

استفاده از روش تراریزش توأم برای انتقال ژن کولین/اکسیداز به برنج

سعیده کی ارسالان^{۱*}، سیدالیا س مرتضوی^۲، بهزاد قره‌یاضی^۳، سکینه مهرانی^۴

۱ و ۴- به ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات

۲ و ۳- به ترتیب استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: saeideh.keyarsalan@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

برنج رقم هاشمی
تراریزش توأم
ریزپرتابه
ژن *hph*
کولین/اکسیداز
گلایسین
بنائین

در این پژوهش به منظور تولید گیاه برنج تراریخته با ژن کولین/اکسیداز با قابلیت حذف ژن نشانگر انتخابی، دو پلاسمید بیانی موسوم به pABRII-Chl (ژن کولین/اکسیداز حاوی پپتید راهنما برای تظاهر ژن در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پپتید راهنما برای تظاهر در سیتوپلاست) ساخته شد و سپس با استفاده از روش تراریزش توأم^۱، به همراه پلاسمید pTRA132 حامل ژن مقاومت به هیگرومایسین (*hph*)، به کالوس‌های جنین‌زایی که از ناحیه اسکوتلوم بذور رسیده رقم هاشمی منشا گرفته بودند، به روش ریزپرتابی منتقل شدند. سلول‌های تراریخته احتمالی از بافت‌های بمباران‌شده پس از ۳ دوره گزینش در محیط کالوس‌زای N6 حاوی هیگرومایسین ب گزینش شدند. به صورتی که غلظت آنتی بیوتیک از ۶۰ میلی گرم در لیتر به ۸۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت. در نهایت کالوس‌های مقاوم به هیگرومایسین، در محیط باززایی MS حاوی هیگرومایسین باززا شدند. صورتی که غلظت آنتی بیوتیک از ۸۰ میلی گرم در لیتر به ۶۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. گیاهان برنج تراریخته‌ی احتمالی به روش آنالیز زنجیره‌ای پلیمرز، آنالیز سادرن و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند و حضور ژن و بروز آن مورد تأیید قرار گرفت. فراوانی قابل قبول گیاهان تراریخته حاصل از روش تراریزش همزمان در این پژوهش نشان داد که روش مورد استفاده یک روش تکرار پذیر و نسبتاً کارا برای انتقال پایدار ژن‌های مفید و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر در مقیاس وسیع است. انتقال ژن مقاومت به آنتی بیوتیک در ساختار جداگانه امکان جداسازی این ژن از محصول نهایی را در نتیجه تفرق فراهم می‌آورد که از جنبه ایمنی زیستی حائز اهمیت است.

مقدمه

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. یکی از راه‌های افزایش تولید برنج، کاهش خسارت ناشی از تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده است. در این میان، خسارت ناشی تنش‌های غیر زنده‌ای مانند شوری، خشکی، سرما و گرما در گیاه برنج بسیار بیشتر از اثر تنش‌های زنده است (Roozitalab, M. 1987). تخمین زده می‌شود که بین ۱۶ تا ۲۳ میلیون هکتار از کل زمین‌های کشور با مشکل شوری مواجه باشد. علاوه بر این بسیاری از شالیزارها در مناطق جنوبی با مشکل شوری آب ناشی از آبیاری یا زمین روبرو هستند و حتی در مناطق شمالی کشور، سطح وسیعی از شالیزارها بر اثر پیشروی آب دریا در معرض شورشدگی هستند (Kovad, V. 1970). بنابراین تولید ارقام مقاوم به شوری برای همه‌ی محصولات کشاورزی و ازجمله برنج بسیار مهم و ضروری به نظر می‌رسد.

یکی از راه‌های احتمالی افزایش تحمل شوری در گیاهان تجمع مواد اسمولیت سازگار نظیر گلیسین بتائین است. شواهد تجربی نشان می‌دهد که گلیسین بتائین می‌تواند قابلیت تحمل چند تنش غیرزنده مثل شوری، خشکی، سرما و گرما را بهبود ببخشد. گلیسین بتائین یک ترکیب آمونیومی قطبی چهارواحدی است که در pH فیزیولوژیک خنثی بوده و می‌تواند از طریق پایدارسازی ساختمان چهارم پروتئین‌ها و ساختمان منظم غشاء در برابر آثار مضر شوری زیاد و دماهای بسیار زیاد و بسیار کم به عنوان حفاظت‌کننده عمل کند. سنتز گلیسین بتائین در گیاهان توسط اکسیداسیون دو مرحله‌ای "کولین" از طریق یک ماده حد واسط سمی به نام "بتائین آلدهید" صورت می‌گیرد (Ikuta, et al. 1977). اما یک روش ساده‌تر برای سنتز این ماده در گیاه، استفاده از یک تک‌ژن باکتریایی موسوم به "کولین اکسیداز" می‌باشد. انتقال ژن "کولین اکسیداز" (*cod A*) به گیاه، منجر به تولید "گلیسین بتائین" بدون نیاز به کاربرد بیرونی "کولین" یا ماده حد واسط "گلیسین بتائین آلدهید" می‌شود. هدف این پژوهش، انتقال ژن کولین اکسیداز به یک رقم بومی برنج، به منظور بررسی اثر آن بر روی توان تحمل تنش اسمزی بود.

مواد و روش‌ها

ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن کولین اکسیداز به منظور تهیه ژن کولین اکسیداز (*cod A*)، دو پلاسمید pChl و pCyt جداگانه با سه آنزیم *HinDIII*، *BamHI* و *EcoRI* و ناقل pTRA132 نیز با دو آنزیم *HinDIII* و *EcoRI* هضم شد و سپس قطعات تشکیل دهنده ژن *Cod A* (pChl: ۱.۹ kb + ۲.۹ kb؛ pCyt: ۱.۷۵ kb + ۲.۹ kb) و یک قطعه از ناقل بیانی (۲/۷ kb)، از روی ژل آگارز جداسازی شده و با استفاده از کیت خالص‌سازی شرکت Roche، خالص‌سازی شدند. پس از انجام دو واکنش اتصال به صورت جداگانه (با استفاده از کیت الحاق سریع، شرکت Roche) مخلوط اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E. coli* (نژاد DH5α) با استفاده از روش شوک حرارتی انتقال داده شد. در پلاسمیدهای نو ترکیب حاصل موسوم به pABRII-Chl (دارای پپتید راهنما در ژن *cod A*، برای تجمع گلیسین بتائین در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پپتید راهنما، برای تجمع گلیسین بتائین در سیتوزول)، ژن *cod A* توسط پیشبر دائمی 35S ویروس موزائیک کلم موجود در پلاسمید pTRA132 هدایت می‌شود. صحت ساخت این حامل‌های پلاسمیدی نو ترکیب با استفاده از آنالیز هضم ساده و دوگانه دی.ان.ا با آنزیم‌های *HinDIII* و *BamHI* و *EcoRI* و *XbaI* و *SacI* و *HinDIII*- *EcoRI* و آزمون پی.سی.آر (با آغازگرهای اختصاصی ژن *cod A* مورد تأیید قرار گرفت. سپس وکتورهای مذکور تعیین توالی شدند.

مواد گیاهی، القا کالوس و گزینش کالوس جنین‌زا برای بمباران در این بررسی از بذور رسیده رقم هاشمی برنج به عنوان ریزنمونه در محیط کشت این- ویترو استفاده شد. برای کالوس‌زایی نیز محیط کالوس‌زای N6 (چو و همکاران، ۱۹۷۶) به همراه ۲ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی به عنوان تنظیم‌کننده رشد بکارگرفته شد. بذور بعد از پوست‌گیری و ضدعفونی در ظروف پتری حاوی محیط کشت کالوس‌زای N6 کشت شدند و در اتاق رشد تاریک در دمای ۲۵ درجه به مدت ۶-۵ هفته یا تا زمانی که کالوس‌های جنین‌زای فراوان در آن‌ها تولید شود، قرار داده شدند (Mortazavi et al., 2006). به منظور آماده سازی بافت هدف برای بمباران،

كالوس هاي جنين زرا در مركز ظروف پتري حاوي محيط كشت N6 به قطر تقريبي ۱/۵ سانتي متر به صورت كاملا متراكم جمع آوري شدند.

تراريزش با تفنگ ژني

پلاسميدهاي نوتركيب pABRII-Chl و pABRII-Cyt هر كدام به طور جداگانه به همراه پلاسميد pTRA132 (حامل ژن هيگروميسين فسفوترانسفراز (*hph*) عامل مقاومت به هيگروميسين ب) به نسبت ۱:۱ در روش تراريزش توأم كالوس جنين زاي برنج با استفاده از تفنگ ژني مورد استفاده قرار گرفت.

در هر بمباران جهت تراريزش همزمان و امكان حذف ژن نشانگر انتخابي پس از يك نسل تفرق صفات و توليد گياهان تراريخته عاري از ژن انتخابگر، ۱۰ ميكروگرم از پلاسميد حاوي ژن كولين اكسيداز (pABRII-Chl و يا pABRII-Cyt) به همراه ۱۰ ميكروگرم از پلاسميد حاوي ژن مقاومت به هيگروميسين (pTRA132) بر روي ذرات طلا رسوب داده شد و با استفاده از تفنگ ژني بايوريد مدل PDS-1000/He دو بار با خلا معادل ۲۰ بار و با فشار ۱۱۰۰ psi و در فواصل ۶ و ۹ سانتي متری، به سمت بافت هدف پرتاب شدند. بلافاصله پس از بمباران، پتري ها براي طي کرده دوره استراحت، به محيط كاملاً تاريك و دماي ۲۵±۱

درجه سانتي گراد منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، كالوس هاي بمباران شده به محيط كشت انتخابي N6 حاوي ۵۰ ميلي گرم در ليتر هيگروميسين، منتقل شدند. كالوس هاي موجود در اين پتري ها در فواصل ۲ تا ۳ هفته اي و جمعاً سه بار در محيط كشت انتخابي واكشت شدند. در انتهاي دوره گزينش، كالوس هايي كه قهوه اي و سياه شده و يا آبي و لزج بودند حذف شده و تنها كالوس هاي جنين زاي كاملاً سفيد، ترد و تازه به محيط كشت باززاي منتقل شدند.

باززاي گياهچه هاي تراريخته احتمالي و انتقال آنها به محيط كشت آبي يوشيدا

محيط باززايي مورد استفاده، محيط كشت انتخابي MS تغيير يافته (وانگ و همكاران، ۱۹۸۷) حاوي ۵۰ ميلي گرم در ليتر هيگروميسين به همراه ۲ ميلي گرم در ليتر كائينين و ۳ ميلي گرم در ليتر نفتالين استيك اسيد (NAA)، ۲۰ گرم در ليتر مالتوز و ۱۰۰ ميلي گرم در ليتر ميو- اينوزيتول بود. كالوس هاي تراريخته احتمالي هر ۳۰ روز يكبار در محيط كشت انتخابي واكشت مي شدند. پس از آنكه طول گياهچه هاي تراريخته احتمالي در محيط باززايي حاوي آنتي بيوتيك به حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتي متر رسيد، گياهچه ها به لوله هاي آمايش حاوي محيط آبي يوشيدا (يوشيدا و همكاران، ۱۹۷۶) منتقل شدند.

جدول ۱: آغازگرهاي مورد استفاده در آزمون پي.سي.آر. گياهان تراريخته احتمالي

Table 1- Primers used for PCR analysis of possible transgenic plants

5'- AGA ATC TCG TGC TTT CAG CTT CGA -3'	Forward	توالي	آغازگرهاي hyg.
5'- TCA AGA CCA ATG CGG AGC ATA TAC -3'	Reverse	توالي	
5'- GCC ACA ACT CCT GCA TCG CCT TCT -3'	Forward	توالي	آغازگرهاي codA5
5'- CGG TTA GCA GGG TGA AGT TCT CCT -3'	Reverse	توالي	
5'- GAT ACG CCG AAG CTG TTG ATG C -3'	Forward	توالي	آغازگرهاي codA4
5'- TGC GTC TTG CGG ATG TAG TCC T -3'	Reverse	توالي	
5'- GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT -3'	Forward	توالي	آغازگرهاي 18s
5'- CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG -3'	Reverse	توالي	

استخراج دی.ان.ا از بافت گیاهی و آنالیز گیاهان تراریخته احتمالی

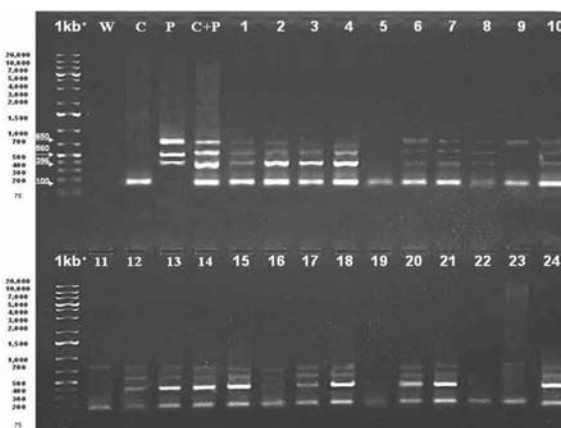
برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دی.ان.ای ژنومی گیاهان تراریخته احتمالی به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای CodA4، CodA5 و hyg (جدول ۱) و در سه دمای اتصال متفاوت انجام شد. جهت اثبات این که ژن‌ها به طور کامل در دی.ان.ای گیاه ادغام شده‌اند، روش استاندارد لکه‌گذاری سادرن مورد استفاده قرار گرفت (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱). برای اثبات بیان ژن در گیاهان تراریخته، آر.ان.ای گیاهی از گیاهان تراریخته استخراج شد و مورد آنالیز RT-PCR دو مرحله‌ای قرار گرفت.

نتایج و بحث

شکل ۱ نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از چهار جفت آغازگر را نشان می‌دهد. در این شکل محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ۲۴ گیاه تراریخته احتمالی که برای وجود یا عدم وجود ژن انتقالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند به همراه گیاه غیرتراریخته، تراریخته مصنوعی، پلاسمید اولیه pChl و نیز کنترل منفی (دارای کلیه مواد مورد نیاز

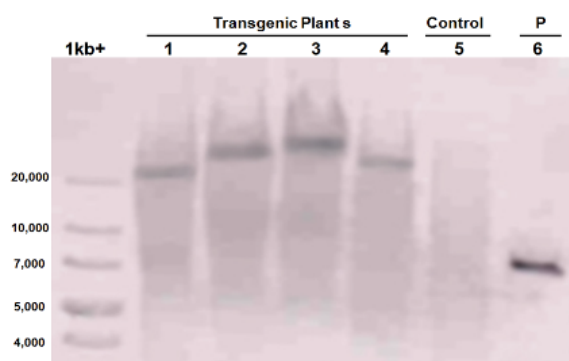
به جز دی.ان.ای الگو) بر روی ژل آگارز بارگذاری شده‌اند. آغازگر hyg قطعه‌ای به طول حدود ۶۵۰ باز، آغازگر CodA5 قطعه‌ای به طول 560 باز، آغازگر A4 cod قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز و آغازگر 18s قطعه‌ای به طول حدود ۱۰۰ باز، را تکثیر کردند. آغازگر 18S نشانگری است که به طور اختصاصی قطعه‌ای از ژنوم برنج را تکثیر می‌کند. این آغازگر در پلاسمید فاقد ناحیه مکمل است و بنابراین باندی تولید نمی‌کند (شکل ۱) ولی در ترایخته مصنوعی (اختلاط پلاسمید و دی.ان.ای گیاه غیرتراریخته) به دلیل وجود ژنوم برنج در آن دارای ناحیه مکمل بوده و همان باند را تولید می‌کند.

آغازگر hyg در گیاهان تراریخته احتمالی، تراریخته مصنوعی (C+P) و نیز در پلاسمید (P) ایجاد باند کرد که این نتیجه نیز مورد انتظار است زیرا در تمامی این نمونه‌ها ژن مقاومت به هیگرومایسین وجود دارد. آغازگرهای CodA4 و CodA5 نیز در همین نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید کرده‌اند که به دلیل وجود ژن کولین اکسیداز در تمامی نمونه‌های یادشده کاملاً قابل انتظار بوده‌است. همانگونه که انتظار می‌رفت، نمونه کنترل منفی (W) باندی تولید نکرده است و این مؤید آن است که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بدون آلودگی بوده و به درستی انجام شده‌است.



شکل ۱- فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از آغازگرهای اختصاصی ژن *codA* (*codA5* و *codA4*)؛ *hph* و 18s: Master Mix (W)؛ بدون دی.ان.ای الگو؛ (C) گیاه غیرتراریخته؛ (P) پلاسمید؛ (C+P) تراریخته مصنوعی؛ (۱ تا ۲۴) گیاهان تراریخته احتمالی.

Figure 1- Polymerase chain reaction products derived from *codA*, *hph* and *18s* gene-specific primers: W: Master Mix without DNA template, C: Control plant (non-transgenic), P: Plasmid, C+P: Artificial transgenic, 1-24: Eventual transgenic plants.



شکل ۲- آنالیز دورگ‌سازی سادرن برای ۴ لاین برنج تراریخته مستقل از هم: ۱-۴: دی.ان.ای ژنومی گیاهان تراریخته، هضم شده با آنزیم *HindIII*؛ ۵: دی.ان.ای ژنومی گیاه شاهد غیرتراریخته هضم شده با آنزیم *HindIII*؛ ۶: پلاسمید نو ترکیب pABRII-Chl با آنزیم *HindIII*.

Figure 2- Southern analysis for 4 independent transgenic rice lines: 1-4: Genome DNA of transgenic plants, digested with *HindIII* enzyme, 5: Genome DNA of non-transgenic plant, digested with *HindIII* enzyme, 6: pABRII-Chl digested with *HindIII* enzyme.

کرده است که این امر، نشان‌دهنده‌ی وجود ام.آر.ان.ای ژن کولین اکسیداز در نمونه اولیه و در واقع مؤید انجام رونویسی از این ژن در این گیاهان است. همانگونه که انتظار می‌رفت، نمونه‌های کنترل منفی (W1 و W2) باندی تولید نکردند و این مؤید آن است که هر دو مرحله واکنش آزمون RT-PCR بدون آلودگی بوده و به درستی انجام شده‌است.

فراوانی قابل قبول گیاهان تراریخته حاوی هر دو ژن انتقال داده شده به روش تراریزش همزمان در این پژوهش نشان داد که روش مورد استفاده یک روش تکرار پذیر و نسبتاً کارا برای انتقال پایدار ژن‌های مفید و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر در مقیاس وسیع است. اندازه سازه‌های بکار رفته، پیشبر مناسب، نوع ترکیبات هورمونی و غلظت آن‌ها در محیط‌های کشت کالوس زایی و باززایی، طول زمان واکشت جهت گرفتن کالوس جنین‌زا، و راهبرد گزینشی مناسب از نکات قابل توجه و مؤثر در موفقیت این روش بود. تراریزش همزمان با استفاده از روش غیر مستقیم تفنگ‌ژنی، همچنان نیازمند پژوهش و بررسی است و برای تولید نسل‌های تراریخته عاری از توالی‌های زائد بسیار مستعد است.

آنالیزهای ملکولی مختلف تلفیق تراژن در ژنوم برنج و عملکرد درست آن را تایید کردند. به طور کلی گیاهان تراریخته بدست آمده، هیچ مشخصه غیر عادی مورفولوژیک نشان ندادند و روند رشدی کاملاً مشابهی با گیاهان شاهد داشتند. اگرچه خصوصیات زراعی و مشابهت عمده^۱ آن‌ها با گیاه والد غیرتراریخته باید مورد

شکل ۲ نتایج آنالیز سادرن برای چهار لاین تراریخته به همراه گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی) و سازه نو ترکیب (کنترل مثبت) را نشان می‌دهد. مطابق انتظار، کاوشگر اختصاصی ژن *codA* با دی.ان.ای گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، دورگ نشده و باندی ایجاد نکرد و این به دلیل عدم حضور قطعه مکمل کاوشگر در ژنوم گیاه غیرتراریخته‌است.

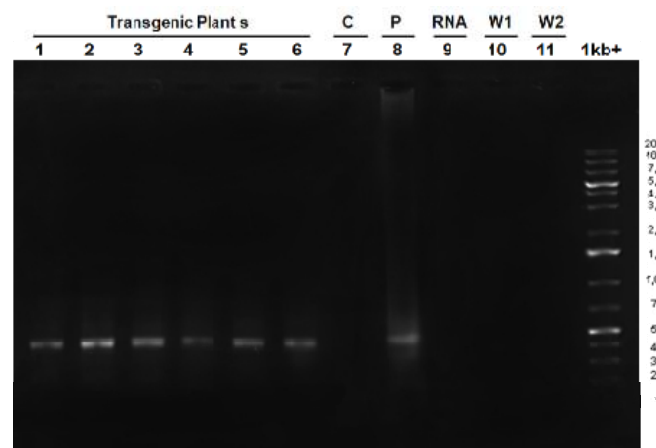
استفاده از روش دورگ‌گیری سادرن و کاوشگر اختصاصی و هضم دی.ان.ای استخراج شده از لاین‌های تراریخته با آنزیم *HindIII* در هر چهار گیاه تراریخته، یک باند ایجاد کرد. تفاوت در الگوی دورگ‌سازی در همه لاین‌ها نشان می‌دهد که ژن *codA* در مکان‌های مختلفی از ژنوم این گیاهان الحاق شده‌است. در نتیجه، این لاین‌ها به عنوان لاین‌های مستقل از هم در نظر گرفته می‌شوند. تعداد نوارها در هر کدام از لاین‌ها، نشان‌دهنده تعداد نسخه الحاق شده از ژن انتقالی در ژنوم آن‌ها است.

شکل ۳ نتیجه آزمون RT-PCR دومرحله‌ای برای شش گیاه تراریخته به همراه گیاه غیرتراریخته، پلاسمید اولیه pChl و نیز دو نوع کنترل مخلوط اولیه (دارای کلیه مواد مورد نیاز به جز دی.ان.ای الگو) برای مرحله اول و دوم پی.سی.آر روی ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید را نشان می‌دهد.

در مرحله دوم آنالیز که نتایج آن در شکل آمده‌است، آغازگر *codA4* که قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز تکثیر می‌کند، برای تشخیص وجود ژن، نسخه سی.دی.ان.ای ژن کولین/اکسیداز به کار برده شد. این آغازگر در تمام نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید

1-Substantial Equivalence

بررسی های بیشتر قرار گیرد.



شکل ۳- فرآورده های واکنش RT-PCR دومرحله ای شش گیاه تراریخته با ژن کولین اکسیداز: ۱-۶: گیاهان تراریخته؛ C: گیاه شاهد (غیرتراریخته)؛ P: پلاسمید؛ W1: کنترل منفی مرحله اول (بدون آر.ان.ای الگو)؛ W2: کنترل منفی مرحله دوم (بدون سی.دی.ان.ای الگو).

Figure 3- Two-phase RT-PCR products for six transgenic plants contains *choline oxidase*: 1-6: Transgenic plants, C: Control plant (non-transgenic), P: Plasmid, W1: Phase one negative control (without RNA template), W2: Phase two negative control (without cDNA template).

منابع

- Ikuta, S., K. Matuura, S. Imamura, H. Misaki, and Y. Horiuti. 1977. Oxydative pathway of choline to betaine in the soluble fraction prepared from *Arthrobacter globiformis*. J Biochem. 82: 157-165
- Kovad, V. 1970. Prevention or salinity and reclamation of saline soil of Iran. Soil Institutr of Iran. Puplication No.227.
- Roozitalab, M. H. 1987. National soil policy and its technical and administrative organization in Iran, Soil and Water Research Ins. Publ. No. 725.
- Mortazavi, S.-E., A. Mirlohi, B. Ghareyazie, A. Arzani, N. Khoshkholgh-Sima, 2006, Physiological

Aspects of Rice Callus Growth and Regeneration in a Modified MS Medium Supplemented with NaCl, IAR, Vol. 23, 51-70.

- Wang, M. S., F. J. Zapata and D. C. deCastro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and Young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench.). Plant Cell Rep., 6: 294-296.
- Yoshida, S., D.A.Forno, J.H.Cock, and K.A.Gomez, 1976. Laboratori manual for physiological studies of rice, International Rice Research Institute, Manilla