



## استفاده از منابع کربن و فنل در محیط کشت به منظور القاء بهینه پرموتر ژن های *Agrobacterium tumefaciens* بیماری زا در

محمدصادق تقی زاده<sup>۱</sup>، محمد مهدی سوهانی<sup>۲\*</sup> و رضا شیرزادیان خرم آباد<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۱۵

### چکیده

انتقال ژن به گیاهان با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* دارای مزایای بسیاری است، اما مشکل مهم این سیستم کارآیی پایین آن است. بر این اساس، یکی از راه‌های بهبود کارآیی، افزایش فعالیت ژن‌های بیماری‌زایی یا *vir* است که نقش اصلی را در انتقال تراژن به داخل ژنوم گیاه میزبان ایفا می‌کنند. برخی متابولیت‌های فنلی و قندها القاگر ژن‌های *vir* هستند که به‌طور سینرژیک عمل می‌کنند. در این تحقیق جهت بررسی شرایط بهینه بیان پرموتر ژن‌های بیماری‌زا از دو سویه موتانت *A. tumefaciens* به نام‌های A348 (MX243) و A348 (MX311) استفاده شد که در سویه موتانت MX243 ژن گزارشگر فاقد پرموتر *lacZ* کدکننده آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز با پرموتر ژن‌های *virB2* امتزاج یافته (*virB2::lacZ*) و در سویه موتانت MX311 پرموتر *virD2* با ژن گزارشگر فاقد پرموتر *lacZ* امتزاج یافته (*virD2::lacZ*) است. بر این اساس، فعالیت پرموترهای این دو ژن بیماری‌زا با میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز تحت سه تیمار قندی گلوکز، مانوز و داکسی‌مانوز در ترکیب با تیمار فنلی استوسیرینگون در سطوح مختلف در دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی اندازه‌گیری شد. ملاک ارزیابی و مقایسه در این خصوص، کشت سه‌روزه *A. tumefaciens* شامل مرحله اول رشد رویشی و مرحله دوم القای ژن‌های بیماری‌زا به‌عنوان پروتکل استاندارد القاء بود. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از تیمار قندی مانوز در ترکیب با ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون برای القای بهینه پرموتر ژن *virB2* و تیمار قندی مانوز در ترکیب با ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون برای القای بهینه پرموتر ژن *virD2* بالاترین فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز را به همراه داشت. همچنین تحت شرایط عدم حضور استوسیرینگون، تیمار قندی گلوکز نسبت به مانوز و داکسی‌مانوز قدرت القا و بیان بالاتر پرموتر ژن‌های بیماری‌زا را داشت. بنابراین، به‌منظور بهبود القا و بیان ژن‌های بیماری‌زای *virB2* و *virD2* پس از مرحله تکثیر رویشی تا زمان هم‌کشتی باکتری و نمونه‌های گیاهی، پیشنهاد می‌شود از تیمار قندی مانوز به‌عنوان منبع کربن جایگزین گلوکز در ترکیب با غلظت ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون در محیط کشت استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** استوسیرینگون، داکسی مانوز، سنجش آنزیمی، گلوکز، مانوز،  $\beta$ -گالاکتوزیداز

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

\* نویسنده مسئول: [msohani@guilan.ac.ir](mailto:msohani@guilan.ac.ir)

## مقدمه

از میان روش‌های تراریزش استفاده‌شده برای تلفیق ژن خارجی به داخل ژنوم گیاهان میزبان، روش تراریزش ژنتیکی به‌واسطه *Agrobacterium tumefaciens* کارآمدترین روش برای تولید گیاهان تراریخت است (Ziemienowicz, 2001; Gelvin, 2003). *A. tumefaciens* باکتری خاک‌زی گرم منفی است که به‌طور طبیعی بیماری غده/گال طوقه را در بسیاری از گیاهان دولپه و همچنین بعضی گونه‌های تک‌لپه ایجاد می‌کند. عامل ایجاد غده در سلول میزبان، پلاسمید "القاکننده تومور" (Ti) موجود در باکتری است. بخشی از این پلاسمید به نام "DNA انتقالی" (T-DNA) به‌طور تماسی به سلول میزبان وارد و در ژنوم تلفیق می‌شود. تحقیقات نشان داده است که T-DNA علاوه بر گیاه (Gelvin, 2003)، به ژنوم سلول‌های قارچ‌ها (De Groot et al., 1998)، سلول‌های پستانداران (Bulgakov et al., 2006) و سلول‌های انسانی (Kunik et al., 2001) نیز انتقال می‌یابد. لذا باکتری به ابزاری مهم در مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به میزبان‌های مختلف تبدیل شده است. فرآیند تراریزش یا انتقال ژن از *A. tumefaciens* به سلول‌های میزبان در گیاهان مطالعه شده و شامل پنج مرحله مهم است: (۱) القا سیستم بیماری‌زایی باکتری، (۲) تولید کمپلکس T-DNA، (۳) انتقال T-DNA از *A. tumefaciens* به هسته سلول میزبان، (۴) تلفیق T-DNA به داخل ژنوم میزبان و (۵) بیان ژن‌های T-DNA در سلول میزبان (Ziemienowicz, 2001; Tzfira and Citovsky, 2006; Pitzschke and Hirt, 2010; Gelvin, 2012).

استفاده از اگروباکتریوم رهیافت ایده‌آل برای انتقال ژن است زیرا، یک فرآیند طبیعی بیولوژیکی است و نتیجه آن فراوانی بالای تلفیق تک لوکوسی بدون بازآرایی DNA انتقالی است (Gheysen et al., 1998). به‌عبارت‌دیگر، DNA خارجی می‌تواند با پایانه‌های مشخص، کارآیی بالاتر، تعداد نسخه پایین و تلفیق مناسب به داخل ژنوم میزبان انتقال یابد (Ishida et al., 2007). در تراریزش به‌واسطه *A. tumefaciens* قطعات خیلی بزرگ (۲۰۰kb) می‌تواند به داخل ژنوم میزبان منتقل شود (Hamilton et al., 1996). ضمن این‌که در تعداد زیادی از گیاهان با استفاده از روش نسبتاً ساده *in planta* حداقل هزینه، امکانات و زمان می‌توان تراژن را به گیاه

زنده وارد کرد (Allahi et al., 2014). اما، کارآیی تراریزش به‌واسطه *A. tumefaciens* در گیاهان اغلب بسیار پایین است. علاوه بر این، در گیاهانی مانند مرکبات استفاده از تکنیک‌های *in vitro* و کشت بافت ضروری است که همین امر سبب می‌شود تا زمان طولانی و هزینه‌های بالایی برای انجام تراریزش صرف شود و کارآیی همچنان بسیار پایین است (Sohani et al., 2015). بر این اساس، در هر دو روش تراریزش - وابسته و - غیر وابسته به کشت بافت هر عاملی که کارآیی انتقال را ارتقاء دهد بسیار با ارزش خواهد بود.

انتقال ژن به‌واسطه *A. tumefaciens* نیازمند فعال‌سازی دو گروه ژن در این باکتری است که شامل ژن‌های با منشأ کروموزومی (*chv*) و ژن‌های بیماری‌زا (*vir*) با منشأ پلاسمیدی است. گروه اول در درک و عدم تحرک باکتری‌ها بر روی سطح سلول‌های اپیدرمی گیاه نقش دارند (Douglas et al., 1982). ژن‌های *vir* به‌طور طبیعی بر روی پلاسمید Ti و به‌صورت *cis* با قطعه T-DNA، قرار دارند. منطقه *vir* پلاسمید Ti شامل هشت اپرون *virA*، *virB*، *virC*، *virD*، *virE*، *virF*، *virG* و *virH* است که پروتئین‌های درگیر در تنظیم پردازش و انتقال T-DNA را رمز می‌کنند (McCullen and Binns, 2006).

بیان ژن‌های *vir* در *A. tumefaciens* را سه دسته مختلف از محرک‌ها به‌طور سینرژیک القا می‌کنند که شامل ترکیبات فنلی، قندها و شرایط pH اسیدی است (Winans et al., 1994). سلول‌های زخمی در گیاهان آسیب‌دیده، راه ورود باکتری به گیاه هستند و هم‌زمان مواد فنلی مختلفی نظیر استوسیرینگون را در محیط رها می‌کنند. این ترکیبات فنلی عامل پیش‌سازهای بیوسنتز لیگنین برای بهبود زخم در گیاه هستند (Dixon and Paiva, 1995; Douglas, 1996). ترکیبات فنلی نقش مهمی در القا بیان ژن *vir* در *A. tumefaciens* دارند و منجر به انتقال T-DNA به درون سلول میزبان می‌گردند (Stachel et al., 1985; Joubert et al., 1995). اما، استوسیرینگون تنها ترکیب فنلی است که به‌طور گسترده مطالعه شده است و در تراریزش تقریباً همه گونه‌های گیاهی به‌واسطه *A. tumefaciens* استفاده شده است (Baker et al., 2005; Opabode, 2006; Harighi, 2009). ترکیبات فنلی به *VirA*، که یک کیناز است و در غشاء داخلی باکتری گسترش می‌یابد، متصل و باعث

A348 (MX243) و A348 (MX311) استفاده شد (Narasimhulu *et al.*, 1996). در این سویه‌ها ناقل‌های دوگانه pCM110 حامل ترانسپوزون Tn3- حاوی ژن بدون پروموتور *lacZ*- با پروموتور ژن‌های *vir* امتزاج یافته است. بر این اساس، سویه (A348 (MX243) حامل *lacZ::virB2* و سویه (A348 (MX311) حامل *lacZ::virD2* است (شکل ۳). باکتری‌ها اهدایی پروفوسور گلوین از دانشگاه پوردو، آمریکا می‌باشند.

**رشد باکتری‌ها و القا ژن‌های بیماری‌زا:** به‌منظور رشد باکتری‌ها و القا پروموتور ژن‌های بیماری‌زا طبق دستورالعمل گلوین (Gelvin, 2006) عمل شد. ابتدا سویه‌های باکتری، در محیط کشت YEP [شامل ۱۰ g/lit تریپتون، ۱۰ g/lit عصاره مخمر، ۵ g/lit سدیم کلراید و ۱۰۰ μg/ml] حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (۱۰۰ μg/ml) و کربنسیلین (۱۰۰ μg/ml) در طول شب در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و لرزش ۲۵۰-۲۲۵ دور در دقیقه کشت شدند. در روز دوم مقدار مشخصی از آن‌ها به محیط حداقل AB [۵۰ ml/lit بافر AB، ۵۰ ml/lit نمک AB و ۹۰۰ ml/lit محلول ساکارز با غلظت نهایی ۰/۵ درصد] حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و کربنسیلین، منتقل گردید و در ۲۸ درجه سلسیوس و با لرزش ۲۵۰-۲۲۵ دور در دقیقه تا OD<sub>600</sub>=۰/۸-۱ رشد داده شدند. در روز سوم، باکتری‌ها در شرایط ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب در حجم دو برابر محیط حداقل AB، در محیط القا [AB-Salts، بافر فسفات ۲mM، MES (2-0-Morpholino-ethan sulfonil acid) ۵۰ و pH=۵/۶] بنا به نوع تیمار که حاوی هر یک از قندهای گلوکز، مانوز و داکسی مانوز (غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار) در ترکیب با غلظت‌های مختلف استوسیرینگون (صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) کشت و به مدت ۱۲-۲۴ ساعت در دمای ۲۵-۲۲ درجه سلسیوس و دور ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

**سنجش فعالیت آنزیم β-گالاکتوزیداز:** به‌منظور سنجش آنزیمی، پس از رشد و القای ژن‌های بیماری‌زا، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری‌های القا شده به تیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و

اتوفسفریلاسیون در اسیدآمینه هیستیدین (His474) آن می‌شود و متعاقباً، *virG* فعال می‌شود. ژن‌های *virG* و *virA* به‌طور دائم در سطح پایین بیان می‌شوند. پروتئین فاکتور رونویسی VirG تولیدشده به‌توالی ۱۲ نوکلئوتیدی در روی اپرون‌های *vir* (*vir* box) متصل و بدین‌وسیله رونویسی ژن‌های *vir* القا می‌شود.

پروتئین VirD<sub>2</sub> در برش T-DNA و سنتز رشته-T، اتصال به انتهای ۵' در رشته-T و تشکیل کمپلکس T-DNA نقش دارد. پروتئین VirB<sub>2</sub> در سنتز سیستم ترشحی نوع IV نقش دارد که برای انتقال کمپلکس T-DNA و VirE<sub>2</sub> به سلول گیاهی ضروری است (Stachel *et al.*, 1987). VirD<sub>2</sub> دارای زیر واحد نشانه بنام NLS است که می‌تواند رشته-T را به هسته سلول میزبان انتقال دهد. بنابراین، برای انتقال T-DNA به سلول میزبان حضور VirD<sub>2</sub> ضروری است (Christie and Vogel, 2000) و احتمالاً باعث افزایش کارایی ترانزیس می‌گردد. pH اسیدی نیز برای القا ژن‌های بیماری‌زا مهم است. فعال‌سازی بیان ژن *vir* تنها در محیط اسیدی با محدوده pH ۵/۷-۵/۲ رخ می‌دهد (Stachel and Zambryski, 1986). بر اساس مشاهدات بیتی و لیندو (Lindow, 1995)، یک منبع کربن برای سطوح حداکثر القا ژن *vir* لازم است. علاوه بر ساختار قند، نوع قند نیز مهم بوده و توانایی اتصال (پروتئین متصل به قند) *chvE* به ترکیبات قندی متنوع، متفاوت است. بعضی از قندهای القاگر در غیاب استوسیرینگون بیان ژن *virB2* را افزایش می‌دهند (Cangelosi *et al.*, 1990).

این تحقیق بر مبنای دستورالعمل کشت گلوین (Gelvin, 2006) انجام شد که از تکثیر رویشی تا زمان هم‌کشتی *A. tumefaciens* با نمونه‌های گیاهی را شامل می‌شود. به‌منظور افزایش کارایی ترانزیس از سطوح مختلف استوسیرینگون در ترکیب با سه قند مختلف یکدیگر به‌منظور القا پروموتور ژن‌های *vir* استفاده شده است. کارایی القا با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم β-گالاکتوزیداز در دو سویه موتانت *A. tumefaciens* انجام شد که فعالیت آنزیم در هر سویه تحت کنترل پروموتور ژن‌های *virB2* و *virD2* بوده است.

## مواد و روش‌ها

**سویه‌های *A. tumefaciens* مورد استفاده:** در این تحقیق از دو سویه *A. tumefaciens* به نام‌های

*virB2* قرار دارد) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون به میزان ۲۴۷۷/۳۵ (واحد میلر) به دست آمد (شکل ۱).

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس تاثیر قندهای مورد آزمایش بر مقدار فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در سویه MX243 اختلاف معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). اما، بین غلظت‌های مختلف استوسیرینگون تفاوت معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) بوده است. در تیمار شاهد (فقدان استوسیرینگون) بین هیچ‌کدام از قندهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری در خصوص فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز مشاهده نشد (شکل ۱). اما، اثرات متقابل قند و استوسیرینگون در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز به میزان ۳۱۸۴/۸ واحد میلر در تیمار ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون در حضور قند مانوز و کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیم (۱۷۹۱/۹ واحد میلر) در تیمار شاهد (فقدان استوسیرینگون) مانوز بدست آمد. در تیمار گلوکز بین شرایط شاهد (فقدان استوسیرینگون) و همه غلظت‌های استوسیرینگون تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم را در این قند به همراه داشته است (شکل ۱). همچنین در قند مانوز بین شرایط شاهد (فقدان استوسیرینگون) و غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما، غلظت ۵۰ میکرومولار به شکل معنی‌داری مقدار فعالیت آنزیم را افزایش داد (شکل ۱). در رابطه با قند داکسی مانوز نیز بین شرایط شاهد (فقدان استوسیرینگون) و غلظت‌های مختلف استوسیرینگون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱).

#### تأثیر منبع کربن و مقادیر مختلف استوسیرینگون بر

##### فعالیت پروموتور ژن *virD2*

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس در سویه MX243 تأثیر قندهای مورد آزمایش بر مقدار فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز (که ژن کد کننده آن در این سویه تحت کنترل پروموتور ژن *virD2* است) و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون تفاوت معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) مشاهده شد (جدول ۲) بیشترین مقدار فعالیت آنزیم (۳۶۵۳/۴۳ واحد میلر) در تیمار ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون در حضور قند مانوز و کم‌ترین میزان

رسوب باکتری در ۵۰۰ میکرو لیتر Z-buffer [شامل ۱۶/۱ g/lit دی سدیم مونوهیدروژن فسفات یک آب  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ ، ۵/۵ g/lit سدیم دی هیدروژن فسفات یک آب  $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ ، ۰/۷۵ g/lit پتاسیم کلراید  $(\text{KCl})$ ، ۰/۲۴۶ g/lit منیزیم سولفات ۷ آب  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ ، ۲/۷ ml/lit بتا مرکاپتواتانول و تنظیم pH روی ۷ با استفاده از اسید فسفریک] حل شد. میزان غلظت باکتری در  $\text{OD}_{600} = 0.1 - 0.25$  تنظیم شد. سپس به هر تیوب دو قطره کلروفورم و یک قطره SDS ۰/۱ درصد (w/v) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد محلول ONPG (۴ mg/ml) و ۵۰۰ میکرو لیتر  $\text{Na}_2\text{Ca}_3$  (۱M) به هر تیوب اضافه و مجدداً به حمام آب گرم با دمای ۵۰-۶۰ درجه سلسیوس منتقل شد. زمان اولین تغییر رنگ در هر تیوب یادداشت شد. برای ثبت میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر (اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز) و طول موج ۵۵۰ نانومتر (اندازه‌گیری میزان بقایای سلولی)، نیز از اسپکتروفوتومتر (Eppendorf Photometer Plus) استفاده شد. میزان فعالیت ژن  $\beta$ -گالاکتوزیداز (واحد میلر) از رابطه میلر (Miller, 1972) به دست آمد:

$$\text{Miller} = \frac{1000 (A_{420 \text{ nm}} - 1.75 \times A_{550 \text{ nm}})}{\text{Time (min)} \times A_{600}} \quad (1)$$

#### تجزیه آماری

کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل با دو فاکتور قند و فنل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام شد.

#### نتایج و بحث

##### تأثیر منبع کربن و مقادیر مختلف استوسیرینگون بر

##### فعالیت پروموتور ژن *virB2*

نتایج تیمار قندی گلوکز (۱۰mM) در ترکیب با غلظت‌های مختلف صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون در سویه MX243 نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز (که ژن کد کننده فاقد پروموتور آن در این سویه تحت کنترل پروموتور ژن

(شکل ۲). در تیمار مانوز بین شاهد (فقدان استوسیرینگون) و غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۲). در تیمار قندی داکسی مانوز نیز بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

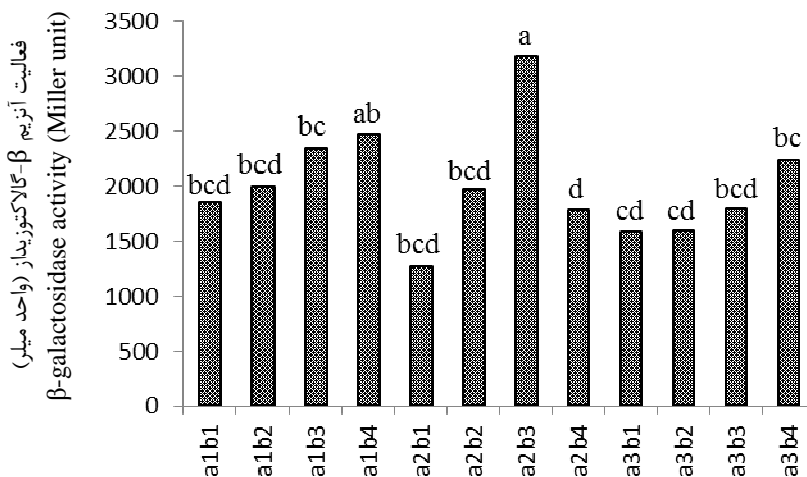
فعالیت آنزیم (۱۰۸۷/۹۱ واحد میلر) در تیمار شاهد (فقدان استوسیرینگون) داکسی مانوز به‌دست آمد (شکل ۲). در تیمار گلوکز بین شاهد (فقدان استوسیرینگون) و غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون و همچنین بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون، هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲- تاثیر قندهای مختلف و استوسیرینگون بر فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در *A. tumefaciens* سویه A348 (MX243)  
Table 2. The effects of different sugars and acetosyringone on activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme in A348 (MX243) variant

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean squares	مقدار F F-value
قند Sugar (S)	2	816335.593	408167.797	3.29 <sup>ns</sup>
استوسیرینگون Acetosyringone (A)	3	2540547.881	846849.294	6.82 <sup>**</sup>
قند × استوسیرینگون S×A	6	4941777.43	823629.572	6.63 <sup>**</sup>
خطای آزمایش Error	24	2980945.72	124206.07	-

<sup>ns</sup> و <sup>\*\*</sup>: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

<sup>ns</sup> and <sup>\*\*</sup>: Not-significant and significant at 1% probability level, respectively.



شکل ۱- اثر متقابل منابع کربن و استوسیرینگون بر میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در *Agrobacterium* سویه A348 (MX243). اثر متقابل قندهای گلوکز (a<sub>1</sub>)، مانوز (a<sub>2</sub>) و داکسی مانوز (a<sub>3</sub>) هر یک در غلظت نهایی ۱۰ mM در ترکیب با سطح صفر (b<sub>1</sub>)، ۱۰ (b<sub>2</sub>)، ۵۰ (b<sub>3</sub>) و ۱۰۰ (b<sub>4</sub>) میکرومولار استوسیرینگون بر میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز. در این سویه ژن کد کننده آنزیم فاقد پروموتور و تحت کنترل پروموتور ژن *virB*<sub>2</sub> (*virB*<sub>2</sub>::*lacZ*) قرار دارد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به تیمار a2b3 به میزان حدود ۳۳۰۰ واحد میلر بوده است.

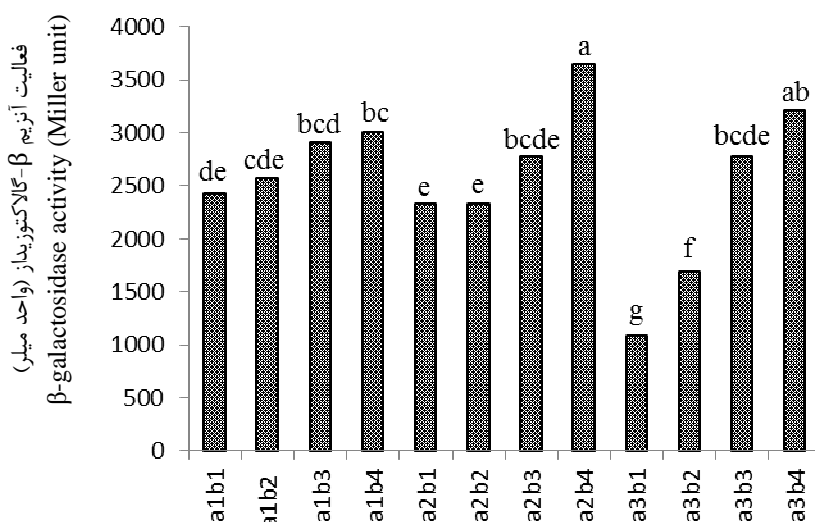
Figure 1. The interaction effects of carbon sources and acetosyringone on  $\beta$ -galactosidase activity in A348 (MX243) strain of *Agrobacterium*. Three types of sugar including glucose (a<sub>1</sub>), mannose (a<sub>2</sub>) and deoxymannose (a<sub>3</sub>) with 10mM final concentration in combination with the 0 (b<sub>1</sub>), 10 (b<sub>2</sub>), 50 (b<sub>3</sub>) and 100 (b<sub>4</sub>) μM concentration of acetosyringone used to study the activity of  $\beta$ -galactosidase. The gene coding for the enzyme is promoterless and under control of *virB*<sub>2</sub> gene promoter (*virB*<sub>2</sub>::*lacZ*). The highest enzyme activity of ~3300 Miller unit was achieved in a2b3 treatment.

جدول ۲- تاثیر قندهای مختلف و استوسیرینگون بر فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در سویه A348 (MX311)  
 Table 2. The effects of different sugars and acetosyringone on activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme in A348 (MX311) variant

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean squares	مقدار F F-value
قند Sugar (S)	2	2506668.132	1253334.066	21.18**
استوسیرینگون Acetosyringone (A)	3	9934591.153	3311530.384	55.95**
قند $\times$ استوسیرینگون S $\times$ A	6	2776199.319	462699.887	7.82**
خطای آزمایش Error	24	1420469.63	59186.23	-

\*\* : Significant at 1% probability level.

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.



شکل ۲- اثر متقابل منابع کربن و استوسیرینگون بر میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در سویه *Agrobacterium* A348 (MX311). اثر متقابل قندهای گلوکز ( $a_1$ )، مانوز ( $a_2$ ) و داکسی مانوز ( $a_3$ ) هر کدام در غلظت نهایی ۱۰ mM در ترکیب با سطح صفر ( $b_1$ )، ۱۰ ( $b_2$ )، ۵۰ ( $b_3$ ) و ۱۰۰ ( $b_4$ ) میکرومولار استوسیرینگون بر میزان فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز. در این سویه ژن کد کننده آنزیم فاقد پروموتور است و تحت کنترل پروموتور ژن *virD2* (*virD2::lacZ*) قرار دارد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به تیمار  $a_2b_4$  به میزان حدود ۳۶۵۳ واحد میلر بوده است.

Figure 2. The interaction effects of carbon sources and acetosyringone on activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme in A348 (MX243) variant of *Agrobacterium*. Three types of sugar including glucose ( $a_1$ ), mannose ( $a_2$ ) and deoxymannose ( $a_3$ ) in 10mM final concentration in combination with the level of 0 ( $b_1$ ), 10 ( $b_2$ ), 50 ( $b_3$ ) and 100 ( $b_4$ )  $\mu$ M acetosyringone on  $\beta$ -galactosidase enzyme activity. The gene coding for the enzyme is promoterless and under control of *virD2* gene promoter (*virD2::lacZ*). The highest enzyme activity of 3650 Miller unit was achieved in  $a_2b_3$  treatment.

ترانسپوزازی ندارد (شکل ۳). این ساختار برای تعیین مکان رونوشت‌برداری ژن‌ها و آنالیز عوامل موثر بر بیان ژن‌ها در *A. tumefaciens* کاربرد دارد. با استفاده از این سیستم موتاسیون‌های تداخلی مختلفی تولید و تست شد از جمله موتانت‌های فعلی و مورد استفاده در این آزمایش که *Tn3-HoHo1* در منطقه ژن‌های *vir* پلاسمید Ti -

استیکل و همکاران (Stachel, et al., 1985) یک کاست ژن گزارشگر *lacZ* بر پایه *Tn3* به نام *Tn3-HoHo1* را ساختند. این ترانسپوزون شامل یک ژن  $\beta$ -لاکتامایز (مقاومت به آمپیسیلین یا کربنسیلین) و یک ژن *lacZ* فاقد پروموتور است که درست در توالی‌های تکراری مرز *Tn3* قرار دارد. ترانسپوزاز آن غیرفعال و قابلیت خود

*virD2* است که در مجاور آن قرار دارد. به عبارت دیگر، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به‌طور غیرمستقیم فعالیت پروموتور ژن ترانسپوزاز شده را نشان می‌دهد. در این آزمایش عوامل القاگر مختلفی به‌منظور تنظیم مثبت پروموتورها و در نتیجه افزایش رونوشت‌برداری ژن‌های بیماری‌زای *vir* استفاده شد که تغییر فعالیت پروموتورها با تغییر فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز همراه بود.

مربوط به ناقل‌های دوگانه pCM110- ترانسپوزاز شده است. سویه‌های *Agrobacterium* استفاده‌شده در این تحقیق شامل A348 (MX243) و A348 (MX311) (Narasimhulu *et al.*, 1996) است که کاست Tn3- HoHo1 به ترتیب در اپرون‌های *virB2* و *virD2* ترانسپوزاز شده است. از آنجا که ژن *lacZ* این کاست فاقد پروموتور است، از این‌رو تولید  $\beta$ -گالاکتوزیداز در سویه‌های مورد نظر به‌ترتیب تحت کنترل پروموتورهای *virB2* و



شکل ۳- ساختار Tn3-HoHo1 واردشده در داخل ژن‌های *virD2* و *virB2*. ساختار ژنتیکی Tn3-HoHo1 شامل مناطق کد کننده که نام هر ژن در زیر فلش‌ها و جهت رونوشت‌برداری با فلش نشان داده شده است. *tnpR* و *bla* تیپ وحشی هستند درحالی‌که *tnpA* به سبب داخل شدن توالی *lac* در انتهای 3' آن غیرفعال است. اپران توالی *lac* کامل و دست‌نخورده اما فاقد یک پروموتور فعال است و رونوشت‌برداری می‌تواند از هر ATG در بالادست ساختار ژن *lacZ* و در این آزمون از پروموتور ژن‌های *virB2* یا *virD2* (P) آغاز شود. علامت‌ها: IRL تکرارهای معکوس چپ؛ IRR تکرارهای معکوس راست که هر دو در مربع مشکی نشان داده شده است؛ *lacYZA* اپرون *lac* از *E. coli*؛ *tnpA* ترانسپوزاز؛ *tnpR* ریسولواز؛ *bla*  $\beta$ -لاکتاماز.

Figure 3. Structure and organization of Tn3-HoHo1. The coding region within the element and the transcriptional orientation of each gene are indicated by an arrow. *tnpR* and *bla* are wild-type, while *tnpA* is non-functional owing to the *lac* sequences inserted into its 3' end. The *lac* operon sequences are intact but lack a functional promoter. Translation can potentially initiate at *virB2* / *virD2* that occurs upstream of the *lacZ* structural gene. Symbols: IRL, left-inverted repeat; IRR, right-inverted repeat; *lacZYA*, *E. coli lac* operon; *tnpA*, transposase; *tnpR*, resolvase; *bla*,  $\beta$ -lactamase.

قند-ChvE با دومین پری پلاسمی پروتئین VirA کنش متقابل دارد تا القاء ژن‌های *vir* را سیگنال‌دهی کند (Cangelosi *et al.*, 1990).

مثال‌های متعددی از ریسپتورهای-جفت شونده پروتئین G (GPCR) وجود دارد که به قندهای معمول در غلظت‌های میلی‌مولار پاسخ می‌دهند. در *Saccharomyces cerevisiae* فعال شدن سریع مسیر cAMP با گلوکز و ساکارز نیازمند GPCR Gpr1 است. مطالعات نشان داده است که گلوکز و ساکارز مستقیماً به‌عنوان لیگاند با Gpr1 کنش متقابل دارند. تمایل به ساکارز در مقایسه با گلوکز در این سیستم بسیار قوی‌تر است (Lemaire *et al.*, 2004). قدرت نسبی منوساکاریدهای مختلف در القاء ژن‌های *vir* معادل تمایل اتصال هر قند به پروتئین متصل شونده به گالاکتوز-گلوکز (GBP1) *Agrobacterium radiobacter* (Cornish *et al.*, 1989). این پروتئین معادل پروتئین ChvE در *A. tumefaciens* است. منوساکاریدهای متیله

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، در شرایط عدم استفاده از استوسیرینگون تاثیر القاگری تیمارهای قندی بر پروموتور ژن‌های *vir* به‌صورت زیر بود: گلوکز < مانوز < داکسی مانوز (جدول ۳)، که مطابق نتایج ارائه‌شده توسط گلین (Gelvin, 2006) است. در شرایط حضور استوسیرینگون به‌عنوان یک ترکیب القاکننده ژن‌های بیماری‌زا، فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز افزایش یافت. به‌طورکلی در محدوده استفاده‌شده در این آزمایش، با افزایش غلظت استوسیرینگون بیان پروموتور ژن‌های *virB2* و *virD2* و فعالیت آنزیم اغلب روند صعودی داشت.

قندها برای القاء ژن‌های *vir* در *Agrobacterium* الزامی نیستند اما، زمانی که سطح سیگنال‌های فنولی ضروری پایین باشد حضور قندها بیان ژن‌های *vir* را به‌شدت افزایش می‌دهد. دریافت سیگنال قند به کنش متقابل مستقیم بین ChvE - یک پروتئین پری پلاسمی متصل شونده به گلوکز و گالاکتوز- و VirA بستگی دارد (Wise, et al, 2005). با اتصال لیگاند قند، کمپلکس

مربوط در *Agrobacterium* برای این منوساکارید در مقایسه با گلوکز یا داکسی مانوز بوده است. رونوشت‌برداری ژن‌های *virB2* و *virD2* با استفاده از روش Real Time PCR در سویه LBA4404 مورد مطالعه قرار گرفت. رونوشت‌برداری ژن‌های *virB2* و *virD2* در غلظت ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب به‌میزان ۳ و ۶ برابر بیشتر از رونوشت‌برداری این ژن‌ها در شاهد و تیمار صفر بود. همچنین میزان رونوشت‌برداری این ژن‌ها به‌تنهایی در شرایط استفاده از گلوکز ۱/۵ درصد به‌میزان ۴ برابر بالاتر از مقدار آن در نمونه‌های شاهد بوده است. هر دو آزمایش با نتایج فعالیت پروموتور (و فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز) انجام‌شده در این آزمایش مطابقت دارد.

شده قادر به اتصال به GBP1 نبوده و در القاء ژن‌های *vir* نیز ناتوان بودند. مشخص شد که خصوصیت ساختمانی موردنیاز GBP1 برای اتصال منوساکاریدها با توانایی این منوساکاریدها در القاء ژن‌های *vir* مرتبط بوده است. پروتئین ChvE با پروتئین GBP از *E. coli* دارای همولوژی بالایی است. اگرچه ChvE و GBP از *E. coli* تمایل بالا به گلوکز و گالاکتوز دارند اما، طیف منوساکاریدهایی که به این پروتئین‌ها متصل می‌شود تفاوت زیادی دارند. برای مثال GBP از *E. coli* ناتوان در اتصال به مانوز و زایلوز است درحالی‌که این منوساکاریدها کنش قوی با ChvE دارند (Huang et al., 1990). در مطالعه حاضر نیز احتمالاً افزایش فعالیت پروموتور دو ژن *vir* در حضور مانوز مربوط به تمایل بالاتر رسپتورهای

جدول ۳- متوسط فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز در *A. tumefaciens* برهمکنش سه قند مختلف و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون بر

متوسط فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز (واحد میلر) در دو سویه MX311 (A348) و A348 (MX243)

Table 3. Average activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme in *A. tumefaciens*. The interaction effect of three types of sugars in combination with different concentrations of acetosyringone on average activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme in two strains of MX311 (A348) and A348 (MX243)

نوع قند Sugar type	غلظت استوسیرینگون (میکرومولار) Acetosyringone concentration ( $\mu$ M)		
	0	50	100
مانوز Mannose	1804	2982	2722
گلوکز Glucose	2143	2629	2745
داکسی مانوز Deoxymannose	1340	2296	2724

میلر) بیشتر از تیمار گلوکز باشد که به‌طور معمول در محیط‌های کشت القاء *Agrobacterium* و در دستورالعمل استاندارد کشت گل‌بین استفاده می‌شود. بنابراین، می‌توان تیمار قندی مانوز را به‌منظور بهبود القا و بیان ژن‌های بیماری‌زای *virB2* و *virD2* جایگزین گلوکز کرد.

#### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پشتیبانی مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور در اجرای طرح پژوهشی نویسنده مسئول این مقاله تشکر و قدردانی می‌شود.

#### نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز و در ساختارهای *virB2::lacZ* و *virD2::lacZ* که به‌ترتیب ارتباط مستقیم با القای پروموتور ژن‌های *virB2* و *virD2* را دارد، پیشنهاد می‌شود برای القای ژن‌های بیماری‌زایی *A. tumefaciens* پس از مرحله تکثیر رویشی تا زمان هم‌کشتی (باکتری با نمونه‌های گیاهی)، از تیمار قندی مانوز به‌عنوان منبع کربن در ترکیب با غلظت ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون در محیط کشت استفاده شود. این تیمار سبب شد تا فعالیت آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز به‌میزان ۲۹۸۲/۱۸ (واحد



## References

- Allahi, S., Khodaparast, A. and Sohani, M. M. 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of Indica rice: A non-tissue culture approach. **International Journal of Agriculture Innovations and Research** 3 (2): 2319-1473.
- Baker, C. J., Mock, N. M., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Rice, C. P., Deahl, K. L. and Sver'yanov, A. A. 2005. Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 328: 130-136.
- Beattie, G. A. and Lindow, S. E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology** 33: 145-172.
- Bulgakov, V. P., Kiselev, K. V., Yakovlev, K. V., Zhuravlev, Y. N., Gontcharov, A. A. and Odintsova, N. A. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos. **Biotechnology Journal** 1: 454-461.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G. and Nester, E. W. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 87: 6708-6712.
- Christie, P. J. and Vogel, J. P. 2000. Bacterial type IV secretion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends in Microbiology** 8: 354-360.
- Cornish, A., Greenwood, J. A. and Jones C. W. 1989. Binding protein-dependent sugar transport by *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens* grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology** 135: 3001-3013.
- De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology** 16: 839-842.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell** 7: 1085-1097.
- Douglas, C. J., Halperin, W. and Nester, E. W. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plants cells. **Bacteriology Journal** 152: 1265-1269.
- Douglas, C. J. 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends in Plant Science** 1: 171-178.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Review** 67: 16-37.
- Gelvin, S. B. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction in *Agrobacterium* protocols. **Methods in Molecular Biology** 343: 77-84.
- Gelvin, S. B. 2012. Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. **Front Plant Science** 3: 52.
- Gheysen, G., Angenon, G. and Van Montagu, M. 1998. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: A scientifically intriguing story with significant applications. In: Lindsey K. (Ed.). Transgenic plant research. 2<sup>nd</sup> ed. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp: 1-33.
- Hamilton, C. M., Frary, C., Lewis, C. and Tanksley, S. D. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 93 (18): 9975 -9979.
- Harighi, B. 2009. Genetic evidence for CheB-and CheR-dependent chemotaxis system in *A. tumefaciens* toward acetosyringone. **Microbiological Research** 164 (6): 634-641.
- Ishida, Y., Hiei, Y. and Komari, T. 2007. *Agrobacterium* mediated transformation of maize. **Nature Protocol** 2 (7): 1614-1621.
- Joubert, P., Sangwan, R. S., Aouad, M. E., Beaupere, D. and Sangwan-Norreel, B. S. 1995. Influence of phenolic compounds on *Agrobacterium* vir gene induction and onion gene transfer. **Phytochemistry** 40: 1623-1628.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 98: 1871-1876.
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M., 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor *Gpr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell** 16 (2): 293-299.

- McCullen, C. A. and Binns, A. N. 2006.** *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology** 22: 101-127.
- Miller, J. 1972.** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 352-355.
- Narasimhulu, S. B., Deng, X., Sarria, R. and Gelvin, S. B. 1996.** Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. **The Plant Cell** 8: 873-886.
- Opabode, J. T. 2006.** *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Emerging factors that influence efficiency. **Biotechnology and Molecular Biology Review** 1: 12-20.
- Pitzschke, A. and Hirt, H. 2010.** New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumor formation in plants by plant transformation. **European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal** 29: 1021-1032.
- Sohani, M. M., Rezadoost, M. H., Zamani, A. H., Mirzaii, M. R. and Afsharifar, A. R. 2015.** High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) using gene encoding Citrus Tristeza virus coat protein. **Journal of Applied Horticulture** 17: 109-114.
- Stachel, S. E., Timmerman, B. and Zambryski, P. 1987.** Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: Requirement for 5' virD gene products. **European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal** 6 (4): 857-863.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. C. 1985.** Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Journal** 318: 624-629.
- Stachel, S. E. and Zambryski, P. C. 1986.** virA and virG control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. **Cell Journal** 46: 325-333.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. 2006.** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: Biology and Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 17: 147-154.
- Vernade, D., Estrella, A. H., Wang, K. and Van Montagu, M. 1998.** Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by Acetosyringone at low pH. **Journal of Bacteriology** 170: 5822-5829.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C. Y., Chang, C. H. and Han, D. C. 1994.** Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbiological Research** 145: 461-473.
- Wise, A. A., Voinov, L. and Binns, A. N. 2005.** Intersubunit complementation of sugar signal transduction in VirA heterodimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology** 187: 213-223.
- Ziemiencowicz, A. 2001.** Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. **Acta Biochemica Polonica** 48: 623-635.



University of Guilan  
Faculty of Agricultural  
Sciences

**Cereal Research**  
Vol. 7, No. 3, Autumn 2017 (369-379)

## **The use of carbon and phenol sources in the medium for optimal induction of virulence genes promoter in *Agrobacterium tumefaciens***

**Mohammad Sadegh Taghizadeh<sup>1</sup>, Mohammad Mehdi Sohani<sup>2\*</sup> and Reza Shirzadian Khorramabad<sup>3</sup>**

Received: July 5, 2016

Accepted: April 4, 2017

### **Abstract**

The virulence genes (*vir*) of *Agrobacterium tumefaciens* induces by many factors such as specific plant phenolic metabolites and sugars. A number of these factors act synergistically with acetosyringone and causing high expression levels of *vir* genes. In present research, the induction of *virB2* and *virD2* gene promoters, were investigated in A348 (MX311) and A348 (MX243) *Agrobacterium* variants, respectively. The promoter sequences from these *vir* genes have been fused with a promoterless *lacZ* gene in a cassettes carrying Tn3. A three-day culture of *Agrobacterium* was performed, which was included a vegetative growth followed by an induction step. Sugar treatment of glucose, mannose and deoxymannose were used in combination with different concentrations of acetosyringone in the two biological and three technical replications. According to the results, the highest activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme attained when the mannose of sugar was used in combination with 50  $\mu$ M acetosyringone for bacterial strain carrying *virB2::lacZ* construct. The mannose of sugar treatment in combination with 100  $\mu$ M acetosyringone treatment, for bacterial strain carrying *virD2:: lacZ*, induced the highest enzyme activity. The monosaccharides in order of descending *vir::lacZ* activity in the absence of acetosyringone: glucose > mannose > deoxymannose. According to our observations, we suggested that the mannose of sugar treatment with 100  $\mu$ M acetosyringone could be utilized for obtaining strong induction of *Agrobacterium vir* genes in an induction medium.

**Keywords:** Acetosyringone,  $\beta$ -galactosidase, Deoxymannose, Enzyme assay, Glucose, Mannose

---

1. Graduated M. Sc., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Assist. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

\* Corresponding author: [msohani@guilan.ac.ir](mailto:msohani@guilan.ac.ir)