فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱- ۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

کنترل زیستی علف هرز پیچک صحرایی *Convolvulus arvensis* با استفاده از پروتئین نوترکیب Nep1 حاصل از *Fusarium oxysporum*

جواد حامدی *: دانشیار میکروبیولوژی، مرکز پژوهشی فن‌آوری و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir
حمید مقیمی: استادیار میکروبیولوژی، مرکز پژوهشی فن‌آوری و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir
الهام رضازاده: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران، elhamrezazadeh92@yahoo.com
علی محمد لطیفی: استادیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، amlatify@yahoo.com
ضرغام سپهری زاده: دانشیار بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، zarghamsz@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پروتئین Nep1 یک علف‌کش زیستی است که به طور مؤثری باعث از بین رفتن تعداد زیادی از گیاهان دولپه‌ای و از جمله طیف وسیعی از علف‌های هرز می‌شود. این پروتئین برای نخستین بار در سال ۱۹۹۵ از مایع تخمیر قارچ *Fusarium oxysporum* خالص‌سازی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ژن *nep1* از *F. oxysporum* جداسازی و پس از حذف سیگنال نشانه از ابتدای ژن، ساختار نهایی در حامل pET16b کلون و به باکتری *E. coli*(DE3) BL21 انتقال داده شد. پروتئین نوترکیب پس از تولید در باکتری، خالص‌سازی و رقت‌های مناسب از آن برای سنجش زیستی روی گیاه هرز تهیه شد.

نتایج: دو میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب تولید شده با غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به گیاه بالغ پیچک صحرایی اسپری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که برگ‌های گیاه پس از حدود ۲ روز شروع به زرد شدن و نکروز وسیع کردند. نکروز کامل و مرگ گیاه هرز، ۵ روز پس از اسپری مشاهده شد. از اسپری بافر بدون پروتئین نوترکیب و همچنین، پروتئین Nep1 نوترکیب تقلیب شده از طریق ۱۵ دقیقه تیمار حرارتی در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان شاهد استفاده شد که پس از گذشت ۵ روز هیچگونه علامتی روی برگ‌های گلدان‌های شاهد، مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که می‌توان از پروتئین نوترکیب Nep1 به عنوان یک عامل زیستی توانمند در کنترل گیاه هرز *C. arvensis* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین نوترکیب، پیچک صحرایی *Convolvulus arvensis*، علف هرز، کنترل زیستی، Nep1

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

باتوجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، نیاز به محصولات غذایی بیش از پیش احساس می‌شود. با وجود پیشرفت‌های صنعتی بسیاری که از سال ۱۹۴۰ تاکنون حاصل شده است، آفت‌ها شامل علف‌های هرز، حشرات و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی) همچنان مشکل اصلی، کاهش تولید در زمین‌های کشاورزی به شمار می‌روند (۱). کنترل علف‌های هرز یکی از مسایل اصلی تولید محصولات زراعی در سرتاسر جهان است. روش‌های کنترل علف‌های هرز شامل روش‌های جلوگیری کننده از رشد علف‌های هرز، روش‌های مکانیکی کنترل شامل رقابت و مدیریت کشت، روش‌های کنترل شیمیایی و زیستی است (۲). در این میان روش کنترل با کمک علف‌کش‌های شیمیایی بیشتر استفاده شده است. با توجه به مقاومت بسیاری از آفت‌ها و علف‌های هرز به آفت‌کش‌های شیمیایی و همچنین، آثار مضر شدید این آفت‌کش‌ها بر سلامت محیط زیست و انسان (۳)، استفاده از روش‌های جایگزین بسیار مورد توجه قرار گرفته است که در این میان روش‌های زیستی و استفاده از عوامل زیستی با توجه به عدم آلودگی محیط زیست و آثار اختصاصی‌تر مورد توجه زیادی هستند (۳).

علف‌کش‌های زیستی شامل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی یا ترکیبات میکروبی حاصل از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا با عنوان فیتوتوکسین‌ها هستند که برای کنترل علف‌های هرز به‌کار می‌روند (۲).

پیچک صحرایی با نام علمی *Convolvulus arvensis* گیاهی دو لپه، چند ساله، خزنده، دارای سطح صاف و بدون کرک بوده و رشد رویشی آن از ابتدای بهار تا شروع سرمای سبک پاییز است. *C. arvensis* یکی از ۱۰ گیاه هرز مهم و مسأله‌ساز دنیاست و از گیاهان هرز مضر در باغات، مزارع گندم و محصولات تابستانه به شمار می‌آید (۴ و ۵). این گیاه، بومی اروپا و غرب آسیا بوده و در مناطق گرمسیری و معتدل توسعه یافته است (۵). گیاه *C. arvensis* با پیچیدن به دور غلات دانه ریز سبب ایجاد مشکل در امر برداشت آن‌ها می‌شود. همچنین، این گیاه به سرما و یخبندان مقاوم بوده و آثار آسیبی شدیدی بر روی ذرت و نیشکر دارد (۴ و ۵).

استفاده از علف‌کش‌های شیمیایی مهم‌ترین راهکار مقابله با این علف هرز است. از جمله مهم‌ترین علف‌کش‌های شیمیایی مورد استفاده برای کنترل این گیاه می‌توان به علف کش 2,4- D[1] از گروه فنوکسی استیک‌اسید و همچنین، علف‌کش شیمیایی خطرناک MCPA[2] اشاره کرد (۴). آثار تخریبی بالا روی محیط زیست و مقاوم شدن علف‌های هرز از جمله پیچک به این علف‌کش‌ها از جمله مهم‌ترین مشکلات این آفت‌کش‌های شیمیایی است. در روزهای گرم سال اسپری کردن این سموم، سبب تغییر فرمولاسیون آن‌ها و به شدت برای انسان‌ها سمی خواهد شد. همچنین، جذب پوستی این سموم عوارض جبران ناپذیری را به همراه دارد (۵). سمیت بالای علف‌کش‌های شیمیایی مورد استفاده برای کنترل *C. arvensis* برای انسان و محیط زیست و مقاوم شدن این علف هرز به این آفت‌کش ها، لزوم توجه به استفاده از عوامل جایگزین با کارایی بالا و سمیت کمتر را روشن می‌کند.

پروتئین Nep1[3] یک علف‌کش زیستی است که اولین بار در سال ۱۹۹۵توسط بیلی[4] از عصاره کشت قارچ *Fusarium oxysporum* کشف و خالص‌سازی

شد (۶). این پروتئین باعث تحریک تولید اتیلن و بافت مردگی در گیاهان دولپه‌ای می‌شود. طیف میزبانی این پروتئین دامنه وسیعی از گیاهان دولپه است، اما در تک لپه‌ای‌ها فاقد خاصیت تخریب‌پذیری است. این پروتئین نقش مهمی در توسعه بیماری توسط *F. oxysporum* داشته (۷ و ۸) و به عنوان یک نامزد مناسب از علف‌کش‌های زیستی در مزارع تک لپه‌ای به ویژه مزارع غلات مثل گندم، برنج، جو، ذرت و... معرفی شده است (۷ و ۹).

هدف از انجام این پژوهش که برای نخستین بار انجام می‌شود، تولید پروتئین نوترکیب Nep1 به عنوان یک عامل زیستی توانمند برای کنترل علف‌های هرز دو لپه‌ای در مزارع غلات تک لپه‌ای است. در این میان از علف هرز *C. arvensis* به عنوان یک علف هرز مقاوم و رایج در مزارع غلات تک لپه‌ای مثل گندم و جو برای ارزیابی فعالیت پروتئین نوترکیب تولید شده استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت قارچ و استخراج RNA: به منظور کشت قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* UTMC01733 (تهیه شده از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران[۵]) در محیط زاپکس داکس برات[۶] همراه با یک درصد کازو آمینواسید به مدت ۴ روز، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. در روز چهارم مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم قارچی در هاون سرد شستشو داده، با اتانول ریخته شد و به آن گوانیدین ایزوتیوسیانات ۵/۴ مولار با اسیدیته ۶/۵ به همراه نیتروژن مایع اضافه و تا رسیدن به یک پودر نرم به خوبی خرد شد. به منظور استخراج RNA، محلول سلول‌های خرد شده به‌دست آمده از مرحله قبل پس از هوموژن کردن در ۷۵۰۰۰ دور در دقیقه با هموژنایز (هایدولف- آلمان مدل سایلنت کروشر- اس[۷]) با کیت استخراج RNA با خلوص بالا[۸] شرکت روشه آلمان[۹] استخراج شد.

ساخت cDNA و انجام RT- PCR: مقدار دو میکرولیتر از RNA استخراج شده به منظور ساختن cDNA تک رشته توسط کیت اکسپند ریورس ترانس کریپتاز[۱۰] شرکت روش آلمان استفاده شد. cDNA ساخته شده در ادامه برای تکثیر ژن *nep1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن استفاده شد. برای انجام PCR از پرایمر اختصاصی ژن رفت:

5´CATATGGCCGTAGTTAACCAT3´

با جایگاه برش آنزیمی *Nde*I و پرایمر اختصاصی ژن برگشت:

5´GGATCCTCAGGACCAGGCCTT3´

با جایگاه برش آنزیم *Bam*HI استفاده شد. چرخه‌های PCR انجام شده برای تکثیر ژن *nep1* شامل مرحله واشرست در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای پلیمریزاسیون ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و به شکل ۳۰ چرخه انجام شد. محصول PCR به منظور تایید ژن جداسازی شده توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی شد (۱۰).

کلونینگ ژن *nep1*: محصول PCR به دست آمده به شکل انتهای صاف در ابتدا درون حامل pUC19 کلون و با روش شوک حرارتی و تیمار با $CaCl_2$ به داخل سلول‌های شایسته *E. coli* نوا- بلو[۱۱] انتقال داده شد. پلاسمید نوترکیب از کلونی‌های سفید استخراج شده و با آنزیم‌های *Nde*I و *Bam*HI شرکت فرمنتاس بریده شد. ژن *nep1* بریده شده از روی ژل خالص‌سازی

شد. برای تولید کلون‌های نهایی واکنش اتصال بین حامل بیانی pET16b بریده شده با آنزیم‌های *Nde*I و *Bam*HI با قطعه *nep1* با انتهای چسبنده مرحله قبل انجام شد. برای انتقال به میزبان نهایی از روش شوک حرارتی و تیمار با $CaCl_2$ استفاده شد و محصول واکنش لیگاسیون به میزبان بیانی *E. coli*(DE3) BL21 انتقال داده شد. از کلون‌های نوترکیب، پلاسمید استخراج و برای تایید نهایی انجام صحیح فرایند کلونینگ به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد (۱۰).

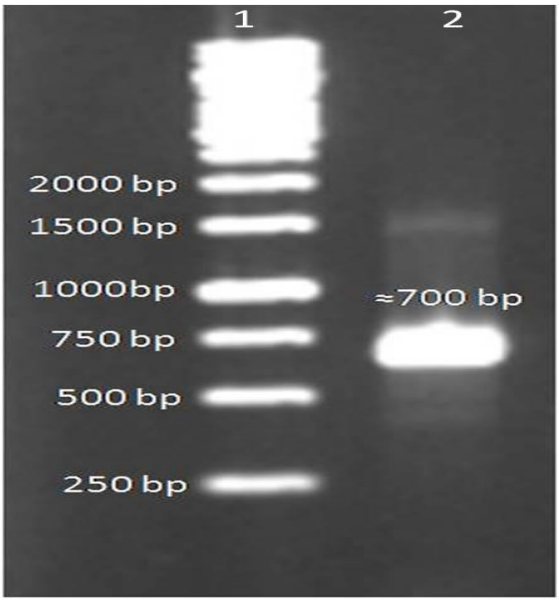
تولید پروتئین Nep1 نوترکیب و خالص‌سازی آن: در ابتدا باکتری نوترکیب داخل محیط کشت LB همراه با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آمپی‌سیلین، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد و پس از اینکه میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید، یک میلی‌مولار از محلول IPTG[۱۲] برای القای بیان ژن به آن افزوده شد. پس از القای باکتری‌ها به مدت ۵ ساعت در همان دور و دما، روی شیکر قرار داده شدند. باکتری‌های آماده شده در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب سلولی دو بار با محلول سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. برای لیز سلول‌ها به رسوب سلولی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پودر لیزوزیم به همراه مهار کننده پروتئاز PMSF[۱۳] با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با توجه به بیان برچسب هیستیدینی در ابتدای پروتئین نوترکیب برای خالص‌سازی پروتئین از ستون‌های کروماتوگرافی NI- NTI[۱۴] و کیت استخراج پروتئین شرکت کیاژن[۱۵] استفاده شد. از روش SDS- PAGE به منظور بررسی تولید و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تولید شده استفاده شد (۱۰).

کشت گیاه و سنجش فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب تولید شده: بذر گیاه هرز *C. arvensis* از شرکت ورتا صنعت اصفهان تهیه شد و در شرایط گلخانه‌ای درون گلدان‌های ۱۰ سانتی متر کشت داده شد. گیاه بالغ ۸ تا ۱۰ هفته‌ای به منظور ارزیابی فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب تولید شده استفاده شد. به منظور تعیین غلظت پروتئین تولید شده از روش برادفورد استفاده شد. از آلبومین سرم انسانی به منظور رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت پروتئین استفاده شد. پروتئین خالص‌سازی شده در محلول Tris- HCl با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار رقیق‌سازی شد و مقدار ۲ میلی‌لیتر از پروتئین رقیق شده با غلظت نهایی ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بین ساعت‌های ۱۰ تا۱۴ به سطح برگ‌های گیاه بالغ اسپری شد. از اسپری محلول Tris- HCl با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به عنوان شاهد بر سطح گیاه اسپری شد. تمامی سنجش‌های گیاهی دو بار و هر بار روی سه گیاه مستقل انجام شد.

نتایج

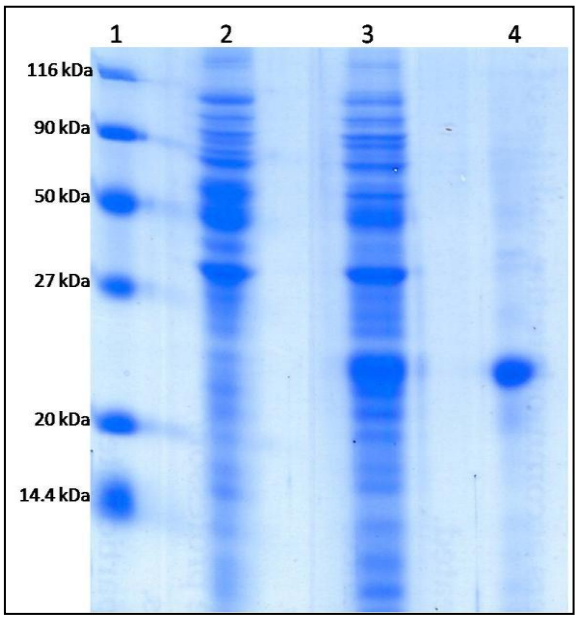
جداسازی ژن *nep1* از قارچ *Fusarium oxysporum*: ژن *nep1* قارچی دارای یک اینترون ۵۸ نوکلئوتیدی است که در میان دو اگزون قرار گرفته است. به همین منظور برای جداسازی ژن از واکنش RT- PCR استفاده شد. پس از جداسازی RNA و انجام واکنش RT- PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nep1*، یک قطعه حدود ۷۰۰ نوکلئوتیدی جداسازی شد که در شکل ۱ مشاهده می‌شود. قطعه جداسازی شده پس از خالص‌سازی تعیین توالی شد که نتایج انطباق توالی به دست آمده با توالی

ثبت شده در بانک ژنی[۱۶] ۹۹ درصد هومولوژی بین ژن جداسازی شده با ژن *nep1* جداشده از *F. oxysporum* با شماره دسترسی AF036580 را نشان داد.



شکل۱- ژل الکتروفورز آگاروز واکنش جداسازی ژن *nep1* با واکنش RT- PCR. ردیف ۱ DNA سایز مارکر[۱۷] از شرکت فرمنتاس و ردیف ۲ باند به دست آمده از واکنش RT- PCR با طول حدود ۷۰۰ نوکلئوتید را نشان می‌دهد.

تولید و خالص‌سازی پروتئین: به منظور تولید پروتئین نوترکیب و خالص‌سازی آن از روش SDS- PAGE استفاده شد. در این مرحله به منظور بررسی تولید پروتئین نوترکیب، سوپ سلولی تهیه شده از سلول‌های القا شده نوترکیب همراه با سلول (DE3) BL21 *E. coli* حاوی پلاسمید pET16b، اما بدون ژن *nep1* به عنوان شاهد منفی روی SDS- PAGE انتقال داده شد که نتایج به دست آمده در شکل ۲ ردیف‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود. با توجه به این شکل در ردیف شماره ۲ که به عنوان شاهد منفی پروتئین‌های سوپ سلولی استفاده شده بیان پروتئین شاخصی در حدود ۲۵ کیلو دالتون مشاهده نمی‌شود، در مقابل در ردیف ۳ بین باندهای ۲۰ تا ۲۷ کیلو دالتون بیان یک پروتئین به صورت شاخص افزایش یافته است. با توجه به اینکه NLPs حدود ۲۲ تا ۲۸ کیلودالتون وزن دارند. این باند مورد نظر احتمالاً مربوط به پروتئین نوترکیب تولید شده است.

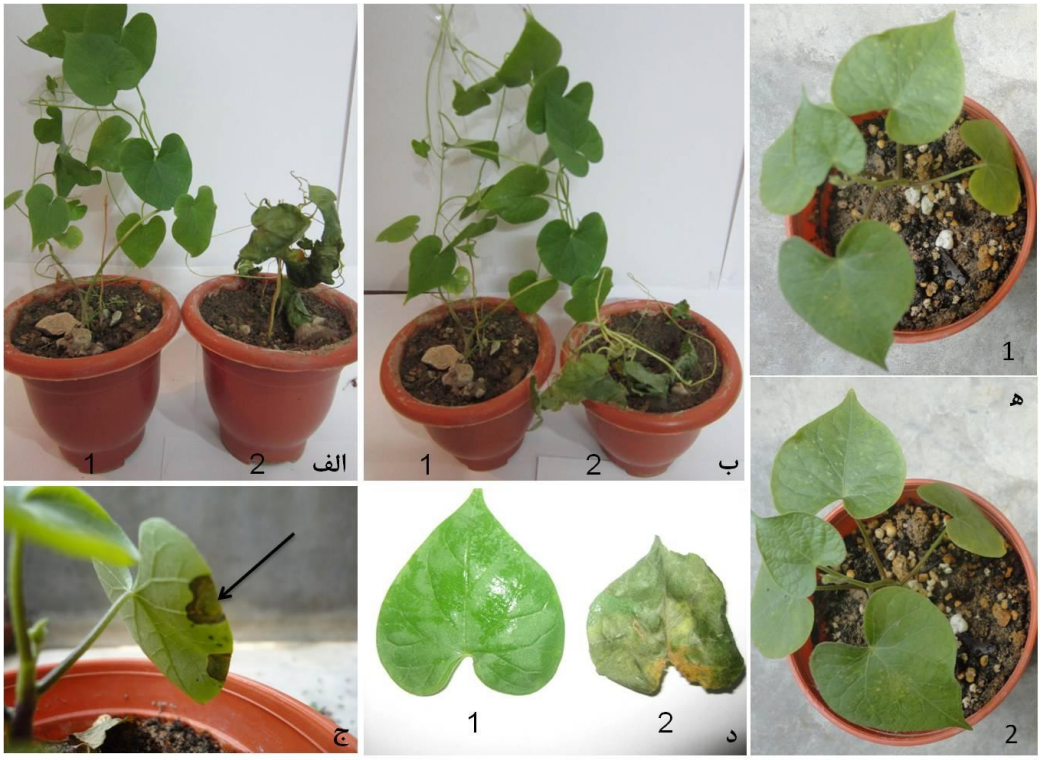


شکل ۲- تصویر ژل SDS- PAGE مربوط به خالص‌سازی پروتئین Nep1. **ردیف ۱:** پروتئین سایز مارکر[۱۸] شرکت فرمنتاس، **ردیف۲:** سوپ لیزشده سلولی از باکتری (DE3) BL21 *E. coli* حاوی pET16b و بدون ژن *nep1* به عنوان شاهد منفی، **ردیف ۳:** سوپ لیزشده سلولی از باکتری (DE3) BL21 *E. coli* حاوی پلاسمید نوترکیب pET16b/nep1، **ردیف ٤:** پروتئین خالص‌سازی شده با وزن تقریبی ۲۵ کیلو دالتون.

در ردیف چهارم از شکل ۲ تصویر پروتئین خالص‌سازی با نیکل مشاهده می‌شود. حضور این باند پروتئینی حدود ۲۴ کیلو دالتونی نشان می‌دهد که احتمالاً پروتئین تولید شده در ردیف ۳ در سوپ لیز شده سلولی همان پروتئین نوترکیب Nep1 است.

بررسی فعالیت زیستی پروتئین تولید شده روی گیاه *C. arvensis*: به دنبال تولید پروتئین نوترکیب Nep1 و تعیین غلظت آن با روش براد فورد، میزان ۲ میلی‌لیتر از پروتئین با غلظت۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سطح برگ‌های گیاه بالغ پیچک صحرایی اسپری شد. نتایج بررسی فعالیت زیستی پروتئین تولید شده در شکل ۳ مشاهده می‌شود. براساس نتایج به دست آمده، پس از اسپری پروتئین به سطح گیاه پس از گذشت ۲ روز نشانه‌های کلروز و زردی و به دنبال آن نکروز بر روی گیاه ظاهر شد و پس از ۵ روز نکروز کامل و مرگ گیاه مشاهده شد. در مورد آزمایش شاهد، یک گیاه تنها با بافر و بدون پروتئین نوترکیب به عنوان شاهد منفی تیمار شده بود و یک گیاه دیگر با ۲ میلی‌لیتر از پروتئین با غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که قبل از تیمار محلول پروتئینی به مدت ۱۵ دقیقه تیمار حرارتی در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در مورد هر دو گیاه شاهد پس از گذشت ۵ روز هیچگونه علامتی از نکروز و مرگ گیاه مشاهده نشد.

همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود گیاه تیمار شده با پروتئین نوترکیب Nep1 دچار آسیب جدی شده و تیمار گیاه هرز با این عامل زیستی پس از ۵ روز باعث مرگ کامل آن شده‌است.



شکل۳- در شکل الف- ۱ گیاه شاهد که فقط با بافر اسپری شده است مشاهده می‌شود. در شکل الف- ۲ تصویر گیاه مورد آزمایش دو روز پس از تیمار با پروتئین نوترکیب Nep1 مشاهده می‌شود. در شکل ب- ۱ گیاه شاهد و در شکل ب- ۲ گیاه مورد آزمایش در روز پنجم مشاهده می‌شود. ج- تصویر شروع نکروز در برگ گیاه پیچک صحرایی ۲۴ ساعت پس از اسپری پروتئین نوترکیب Nep1. در شکل د- ۱ برگ جدا شده گیاه شاهد پیچک و در شکل د- ۲ برگ گیاه تیمار شده با Nep1 نوترکیب در روز چهارم مشاهده می‌شود. در شکل ه- ۱ و ه- ۲ گیاه شاهد اسپری شده با پروتیئن Npe1 نوترکیب تقلیب شده با حرارت به ترتیب در روز اول و پنجم مشاهده می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین Nep1 یک پروتئین ترشحی قارچی با وزن حدود ۲۵ کیلودالتون و دارای یک سیگنال نشانه ۳۱ اسیدآمینه در انتهای آمینی و یک اینترون به طول ۵۸ نوکلئوتید است (۸ و ۱۱). در این پژوهش، با طراحی پرایمر اختصاصی و انجام واکنش RT-PCR توالی اینترون و سیگنال نشانه از ژن *nep1* حذف شد و یک قطعه حدود ۷۰۰ نوکلئوتیدی مربوط به ORF پروتئین Nep1 قارچی به دست آمد (شکل ۱). کلون نهایی ژن جدا شده در *E. coli* بیانی باعث تولید بسیار زیاد پروتئین نوترکیب Nep1 (حدود ۱۷ میلی‌گرم در لیتر) شد (شکل ۲). در پژوهش‌های انجام شده قبلی پروتئین نوترکیب Nep1 در مخمر *Pichia pastoris* به شکل نوترکیب تولید شده بود، ولی به میزان تولید پروتئین اشاره نشده و هدف از تولید پروتئین بررسی فعالیت آن روی سلول‌های گیاهی بوده و فعالیت علف‌کشی آن بررسی نشده بود (۱۲). در این پژوهش، با به کارگیری روش خالص‌سازی با یون‌های نیکل پروتئین نوترکیب به شکل خالص تولید شد (شکل ۲). از مزایای این روش خالص‌سازی می‌توان به خالص‌سازی سریع و پربازده پروتئین نوترکیب اشاره کرد.

استفاده از پروتئین Nep1 به عنوان علف‌کش زیستی توسط سایر دانشمندان نیز مورد توجه قرار گرفته است و کوشش‌هایی برای استفاده از قارچ مولد و یا پروتئین تولید شده توسط قارچ به عنوان علف‌کش زیستی انجام شده است (۱۳ و ۱۴). همچنین، در پژوهش دیگر انجام شده آثار علف‌کشی پروتئین Nep1 روی گیاه خردل وحشی ارزیابی و عنوان شد که می‌توان از این علف‌کش زیستی برای کنترل آن استفاده کرد (۱۵). قارچ *F. oxysporum* به تنهایی به عنوان علف‌کش زیستی علیه برخی از علف‌ها از جمله: *Cassia obtusifolia*، *Cassia occidentalis* و *Sesbania exaltata* به کار برده شده است. اما نکته‌ای که این پژوهش را نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده برجسته می‌کند، این است که در این پژوهش از پروتئین نوترکیب تولید شده استفاده شده است که مشکلات استفاده از قارچ طبیعی را از جمله نیازمندی به میزبان اختصاصی، رطوبت بالا برای تندش اسپور قارچ و آلودگی مزارع مجاور با قارچ بیماری‌زای *F. oxysporum* را ندارد (۹ و ۱۸). همچنین، میزان تولید پروتئین نوترکیب در این پژوهش حدود ۱۷ میلی‌گرم در لیتر بوده است که در مقایسه با پروتئین تولید شده توسط قارچ *F. oxysporum* بسیار بیشتر است؛ و برای اولین بار در این پژوهش از یک علف‌کش زیستی برای کنترل گیاه هرز پیچک صحرایی استفاده شده است. همان‌گونه که اشاره شد برای کنترل *C. arvensis* در مزارع به طور رایج از سموم شیمیایی نظیر 2,4-D و MCPA استفاده می‌شود. گزارش شده مصرف این سموم در بعضی از کشورها مانند دانمارک سبب افزایش نرخ سرطان شده است. همچنین، در پژوهشی که توسط سادلورا [۱۹] و همکاران انجام شده سمیت این آفت‌کش بر حیوانات نیز گزارش شده است (۱۶). در گزارشی دیگر افزایش خطر این آفت‌کش بر روی انسان و محیط بیان شده است (۱۷). این

علف‌کش‌ها فرار بوده و انتقال آن پس از مصرف موجب بروز خسارت بر روی مزارع مجاور در گونه‌های زراعی پهن برگ (به ویژه مزارع چغندرقند، پنبه، کلم، سبزی و محصولات صیفی، باغ‌های گلابی، تاکستان‌ها و غیره) می شود. MCPA به راحتی توسط گیاهان جذب می‌شود و مقدار باقیمانده از این سم در محصولات غذایی باعث افزایش نگرانی در مورد سلامت بشر می‌شود، تا حدی که آژانس بین المللی پژوهش بر روی سرطان، این علف‌کش را به عنوان یک عامل سرطان‌زا معرفی کرده است (۱۶). در این پژوهش، برای اولین بار کنترل زیستی *C. arvensis* به روش زیستی و با پروتئین نوترکیب Nep1 مطالعه شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌هد که می‌توان پروتئین نوترکیب Nep1 را به عنوان یک عامل زیستی توانمند برای کنترل علف هرز پیچک صحرایی استفاده کرد.

References

(1) Saxena S., Pandey AK. Microbial metabolites as eco- friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied microbiology and biotechnology* 2001; 55 (4): 395- 403.

(2) Hoagland R., Boyette C., Weaver MA., Abbas HK. Bioherbicides: Research and risks. *Toxin Reviews* 2007; 26 (4): 313- 42.

(3) Ash GJ. The science., art and business of successful bioherbicides. *Biological Control* 2010; 52 (3): 230- 40.

(4) Davison JG. Control of the bindweeds *Convolvulus arvensis* and *Calystegia sepium* in fruit crops. *Pesticide Science* 1976; 7 (5): 429- 435.

(5) Crafts AS., Kennedy PB. The physiology of *Convolvulus Arvensis* (morning- glory of bindweed) in relation to its control by chemical sprays. Plant Physiology 1930; 5 (3): 329- 44.

(6) Bailey BA. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 1995; 85: 1250- 55.

(7) Bailey BA., Apel- birkhold PC., Luster DG. Expression of NEP1 by *Fusarium oxysporum f. sp. erythroxyli* after gene replacement and overexpression using polyethylene glycol- mediated transformation. *Phytopathology* 2002; 92 (8): 833- 41.

(8) Gijzen M., Nurnberger T. Nep1- like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa Phytochemistry. *Phytochemistry* 2006; 67 (16): 1800- 07.

(9) Amsellem Z., Cohen BA., Greaael J. Engineering hyper- virulence in a mycoherbicide fungus for efficient weed control. *Nature biotechnology* 2002; 20 (10): 1035- 39.

(10) Sambrook j., Russell DW. *Molecular Cloning., A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold New York: Springr Harbor Laboratory Press. 2001.

(11) Jennungs JC., Apel- birkhold PC., Bailey BA., Anderson JD. Induction of ethylene biosynthesis and necrosis in weed leaves by a *Fusarium oxysporum* protein. *Weed Science* 2000; 48 (1): 7- 14.

(12) Schouten A., Baarlen PV., Van Kan JAL. Phytotoxic Nep1- like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist* 2008; 177 (2): 493- 505.

(13) Cechinl A., Sinigalial M., Lemke N., Echeverrigaray S., Cabrera O., Perira G., et al. Cupin: A candidate molecular structure for the Nep1- like protein family. *BMC Plant Biology* 2008; 8: 50-63.

(14) Clare L., Pemberton G., Salmond GPC. The Nep1- like proteins a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Physiology* 2004; 5 (4): 353- 59.

(15) Moghimi H., Hamedi J., Sepehrizadeh Z., Ofoghi H. Overexpression of recombinant Nep1 in *Escherichia coli* and its use as a biological agent for control of *Sinapis arvensis*. *Annals of Microbiology* 2013; 63 (2): 669- 75.

(16) Sadlonova I., Hozova R., Flaskarova E. Adverse effects of herbicide MCPA on dogs in a 90 day toxicological study. *Neuro Endocrinol Letter* 2006: 108- 11.

(17) Maria. Developmental toxicity of a commercial herbicide mixture in mice: I. Effects on embryo implantation and litter size. *Environ Health Perspect* 2011; 110 (11): 1081- 5.

(18) Bailey BA., Apel- birkhold PC., Akingbe OO., Ryan JL., O'neill NR., Anderson JD. Nep1 protein from *Fusarium oxysporum* enhances biological control of opium poppy by *Pleospora papaveracea*. *Phytopathology* 2000; 90 (8): 812- 18.

---

[1]- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
[2]- 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid
[3]- Necrosis and ethylene inducing protein1
[4]- Bailey
[5]- University of Tehran Microorganisms Collection (UTMC)
[6]- Czapek-Dox broth
[7]- Heidolph-Germany- Silent crusher S
[8]- High Pure RNA Extraction
[9]- Roche -Germany
[10]- Expand reverse Transcriptase
[11]- E. coli novablue
[12]- Isopropyl-β-D-thiogalactoside
[13]- phenylmethanesulfonyl fluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
[14]- Nickelnitrilotriacetic acid agarose
[15]- Qiagen
[16]- NCBI-GenBank
[17]- DNA Size marker
[18]- Protein size marker
[19]- Sadlohora

Recombinant Nep1 From *Fusarium oxysporum* as a biological agent for control of *Convolvulus arvensis*

Javad Hamedi * **
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, jhamedi@ut.ac.ir
Hamid Moghimi **
Assistant Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir
Elham Rezazadeh
M.Sc. in Microbiology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran, elhamrezazadeh92@yahoo.com
Ali Mohhamad Latifi
Assistant Professor of Microbiology, Bagiatallah University of Medical Science, Tehran, Iran, amlatify@yahoo.com
Zargham Sepehri zadeh
Associate Professor of Pharmaceutical Biotechnology, Tehran University of Medical Science, Iran, zarghamsz@yahoo.com

Abstract

Introduction: Nep1 is a natural bio-herbicide protein which has an effective necrosis stimulant in dicotyledonous weeds. This protein was first purified in 1995 form fermentation broth of *Fusarium oxysporum*.

Materials and methods: In this study, the *nep1*gene was isolated form *F. oxysporum*, after removal of signal peptide from the beginning of the gene; final *pET16b-nep1* construct was cloned and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant Nep1 was produced in *E. coli*. Recombinant protein was purified, diluted and prepared for biological assay on weed.

Results: Two ml of recombinant Nep1 with 60 µg/ ml final concentrations was sprayed on *Convolvulus arvensis*. Our results showed necrosis and chlorosis symptoms were started on the plant leaves after 2 days, also significant necrosis on the leaves of *C. arvensis* was seen after 5 days. No necrosis lesion was seen in the negative control plants that sprayed only with buffer and denatured recombinant Nep1 in 100 ºC for 15 min.

Discussion and conclusion: Our results introduced recombinant Nep1 as a biological potent agent for biocontrol of *C. arvensis*.

Key words: Recombinant protein, *Convolvulus arvensis*, Weed, Biocontrol, Nep1

* Corresponding author
** Microbial Technology and Products Research Center
Received: October 13, 2013/ **Accepted:** January 15, 2014