

جهش‌زایی هدف‌دار و بررسی عملکرد پروتئین ریپوزومی L3 گوجه

فرنگی در مخمر در راستای ایجاد تحمل به دی اکسی نیوانول

فروغ سنجریان^۱، امیر موسوی^{۲*}، اکبر صفی پور افشار^۳

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی - دانشگاه آزاد اسلامی - واحد نیشابور

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

داکسی نیوانول (DON) میکوتوکسینی است که بطور معمول توسط قارچ عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در غلات دانه ریز ایجاد می‌شود. این توکسین همچنین از عوامل تشدید بیماری‌زایی قارچ *F. graminearum* در زمان آلوده کردن گیاه میزبان از طریق ممانعت از سنتز پروتئین‌ها به شمار می‌رود. یکی از روش‌های ایجاد تحمل به DON، تغییر در جایگاه اثر آن در سلول یعنی پروتئین ریپوزومی L3 (RPL3) است. در این مطالعه *rpl3* های جهش یافته و طبیعی از گوجه فرنگی به مخمر حساس به DON بعنوان سلول مدل، منتقل گردیدند. نتایج بیانگر این بود که *rpl3* تغییر یافته گیاه می‌تواند در مخمر بیان یافته و مورد استفاده قرار گیرد و جهش‌های W258R و H259Y به صورت انفرادی و توأم باعث افزایش قدرت رشد سلول در محیط واجد توکسین DON می‌شوند.

مقدمه

قارچ *Fusarium graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی *Fusarium Head Blight* (FHB) در گندم، جو و ذرت است. این بیماری علاوه بر اینکه باعث افت شدید عملکرد شده (۱۲)، میکوتوکسین‌هایی نظیر تریکوتسین‌ها را تولید می‌کند که کیفیت محصول را نیز کاهش می‌دهد (۲، ۶ و ۲۱). این میکوتوکسین‌ها به فرایندهای عمل آوری بعد از برداشت مانند تخمیر و پخت مقاوم بوده و در انسان و دام‌های تغذیه کننده از محصولات آلوده اثرات حاد و مزمنی مانند التهابات پوستی، بی‌اشتهایی، استفراغ و تضعیف سیستم ایمنی را سبب می‌شوند (۱۷، ۲۰) این عوارض بخصوص در کودکان حادثر هستند (۲۲).

واژه‌های کلیدی

بلایت فوزاریومی سنبله،
دی اکسی نیوانول،
پروتئین ریپوزومی L3،
سنجش در مخمر

گوجه فرنگی (LeRPL3) در ایجاد مقاومت به DON مورد بررسی قرار گرفته است

مواد و روش‌ها

جهش‌زایی هدف‌دار:

برای ایجاد نغیرات W258R و H259Y و نیز جهش دوگانه W258R/H259Y در توالی cDNA ژن rpl3 گوجه فرنگی، از روش جهش‌زایی نقطه‌ای با جایگاه مشخص (SDM) مطابق مراحل شرح داده شده توسط صفی‌پور افشار و همکاران (۲۳) استفاده به عمل آمد.

آزمون سنجش تحمل در مخمر:

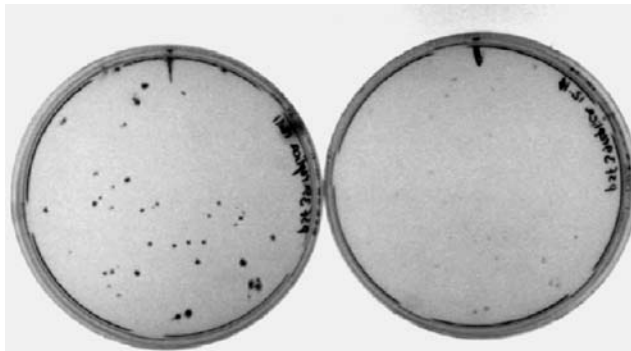
سویه مخمری حساس به DON و پلاسمید pTK2 استفاده شده در این مطالعه توسط پروفیسور Adam از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی وین تامین گردید (۱۸). نسخه‌های نوع وحشی و جهش‌دار rpl3 گوجه فرنگی توسط برش آنزیمی با BamHI و XhoI از پلاسمید pBluescript KS+ به پلاسمید pTK2 منتقل شدند. این پلاسمید دارای ژن‌های β -Lactamase و Leu2 بعنوان نشانگرهای انتخابی است و قطعه خارجی تحت کنترل پروموتور ADH1 و قبل از توالی خاتمه دهنده این ژن وارد شد. تراریختی مخمر با سازه‌های بدست آمده توسط روش شوک حرارتی و استات لیتیم انجام شد (۱۱). مخمرهای تراریخت ابتدا در محیط SD-Leu (18) با منبع کربن گالاکتوز (جهت از دست دادن RPL3 نوع وحشی) انتخاب شدند و سپس به محیط SD-Leu با منبع کربن گلوکز منتقل گردیدند. از آزمون پلیت‌های همانند (Replica Plates) در محیط کشت‌های SD-Leu و SD-Ura برای اطمینان از استفاده مخمر از rpl3 خارجی استفاده شد. از کلنی‌هایی که در محیط SD-Leu رشد کرده بودند ولی قادر به رشد در محیط SD-Ura نبودند به پلیت حاوی 34 mg/ml

5-fluoroorotic acid (FOA) که برای مخمرهای دارای نشانگر Ura کشنده است، برده شد و رشد آنها در این محیط نیز بررسی گردید. مخمرهایی که در این محیط می‌توانستند رشد کنند برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

تریکوتسین‌ها فاکتورهای تهاجمی قارچ نیز به شمار می‌روند (۸) و سبب شدت بیماری در گیاهان می‌شوند (۸)، بررسی‌ها نشان داده‌اند که در مقایسه با سویه‌های تولید کننده تریکوتسین، سویه‌هایی از قارچ که فاقد توانایی تولید این مواد بودند بیماری‌زایی کمتری در مزرعه نشان می‌دهند (۱۵). این سموم بر روی سلول نیز اثرات سوئی مانند ممانعت از سنتز پروتئین، تاثیر بر سنتز DNA و RNA، ممانعت از فعالیت میتوکندری، تاثیر روی غشاها و تقسیم سلولی و آپوپتوز (Apoptosis) دارند (۱۶). تریکوتسین‌ها با اتصال به جایگاه پپتیدیل ترانسفراز مانع سنتز پروتئین می‌شوند آزمایشات نشان داده‌اند که جایگاه اتصال تریکودرمین، یکی از تریکوتسین‌ها در سلول مخمر، زیر واحد بزرگ ریپوزوم (S60) است (۳) و ژن جهش یافته مسئول مقاومت به آن tcm1 می‌باشد (۱۳) که پروتئین ریپوزومی (RPL3) را L3 را کد می‌کند (۹) نوع جهش در این ژن نیز شناسایی شده است و مشخص شده که جهش نقطه‌ای تریپتوفان به سیستئین در اسید آمینه شماره ۲۵۵ (W255C) مسئول ایجاد مقاومت به تریکوتسین‌هاست (۲۵). معادل این جهش در rpl3 برنج و گوجه فرنگی ایجاد شده بیان پروتئین تغییر یافته و همچنین ایجاد مقاومت به تریکوتسین‌ها در گیاه تراریخت به اثبات رسیده است (۱۴، ۱۸). از طرف دیگر با مطالعه بر روی مخمرهای جهش یافته مقاوم به تریکوتسین‌ها جهش‌های دیگری از جمله تغییر تریپتوفان به آرژینین در اسید آمینه شماره ۲۵۵ (W255R) و تغییر هیستیدین به تیروزین در اسید آمینه شماره ۲۵۶ (H256Y) در این ژن معرفی شده‌اند (۱۸). معادل این جهش‌ها در پروتئین RPL3 گوجه فرنگی (LeRPL3) جهش‌های W258R و H259Y هستند.

یکی از مهمترین تریکوتسین‌ها که بطور عمده‌ای غلات را آلوده می‌کند (DON) Deoxynivalenol است. وجود DON در بسته‌های غلات بعنوان نشانگر آلودگی به فوزاری‌توکسین‌ها بکار می‌رود (۱۰)

در این مطالعه، با استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بعنوان میزبان مدل، توانایی جهش یافته‌های W258R، H259Y و جهش یافته دوگانه (DM) W258R/H259Y از پروتئین RPL3



شکل ۱- غربالگری کلنی‌های حاوی RPL3 جهش‌دار از طریق پلیت‌های همانند در محیط SD فاقد لوسین (سمت چپ) و فاقد اوراسیل (سمت راست). رشد کلنی‌ها در محیط SD فاقد لوسین نمایانگر وجود سازه دارای LeRPL3 است و عدم رشد آنها در محیط فاقد اوراسیل نمایانگر از دست دادن سازه دارای RPL3 مخمری است.

همچنین چنانچه مخمر واجد نشانگر Ura3 باشد، قادر به رشد در محیط دارای FOA نخواهد بود (۵). تعداد مخمرهای تراریختی که قادر به رشد در این محیط کشت بودند، کمتر از مخمرهایی بود که از آزمون پلیت‌های همانند بدست آمده بود. با توجه به خاصیت سمی FOA برای سلول این موضوع قابل توضیح است. سرعت رشد مخمرهای تراریخت در محیط SD-Leu یکسان نبود بطوریکه بیشترین سرعت رشد مربوط به مخمر تراریخت شده با Lerpl3 و کمترین سرعت رشد مربوط به جهش یافته W258R بود. در محیط کشت دارای DON، مخمر تراریخت شده با ژن rpl3 دارای جهش دوگانه W258R/H259Y بیشترین مقاومت را نشان می‌داد (50 ppm) که پس از آن به ترتیب جهش یافته‌های H259Y و W258R در آخر LeRPL3 پروتئین نوع وحشی قرار داشتند (شکل ۳).

کشت شبانه از کلنی‌های انتخابی در محیط کشت مایع SD-Leu (با منبع کربن گلوکز) انجام گرفت و سپس تا $OD_{600} = 0.2$ در محیط کشت (24) YPD رقیق شدند و برای سه ساعت رشد داده شدند. در ابتدا مقایسه سرعت رشد تراریخت‌های مختلف مخمر صورت گرفت، سپس از کشت مایع مخمر سری رقت تهیه گردید و در پلیت YPD دارای مقادیر مختلف DON (30, 50 ppm) و لکه گذاری شدند. پلیت‌ها به مدت ۳-۴ روز در $30^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شدند. سپس الگوی رشد کلنی‌ها در غلظت‌های مختلف DON و طی حداقل سه تکرار مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

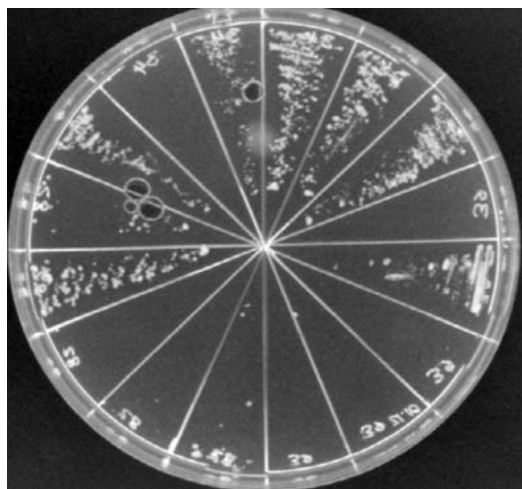
نتایج و بحث

همردیفی توالی اسیدامینه‌ای LeRPL3 نوع وحشی با توالی موجود در بانک ژن صحت توالی بدست آمده را تایید کرده، همچنین با مقایسه توالی انواع جهش یافته با این توالی مشخص شده بود که این توالی‌ها بجز جهش مورد نظر فاقد هر جهش غیر مطلوب می‌باشند.

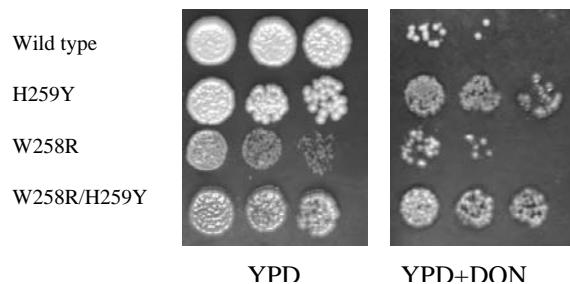
از مخمر به دفعات در آزمایشات زیست سنجی برای ارزیابی تولید میکوتوکسین استفاده شده است (۱۹ و ۱۰). سویه مخمر مورد استفاده در این تحقیق سویه‌ای است که برخی از ژن‌های آن جهت ایجاد قابلیت‌گزینش در محیط انتخابی و نیز ژن‌های دخیل در مقاومت به DON از جمله rpl3 و pdr5 در آن تخریب شده‌اند (Adam, انتشار نیافته). از آنجا که rpl3 یک ژن ضروری برای بقای سلول است، نوع وحشی این ژن توسط سازه‌ای با نشانگر انتخابی Ura3 و تحت پروموتور GAL1/GAL10 در اختیار مخمر قرار داده شده است. بدلیل وجود سانترومر شرطی (Conditional)، مخمر این سازه را در محیط دارای گالاکتوز از دست می‌دهد (۴)، که در این حالت مخمر قادر به رشد در محیط فاقد اوراسیل نخواهد بود. نتایج حاصله از آزمون پلیت‌های همانند نشان دادند که بسیاری از مخمرهای تراریخت بعد از رشد در محیط گالاکتوز دار، این سازه را از دست داده‌اند و از Lerpl3 استفاده می‌کنند (شکل ۱).

می‌شوند (۱۸). گزارشاتی از افزایش تحمل به DON در گیاهان تراریخت با جهش یافته W258C نیز وجود دارد (۱۴، ۱۸). پروتئین ریبوزومی L3 از جمله پروتئین‌های حفظ شده در طبیعت است. ناحیه‌ای شامل اسیدهای آمینه ۲۴۰ تا ۲۶۳ از جمله مناطق به شدت حفظ شده این پروتئین می‌باشد و جهش‌ها در این منطقه معمولاً کشنده هستند (۲۶). این واقعیت با توجه به اینکه RPL3 های مقاوم به تریکوتسین‌ها در این ناحیه دارای جهش هستند، تعدد جهش‌های احتمالی جهت ایجاد مقاومت به تریکوتسین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین یکی از راه‌کارها، ایجاد جهش‌های مضاعف و بررسی کاراترین ترکیب می‌باشد.

در این مطالعه دو جهش یافته جدید و متحمل از RPL3 یعنی جهش یافته انفرادی H259Y و جهش یافته دوگانه W258R/H259Y معرفی شدند که می‌توانند در ویرایش ژن‌های RPL3 غلات بکار روند و باعث افزایش سطح تحمل گیاه نسبت به توکسین DON شوند.



شکل ۲- غربالگری کلنی‌های فاقد LeRPL3 نوع وحشی از طریق رشد تراریخت‌های مختلف مخمر در محیط دارای 5-FOA 34 mg/ml سلول‌های دارای پلاسمید با نشانگر انتخابی Ura3 قادر به رشد در این محیط نیستند. پلیت‌ها به مدت ۴ روز در 30°C گرمخانه گذاری شدند.



شکل ۳- تاثیر DON بر روی رشد مخمرهای تراریخت شده با سویه‌های مختلف LeRPL3. در مقایسه با سایر مخمرها، مخمر تراریخت شده با جهش یافته دوگانه W258R/H259Y بیشترین تحمل و مخمر تراریخت شده با LeRPL3 نوع وحشی کمترین تحمل را نشان می‌دهند.

از آنجا که مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه تحت کنترل چندین ژن است، توسعه واریته مقاومی که دارای صفات مطلوب زراعی و کیفیت بالا باشد چالش برانگیز است (۷). در مقابله با بیماری FHB می‌توان با استفاده از قارچ کش‌ها از خسارت مزرعه کاست، اما میکوتوکسین‌های موجود در غلات در حد غیر مجاز برای مصرف انسان و دام باقی می‌مانند و رفع آلودگی مواد غذایی بسیار ضروری است (۲). در عین حال، DON عامل تهاجمی قارچ به شمار می‌رود و در همین راستا با جلوگیری از ساخت پروتئین در سلول اجازه بیان پروتئین‌های وابسته به مقاومت را نمی‌دهد و از توان مقابله سلول می‌کاهد. بین مقاومت به DON در زمان جوانه زنی بذر و مقاومت به FHB در سطح مزرعه رابطه مستقیمی گزارش شده است (۲۷).

یکی از راه‌کارهای مقابله با اثرات منفی تریکوتسین‌ها تولیدی در بیماری FHB، کاهش تمایل پروتئین RPL3 گیاه به توکسین‌ها از طریق ایجاد جهش‌های هدف‌دار است. تریکوتسین‌ها از جمله DON قادر به برهمکنش با RPL3 جهش یافته نیستند و این باعث تقویت پاسخ دفاعی میزبان، بدلیل بیان پروتئین‌های وابسته به مقاومت، و نیز ایجاد فرصت برای فعالیت سایر عوامل کاهش دهنده سمیت میکوتوکسین‌ها در سلول می‌شود. به عنوان مثال، توکسین‌های باقی مانده در سلول می‌توانند توسط پمپ‌های سلولی (ATP binding cassette) به بیرون ریخته می‌شود (۱۹).

چندین تغییر اسید آمینه‌ای در RPL3 مخمر *S. cerevisiae* گزارش شده‌اند که فنوتیپ تحمل به تریکوتسین‌ها را در آن باعث

14. Hariss L, Gleddle SG (2001) A modified RPL3 from rice confer tolerance of the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:173-181
15. Harisch R. B., Fry J., Hoffmann N., Nidermeyer J., Rogres S. G., Fraley R. T. 1988. Leaf disc transformation; in *Plant molecular biology manual*.(eds). S. B Gelvin and R. A Schilperoort (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). pp: 1-9.
16. Lutz MP, Feichtinger G, Defago G, Duffy B (2003) Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production represses chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Appl. Environment. Microbiol.* 69: 3077-3084.
17. Maiorano A, Blandino M, Reyneri A and Vanara F. 2008. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. Infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protection*, 27: 182-188
18. Mitterbauer R, Poppenberger B, Radisching A, Lucyshyn D, Lemmens M, Glossel J, Adam G (2004) Toxin dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. *Pant Biochem J.* 2: 329-340.
19. Mitterbauer R, Weindorfer H, Safaei N, Krska R, Lemmens M, Ruckebauer P, Kuchler K, Adam G (2003) A sensitive and inexpensive yeast bioassay for mycotoxin zearalenone and other compound with esterogenic activity. *Appl. Environment. Microbiol.* 69: 805-811
20. Palazzini JM, Ramirez ML, Torres AM, Chulze SN (2007) Potential biocontrol against for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection* 26: 1702-1710
21. Parry DW, Jenkinson P, Mc Leod L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereal-a review. *Plant Pathol.* 44: 207-278.
22. Poppenberger B., Berthiller F., Lucyshyn D., Siebere T., Schuhmacher R., Kuchler K., Glossel J., Lushning C., Adam G. 2003. Detoxification of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by UDP-glycosyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278(48): 47905-14
23. safipoor Afshar A., Mousavi A., Majd A., Renu and Adam G. 2007. Double mutation in tomato ribosomal L3 cDNA confers tolerance to deoxynivalenol (DON) in transgenic tobacco. *Pakistanish. J. Bio. Sci* 10(14): 2327-33
24. Sambrook K .J. and Russell D. W. 2004. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor. New York.
25. Schultz LD, Friesen JD (1983) Nucleotide sequence of the *tcm1* gene (ribosomal protein L3) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 155: 8-14.2
26. Warner J. R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24:437-440.
- Urban M, Daniels S, Mott E, Hammond-Kosack K (2002) *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogen *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant J.* 32: 961-973.

سپاسگزاری:

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (طرح پژوهشی ۱۵۹) بدلیل فراهم آوری امکانات انجام این پروژه و از پروفسور گرهارد آدم (مرکز تحقیقات ژنتیک کاربردی، دانشکده کشاورزی دانشگاه وین، اتریش) بخاطر در اختیار قرار دادن سویه و پلاسمید مخمری، قدردانی می‌نمایند.

منابع:

- 1-صفایی ن، علیزاده ع، سعیدی ع، رحیمیان ح، آدم گ، ۱۳۸۴. بهینه سازی یک روش زیست سنجی برای ارزیابی تولید زیرالینون در قارچ ها و کاربرد آن در مورد جدایه های ایرانی. بیماریهای گیاهی. ج:۴۱، ش:۲: ۲۲۹-۲۴۳.
2. Bai G, Shaner G (2004) Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* Head Blight. *Annu Rev Phytopathol.* 42: 135-61.
3. Barbacid M, Vazquez D (1974) Binding of [acetyl14-C] trichodermin to peptidyl transferase of eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem.* 44: 437-446.
- 4 Barbour L, Zhu Y, Xio W (2000) Improving synthetic lethal screen by regulation the yeast centomere sequence. *Genome.* 43: 910-917
5. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, fink GR (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154: 164-175.
6. Burstmayr H, Lemmens M, Grausgruber H, Ruckebauer P (1996) SCAB resistance of international wheat germplasm. *Cereal Res. Commun.* 24:195-202.
7. Dahleen LS, Okubara PA, Bleehl AE (2001) Transgenic approaches to combat *Fusarium* Head Blight in wheat and barley. *Crop Sci.* 41:628-637
8. Desjardins AE, Hohn TM (1997) Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol Plant-Microb Interact.* 10: 147-152.
9. Fried HM, Warner JR (1981) Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 238-242.
10. Gartner BH, Munich M, Kleijer G and Mascher F. 2008. Characterisation of kernel against *Fusarium* infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessment. *Eu J Plant Pathol.* 120: 61-68
11. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Wood RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cell by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11:355-360.
12. Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal corps. *Mol Plant Pathol.* 5: 515-525.
13. Grant PG, Schindler D, Davies JE (1976) Mapping of trichodermin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: a genetic locus for component 60S ribosomal subunit. *Genetics.* 83: 667-673.

