



آنالیز مولکولی و بررسی بیان ژن استیل ترانسفراز مخمری (*AYTI*) جهت سم‌زدایی توکسین فوزاریومی DON در لاین‌های نسل دوم گندم تراریخته (*Triticum aestivum*)

مهرداد اسدیان^۱، شاهرخ قرنجیک^{۲*}، امیر موسوی^۳، ناصر فرخی^۲

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

^۲استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

^۳دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۱۶

چکیده

گندم یکی از مهمترین غلات تامین‌کننده نیازهای غذایی انسان در کشورهای مختلف جهان، بخصوص کشورهای در حال توسعه است. بلایت فوزاریومی سنبله گندم یکی از بیماری‌های رایج و آسیب‌رسان به این محصول است که عامل این بیماری قارچ *Fusarium graminearum* می‌باشد. این بیماری علاوه بر تاثیر منفی بر روی عملکرد محصول، با تولید مایکوتوکسین‌های خطرناکی نظیر توکسین دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) بر روی کیفیت دانه‌های تولیدی نیز اثرات منفی می‌گذارد و خطراتی را برای سلامتی انسان و دام در پی دارد. ایجاد تغییر شیمیایی در ساختار توکسین DON می‌تواند از تجمع این توکسین درون دانه بکاهد. ژن *AYTI* کدکننده یک آنزیم استیل ترانسفراز بوده و در کاهش سمیت توکسین DON نقش دارد. در این تحقیق گیاهان نسل دوم گندم تراریخته حاوی این ژن، جهت بررسی تلفیق پایدار و بیان مناسب ژن انتقال‌یافته با استفاده از روش‌های مولکولی شامل PCR، RT-PCR و روش دورگه‌سازی سادرن مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج به دست آمده حاکی از حضور پایدار و بیان مناسب ژن *AYTI* در اکثر گیاهان نسل دوم گندم تراریخته مورد بررسی بود. واکنش RT-PCR از روی RNA استخراج شده در گیاهان تراریخته، نشان‌دهنده رونویسی ژن در سطح RNA در ۲۳ لاین از گیاهان مورد مطالعه بود. نتایج آنالیز دورگه‌سازی سادرن جهت بررسی تعداد نسخه‌های ژنی ورودی در گیاهان تراریخته مورد بررسی، حاکی از ورود بیش از یک نسخه از ژن *AYTI* در برخی از لاین‌های مورد بررسی بود.

کلمات کلیدی: گندم تراریخته، بلایت فوزاریومی، دی‌اکسی‌نیوالنول، ژن استیل ترانسفراز مخمری.

مقدمه

می‌باشند و از سنتز پروتئین در مرحله تولید شدن و خاتمه جلوگیری می‌کنند (Gharanjik *et al.*, 2008). یکی از مهمترین این تریکوتسین‌ها، دی-اکسی‌نیوالنول (DON) است. محققین معتقدند که DON احتمالاً به عنوان فاکتوری بیماری‌زا عمل می‌کند و جلوتر از میسیلیوم‌های قارچی حرکت کرده و بافت میزبان را جهت تجمع قارچ آماده می‌سازد (Mitterbaure *et al.*, 2004). اهمیت ویژه DON، آثار بیماری‌زایی آن در انسان و حیوانات است. این مایکوتوکسین در انسان سبب بروز علائمی از قبیل بی‌اشتهایی، تشنج، تهوع و استفراغ و اختلالاتی در سیستم عصبی و ایمنی می‌شود (Urban *et al.*, 2002). لذا مبارزه با این بیماری یا تلاش در جهت کم کردن مقدار توکسین موجود در دانه ارزش ویژه‌ای در تولید غذای سالم در جوامع دارد (Poppenberger *et al.*, 2003).

با توجه به اهمیت این بیماری و آثار نامطلوب توکسین‌های ناشی از قارچ عامل بیماری و نیز ناکارآمدی روش‌های مختلف کنترل این بیماری، توسعه و ارزیابی ژرم‌پلاسم و ایجاد ارقام متحمل از ضرورت ویژه‌ای برخوردار است (Falasconi *et al.*, 2005). امروزه با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، ژن‌های مسئول مقاومت می‌تواند از هر منبعی به گیاه زراعی انتقال داده شود. در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ژنی به نام *AYTI* که محصول آن نوعی آنزیم استیل ترانسفراز بوده، شناسایی شده

در بین جنس‌های مختلف غلات، گندم نان (*Triticum aestivum*) اهمیت زیادی در تامین غذایی انسان دارد و به تنهایی حدود یک پنجم از کالری مورد نیاز انسان را تامین می‌کند (Bai & Shaner, 2004). این محصول در سرتاسر جهان و در مناطق مختلف آب و هوایی قابل کشت بوده و ۳۰ درصد از سطح زیر کشت محصولات زراعی را به خود اختصاص داده است (Bai & Bar, 1986 ; Shaner, 2004). یکی از بیماری‌های خسارت‌زایی که این محصول استراتژیک را تحت تاثیر قرار می‌دهد بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم یا اسکب می باشد که توسط قارچ *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود و در نقاط مختلف دنیا مانند آمریکا و کانادا، اروپا، چین و هند دیده شده و عملکرد گندم را تا حد قابل توجهی کاهش می‌دهد (Okubara *et al.*, 2000; Sepahvand *et al.*, 2009). علاوه بر کاهش چشمگیر در عملکرد محصول، به دلیل تولید مایکوتوکسین‌های خطرناک و تجمع آن‌ها در دانه سبب بروز بیماری‌ها و عوارض متعدد انسانی و دامی ناشی از مصرف دانه و فرآورده‌های آلوده آن می‌شود (Snijders, 2004). فیتوتوکسین‌هایی که به وسیله این پاتوژن تولید می‌شوند از دسته تریکوتسین‌ها هستند (Prandini *et al.*, 2009). تریکوتسین‌ها از جمله ترکیبات sesquiterpene می‌باشند که مهار کننده فعال مرکز پپتیدیل ترانسفراز ریپوزوم‌های یوکاریوتی

روی گیاهان نسل دوم گندم تراریخته حاوی ژن استیل ترانسفراز مخمری صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق تعداد ۴۰ لاین از بذور جمع-آوری شده از نسل اول گندم تراریخته جهت انجام آنالیزهای مولکولی لازم در داخل گلدان-هایی با قطر ۲۵ سانتی متر و حاوی خاک استریل با بافت لومی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. نمونه برگگی جهت استخراج DNA و RNA در مرحله دو تا سه برگگی از گیاهان کشت شده جدا شد.

DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش CTAB (Doyle *et al.*, 1987) استخراج گردید. پس از استخراج DNA، رسوب DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر حل شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. DNA استخراج شده برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA نیز با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری، از رقت ۱ به ۱۰۰ نمونه DNA در آب مقطر و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل ۶۱۰۵ (S 2000 UV/Vis) استفاده شد.

که به نظر می رسد در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسین ها نقش دارد (Alexander *et al.*, 2002). محققین این ژن از مخمر جدا و به گیاه توتون به عنوان گیاه مدل انتقال دادند (Sanjarian *et al.*, 2009; Irani *et al.*, 2015)، اما از آنجا که گیاه هدف، گیاه گندم و قارچ هدف آن، قارچ *F. graminearum* می باشد در تحقیق دیگری ژن *AYT1* به گیاه گندم نیز انتقال یافت (Gharanjik *et al.*, 2008).

اطمینان از تلفیق پایدار ژن انتقال یافته به گیاه تراریخته و نیز رونویسی مناسب از آن در طی نسل های بعدی، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از طرفی تعداد نسخه های ورودی به ژنوم گیاهان تراریخته می تواند بر روی سطح بیان ژن وارد شده و پایداری این ژن در ژنوم طی نسل های بعدی تاثیر گذار باشد. تحقیقات نشان داده است که در صورت ورود چندین نسخه از یک ژن به درون ژنوم امکان خاموشی آن ژن در گیاه تراریخته وجود دارد. با روش آنالیز دورگه سازی سادرن می توان وجود ژن بیگانه در ژنوم و تعداد نسخ آن ژن را در ژنوم گیاه تراریخته مشخص نمود (Young *et al.*, 2003). لذا در این تحقیق با هدف بررسی تلفیق پایدار تراژن مورد نظر در ژنوم گیاه و عدم تفرق در نسل های بعد و نیز اطمینان از بیان مناسب این ژن، همچنین بررسی تعداد نسخه های ژنی انتقال یافته، آنالیزهای مولکولی با استفاده از روش های PCR، RT-PCR و روش دورگه سازی سادرن بر

سانتی‌گراد برای مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید و سپس محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. طول ژن *AYTI* مورد نظر در این تحقیق ۱۴۰۰ جفت باز می‌باشد. برای طراحی آغازگر برای ژن *AYTI* ابتدا توالی ژن *AYTI* مخمری با شماره دسترسی Z73168Y13138 از بانک ژن (-) سایت NCBI دریافت و سپس با استفاده از دو نرم افزار Primer 3 و Oligo analyzer اقدام به طراحی آغازگر گردید. توالی و مشخصات دو جفت آغازگر رفت و برگشت طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. جفت آغازگر اول که از ابتدا و انتهای ژن *AYTI* طراحی شده است، کل ژن را با اندازه ۱/۴ کیلو باز تکثیر می‌نماید و جفت آغازگر دوم که از بخش داخلی ژن طراحی گردیده است، بخشی از ژن را با اندازه نزدیک به ۳۰۵ جفت باز تکثیر خواهد کرد.

در این آزمایش غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{فرمول (۱) ضرب رقت / OD 260} \times 50 = \text{غلظت DNA}$$

در روش دوم برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، پنج میکروگرم از نمونه‌های DNA همراه با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ DNA safe stain (-) (CinaGen, Iran) صورت گرفت.

هر واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و با شرایط زیر انجام گرفت: دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واکنش شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد دمای واسرشت‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت. در نهایت دمای ۷۲ درجه

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن *AYTI*

Table 1- Characteristics of primers designed for *AYTI* gene

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer Sequence	دمای اتصال (C°) Annealing Temperature
<i>AYTI</i> Fw1	5' – ATCGAATTCGAAGGTAGATGGATGTTTATAGAG-3'	63
<i>AYTI</i> Re2	5' –TAGTCGACATATCATCATCCTATATGTGTAG- 3'	61
<i>AYTI</i> -f6	5'- TTGCATCACAGATTCGCAGG- 3'	57
<i>AYTI</i> - r6	5'- AAGGCAAAGAGCAACCACCA- 3'	57

دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای ساخت دومین رشته و تکثیر cDNA، از واکنش PCR با شرایط ذکر شده در بخش قبل استفاده شد. همچنین از آغازگرهای 18S rRNA هم به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش RT-PCR استفاده شد. این آغازگر قطعه‌ای به‌طول ۶۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند. مشخصات توالی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای ژن 18srRNA در جدول ۲ نشان داده شده است.

RNA کل گیاه با استفاده از کیت استخراج RNA (RNX- Plus CinaGen, Iran) از بافت برگ گیاه استخراج گردید. cDNA نیز با استفاده از کیت سنتز cDNA (Vivantis, Indonesia) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید. شرایط ساخت اولین رشته cDNA عبارت است از: RNA ۵ µg کل، ۰/۵ میکرو مولار Oligo d(T)₁₈، ۲۰nM از هر کدام از dNTP ها و ۱۰۰ واحد از آنزیم رونویسی معکوس که بمدت ۶۰

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن 18srRNA.

Table 2- Characteristics of primers designed for 18srRNA gene

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer Sequence	دمای اتصال (C°) Annealing Temperature
18sFw	5' – CTTCGGGATCGGAGTAATGATTAA- 3'	59
18sRe	5' – GCCGAGAACATCTAAGGGCATCACAGA- 3'	59

کاوشگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بمدت یک شبانه‌روز انجام شد. پس از شستشوی غشا در بافرهای مناسب، رنگ‌آمیزی غشا توسط محلول سوبسترای رنگ موجود در کیت دورگه‌سازی سادرن صورت پذیرفت. پس از حدود ۲۰ دقیقه لکه‌های مورد نظر روی غشا پدیدار شدند.

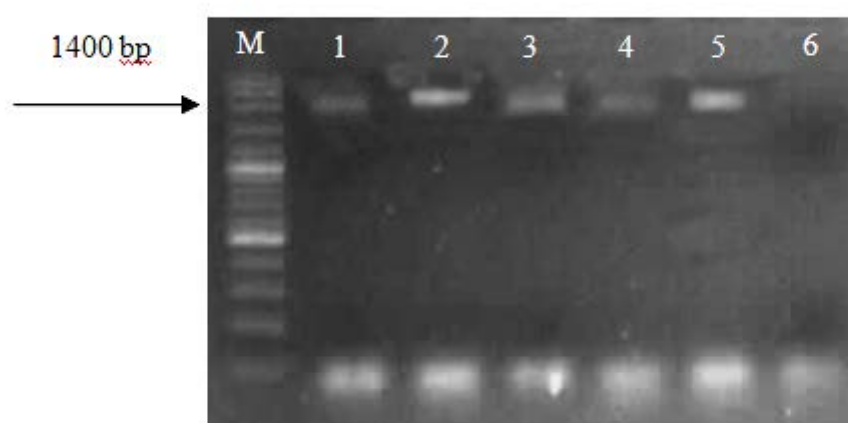
نتایج و بحث

آزمون PCR روی نمونه‌های DNA استخراج شده از گیاهان به کمک آغازگرهای اختصاصی AYT1-Fw1 و AYT1-Re2 صورت

برای انجام آنالیز دورگه‌سازی سادرن، از سه گیاه گندم تراریخت با بیان مناسب (لاین‌های شماره ۷۵، ۴۰۰ و ۲۰۷) استفاده شد. مقدار ۳۰ میکروگرم از DNA ژنومی با استفاده از آنزیم Hind III هضم گردید و قطعات هضم شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد از هم جدا شدند و سپس ژل بر روی غشای نایلونی با بار مثبت منتقل گردید. کاوشگر مورد استفاده نیز بر اساس بخشی از ژن به اندازه ۳۰۵ جفت باز با استفاده از کیت Dig-dUTP و طبق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. عمل دورگه‌سازی غشا و

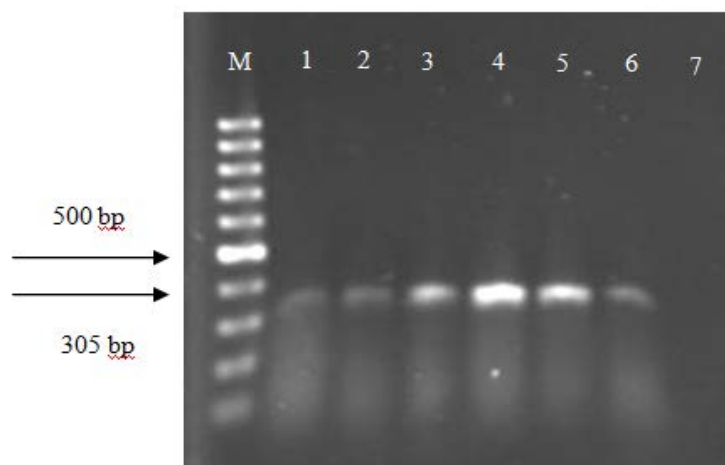
۴۰ لاین کشت شده بود. RNA کل از برگ گیاهان گندمی که تراریختی آنها در مرحله قبل به اثبات رسیده بود، استخراج و کیفیت آن بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید (شکل ۳). الگوی الکتروفورزی نمونه‌های استخراج شده باندهای 28srRNA و 18srRNA را بروی ژل آگارز به صورت مطلوب نشان دادند که این موضوع نشان از کیفیت بالای RNAهای استخراج شده داشت.

گرفت و الگوی الکتروفورزی محصولات PCR، نشان‌دهنده تکثیر قطعه مورد انتظار با اندازه Kb ۱/۴ بر روی ژل آگارز بود. این قطعه در گندم غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی مشاهده نشد (شکل ۱). حضور ژن *AYTI* در ۳۷ لاین (۹۰ درصد) از گیاهان نسل دوم گندم تراریخته مورد تایید قرار گرفت. همچنین از آغازگرهای داخلی *AYTI-f6* و *AYTI-r6* نیز جهت اطمینان استفاده گردید. این آغازگرها باعث تکثیر قطعه‌ای معادل ۳۰۵ جفت باز شدند. نتایج مربوط به این PCR نیز نشان‌دهنده حضور ژن *AYTI* در ۳۷ لاین از



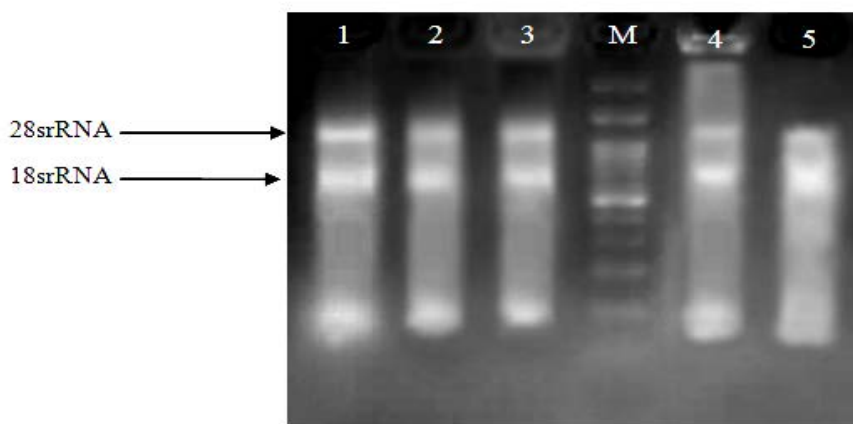
شکل ۱- الگوی الکتروفورزی محصولات PCR برای تایید تراریختی گیاه گندم با استفاده از آغازگرهای *AYTI-Fw1* و *AYTI-Re2*: نشانگر اندازه 100 جفت بازی (Vivantis, Malaysia). ۱: لاین GA30، ۲: لاین GA76، ۳: لاین GA19، ۴: لاین GA171، ۵: لاین GA15، ۶: کنترل منفی با گندم غیرتراریخته.

Figure 1- Electrophoretic pattern of PCR products to confirmation of transgenic wheat plant using *AYTI-Fw1* and *AYTI-Re2* primers. M: 100 bp Ladder, 1-5 lanes: Transgenic wheat lines, 6: Negative control (untransformed wheat).



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی محصولات PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی ژن *AYTI*: نشانگر اندازه 100 جفت بازی (Vivantis, Malaysia) ۱: لاین GA75، ۲: لاین GA283، ۳: لاین GA444، ۴: لاین GA158، ۵: لاین GA60، ۶: لاین GA42، ۷: کنترل منفی با گندم غیرتراریخته.

Figure 2- Electrophoretic pattern of PCR products to confirmation of transgenic wheat plant using internal primers. M: 100 bp Ladder, 1-6 lanes: Transgenic wheat lines, 7: Negative control (untransformed wheat).



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA کل استخراج شده از گیاهان تراریخته. M: نشانگر اندازه 100 جفت بازی (Vivantis, Malaysia) ۱: لاین GA 30.1، ۲: لاین GA400، ۳: لاین GA105، ۴: لاین GA143، ۵: لاین GA260.1.

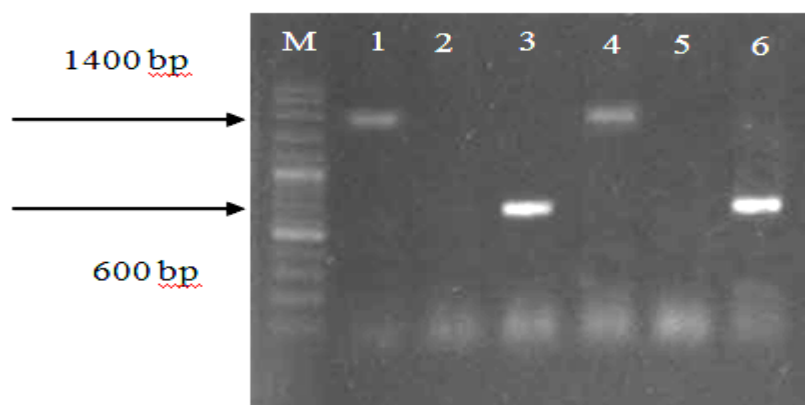
Figure 3- Electrophoretic pattern of total RNA extracted from transgenic plants, M: 100 bp Ladder, 1-5 lanes: Transgenic wheat lines.

واکنش RT-PCR از روی RNA استخراج شده از گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *AYTI-Fw1* و *AYTI-Re2* نیز قطعه مورد نظر (با اندازه 1/4Kb) را نشان داد که

مورد نظر (با اندازه 1/4Kb) را نشان داد که

مثبت کاذب گردد. لذا علاوه بر تیمار نمونه ها با آنزیم DNAase، استفاده از واکنش کنترل منفی، یعنی واکنش RT-PCR در غیاب آنزیم رونویسی معکوس نشان داد که RNA استخراجی فاقد آلودگی با DNA است. همچنین برای واکنش کنترل مثبت از آغازگرهای اختصاصی 18srRNA استفاده گردید و با مشاهده قطعه ۶۰۰bp مورد نظر کیفیت RNA و واکنش RT-PCR مورد تایید قرار گرفت.

نشانگر رونویسی ژن در سطح RNA در ۲۳ لاین (۵۵ درصد) گیاهان تراریخته بود. نتایج حاصل از واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای *AYTI-Fw1* و *AYTI-Re2* برای سه گیاه تراریخته حاوی ژن *AYTI* به همراه کنترل منفی مربوط به هر واکنش در شکل ۴ نشان داده شده است. شایان ذکر است که ژن *AYTI* فاقد توالی ایترون است و آلودگی RNA استخراج شده با DNA ژنومی، می تواند باعث بروز خطا و جواب



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR برای تایید رونویسی از ژن *AYTI* در گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای *AYTI-Fw1* و *AYTI-Re2*. M: نشانگر اندازه 100 جفت بازی (Vivantis, Malaysia)؛ ۱: لاین GA143، ۲: کنترل منفی (- RT)، ۳: کنترل مثبت 18s، ۴: لاین GA 30.1، ۵: کنترل منفی (- RT)، ۶: کنترل مثبت 18s.

Figure 4- Electrophoretic pattern of RT-PCR products from transgenic wheat plants. M: 100 bp Ladder, 1: transgenic line GA143, 2: negative control (no RT), 3: positive control using 18srRNA primers, 4: transgenic line GA 30.1, 5: negative control (no RT), 6: positive control using 18srRNA primer.

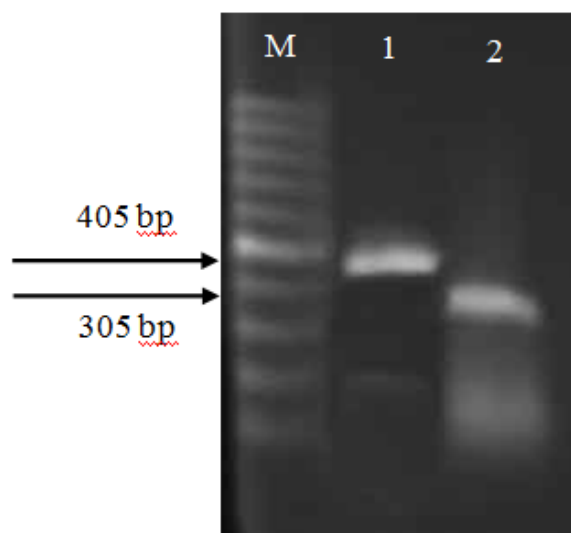
جهت انجام آزمون دورگه‌سازی سادرن DNA ژنومی استخراج شده از بافت برگي تعدادی از گیاهان تراریخته به همراه گیاه شاهد

(غیرتراریخته) به وسیله آنزیم *HindIII* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. این آنزیم DNA را به قطعاتی با اندازه‌های مختلف برش می‌دهد.

جهت انجام آزمون دورگه‌سازی سادرن DNA ژنومی استخراج شده از بافت برگي تعدادی از گیاهان تراریخته به همراه گیاه شاهد

غیررادیواکتیو Dig-dUTP استفاده شد که خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو را مرتفع می-سازد. همان طور که در شکل ۵ مشخص است کاوشگر طراحی شده از اندازه بزرگتری (۴۰۵ جفت باز) نسبت به قطعه تکثیر شده توسط واکنش معمولی PCR برخوردار می‌باشد.

برای مشخص شدن تعداد نسخه‌های ژنی ورودی به گیاه تراریخته نیاز است که برای ژن *AYTI* کاوشگری طراحی شود که این کاوشگر مکمل ژن *AYTI* می‌باشد و توانایی اتصال به آن را دارا باشد. لذا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *AYTI-f6* و *AYTI-r6* و انجام واکنش PCR اقدام به تهیه کاوشگر نمودیم. در تهیه این کاوشگر بجای استفاده از عناصر رادیواکتیو برای نشاندار کردن توالی DNA مورد نظر، از دنباله



شکل ۵- کاوشگر سنتز شده برای ژن *AYTI* با اندازه بزرگتر از سایز معمول. M: نشانگر اندازه 100 جفت بازی (Vivantis, Malaysia)، ۱: کاوشگر طراحی شده به کمک Dig-dUTP، ۲: محصول واکنش PCR معمولی

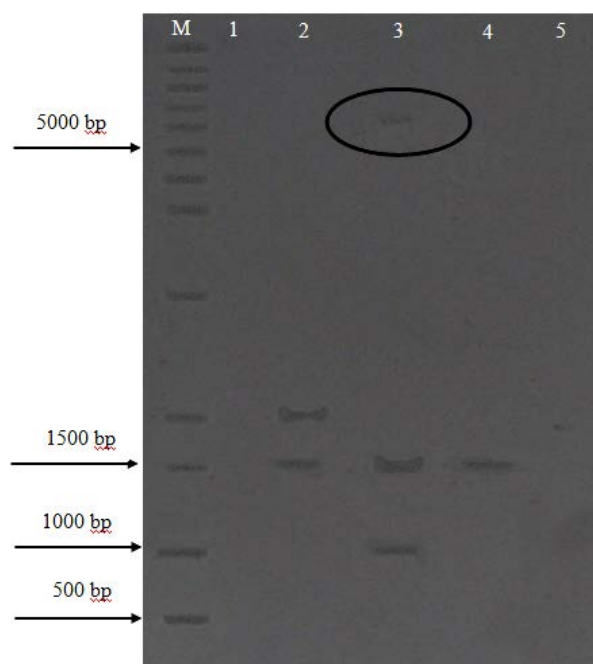
Figure 3- Synthesized probe for *AYTI* gene. M: 100 bp Ladder, 1: Designed probe, 2: Normal PCR product.

شماره ۲۰۷ سه باند دیده شد. کنترل منفی نیز هیچ بانندی را نشان نداده است که این موضوع نشان از صحت این آنالیز دارد. از ناقل حاوی ژن *AYTI* نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. لکه

آنالیز دورگه‌سازی سادرن تعداد نسخه‌های ژنی ورودی به هر لاین را مشخص نمود. بدین صورت که در یکی از لاین‌ها هیچ بانندی مشاهده نشد ولی در لاین شماره ۴۰۰ دو باند و در لاین

لاین ۴۰۰ که دو لکه بر روی غشا ایجاد کرده بود، در آزمون های زیست سنجی، مقاومت خوبی را در برابر قارچ فوزاریوم از خود نشان داد. همچنین لاین شماره ۲۰۷ نیز که سه لکه بر روی غشا ایجاد نموده بود نیز در برابر قارچ عامل بیماری از خود مقاومت قابل قبولی نشان داد، اما میزان مقاومت آن در مقایسه با لاین شماره ۴۰۰ کمتر بود.

مشاهده شده در این بخش نیز نشان از صحت کار لکه گذاری بر روی غشا می باشد (شکل ۶). تعداد این لکه ها نشان دهنده تعداد نسخه های ژنی ورودی به داخل ژنوم گندم تراریخته می باشد. از آنجا که بین افزایش تعداد نسخه های ورودی ژن به ژنوم و ایجاد مقاومت در گیاه می تواند رابطه عکس وجود داشته باشد، لذا وجود یک نسخه از ژن در ژنوم گیاه مطلوب تر می باشد. با این حال در



شکل ۶- آنالیز سادرن بلات. چاهک M: نشانگر اندازه ۱ کیلوبازی (Vivantis, Malaysia)، : لاین ۷۵، ۲: لاین ۴۰۰، ۳: لاین ۲۰۷، ۴: کنترل مثبت ۵: کنترل منفی

Figure 6- Southern-blot analysis of wheat transgenic plants, M: 1 Kb Ladder, 1-3 lanes: transgenic wheat lines, 4: Positive control (pCAMBIA 3301 + *AYT1* gene), 5: negative control (untransformed plant).

بحث

در توتون‌های تراریخت شده با ژن *Fs Tri101* وجود دارد، اما برخی گزارشات نیز نشان داده‌اند که لاین‌های گندم تراریخت شده با این ژن افزایش معناداری در مقاومت به FHB نشان نمی‌دهند که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در جذب و متابولیسم DON (Higa et al., 2003) و یا مقدار کم بیان این آنزیم (Dahleen et al., 2001) در گیاهان تراریخته باشد. همچنین بررسی‌های اخیر نشان داده است که بیان ژن *AYTI* موجب افزایش مقاومت به DON در توتون‌های تراریخت می‌شود (Sanjarian et al., 2009). مطالعه حاضر نشان داد که تعداد زیادی از گندم‌های تراریخته مورد مطالعه حاوی ژن *AYTI* قابلیت بیان ژن در سطح رونویسی را دارا می‌باشند، البته در ۱۴ لاین از گیاهان مورد مطالعه (۳۵ درصد) که الگوی الکتروفورزی محصول PCR آن‌ها نشان‌دهنده حضور ژن *AYTI* بود، عدم رونویسی و بیان ژن *AYTI* مشاهده شد. از دلایل احتمالی این امر می‌توان به قرار گرفتن ژن موردنظر در ناحیه هتروکروماتینی ژنوم اشاره نمود، همچنین چون در این تحقیق از روش تفنگ ژنی برای انتقال ژن *AYTI* استفاده شده بود، لذا امکان ورود چندین نسخه از ژن و به دنبال آن خاموشی ژن وجود دارد. از طرفی امکان دارد که بیان ژن در تعدادی از لاین‌ها به قدری پایین باشد که توسط روش نیمه کمی RT-PCR نتوان بیان آن‌ها را تشخیص داد. لذا با استفاده از تشدید کننده‌های قوی می‌توان بر این مشکل

قارچ *F. graminearum* ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه‌ای را تولید می‌کند که دارای سمیت زیادی برای انسان و همچنین گیاه هستند (Alizadeh & Saeidi, 2007). بررسی‌ها روی سویه‌های جمع‌آوری شده از ایران نشان می‌دهد که آن‌ها قادر به تولید مخلوطی از میکوتوکسین‌ها از جمله زرالنون و دی‌اکسی نیوالنول هستند (Alizadeh & Saeidi, 2007). یکی از راه‌های مقابله با این عوامل، تغییر در ساختمان آن‌ها به وسیله آنزیم‌های سم‌زدا می‌باشد. تولید تریکوتسین‌ها تنها عامل بیماری‌زایی است که سازوکار عمل آن شناخته شده است و به همین دلیل اولین هدف در راهکارهای زیست فناوریانه جهت مقابله با قارچ محسوب می‌شود. اگرچه برای بیماری‌زایی کامل، ضرورت وجود ژن‌های دیگری نیز گزارش شده است. ژن *AYTI* که در این تحقیق بررسی شده، DON را به 3-A DON تبدیل می‌کند که سمیت آن بسیار کمتر از DON است (Ruckenbauer et al., 2001). از آنجایی که DON فاکتور تشدید کننده بیماری شناخته شده است بنظر می‌رسد بیشترین نقش ژن *AYTI* در تحمل به DON و مراحل بعد از آلودگی اولیه مشخص می‌شود. به طور کلی کم کردن مقدار DON از طریق سم زدایی آن باعث افزایش کیفیت غلات شده و به نظر می‌رسد در مقاومت به قارچ *F. graminearum* نیز نقش بسزایی ایفا نماید. گزارشاتی مبنی بر تشدید تحمل به DON

و بیان تراژن مورد نظر در آن تایید شده بود، هیچگونه لکه‌ای را نشان نداد. این نکته را می‌توان از دو منظر تفسیر نمود. یکی آنکه، ممکن است آنزیم متیل ترانسفراز ناحیه‌ای را که توسط آنزیم *HindIII* برش می‌خورد متیله کرده باشد، پس آنزیم *HindIII* نمی‌تواند ناحیه موردنظر را برش دهد. دلیل دیگر؛ این می‌تواند باشد که تراژن *AYT1* وارد ناحیه هتروکروماتینی ژنوم شده باشد. لذا بررسی محل قرار گرفتن ژن در ژنوم و اینکه بر روی کدام کروموزوم قرار گرفته است توسط آزمون FISH در مراحل بعدی این پژوهش پیشنهاد می‌گردد.

غلبه نمود. پس از انجام آزمون RT-PCR و با اسکن نمودن ژل و بررسی شدت درخشندگی باندها در الگوی الکتروفورزی، می‌توان میزان بیان ژن در نمونه‌های مختلف را مورد مقایسه قرار داد. در این تحقیق، در تعدادی از لاین‌ها شدت باند الکتروفورزی بیشتر بود که این موضوع می‌تواند بدلیل فعالیت مناسب پیش‌بر و مکان مطلوب قرار گرفتن کاست ژنی در ژنوم باشد. جهت بررسی دقیق‌تر میزان تغییرات بیان ژن در گیاهان تراریخته مورد بررسی پیشنهاد می‌شود که در ادامه کار از روش کمی Real Time PCR استفاده شود. در آنالیز دورگه‌سازی سادرن مشاهده گردید که یکی از لاین‌ها که قبلاً حضور

منابع

- Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM (2002). The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1*(ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. *Yeast* 19:1425-30.
- Alizadeh A, saiedi A (2007). Effect of plant methabolomics in Fusarium Head Blight. Progress report of fusarium nation. SPII. Karaj Iran.
- Bai G, Shaner G (2004). Management and resistance in wheat and barley to fusarium Head Blight. *Annual Review of Phytopathology* 42: 135-61.
- Bar N (1986). Gramineaceae. In: Townsend CC. G and E, Al-Raw A. (eds): *Flora of Iraq* 9: 173-208.
- Dahleen LS, Okubara PA, Blechl AE (2001). Transgenic approaches to combat fusarium Head Blight in wheat and barley. *Crop Science* 41: 628-37.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantites of fresh leaf tissue. *phytochem Bulletin* 19:11-15.
- Falascioni M, Gobbi E, Pardo M, Sberveglieri G (2005). Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* in corn by electronic olfactory system. *Biochemical* 108: 250-257.
- Gharanjik Sh, Moieni A, Mousavi A, Alizadeh H (2008). Designing and cloning of gene constructs containing yeast acetyl transferase gene (*Ayt1*) in order to transformation of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Proceeding of 10th Iranian Genetics Congress*. Tehran Iran.
- Higa A, Kimura A, Mimori K, Ochiaifukuda T, Tokai T, Takahashi Ando N, Nihuchi T, Igawa T, Fujimura M, Hamamoto H, Usami R, Yamaguchi I (2003). Expression in

- cereal plants of genes that inactivated Fusarium mycotoxins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67: 914-918.
- Irani Z, Sanjarian F, Azimi M.R (2015). Conversion of Deoxynivalenol to 3-acetyl deoxynivalenol in wheat and tobacco through the expression of Synthetic Acetyltransferase gene. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 17-27.
- Mitterbaure R, Poppenberger B, Raditsching A (2004). Toxin dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. *Plant biotechnology journal* 2: 329-340.
- Okubara PA, Blech AE, McCormic SP, Alexander NJ (2000). Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichotecen acetyl transferase gene. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 74-83.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshin D, Siebere T, Schuhmacher R, Kuchler K, Luschning C, Adam G (2003). Detoxification of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by UDP-glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 728: 47905-47914.
- Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G (2009). Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chemical Toxicology* 47:927-31.
- Ruckenbauer P, Buerstmayr H, Lemmens M (2001). Present strategies in resistance breeding against scab. *Euphytica* 119:121-127.
- Safipoor Afshar A, Mousavi A, Adam G (2007). Double Mutation in Tomato Ribosomal Protein L3 cDNA Confers Tolerance to Deoxynivalenol (DON) in Transgenic Tobacco. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 2327-2333.
- Sanjarian F, Mousavi A, Alizadeh A, Weindorfer H, Adam G (2009). Evaluation of the acetyltransferase in detoxification of the *F.graminearum* toxin deoxynivalenol in transgenic plants. *Iranian Journal of Biology* 19:222-231.
- Sepahvand N.A, Heidari F, Totiaei A, Seraj M, Mozafari J (2009). Field and Molecular Evaluation of Resistance of Iranian Bread Wheats to Fusarium Head Blight. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1: 63-79.
- Urban M, Daniels S, Mott E, Hammond Kosack K (2002). Arabidopsis is susceptible to cereal ear blight fungal pathogens Fusarium graminearum and Fusarium culmorum. *The plant Journal* 32: 961-973.
- Young JC, Trenholm HL, Friend DW, Prelusky DB (1987). Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 35:259-261.

Molecular analysis of the second generation of transgenic wheat containing yeast acetyltransferase gene (*AYT1*)

Asadian M.¹, Gharanjik Sh. ^{*2}, Mousavi A.³, Farrokhi N.²

¹M.Sc Student of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology.

²Assistant professor in Molecular Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology.

³ Associate professor, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Wheat is one of the most important cereals that supply needs of the human food in all countries. Fusarium head blight (FHB), caused primarily by *Fusarium graminearum* is one of the most destructive diseases of wheat that produces the mycotoxin deoxynivalenol (DON), a protein synthesis inhibitor which is harmful to human and livestock. Chemical modification in DON structure could reduce DON accumulation in the grain. *AYT1* gene, encoding an acetyltransferase enzyme plays a major role in reducing the toxicity of DON. In this study, we used molecular techniques such as PCR, RT-PCR and southern blotting to confirm the insertion and proper expression of this transgene in the second generation of transgenic wheat plants. Obtained results showed the presence of *Ayt1* gene in most of the evaluated transformed plants, and transgene expression was confirmed by RT-PCR. Moreover, southern blot analysis for evaluation of transgene copy number showed more than one copy in some of the transgenic lines.

Keywords: *Fusarium Head bight, Deoxynivalenol, Acetyltransferase gene, Southern blotting.*

* Corresponding Author: Gharanjik Sh.

Tel: 09111721462

Email: gharanjik@hotmail.com



مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

