



به زراعی کشاورزی

دوره ۲۴ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۱

صفحه‌های ۹۹۵-۱۰۰۵

DOI: 10.22059/jci.2022.327046.2580

مقاله پژوهشی:

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه‌بریده ("Pearl" و "Angelina") به وسیله یک نانو زیست حسگر

اکرم وطن‌خواه^۱، سعید ریزی^{۳*}، زهرا ایزدی^۲، عبدالرحمان معتمدی^۴، مهدی قاسمی ورنامخواستی^۵

۱. دانشجوی دکتری، بخش علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. استادیار، بخش علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. استادیار، بخش مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴. استادیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۵. دانشیار، بخش مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۸/۲۲

چکیده

در این پژوهش ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز (*Rosa hybrida* L. ("Pearl" و "Angelina")) با کمک روش‌های الکتروشیمیایی شناسایی شد. در این پژوهش تثبیت و هیبریداسیون توالی تک‌رشته (ssDNA) مربوط به ژن *tms2* *Agrobacterium tumefaciens* با روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شد. الکتروگرافیتی مغز مداد با نانو موادی شامل گرافن اکساید احیاشده و نانوذرات طلا اصلاح شد. زیست‌حسگر توانست برای تشخیص نمونه‌های آلوده رز "Angelina" و "Pearl" به کار رود. هیبریداسیون DNA/DNA با قرار دادن الکتروده اصلاح‌شده با ssDNA در غلظت دو میکرومولار DNA هدف انجام شد. نتایج تثبیت و هیبریداسیون مناسب DNA را در سطح الکتروده نشان داد. زیست‌حسگر طراحی شده گزینش‌پذیری خوبی دارد. نانوزیست‌حسگر مبتنی بر DNA، دارای مزایایی از جمله هزینه کم، سادگی و قابلیت کوچک‌سازی می‌باشد و می‌تواند زمینه‌ای برای توسعه ابزار تشخیص ژنومی را فراهم آورد.

کلیدواژه‌ها: پاتوزن‌های گیاهی، حسگرهای زیستی، روش‌های الکتروشیمیایی، گال طوقه، *Rosa hybrida* L.

Detection of *tms2* Gene Causing Crown Gall in Two Commercially Cut Flower Roses ("Pearl" And "Angelina") by a Nano Biosensor

Akram Vatankhah¹, Saeed Reezi^{2*}, Zahra Izadi³, Abdolrahman Motamedi⁴, Mahdi Ghasemi-Varnamkhasti⁵

1. Ph.D. Student, Department of Science and Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Science and Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

5. Associate Professor, Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: July 13, 2021

Accepted: November 13, 2021

Abstract

In this study, the *tms2* gene, the cause of crown gall, is detected in two *Rosa hybrida* L. ("Pearl" and "Angelina") cultivars using electrochemical methods. In this study, stabilization, and hybridization of single-strand DNA (ssDNA) related to *tms2* gene, *Agrobacterium tumefaciens* is investigated by electrochemical impedance spectroscopy. For this purpose, the pencil graphite electrode is modified with nanomaterials including reduced graphene oxide and gold nanoparticles. The biosensor could be used to detect infected samples of "Angelina" and "Pearl" roses. DNA/DNA hybridization is performed by placing an electrode modified with ssDNA at a concentration of two ($\mu\text{mol/L}$) target DNA. Results show proper stabilization and hybridization of DNA at the electrode surface. The designed biosensor has good selectivity. DNA-based nanosensor has advantages such as low cost, simplicity, and scalability and can be the basis for the development of genomic detection tools.

Keywords: Biosensors, crown gall, electrochemical methods, Plant pathogens, *Rosa hybrida* L.

۱. مقدمه

موجب تقسیم بی‌رویه سلولی و تشکیل تومور بر روی گیاه می‌شود (Atson, 2019; Mafakheri et al., 2019).

تشخیص به موقع پاتوژن‌های گیاهی، مدیریت عامل بیماری‌زا را در سیستم‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای طی مراحل مختلف رشد بیماری گیاه تسهیل می‌کند. متداول‌ترین روش تشخیص پاتوژن کشت پلیت است که برای جداسازی، کشت و تعیین پاتوژن براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و واکنش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مدت زمان طولانی لازم است. PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) زمان تشخیص پاتوژن را بسیار کوتاه می‌کند، اما بستگی زیادی به ابزار کنترل دما دارد. روش‌های نوین برای تشخیص اسید نوکلئیک به‌طور عمده به حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی، زیست‌حسگرهای نوری و حسگرهای صفحه پیزوالکتریک طبقه‌بندی می‌شوند. به‌تازگی زیست‌حسگرهای مبتنی بر DNA برای تشخیص عوامل بیماری‌زای گیاهی باکتریایی گزارش شده است (Khater et al., 2017).

در پژوهشی (Mohd Said et al., 2018)، با استفاده از یک زیست‌حسگر مبتنی بر DNA توانستند سرخشکیدگی خریزه درختی ناشی از *Erwinia mallotivora* را تشخیص دهند. یک نمونه از هیبریداسیون DNA به‌وسیله Zhao et al. (2011) برای تشخیص بیماری باکتریایی در خریزه *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* (AAC) گزارش شده است. یک نمونه دیگر از کاربرد هیبریداسیون DNA با استفاده از پروب AuNPs-DNA به‌وسیله (Wei et al., 2014) برای تشخیص اولیه ویروس *Banana bunchy top virus* (BBTV) در موز گزارش شده است. در پژوهشی (Choie et al., 2019)، یک زیست‌حسگر مبتنی بر متابولیسم اپین (opine) آگروباکتریوم، توانست آگروباکتریوم ایجادکننده گال ریشه را از نماتد مولد گال ریشه تشخیص دهد. در این زیست‌حسگر، نوپالین تولیدشده به‌وسیله گال‌های ریشه گیاه به NocR متصل

تولید گال شاخه‌بریده رز مهم‌ترین جنبه کشت صنعتی رز در جهان است (Castilon, 2006). تولید گال شاخه‌بریده رز *Rosa hybrida L.* به‌طور عمده در گلخانه‌ها صورت می‌گیرد که نسبت به سایر محصولات گلخانه‌ای نیاز به تخصص و مراقبت بیش‌تری دارد (Atson, 2019). بیماری گال طوقه ناشی از *Agrobacterium tumefaciens* توسط برخی از گونه‌های بیماری‌زای جنس آگروباکتریوم ایجاد می‌شود و طیف وسیعی از محصولات را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به ایجاد گال روی ساقه و یا ریشه‌های گیاهان می‌شود (Chandrasekaran et al., 2019). زیان اقتصادی حاصل از این بیماری اصولاً در گلخانه‌های رز بیش‌تر است که باعث غیرقابل فروش شدن گل‌های گیاهان آلوده می‌شود. به‌طور کلی رزهای آلوده به گال علائم کاهش رشد یا توقف رشد، کلروز برگ و کاهش عملکرد را نشان می‌دهند (Agrios, 2005; Azadi et al., 2013).

باکتری *A. tumefaciens* از طریق انتقال بخشی از پلاسمید Ti (Tumor inducing plasmid) به درون سلول گیاهی و ادغام آن در ژنوم گیاه موجب ایجاد تومور می‌شود. لازمه ایجاد گال طوقه، ترکیبات فنلی آزادشده از زخم‌های سلول گیاهی است که بیان ژن‌های منطقه بیماری‌زای (ناحیه *vir*) باکتری را القا می‌کنند و پروتئین‌های حاصل از بیان این ژن‌ها نقاط مرزی در دو انتهای T-DNA را تشخیص داده و آن را جدا می‌کنند. در هنگام القای تومور، آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی متصل شده و بخشی از DNA خود را به سلول‌های فوق منتقل می‌کند. DNA قطع‌شده به‌صورت کمپلکس پروتئین-T-DNA به سلول گیاه منتقل می‌شود و در ژنوم گیاه ادغام می‌شود. بیان ژن‌های T-DNA موجب سنتز پروتئین‌های لازم برای تولید فیتوهورمون‌هایی مانند اکسین و سایتوکینین می‌شود و تولید این فیتوهورمون‌ها،

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه بریده ("Pearl" و "Angelina") به وسیله یک نانو زیست حسگر

گال‌های ضد عفونی شده در هاون‌های سترون همراه آب مقطر کاملاً له شده و به مدت یک شب در دمای اتاق قرار داده شد. به وسیله لوپ استریل چند قطره از عصاره حاصل روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا ظهور کلونی‌های باکتریایی در انکوباتور قرار داده شد. پس از رشد باکتری‌ها، به منظور خالص‌سازی تک‌کلونی‌های شبیه به *Agrobacterium* از روی محیط NA انتخاب و هر کلونی به صورت جداگانه روی محیط کشت NA کشت شد. از تک‌کلونی‌های رشد کرده سوسپانسیون باکتری تهیه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمون بیماری‌زایی روی دیسک‌های هویج و گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد (Mafakheri et al., 2019; Schaad, 2001; Chandrasekaran et al., 2019).

حجم ترکیب PCR به میزان ۳۰ میکرولیتر برای هر نمونه تهیه شد. ترکیب هر واکنش شامل ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱/۸ میکرولیتر هر کدوم از آغازگرهای پیشرو و برگشتی، DNA نمونه ۴ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۷/۴ میکرولیتر استفاده شد. پس از پایان یافتن واکنش PCR جهت مشاهده اندازه باند تکثیر در مقایسه با نشانگر استاندارد، دو میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد رنگ‌آمیزی شده با ترکیب (TMDNA Green Viewer) ران و سپس زیر نور UV مورد آزمون قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه واسرشت‌سازی اولیه به مدت شش دقیقه در در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۸ چرخه شامل واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه بسته به نوع آغازگرهای هر ژن در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ژن *tms2* بسط اولیه به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در آخر بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت.

شده و منجر به تشکیل کمپلکس نوپالین NocR می‌شود که به پروموتور ژن نوپالین اکسیداز متصل و رونویسی *noxB-lacZY* را فعال می‌کند. در نتیجه رنگدانه‌های آبی بر روی محیط کشت ABM همراه X-gal (ABMX-) مشاهده می‌شوند. هدف از انجام این پژوهش تشخیص ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه بریده ("Pearl" و "Angelina") به وسیله یک زیست حسگر و راستی آزمایشی حسگر، با روش مولکولی PCR است.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه، پروب طراحی شده و سایر الیگونوکلئوتیدها (توالی ۲۲ mer DNA با اصلاحات HS-6 (CH2) در انتهای ۵) از شرکت Bioneer کره جنوبی خریداری شدند. الیگونوکلئوتیدهای دیگر، شامل توالی ۲۲ mer رشته مکمل و توالی ۲۲ mer با یک باز ناجور می‌باشند (جدول ۱).

جدول ۱. الیگو نوکلئوتیدهای طراحی شده شامل توالی پروب، توالی مکمل و توالی ناجور با یک باز متفاوت

نوع	توالی 5'-SH-(CH2)6-
الیگونوکلئوتید	5'-SH-CCACATCAGCATCAAGGTCATC3'
Probe	5'-GATGACCTTGATGCTGATGTGG3'
Complementary	5'-GATGACCTTAATGCTGATGTGG3'
Missmatch	

۲.۱. آماده سازی و کشت رزهای آلوده و تشخیص ژن *tms2* با colony PCR

پس از جمع‌آوری رزهای گال‌دار از نواحی مختلف، به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد منتقل شده و گال‌ها جوان از گیاهان مبتلا جدا شد و شست‌وشو داده شد و گال‌ها به مدت سه دقیقه در وایتکس (NaOCl) استریل و سپس توسط آب مقطر سترون شست‌وشو شد. سپس

جدول ۲. آغازگرهای پیشرو و برگشتی طراحی شده مربوط به

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
توالی 3' → 5'	
نوع الیگونوکلوئوتید	
Primer F	ACATCAGCATCAAGGTCATC
Primer R	TGCATGAGTTATCGTTTGGG

۲.۲. تشخیص ژن *tms2* با استفاده از طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

تست‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه الکتروشیمی پتانسیواستات/گالوانوستات، (شرکت ایویوم مدل VERTEX 1، ساخت هلند) که از یک سو به یک سیستم سه الکترودی و از سوی دیگر به لپ‌تاپ متصل است انجام شد. سیستم سه الکترودی شامل الکترود گرافیتی مغز مداد شرکت پنتل با قطر ۰/۷ میلی‌متر به‌عنوان الکترود کار، الکترود پلاتین به‌عنوان الکترود کمکی، الکترود نقره/نقره کلرید (در محلول سه مولار پتاسیم کلرید) به‌عنوان الکترود مرجع، در سل الکتروشیمیایی حاوی پروب آهن پنج میلی‌مولار $[KCl + k3Fe(CN)_6]$ به‌عنوان الکترولیت قرار داده شدند. ولتاژتری چرخه‌ای در محدوده پتانسیل ۰/۳- تا ۰/۷+ ولت با سرعت رویش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه و اندازه‌گیری‌های امپدانس در محدوده فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز تا ۱۰ میلی‌هرتز و در پتانسیل ۱۵۰ میلی‌ولت صورت گرفت (Razdari et al., 2019).

در این پژوهش اصلاح سطح الکترود گرافیتی با استفاده از گرافن اکساید احیا شده و نانوذرات طلا صورت گرفت. برای تثبیت گرافن بر سطح الکترود مغز مداد، الکترود فعال‌شده به مدت ۹۰ دقیقه در محلول گرافن احیا قرار داده شد. پس از آن الکترود اصلاح‌شده با گرافن احیا را در محلول بافر فسفات قرار داده و تغییرات میزان جریان در محدوده ۰/۳- و ۰/۷+ ولت و سرعت رویش ۵۰ میلی‌ولت اندازه‌گیری شد. به‌منظور تثبیت نانوذرات طلا بر سطح الکترود، الکترود اصلاح‌شده با گرافن اکساید احیا، در محلول ۳ میلی‌مولار $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ قرار

گرفت و CV در محدوده پتانسیل ۰/۳- و ۰/۷+ ولت با سرعت رویش ۵۰ میلی‌ولت در ثانیه اندازه‌گیری شد. در نهایت الکترود اصلاح‌شده با گرافن احیا و نانوذرات طلا در محلول KNO_3 ، ۰/۱ مولار در محدوده پتانسیل ۰/۵- تا ۱/۵ ولت به مدت ۱۰ سیکل قرار گرفت و دوباره CV اندازه‌گیری شد. در نهایت، الکترود در محلول ۱۲/۵ میکرومولار ssDNA به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور (مدل: EC 160، ساخت: ایران) قرار گرفت. برای ارزیابی کارایی هیبریداسیون زیست‌حسگر، مقاومت انتقال بار قبل از واکنش با توالی هدف و پس از برهم‌کنش با توالی مکمل با روش امپدانس الکتروشیمیایی در پنج میلی‌لیتر محلول پروب آهن $[KCl + k3Fe(CN)_6]$ اندازه‌گیری شد. برای بازیابی زیست‌حسگر پس از هیبریداسیون با DNA هدف، آن را به مدت چهار دقیقه در محلول NaOH ۰/۱ مولار قرار داده و سپس با آب دیونیزه شست‌وشو داده شد (Razdari et al., 2016; Izadi et al., 2019).

۲.۳. استخراج پلازمید از باکتری‌های تخلیص شده

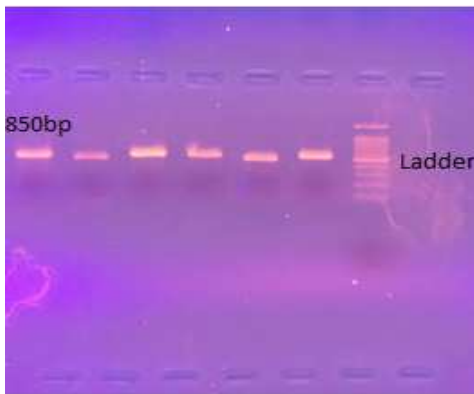
برای استخراج پلازمید باکتری از کیت PrimePrep™ شرکت GeNet Bio کشور کره جنوبی مطابق با دستورالعمل زیر استفاده شد. یک تک‌کلونی رشد کرده از باکتری اگروباکتريوم در محیط کشت نوترینت آگار در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB [(محیط کشت لوریا-جرتانی یک محیط کشت عمومی برای انجام فرایندهای مهندسی ژنتیک است و شامل سدیم کلرید (۵ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۵ گرم بر لیتر) و تریپتون (۱۰ گرم بر لیتر) است] تلقیح شد و به مدت یک شبانه روز درون انکوباتور شیکردار تحت دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری به مدت سه دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (مدل: Centurion K2015،

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه بریده ("Pearl" و "Angelina") به وسیله یک نانو زیست حسگر

۳. نتایج و بحث

۳.۱. colony PCR

کارایی زیست حسگر طراحی شده جهت شناسایی باکتری *A. tumefaciens* در دو رقم گل رز ("Pearl" و "Angelina") اعتبار سنجی شد. به منظور تشخیص باکتری از روش PCR استفاده شد. جهت تشخیص از DNA ژنومی استخراج شده باکتری به عنوان نمونه استفاده شد. باکتری بعد از تکثیر ژن مورد نظر با پرایمرهای پیشرو و برگشتی روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی بارگذاری شد. باند مورد انتظار محصول PCR، 850bp است که در تصویر ژل آگارز مشاهده می شود (شکل ۱). نتایج نشان داد که واکنش زنجیره ای پلیمرز توانست به طور مشابه زیست حسگر طراحی شده، باکتری *A. tumefaciens* در نمونه های آلوده رز ("Pearl" و "Angelina") تشخیص دهد.



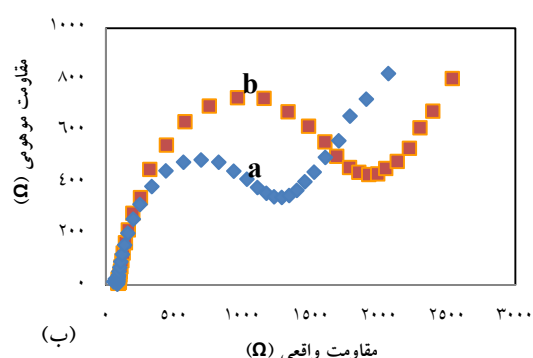
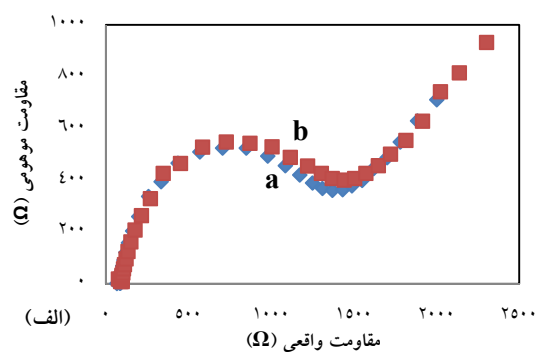
شکل ۱. محصول PCR ژن *tms2* روی ژل آگارز یک درصد

بررسی تغییرات سطح الکتروود در حین ساخت زیست حسگر با استفاده از روش ولتامتری چرخه ای صورت گرفت. شکل (۲) نتایج CV مراحل مختلف اصلاح سطح الکتروود را نشان می دهد. پس از اصلاح سطح الکتروود گرافیتی با گرافن و نانوذرات طلا و افزایش سطح، میزان جریان افزایش یافت. پس از استقرار پروب

ساخت انگلستان) شد. سلول های رسوبی برای استخراج پلازمید با استفاده از کیت استخراج پلازمید PrimePrep™ از باکتری های گرم منفی استفاده شد. سلول های باکتری های ته نشین شده در ۲۵۰ میکرو لیتر بافر PR حل شده و سانتریفیوژ شد. سپس، ۲۵۰ میکرو لیتر بافر PL اضافه شد و با وارونه سازی لوله چهار تا شش بار در دمای اتاق، برای مدت زمان کم تر از پنج دقیقه، به آرامی مخلوط شد. سپس ۳۵۰ میکرو لیتر بافر PN به محلول اضافه کرده و کاملاً مخلوط شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm در میکرو سانتریفیوژ انجام شد. با استفاده از پیپت محلول رویی به ستون های جدا کننده (Spin Column) کیت منتقل شد و برای ۳۰ تا ۶۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. ستون جدا کننده درون تیوب جمع آوری (collection tube) قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر بافر PO اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. همچنین، ۷۰۰ میکرو لیتر بافر PW اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. ستون جدا کننده به یک میکرو تیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل انتقال داده شد و ۵۰ میکرو لیتر از بافر PE به آن اضافه شد و به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاوی پلاسمید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای ارزیابی کمیت و کیفیت پلاسمید استخراج شده از ژل الکتروفورز حاوی یک درصد آگارز و نانودراپ (LSPR and Micro-volume Spectrophotometer System, Nano Mabna Iranian) استفاده شد. غلظت پلاسمید استخراج شده ۱/۴۹ میکرو گرم در میکرو لیتر بود. برای به دست آوردن ssDNA، پلاسمید استخراج شده در حمام آب در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس بلافاصله به حمام یخی در دمای پنج درجه سانتی گراد منتقل شد (Moattari et al., 2021; Izadi et al., 2016).

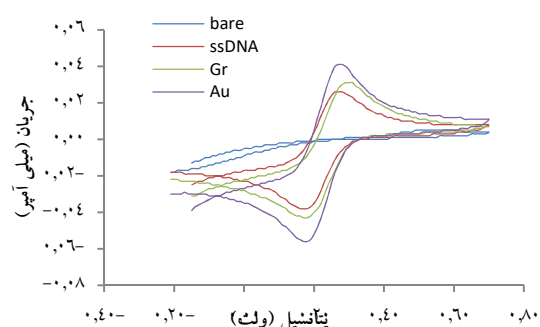
قابل توجهی نداشت. مطابق نتایج (شکل ۳-ب) DNA تک‌رشته‌ای تثبیت شده بر روی سطح الکتروود اصلاح شده با گرافن و نانوذرات طلا، نتوانست با رشته ناچور برهم‌کنش داشته باشد و پیوند پایداری تشکیل دهد.



شکل ۳. منحنی نایکوئیست تک‌رشته DNA. (الف) بعد از برهم‌کنش با ۲۲ mer DNA مکمل، (ب) بعد از برهم‌کنش با ۲۲ رشته ناچور. شرایط: محلول ۵ میلی‌مولار $[KCL + k_3Fe(CN)_6]$ و محدوده پتانسیل ۰/۱۵۰۰ و ۰/۱۰۰۰۰ V.

برای بررسی کارایی تثبیت پروب DNA روی سطح الکتروود اصلاح شده با گرافن و نانوذرات طلا، زمان تثبیت تک‌رشته DNA، غلظت تک‌رشته DNA و شرایط هیبریداسیون بررسی شد. برای تعیین غلظت بهینه الکتروودها در غلظت‌های ۱۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار تک‌رشته DNA به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نتایج مقاومت انتقال بارها

روی سطح الکتروود، میزان انتقال الکترون و جریان نسبت به اصلاح سطح با گرافن و نانوذرات طلا کاهش یافت. تکنیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی جهت ارزیابی کارایی تثبیت پروب (ssDNA) و هیبریداسیون آن با توالی مکمل در محلول پنج میلی‌مولار $[KCL + k_3Fe(CN)_6]$ استفاده شد.



شکل ۲. ولتاژمتری چرخه‌ای مراحل مختلف ساخت الکتروود در محلول پنج میلی‌مولار $[KCL + k_3Fe(CN)_6]$

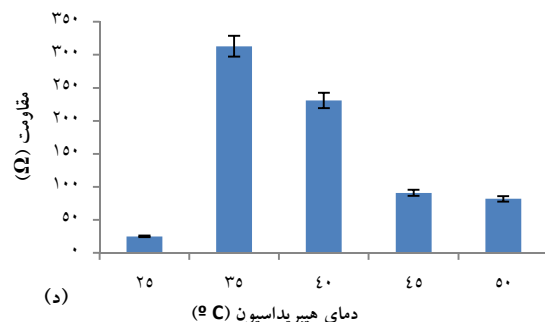
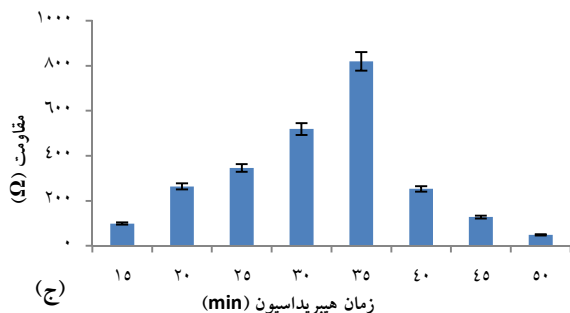
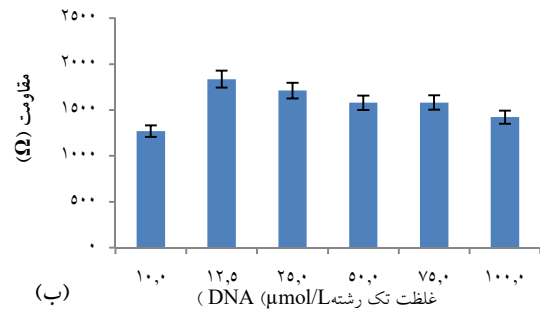
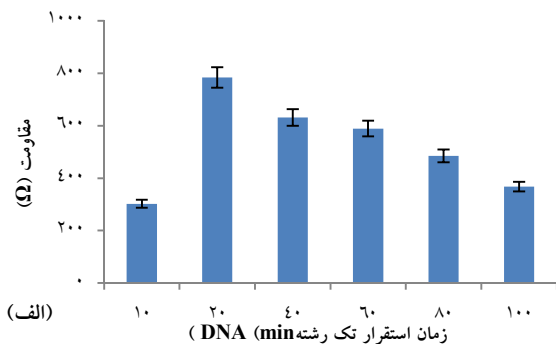
تثبیت DNA تک‌رشته‌ای در سطح الکتروود، یک لایه مقاوم در سطح الکتروود ایجاد می‌کند که مانع از انتقال الکترون شده و در نتیجه مقاومت انتقال بار را افزایش می‌دهد. در اثر هیبریداسیون ssDNA با DNA مکمل به دلیل ایجاد دافعه الکترواستاتیک بین گروه‌های فسفات DNA و فرو سیانید، مقاومت انتقال بار به میزان بیشتری افزایش یافت. برخی از پژوهش‌گران گزارش کردند که مقاومت انتقال بار با هیبریداسیون افزایش می‌یابد (Izadi *et al.*, 2016; Moattari *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2011; Kafka *et al.*, 2008). برای بررسی هیبریداسیون DNA تک‌رشته‌ای (پروب) با رشته ناچور از امپدانس استفاده شد. نتایج نشان داد که توالی ناچور (یک نوکلئوتید متفاوت با رشته مکمل) نمی‌تواند با DNA تک‌رشته‌ای تثبیت شده روی سطح الکتروود اتصال پایداری تشکیل دهد به همین دلیل مقاومت انتقال بار تغییر

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم تجاری شاخه بریده ("Angelina" و "Pearl") به وسیله یک نانو زیست حسگر

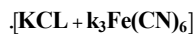
پروپ DNA بر روی سطح الکتروود است (شکل ۴-ب) و در این زمان پروپ DNA با گروه‌های تیولی نانوذرات طلا به طور کامل پیوند کووالانسی تشکیل می‌دهد.

برای بررسی زمان بهینه هیبریداسیون پروپ DNA با رشته مکمل، زیست حسگر ساخته شده (هشت الکتروود ساخته شده در شرایط بهینه، غلظت ۱۲/۵ میکرومولار تک رشته DNA (پروپ)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه) در محلول دو میکرومولار DNA هدف در زمان‌های مختلف (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ دقیقه) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. سپس نتایج مقاومت انتقال بار مطابق شکل نشان داد که ۳۵ دقیقه بیشترین میزان اختلاف مقاومت انتقال بار را نشان داد و ۳۵ دقیقه به عنوان زمان بهینه هیبریداسیون به دست آمد (شکل ۴-ج).

نشان داد که در غلظت ۱۲/۵ میکرومولار بیشترین میزان مقاومت انتقال بار مشاهده شد و غلظت بهینه ۱۲/۵ میکرومولار به دست آمد (شکل ۴-الف). در غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومولار تفاوت زیادی در مقاومت انتقال بار مشاهده نشد که به دلیل اشباع شدن جایگاه‌های فعال الکتروود، با اتصال پروپ بر روی سطح الکتروود اتفاق افتاده است. برای بررسی زمان بهینه تثبیت پروپ DNA روی سطح الکتروود، تعداد شش الکتروود اصلاح شده با گرافن و نانوذرات طلا و غلظت بهینه ۱۲/۵ میکرومولار در زمان‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور) قرار گرفت و مقاومت انتقال بار ثبت شد. همان‌طور که در شکل مشخص است پس از ۲۰ دقیقه مقاومت انتقال بار کاهش یافت. مقاومت انتقال بار نشان داد که زمان ۲۰ دقیقه مناسب‌ترین زمان برای تثبیت



شکل ۴. بهینه‌سازی تثبیت پروپ و هیبریداسیون آن. (الف) تثبیت پروپ در زمان‌های مختلف، (ب) تأثیر غلظت‌های مختلف پروپ بر تثبیت آن بر سطح الکتروود، (ج) تأثیر زمان‌های مختلف بر هیبریداسیون، (د) تأثیر دماهای مختلف بر هیبریداسیون. محلول ۵ میلی‌مولار

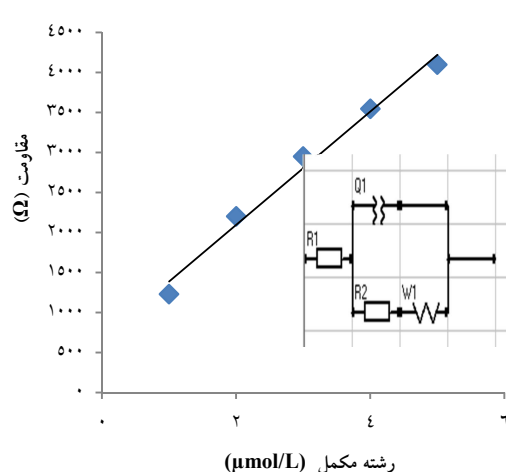
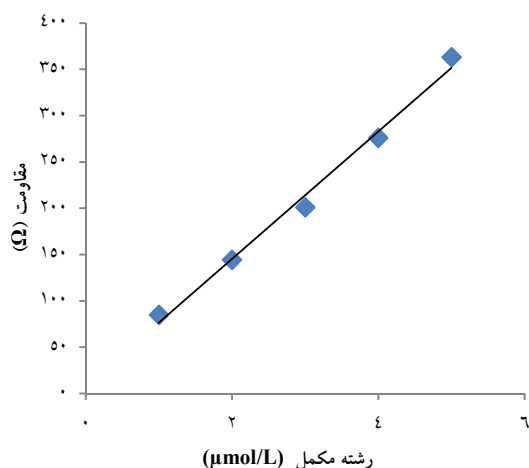


مکمل، اندازه گیری و منحنی کالیبراسیون رسم شد. منحنی کالیبراسیون زیست حسگر طراحی شده دو رنج خطی را در محدوده رقت های 10^{-4} تا 10^{-13} نشان داد در محدوده خطی 10^{-4} تا 10^{-8} از معادله $Y = 70.8/5 x + 67.9/1$ و در محدوده خطی 10^{-8} تا 10^{-13} از $(R^2 = 0.98)$ و در محدوده خطی 10^{-9} تا 10^{-13} از $(R^2 = 0.99)$ $Y = 6.8/75 x + 7/65$ تبعیت می کند. در این روابط، x غلظت DNA مکمل و y مقاومت انتقال بار است (شکل ۵). وجود دو محدوده خطی در منحنی کالیبراسیون به رفتار معمول زیست حسگر طراحی شده بر پایه امپدانس اشاره دارد. بر اساس طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی در محلول پنج میلی مولار $[KCl + K_3Fe(CN)_6]$ ، غلظت DNA هدف روی سطح الکتروود کم است، با افزایش غلظت محلول DNA هدف، سطح الکتروود اشباع می شود و مکانیسم کنترل دیفوزیون مشاهده می شود. در غلظت های پایین تر از DNA هدف، چندین مکان در سطح الکتروود برای هیبریداسیون وجود دارد، در حالی که در غلظت های بالاتر مکان های آزاد کمتری در سطح الکتروود برای هیبرید شدن DNA هدف وجود دارد (Izadi et al., 2016).

به منظور بررسی تأثیر دما بر هیبریداسیون، زیست حسگر ساخته شده (تعداد پنج الکتروود در شرایط بهینه، غلظت $12/5$ میکرومولار تک رشته DNA به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد) در محلول دو میکرومولار DNA مکمل در دماهای مختلف (25 ، 35 ، 40 ، 45 و 50 درجه سانتی گراد) به مدت ۳۵ دقیقه قرار داده شد. نتایج مقاومت انتقال بار نشان داد که با افزایش دما تا 35 درجه سانتی گراد، مقاومت انتقال بار افزایش یافت و هیبریداسیون در 35 درجه سانتی گراد حداکثر بود (شکل ۴-د). دماهای بالا به دلیل جداسازی تک رشته DNA (پروب) از سطح الکتروود، مانع از هیبریداسیون می شوند. نتایج مشابه هم قبلاً گزارش شده است (Izadi et al., 2016; Moattari et al., 2021).

۳.۲. ارقام شایستگی

با استفاده از تکنیک طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی، مقاومت انتقال بار زیست حسگر در محلول پنج میلی مولار $[KCl + K_3Fe(CN)_6]$ در حضور غلظت های مختلف DNA



شکل ۵. منحنی کالیبراسیون dsDNA در حضور غلظت های مختلف DNA مکمل. (الف) 10^{-9} ، 10^{-10} ، 10^{-11} ، 10^{-12} ، 10^{-13} (ب) 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} و 10^{-10} . شرایط هیبریداسیون: (دمای 35 درجه سانتی گراد و زمان 35 دقیقه).

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه بریده ("Pearl" و "Angelina") به وسیله یک نانو زیست حسگر

به طور قابل توجهی کاهش می یابد. بازیابی زیست حسگر طراحی شده مطابق با بخش اشاره شده در قبل اندازه گیری شده. مطالعه ما نشان داد که زیست حسگر DNA ساخته شده توانست برای چهار بار در چرخه های هیبریداسیون- و اسرشته شدن استفاده شود. تنها ۲/۸ درصد کاهش در مقاومت انتقال بار در مقایسه با آزمایش اول مشاهده شد. بنابراین، محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار می تواند معرف مناسب برای بازیابی حسگر زیستی باشد. در مطالعه ای (Izadi et al., 2016) حسگر زیستی طراحی شده توانست برای هفت بار هیبریداسیون- دناتوراسیون استفاده شود، در حالی که مقاومت انتقال بار در مقایسه با پاسخ اولیه ۴/۸ درصد کاهش یافت. مطابق با گزارش Chung et al. (2013) محیط های بسیار قلیایی بر اتصال DNA تک رشته ای و DNA هدف تأثیر می گذارد و باعث بی ثباتی آن می شود. به منظور بررسی تکرارپذیری زیست حسگر، پنج بار هیبریداسیون DNA مکمل با یک زیست حسگر بررسی شد. انحراف استاندارد نسبی محاسبه شده برای پنج تکرار اندازه گیری DNA هدف (دو میکرومولار) با یک زیست حسگر ۴/۸۳ درصد بود که تکرارپذیری قابل قبولی را نشان می دهد.

۴. نتیجه گیری

نتایج نشان داد که حسگر زیستی ساخته شده می تواند به طور مؤثری گال طوقه ناشی از آلودگی *Agrobacterium tumefaciens* را دو رقم گل رز ("Pearl" و "Angelina") تشخیص دهد. راستی آزمایی این پژوهش با PCR نشان داد که زیست حسگر پیشنهادی می تواند جهت تشخیص گال طوقه در *Rosa hybrida* L. به کار رود. زیست حسگر DNA ساده، سریع و کم هزینه است. از دیگر مزایای حسگر زیستی می توان به پایداری مطلوب و تکرارپذیری بالا اشاره کرد. امیدوارکننده است

حد تشخیص (LOD) زیست حسگر طراحی شده $M \times 10^{-13}$ براساس $3S_{\text{blank}}/m$ تخمین زده شد، در این رابطه S_{blank} انحراف استاندارد نمونه های بلنک است و m نشان دهنده شیب در دامنه غلظت 10^{-13} تا 10^{-9} است. قابلیت تکثیرپذیری زیست حسگر طراحی شده با استفاده از طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی در محلول $[k_3Fe(CN)_6 + KCL]$ بررسی شد. تکثیرپذیری زیست حسگر با اندازه گیری امپدانس پنج زیست حسگر مستقل برای تشخیص DNA مکمل (دو میکرومولار) محاسبه شد. انحراف استاندارد نسبی *relative standard deviation* (RSD) ۳/۳۸ درصد براساس S/\bar{X} محاسبه شد (S انحراف استاندارد است و \bar{X} میانگین اندازه گیری هاست)، نشان دهنده قابلیت تکثیرپذیری قابل قبول حسگر زیستی است. برای بررسی پایداری زیست- حسگر طراحی شده، حسگرهای مختلف به طور جداگانه تهیه و به مدت ۳۰ روز در چهار درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس، مقاومت انتقال بار از هر یک از آنها در فاصله زمانی هر سه روز یکبار در محلول پنج میلی مولار $[k_3Fe(CN)_6 + KCL]$ اندازه گیری شدند. در طی ۳۰ روز، مقاومت انتقال بار به تدریج کاهش یافته و پس از ۳۰ روز، فقط ۳/۶۶ درصد کاهش در مقاومت انتقال بار مشاهده شد، که نشان دهنده پایداری مطلوب زیست حسگر DNA است. براساس نتایج، دمای چهار درجه سانتی گراد شرایط خوبی برای نگهداری طولانی مدت حسگر زیستی است. این نتیجه مطابق با یافته های Izadi et al. (2016) و Moattari et al. (2021) است.

دلیل پایداری خوب حسگر زیستی طراحی شده، محافظت از DNA است که از طریق نانوذرات طلا بر روی سطح الکتروود تثبیت شده است. در گزارشی (Bhatt et al., 2011) بیان شده است که در دمای چهار درجه سانتی گراد، سرعت واکنش های آزادسازی DNA از سطح

- Weissleder, R. (2013). A magneto-DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria. *Journal of Nature Nanotechnology*, 8(5), 369-375. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.70>.
- Choi, O., Bae, J., Kang, B., Lee, Y., Kim, S., Fuqua, C., & Kim, J. (2019). Simple and economical biosensors for distinguishing *Agrobacterium* mediated plant galls from nematode-mediated root knots. *The Journal of Scientific reports*, 9, 17961. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54568-2>.
- Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A.A., & Soleimanian-Zad, S. (2016). Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 80, 582-589. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.032>.
- Kafka, J., Pänke, O., Abendroth, B., & Lisdat, F. (2008). A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Journal of Electrochimica Acta*, 53(25), 7467-7474. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.01.031>.
- Khater, M., Escosura-Muñiz, A., & Merkoçi, A. (2017). Biosensors for plant pathogen detection. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 93, 72-86. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.091>.
- Mafakheri, H., Taghavi, S. M., Puławska, J., Lajudie, P., Lassalle, F., & Osdaghi, E. (2019). Two novel genospecies in the *Agrobacterium tumefaciens* Species.complex associated with rose crown gall. *Journal of Phytopathology*, 109, 1859-1868. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0178-R>
- Mohd Said, N.A., Abu Bakar, N., & Lau, H.Y. (2018). Development of DNA biosensor for impedimetric detection of *Erwinia Malletivora* (papaya dieback) as early warning system tool in plant disease management. *National Conference on Agricultural and Food Mechanization (NCAFM)*. Conference April 2018. Mardi. Selangor.
- Moattari, Gh., Izadi, Z., & Niaei, M. SH. (2021). Development of an electrochemical genosensor for detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) using glycoprotein (G) gene probe. *Aquaculture*, 536, 736451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736451>.
- Razdari, A.M., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Izadi, Z., Rostami, S., Ensafi, A.A., Siadat, M., & Losson, E. (2019). Detection of sulfadimethoxine in meat samples using a novel electrochemical biosensor as a rapid analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103252. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103252>.
- که این روش بتواند به سادگی برای تشخیص سایر آنالیت‌ها با تغییر توالی پروب استفاده شود، که نشان‌دهنده پتانسیل بالای حسگرهای زیستی مبتنی بر DNA در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی است.
- ۵. تشکر و قدردانی**
- از دانشگاه شهرکرد برای تأمین بخشی از هزینه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.
- ۶. تعارض منافع**
- هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.
- ۷. منابع**
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*, Academic press, Elsevier academic press. New York. 922 p.
- Atson, E. (2019). *Use of Amino Oligosaccharins and Alternaria Activated Protein in Management of Crown Gall and Enhancement of Growth in Roses*. M.Sc. Thesis. Department of Plant Science and Crop Protection. College of Agriculture and Veterinary Sciences. University of Nairobi. 86p.
- Azadi, P., Beyrai zadeh, E., & Otang ntui, V. (2013). A simple protocol for somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* L. cv. Apollo. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 399-402.
- Bhatt, N.; Huang, P.J.J.; Dave, N., & Liu, J. (2011). Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents. *Journal of Langmuir*, 27(10), 6132-6137.
- Castilon, J., Jones, B., & Kamo, K. (2006). *Efficient regeneration of rose plants from somatic embryos of three genetically diverse cultivars*. Floral Nursery Plants Research Unit, US National Arboretum, Beltsville, MD, USA.
- Chandrasekaran, M., Lee, J. M., Moon, Ye. B., Jung, S. M., Kim, J., Kim, J. W., & Chul Chun, S. (2019). Isolation and characterization of a virulent and virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* from rose crown gall in selected regions of South Korea. *Journal Plants*, 8(11), 452. <https://doi.org/10.3390/plants8110452>.
- Chung, H.J., Castro, C.M., Im, H., Lee, H., &

ردیابی ژن *tms2* عامل گال طوقه در دو رقم رز تجاری شاخه‌بریده ("Angelina" و "Pearl") به‌وسیله یک نانو زیست‌حسگر

- Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Ed. USA: American Phytopathological Society, 373pp.
- Wang, M., Gong, W., Meng, Q., & Zhang, Y. (2011). Electrochemical DNA impedance biosensor for the detection of DNA hybridization with polymeric film, single walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Russian Journal of Electrochemistry*, 47(12), 1368-1373. <https://doi.org/10.1134/S1023193511120123>
- Wei, J., Liu, H., Liu, F., Zhu, M., Zhou, X., & Xing, D. (2014). Miniaturized paper-based gene sensor for rapid and sensitive identification of contagious plant virus. *Acs Applied Materials And Interfaces*, 6(24), 22577-22584.
- Zhao, W., Lu, J., Ma, W., Xu, C., Kuang, H., & Zhu, S. (2011). Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae subsp. citrulli* by gold-labeled DNA strip sensor. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 26(10), 4241-4244. <https://doi:10.1016/j.bios.2011.04.004>.