22- Rao, S.R. and Ravishankar, G. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv, 20, 101–153.

23- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W. and Sagen, H.E. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery-apple tree. J Agric Res, 41, 507–540.

24- Schmülling, T., Schell, J. and Spena, A. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J, 7, 2621–2629.

25- Shen, W.H., Petit, A., Guern, J. and Tempe, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. Proc Natl Acad Sci USA, 85, 3417-3421.

26- Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A. and Zhuravlev, Y. N. 2008. Individual and combined effects of the *rolA, B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnol. Bioeng. 1, 118-125.

27- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. and Tepfer, D. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid: identification of open reading frames. J. Biol.Chem, 261, 108–121.

28- Spano, L., Mariotti, D., Cardarelli, M., Branca, C. and Costantino, P. 1988. Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. Plant Physiol, 87, 479-483.

29- Suzuki, K., Yamashita, I. and Tanaka, N. 2002. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. Plant J, 32, 775–787.

30- Tempe´ J., Petit A. 1982. Opine Utilization by Agrobacterium. New York: Academic.

31- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes:* sexual transmission of the transformed geneotype and phenotype. Cell, 37, 959–967.

32- White, F. F., Garfinkel, D. J., Huffman, G. A., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1983. Sequence homologous to *Agrobacteriurn rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. Nature, 301, 348–350.

33- Winans, S. C. 1992. Two-Way Chemical Signaling in Agrobacterium-Plant Interactions. Microbiological reviews 51, 12–31.

34- Yoshida, R., Kanno, A. and Kameya, T. 1996. Cool Temperature-lnduced Chlorosis in Rice Plants. Plant Physiol. 112, 585-590.

35- Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspuria, E., Kato, A. and Uchimiya, H. 1994. The role promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. Mol Gen Genet, 244, 15–22.

36- Zuker, A., Tzfira, T., Scovel, G., Ovadis, M., Shklarman, E. and Itzhaki, H. 2001. *rolC*-transgenic carnation with improved agronomic traits: Quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants. J. Am. Soc. Hortic. Sci, 126, 13–18.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of the effect of *rolC* and *trolC* genes on chlorosis in Tobacco plants

Gardoonpar H.[1], Mohajjel shoja H.[2] and Hosseinpour feizi M.A.[3]

[1] **Botany Dept., Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran**

[2] **Zoology Dept., Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran**

Abstract

The *rol* (rooting locus) genes are located on T-DNA (Transferred DNA) of *Agrobacterium rhizogenes* and induce the morphological and developmental abnormalities upon the integration in to the plant genome. In this study we investigated the effect of bacterial *rolC* gene and its homologue in Tobacco -tobacco *rolC* or *"trolC"* gene- on growth of *Nicociana tabaccum* cv.samsun plants. In the first time, the presence of *rolC* and *trolC* genes was confirmed in transgenic lines and then using RT-PCR technique, we have shown that the transgenic plants expressing the bacterial *rolC* or tobacco *trolC* genes -which demonstrate the chlorotic phenotype-, have very low or no expression of the chloroplastic gene *"psbA"*. This gene encodes for one of the proteins of photosystem II. We conclude that the lack of expression of chloroplastic *psbA* gene and thus the defective feature of chloroplasts in *rolC/trolC* transgenic plants may cause the chlorotic phenotype of these plants.

Key words: Agrobacterium, chlorosis, RT-PCR, *rolC, trolC*

www.SID.ir