

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

حسین گردونپر<sup>۱</sup>، هانیه محجل شجاء<sup>۱\*</sup> و محمدعلی حسینپور فیضی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی گیاهی

<sup>۲</sup> تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی جانوری

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۰

### چکیده

ژنهای *rooting locus (rol)* 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 همولوگ گیاهی آن یعنی ژن *rolC* از گیاه توتون، بر رشد و نمو گیاه *Nicotiana tabacum cv. samsun* انجام گرفته است. در این تحقیق ابتدا DNA گیاهان تراژن *rolC* و *rolC* استخراج و از حضور ژنهای مورد نظر اطمینان حاصل شد. با توجه به اینکه گیاهان تراژن با بیان ژنهای *rolC* و *rolC* 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 کدکننده یکی از پروتئینهای فتوسنتز II می‌باشد در گیاهان تراژن و کلروزه به شدت کاهش یافته یا متوقف می‌شود و به عبارت دیگر یکی از دلایل ایجاد کلروز ناشی از این تراژنها از نقطه نظر مولکولی می‌تواند نقص بیان ژن *psbA* در گیاهان بیان‌کننده ژنهای *rolC* و *rolC* باشد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، T-DNA، *rolC*، *rolC* RT-PCR، کلروز

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۹۷۶۲، پست الکترونیکی: h\_mohajjel@tabrizu.ac.ir

### مقدمه

عنوان منبع کربن و نیتروژن برای باکتری محسوب می‌شوند.

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 آماده‌سازی، 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 می‌روند، می‌باشد (۳۳).

سندرم ریشه‌های موئین یا حصیری (root-mat disease)

آگروباکتریوم ریزوژن (*Agrobacterium rhizogenes*) دارای ژنهای مورد نیاز برای همیوخی (*tra*, *trb*) و تولید مثل رویشی (*rep* or *reproduction*) بر روی ژنوم اصلی خود است. پلاسمید (Root inducing) Ri این باکتری نیز دارای ژنهای بیماری‌زایی (*vir* or *virulence*) و قسمتی موسوم به T-DNA (Transferred DNA) می‌باشد 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). اوپین‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که حاصل تجمع یک اسیدآمین به یک قند یا یک  $\alpha$ -کتواسید می‌باشند و به

ساکارز در پرئوموتر 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 رآسی و افزایش میزان شاخه‌های فرعی اشاره بر تغییر میزان هورمون سایتوکینین دارد (۲۴ و 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 می‌یابد (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 پرئوموترقوی 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 می‌باشد (۵ و ۲۶).

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

(۲۳) که ناشی از انتقال T-DNA به ژنوم میزبان گیاهی می‌باشد با ایجاد ریشه‌های بسیار منشعب که عدم تمایل به جذب (ageotropic) را دارند مشخص می‌گردد. 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، میان‌گره‌های کوتاه شده، برگهای چروکیده، کاهش غالبیت رآسی و ریشه‌های حجیم و آژنوتروپیک متمایز می‌شوند. به مجموع این صفات سندرم ریشه‌های موئین (hairy roots) گفته می‌شود (۳۱). مهم‌ترین ویژگی ریشه‌های 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 بر روی T-DNA ی آ. ریزوژنر عامل اصلی ایجاد سندرم ریشه‌های موئین محسوب می‌شوند. 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 زود هنگام، کاهش اندازه گلها و ایجاد نر عقیمی با کاهش تولید دانه‌گرده از دیگر تغییرات مورفولوژیکی ناشی از بیان ژن *rolC* در گیاهان می‌باشد (۸، ۱۰، ۱۸ و ۲۴). یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های بیان ژن *rolC*، ساکارز است. طبق بررسی‌های به عمل آمده ناحیه پاسخ به

الفای 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 محتویات هاون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه‌ها 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 ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب استریل اضافه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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 کلروفورم اضافه گردید و پس از ورتکس کردن، سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و به میزان ۲ حجم ایزوپروپانول اضافه گردید. تیوبها به مدت یک شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و روز بعد سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰rpm انجام شد. در ادامه رسوب‌دهی به روش اتانول انجام شد و بعد از خشک شدن، به میزان ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase به آن اضافه گردید. به منظور حذف مولکولهای DNA از RNA استخراج شده، واکنش DNase توسط کیت Qiagen انجام گرفت و بررسی کمی 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.

سنتر cDNA و واکنش PCR: برای سنتر cDNA از کیت (

عملکردی ژنهای T-DNA و cT-DNA را به اثبات رسانده اند (۳ و ۲۹). توالی مشابه با ژن *rolC* در گیاه توتون، *trolC* (*tobacco rolC*) نامیده می‌شود (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 الفای کلروز توسط ژن *rolC* و *trolC* با بررسی نحوه بیان ژنهای کلروپلاستی در گیاهان تراژن مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

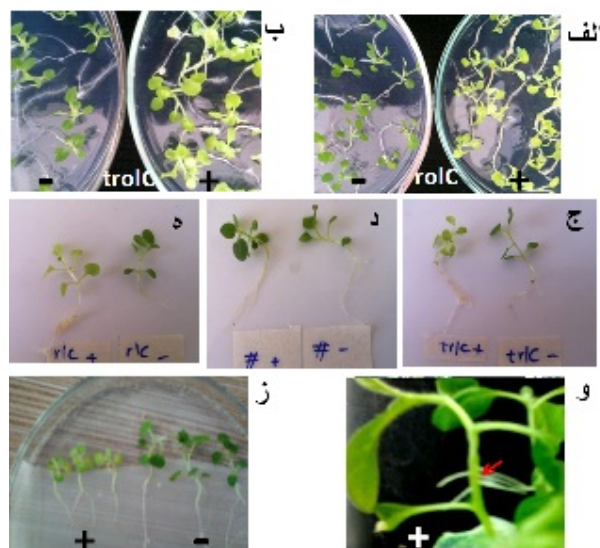
### مواد و روشها

**گیاهان مورد استفاده:** گیاهان توتون تراژن مورد استفاده در این تحقیق (*Nicotiana tabacum cv.samsun*) دارای ژن *rolC* و *trolC* در ژنوم خود می‌باشند که ژنها تحت کنترل پروموتور القا شونده با گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون (*dexamethasone*) می‌باشند. 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 مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (حاوی یک قطره ۲۰ Tween) استریل سطحی شدند. سپس ۳ بار، هر یک به مدت 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 سانتی‌گراد، شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی رشد داده شدند. بعد از جوانه‌زنی بذرها جهت

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 (دگرامتازون) 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 (تصویر ۱، 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 گاهی با انتهای پیچ خورده مشاهده شدند (تصویر ۱، ج تا ز). این صفات مربوط به گیاهان تراژن *rolC* و *rolC* و پس از القاء بودند و در گیاهان تراژن بدون القاء و گیاهان غیر تراژن (# یا شاهد) مشاهده نشدند.



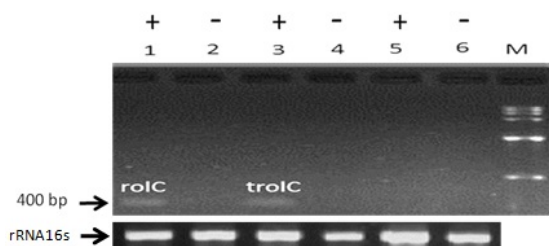
تصویر ۱- الف و ب) گیاهچه‌های ۲۱ روزه تراژن *rolC* و *rolC* در محیط دارای دگرامتازون (+) یا فاقد آن (-). ج تا ه) هر کدام از گیاهچه‌ها را به صورت مجزا نشان داده شده است. تفاوت‌های مورفولوژیک ناشی از ژنهای *rolC* و *rolC* به خوبی آشکار است. در گیاهچه‌های # تفاوتی بین حالت القاء (+) یا عدم آن (-) مشاهده 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.

Superscript III ساخت شرکت Invitrogen) استفاده گردید. پرایمرهای ژن housekeeping به نام *rRNA 16s* برای سنجش کیفیت 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.

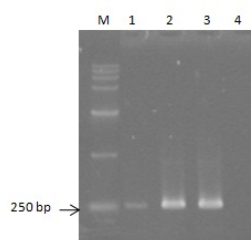
## نتایج

همان گونه که اشاره شد ژن *rolC* آگروباکتریوم و هومولوگ گیاهی آن - *trolC* - فنوتیپ کلروزه را در گیاهان بیان‌کننده این ژنها اعمال می‌کنند (۲۱ و ۲۳). در این تحقیق به منظور شناسایی عملکرد مولکولی این ژنها در ایجاد کلروزه در گیاه توتون، مبنای بر این قرار گرفت تا با طراحی پرایمرهای گوناگون ژنوم کلروپلاستی، میزان بیان این ژنها در گیاهان تراژن القاء شده با دگرامتازون توسط تکنیک-RT PCR (Reverse transcription-PCR) بررسی گردد و آنها با گیاهان تراژن القاء نشده و نیز گیاهان غیر تراژن (#) که به عنوان شاهد به کار می‌روند مقایسه شود. در ابتدا بذر

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).



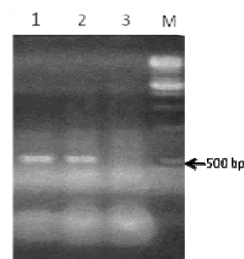
تصویر ۳- RT-PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژنهای *rolC* و *trolC* (M مارکر وزن مولکولی، ۴-۱ گیاهان تراژن ۵ و ۶) گیاه تیپ وحشی # باندهای مشاهده شده مربوط به ژنهای *rolC* و *trolC* همراه با القاء توسط dex (+) می‌باشند (۴۰۰bp) و در گیاهانی که القاء نشده اند (-) حضور ندارد. تصویر پایین مربوط به نتیجه واکنش PCR توسط پرایمرهای ژن *rRNA16s* می‌باشد. در مرحله بعد، بیان ژن *psbA* که یکی از مهم‌ترین ژنهای کلروپلاستی گیاه توتون می‌باشد بررسی گردید. این ژن، از ژنهای اصلی درگیر در مسیر فتوسنتز می‌باشد و اختلال در بیان آن می‌تواند موجب کاهش یا قطع تولید کلروفیل و در نتیجه ایجاد کلروز گردد.



تصویر ۴- RT-PCR توسط 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 می‌باشند).

همان‌گونه که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود در گیاهان تراژن *trolC* و *rolC* 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

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 تصویر ۲ مشاهده می‌شود باند مربوط به ژنهای *rolC* و *trolC* در لاین ۱ و 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

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 می‌تواند 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.

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. ریزوترنز* 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 می‌شود، در حالی که با القای ژنهای *rolC* و *trolC* بیان ژن *psbA* کاسته و حتی متوقف می‌گردد که در واقع با زردی گیاهان ترازیخت 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 می‌باشد. با توجه به هومولوژی توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژنهای *rolC* و *trolC* و پروتئین‌های مربوطه و شباهت‌های فیزیومورفولوژیک حاصل

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 زیتنی 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 و یا تجزیه آن (۱ و ۴)، کمبود مواد معدنی مانند آهن (۱۷)، به کارگیری ترکیبات سمی مانند تتوکسین و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (۲ و ۱۶) باشد.

### بحث و نتیجه گیری

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  $\beta$  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

شجا و همکاران) تحقیق پیش رو شباهت عملکردی ژنهای *rolC* و *trolC* را در سطح مولکولی به اثبات می‌رساند که همراه با مشاهدات فتوتیپی می‌باشند. به عبارت دیگر *rolC* و *trolC* با کاهش بیان یک ژن خاص (*psbA*) موجب تظاهر یک فنوتیپ خاص (کلروز) می‌گردند.

از گیاهان تراریخت *rolC* و *trolC* که شامل مواردی چون کاهش رشد کلی گیاه، ریشه‌های کوتاه و پیچ‌خورده و نیز افزایش جذب قند و نشاسته (۲۱) می‌باشد و نیز وجود پروتئینهای میانکنش‌کننده مشابه با پروتئینهای RolC و tRolC مثل پروتئین TCP13 (نتایج منتشر نشده محفل

## منابع

- ۱- زهره امینی و رحیم حداد. ۱۳۹۲. نقش رنگیزه‌های فنوستیزی و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی مولکولی. شماره ۳. صفحه ۲۵۱-۲۶۵
- ۲- مریم السادات ذکری؛ پروین صالحی شانجانی؛ حمیده جوادی؛ 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.
- ۱۰- 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.
- ۱۱- 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 *Cl*: molecular biology, biochemistry and ultra structure. Plant J. 18, 477-489.
- ۱۲- 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.
- ۱۳- Draper J., Scott R., Armitage P. and Walden R. 1988. Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual. London. Blackwell Scientific Publications Ltd.
- ۱۴- Fladung, M., Ballvora, A. and Schmölling, 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.
- ۱۵- Gamble, P. E. and Mullet, J. E. 1989. J. Biol. Chem. 264, 7236-7242
- 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

- 16- Holland, N., Evron, Y., Jansen, A.k., Edelman, M. and Pick, U. 1997. Involvement 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 State Univ. 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 tabacum*. *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 genotype 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 *Agrobacterium 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-Induced 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.



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

Gardoopar H.<sup>1</sup>, Mohajjel shoja H.<sup>2</sup> and Hosseinpour feizi M.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Botany Dept., Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

<sup>2</sup> 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 *Nicotiana 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*