مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۱۰-۱

جداسازی و آنالیز عملکرد ژن افزایش جذب فسفر (*PSTOL1*) از گونه وحشی برنج

Isolation and functional analysis of *PSTOL1* from wild species of rice

فاطمه چمنی محصص[۱]، محمود سلوکی[۱]، بهزاد قره یاضی[۲*]، فاطمه فرشاد[۳]، لیلا فهمیده[۱]، اکرم غفاری[۲] و مطهره محسن پور[۲*]

Fatemeh Chamani Mohasses[1], Mahmood Soluki[1], Behzad Ghareyazie*[2], Fatemeh Farshad[3], Leila Fahmideh[1], Akram Ghafari[2], Motahhareh Mohsenpour*[2]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲- به ترتیب استاد، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، شرکت زیست فناوران پردیس

1- Ph.D. student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol.
2- Professor, MSc. and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.
3- Zist Fanavaran Pardis Company

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mthrhm@yahoo.com ،ghareyazie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۴ – تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

فسفر پس از نیتروژن مهمترین عنصر ضروری در گیاهان است. پیشرفت‌های گذشته در زیست-شناسی مولکولی، فرصتی را برای مهندسی گیاهان به منظور به حداکثر رساندن مکانیسم جذب فسفر فراهم آورده است. ساخت سازه‌های ژنی چند منظوره که بتوانند علاوه بر افزایش کارایی جذب فسفر که بهبود عملکرد گیاه را در پی خواهد داشت، دارای ژن‌های اقتصادی رایج در گیاهان تراریخته دنیا مانند تحمل به علفکش باشند، در مهندسی ژنتیک گیاهی با ارزش خواهند بود. در این پژوهش با جداسازی ژن *PSTOL1* از برنج وحشی رقم کاسالاس و همسانه‌سازی آن در کنار ژن ایجاد کننده تحمل به علفکش گلایفوسیت تحت پیشبر و پایانبر مستقل، کارایی جذب فسفر و عملگرا بودن ژن توسط آزمایش اندازه‌گیری عنصر فسفر در محیط کشت باکتری نشان داده شد. علاوه بر آن انتظار می‌رود ژن *PSTOL1* ساختار ریشه گیاهی را نیز بهبود بخشد و در ایجاد تحمل گیاه به خشکی نیز موثر باشد. به منظور بررسی عملکرد ژن *PSTOL1* و به دلیل اینکه ژن مذکور تحت پیشبر CaMV35S همسانه‌سازی شد و امکان شناسایی این پیشبر توسط عوامل رونویسی باکتریایی وجود دارد، بنابراین میزان جذب فسفر توسط باکتری با اندازه‌گیری این عنصر در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های حاوی سازه نوترکیب *PSTOL1* نسبت به باکتری‌های فاقد این پلاسمید حدود دو برابر فسفر بیشتری را از محیط کشت جذب کردند. بدین ترتیب عملگرا بودن و بیان ژن مذکور تایید شد. انتظار بر این است استفاده از اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب ساخته شده در این پژوهش (pUEs-PSTOL1) در انتقال ژن به گیاهان مختلف بتواند با افزایش کارایی جذب فسفر، سبب افزایش عملکرد، بهبود ساختار ریشه، تحمل به خشکی و نیز باعث جایگزینی استفاده از علفکش ایمن گلایفوسیت شود.

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن،
جذب فسفر،
تراریخته،
گلایفوسیت،
مهندسی ژنتیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

مقدمه

کمبود عناصر غذایی از عوامل غیرزیستی مهمی است که می‌تواند بر رشد گیاهان تاثیر بگذارد، نیتروژن و فسفر به ترتیب عوامل محدود کننده عملکرد محصولات هستند. حدود ۰/۲ درصد وزن خشک گیاه را فسفر تشکیل می‌دهد. گیاهان بدون وجود فسفر قادر به رشد نیستند. خاک‌های ایران از نظر فسفر و نیتروژن فقیر هستند . بررسی وضعیت حاصلخیزی خاک‌های کشاورزی در ۳۰ استان کشور نشان می‌دهد که میزان فسفر ۷۱/۸ درصد خاک‌های کشور کمتر از حد بحرانی فسفر و میزان پتاسیم ۲۱ درصد از خاک‌ها کمتر از حد بحرانی پتاسیم است (Shahbazi and Besharati, 2013). فقر خاک از عناصر غذایی و فرسایش شدید خاک موجب بروز مشکلات عمده در عرصه کشاورزی شده است. از این رو مصرف کودهای شیمیایی در کشور با رشد تصاعدی همراه است. کودهای شیمیایی در کوتاه‌مدت، مواد مغذی مورد نیاز خاک را تأمین می‌کند ولی در بلندمدت موجب از بین رفتن کیفیت خاک، افت حاصلخیزی و در نتیجه فرسایش خاک می‌شود. بیش از ۸۰ درصد کل فسفر موجود در خاک غیر قابل تحرک است و به دلیل جذب توسط عناصر خاک، رسوب و تبدیل شدن به فرم آلی در خارج از منطقه رایزوسفر هستند (Schachtman, 1998). در برخی نواحی جهان مانند امریکای شمالی و اروپا کودهای فسفره به صورت آزادانه در زمین‌های کشاورزی استفاده می‌شوند. فقدان منابع محلی حاوی فسفر و هزینه‌های بالای واردات آن موجب عدم استفاده و یا استفاده کم کشاورزان از کودهای فسفره در کشورهای در حال توسعه شده است. (Sanchez and Salinas, 1981). توانایی تحمل به کمبود فسفر و افزایش جذب آن به طور عمده تحت تاثیر تفاوت ژنوتیپی گونه‌های گیاهی است. مرفولوژی ریشه با نسبت بالاتر سطح به حجم برای جذب حداکثر فسفر بسیار مهم است. اضافه کردن فسفر به صورت کود تاثیر چندانی در افزایش جذب آن توسط گیاه ندارد. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، فرصتی را برای مهندسی گیاهان به منظور به حداکثر رساندن مکانیسم جذب فسفر در گیاه و به حداقل رساندن عوارض جانبی فسفر بر روی محیط زیست مانند تراوش فسفر از زمین‌های کشاورزی به دریاچه‌ها و رودخانه‌ها فراهم آورده است (Miyasaka and Habte, 2007). درسال‌های اخیر، گروهی از برنج‌ها که از منطقه‌ای در هند با خاک‌های مشکل دار و فقیر به عنوان یک منبع با ارزش ژن‌های مقاوم شناسایی شدند. واریته تیپ aus کاسالاس که راندمان جذب فسفر بالاتری را نسبت به سایر انواع برنج‌ها از خاک‌های فقیر نشان دادند. این نوع برنج‌ها می‌توانند به عنوان منبع با ارزشی از ژن‌های افزایش جذب فسفر مورد استفاده قرار بگیرند (Wissuwa *et al.*, 2002). در سال ۱۹۹۸ جایگاه ژنی صفت کمی ژن مسئول ایجاد تحمل به کمبود فسفر*Pup1* (Phosphorus uptake 1) توسط Wissuwa در برنج واریته Kasalath شناسایی و از طریق تلاقی به برنج جاپونیکا واریته Nipponbare منتقل شد (Wissuwa *et al.*, 2002). لاین-های ایزوژنیک حامل این QTL، عملکرد بیشتر و معنی‌داری را نسبت به گیاه والدینی حساس نشان دادند (Wissuwa *et al.*, 2005). توالی‌یابی این مکان در کاسالاس یک مکان پیچیده شامل ۹۰ کیلو باز غنی از ترانسپوزون حذف و اضافه (INDEL) را نشان داد که در ژنوم گیاه حساس وجود نداشت (Heuer *et al.*, 2009). پس از آن *PSTOL1* در این مکان به عنوان ژن اصلی که منجر به افزایش جذب فسفر می‌شود، شناسایی شد (Gamuyao *et al.*, 2012). چون *PSTOL1* یک پروتئین کیناز است و به طور مستقیم نمی‌تواند تنظیم بیان ژن را انجام دهد و از طریق فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی به طور غیر مستقیم این کار را انجام می‌دهد. به منظور اینکه بینشی نسبت به پاسخ‌های پایین دست *PSTOL1* بدست آید، تجزیه و تحلیل Affymetrix gene-array بر روی خاک گیاهان تراریخت IR64 حاوی *PSTOL1* و گیاه کنترل انجام شد. نتایج نشان داد ۲۳ ژن که مرتبط با رشد ریشه و پاسخ به تنش بودند، بیان متفاوتی داشتند و۲۱ ژن از ۲۳ ژن با QTLهای مرتبط با رشد ریشه و خشکی همپوشانی داشتند که نشان‌دهنده نقش مهم *PSTOL1*/PUP1 در طول توسعه ریشه و تحمل به تنش‌ها است (Gamuyao *et al.*, 2012). همچنین آنالیز آغازگرهای مرتبط با جایگاه PUP1، حفاظت‌شدگی بالای *PSTOL1* را در ارقام متحمل به خشکی نشان دادند (Chin *et al.*, 2010: Chin *et al.*, 2011). در پروژه مشترکی بین پژوهشگران مراکز تحقیقات بین المللی برنج (IRRI)، ژاپن و اندونزی به منظور توسعه عملکرد بالای برنج در شرایط کمبود فسفر، جایگاه ژنی *Pup1* بررسی شد. ژن‌های شناخته شده در ناحیه *Pup1* از واریته‌های متحمل، به دو واریته برنج غرقاب و سه واریته برنج اندونزیایی منتقل شدند (Chin *et al.*, 2011). به منظور بهبود تحمل واریته‌های برنج آفریقایی به کمبود فسفر، ژن *PSTOL1* به واریته‌های *O.glaberrima CG14* و واریته جدید NERICAs منتقل شد (Pariasca-Tanaka *et al.*, 2014).

تحمل به علف‌کش یک صفت مهم زراعی است که یک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

راه موثر و قابل انعطاف برای کنترل علف‌های هرز فراهم می‌کند. همچنین، این صفت می‌تواند به عنوان یک نشانگر انتخابی در گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار بگیرد. دو ژن که بطور معمول برای تولید گیاهان متحمل به علفکش استفاده می‌شوند عبارتند از ژن *bar* جدا شده از *Streptomyces hygroscopicus* به منظور سم‌زدایی علفکش گلایفوسینیت و ژن *EPSPS* جدا شده از اگروباکتریوم سویه CP4 برای سم‌زدایی علفکش گلایفوسیت است (Shavindra Bajaj and Amitabh Mohanty, 2005).

هدف از این پژوهش جداسازی و آنالیز عملکرد ژن افزایش جذب فسفر از گونه وحشی برنج و تهیه سازه‌ای برای ایجاد گیاهانی است که با دارا بودن ژنی برای افزایش جذب فسفر، علاوه بر افزایش عملکرد گیاه به دلیل اینکه انتظار می‌رود ساختار ریشه را نیز بهبود بخشد، در ایجاد تحمل گیاه به خشکی نیز موثر باشد و از ژن تحمل به علف‌کش نیز در کنار ژن افزایش جذب فسفر در سازه استفاده شود. همچنین به منظور بررسی این که ژن جداسازی شده برای افزایش جذب فسفر دارای عملکرد مناسبی است، میزان جذب فسفر توسط باکتری با اندازه گیری این عنصر در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده

در این پژوهش گونه برنج وحشی، رقم "کاسالاس" برای استخراج دی.ان.ای ژنومی استفاده شد. باکتری‌های مورد استفاده *E. coli* سویه XLI-blue و اگروباکتریوم تومی فاشیسین سویه LBA4404 و سویه GV3101 به عنوان میزبان برای پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمید pTZ57A/T (Fermentas) با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین و پلاسمید دوگانه pBI121 حامل نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین بودند. استخراج پلاسمید، واکنش هضم با آنزیم‌های اندونوکلئاز نوع II، تهیه باکتری‌های مستعد و واکنش اتصال طبق دستور کار Sambrook و Russel (۲۰۰۱) انجام شد.

همسانه‌سازی سازه دو ژنی *PSTOL1- EPSPS*

توالی مربوط به ژن *PSTOL1* از بانک اطلاعاتی NCBI (Accession number: KM079161) دریافت شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای *PSTOL1* که دارای دنباله جایگاه آنزیمی *Bam*HI و *Sal*I به ترتیب به انتهای '۵ آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب به منظور جداسازی ناحیه کامل کد کننده ژن مذکور بودند (جدول ۱)، انجام شد.

ترکیب واکنش ۵۰ میکرولیتری حاوی ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز HF (Thermo Fisher Scientific) که دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی است، ۳۰ نانوگرم دی.ان.ا، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۵ میکرولیتر dNTP (۲ میلی مولار)، ۵ میکرولیتر کلراید منیزیوم (۲۵ میلی‌مولار) با نیمرخ حرارتی زیر انجام شد (جدول ۲). قطعه تکثیر شده به طول ۹۹۹ جفت‌باز که بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد فاقد اینترون است، پس از خالص‌سازی از روی ژل آگارز در پلاسمید حدواسط pTZ (شکل ۱) بر اساس دستور عمل شرکت سازنده همسانه‌سازی شد. پس از واکنش اتصال، مخلوط حاصل با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد منتقل شد (An, 1987). همسانه‌های نوترکیب *E. coli* سویه XL1-Blue حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG رشد کرده و همسانه‌های سفید حاوی ژن مورد نظر با جهت ورود مناسب، به روش کلنی PCR و هضم آنزیمی، مورد بررسی قرار گرفت. قطعه مربوط به ژن *PSTOL1* پس از استخراج پلاسمید از کلنی نوترکیبی که قطعه مورد نظر را با جهت صحیح دریافت کرده بودند ابتدا توسط آنزیم *Bam*HI تحت هضم آنزیمی کامل قرار گرفت و سپس به دلیل اینکه آنزیم *Sac*I در داخل قطعه نیز دارای جایگاه آنزیمی بود هضم ناقص با این آنزیم با کاهش میزان آنزیم و مدت زمان هضم انجام و قطعه مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز از بین قطعات حاصل انتخاب و خالص سازی شد. هم زمان پلاسمید pBI121 نیز توسط این دو آنزیم به منظور خارج کردن ژن *gus* و ورود قطعه خالص شده از ژن *PSTOL1* مورد هضم قرار گرفت. پس از انجام واکنش اتصال، مخلوط حاصل به سلول‌های مستعد منتقل شد. کلنی‌های نوترکیب حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین رشد کرده و کلنی‌های نوترکیب حاوی ژن مورد نظر به روش کلنی PCR و هضم آنزیمی، مورد تایید قرار گرفتند. سپس کاست کامل ژن *PSTOL1* که تحت پیشبر CaMV35S و پایانبرnos قرار گرفته بود، با استفاده از آغازگرهای M13 و آنزیم پلیمراز دارای خاصیت تصحیح کنندگی تکثیر و کاست کامل ژن در وکتور حدواسط pTZ همسانه‌سازی شد. پس از تجزیه و تحلیل همسانه‌های نوترکیب به روش کلنی PCR، همسانه دارای کاست ژنی در جهتِ ورود مورد نظرِ این تحقیق،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

انتخاب شد و به دلیل وجود جایگاه آنزیمی داخلی در ژن، تحت واکنش هضم ناقص با هر دو آنزیم *Hind*III و *Eco*RI قرار گرفت (شکل ۱). و پس از خالص‌سازی، در ناحیه T-DNA حامل دوگانه اگروباکتریومی در کنار کاست ژن *EPSPS* که تحت پیشبر *tsf1* قرار داشت، همسانه‌سازی شد. مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرپتومایسین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپکتینومایسین رشد کرد، زیرا ژن نشانگر انتخابی مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها روی سازه اگروباکتریومی قرار داشت و همسانه‌های نوترکیب، به روش کلنی PCR و هضم آنزیمی، مورد تایید قرار گرفتند. پلاسمید نوترکیب توالی‌یابی شد.

بررسی عملکرد ژن

میزان جذب فسفر در باکتری، با اندازه گیری این عنصر در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که ابتدا باکتری‌های اگرو باکتریوم سویه LBA4404 حاوی ژن‌های *PSTOL1-EPSPS* (در پلاسمید نوترکیب pUEs-PSTOL1 حاصل از این تحقیق) و سویه GV3301 حاوی ژن‌های *PSTOL1-EPSPS*، سویه GV3301 حاوی ژن *EPSPS*، سویه LBA4404 خالص و سویه GV3301 خالص، پس از کشت جامد، یک کلنی از آنها در ۵ سی‌سی محیط کشت مایع LB کشت داده شد و غلظت آن‌ها با نانو دراپ سنجیده شد. غلظت همه آن‌ها به ۰/۵ OD600nm رسانیده شد و سپس ۱۰۰ سی‌سی از هر کدام از این باکتری‌ها برداشته شد و در ۵ سی سی محیط LB مایع کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه قرار گرفت. سپس همه باکتری‌ها فیلتر شده و به میزان ۲۰۰ برابر رقیق شدند و توسط دستگاه Metrohm 850 professional IC مقدار فسفات هر محیط سنجیده شد.

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای جداسازی *PSTOL1* از رقم برنج وحشی کاسالاس

Table 1- Primer name and sequences used to isolate *PSTOL1* from wild rice, kasalath

نام آغازگر	توالی
F1: *pstol-Bam-F*	TTACGGGATCCTAATGCTGC TCTGTCAAAGGGC-3’
R1: *pstol-sal-R*	TACAAGTCGACTCAAAGCCC TTTTGGTG-3'

جدول ۲- درجه حرارت و زمان بهینه در مراحل مختلف PCR

Table 2- PCR time and temperature program

مراحل واکنش	حرارت °C	زمان	تعداد دور
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگر	۶۰	۳۰ ثانیه	
بسط آغازگر	۶۸	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۶۸	۵ دقیقه	۱

نتایج و بحث

۱- تکثیر ژن *PSTOL1*

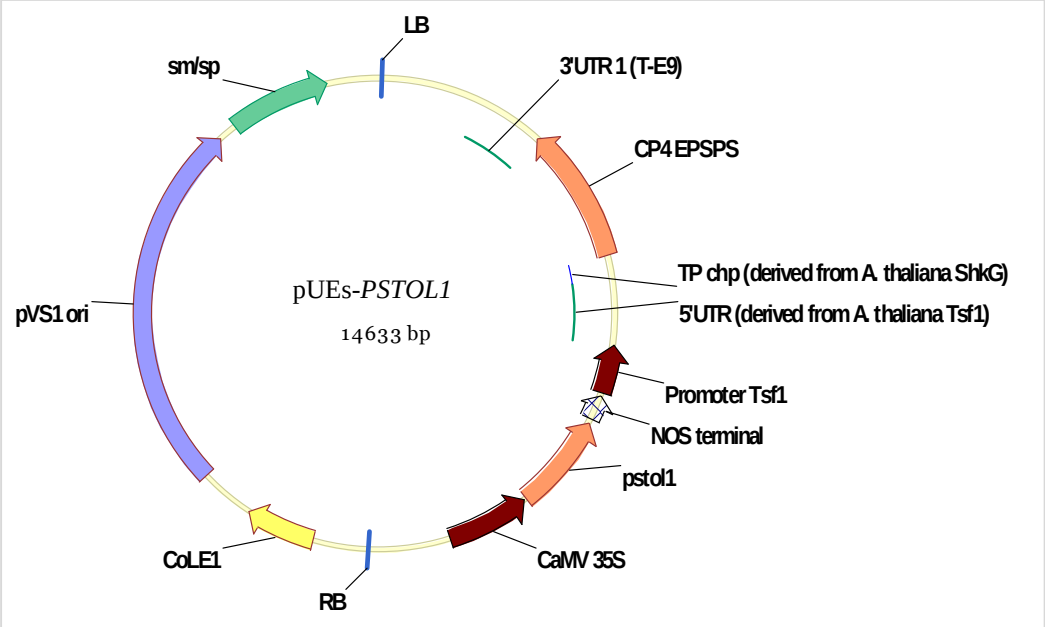
پس از استخراج دی ان ا از رقم کاسالاس برنج، قطعه ژن *PSTOL1* با اندازه ۹۹۹ جفت باز فاقد اینترون توسط آغازگرهای R1، F1 شناسایی شد (شکل ۲-الف).

۲- ساخت سازه دو ژنی *PSTOL1* و *EPSPS*

قطعه ژن *PSTOL1* داخل پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شد (شکل ۱). همسانه‌های مثبت با کلنی PCR تایید شدند. حذف ژن *gus* از ناقل گیاهی pBI121 در اثر برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I با مشاهده قطعه ۱۸۱۲ جفت بازی تایید شد. قطعه *PSTOL1* پس از برش با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I از ناقل PTZ خارج و در ناقل گیاهی pBI121 به جای ژن *gus* قرار گرفت (شکل ۱) و با کلنی PCR تایید شد. وکتور نوترکیب pTZ-*PSTOL1* پس از برش آنزیمی با دو آنزیم مذکور به دلیل اینکه آنزیم *Sac*I جایگاه داخلی در ژن *PSTOL1* داشت، انتظار می‌رفت باندهای ۲۸۵۷، ۶۹۱، ۳۲۳ و ۱۴ جفت‌باز را نشان دهد. برای افزودن جایگاه‌های آنزیم مذکور به طول کامل ژن نیاز بود برش آنزیمی ناقص توسط *Sac*I انجام شود. پس از برش ناقص، بیش از ۶ باند حاصل شد.

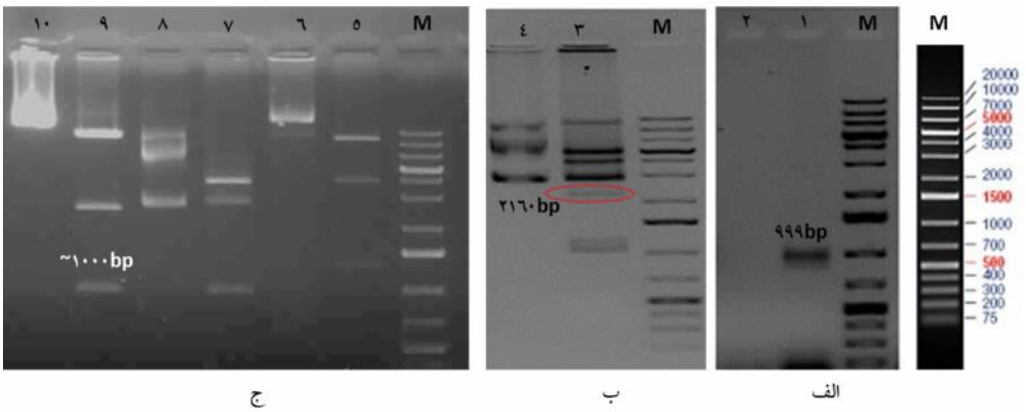
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]



شکل ۱- نمای شماتیک سازه نوترکیب دو ژنی pUEs-*PSTOL1* دارای ژن‌های *PSTOL1* و *EPSPS* تحت پیشبرها و پایانبرهای مستقل.

Fig 1- Schematic view of recombinant plasmid containing two genes, *PSTOL1* and *EPSPS* under the control of independent promoters and terminators



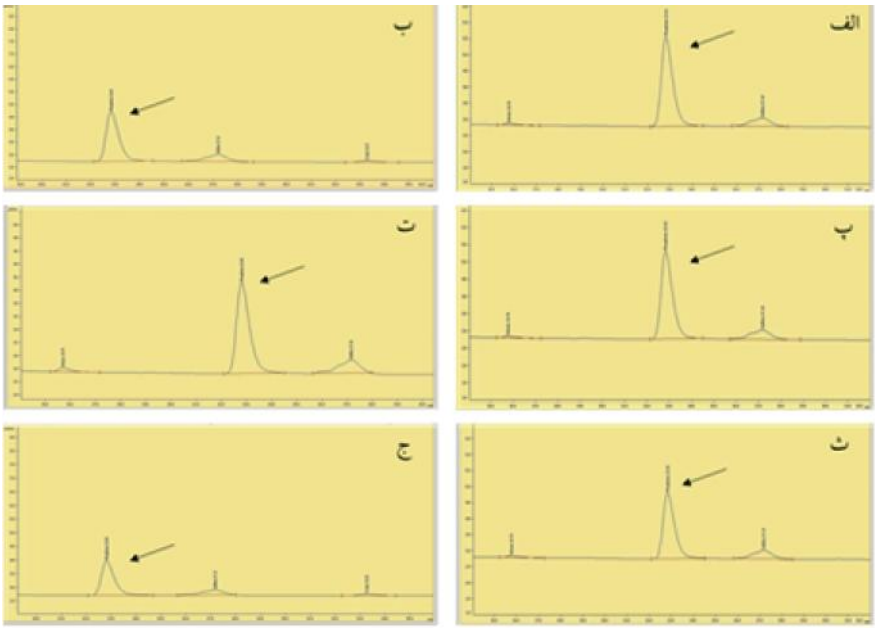
شکل ۲- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) به منظور جداسازی ژن *PSTOL1* از ژنوم برنج رقم کاسالاس و تایید پلاسمیدهای نوترکیب با هضم آنزیمی.

Fig 2- Polymerase chain reaction for isolation of *PSTOL1* gene from rice genome (Kasalath) and confirmation of recombinant plasmids usig digestion rection.

(الف) واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) به منظور جداسازی ژن *PSTOL1* از ژنوم برنج رقم کاسالاس؛ M: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی دی.ان.اِ. (1kb ladder شرکت Fermentas)؛ ۱: واکنش با الگوی دی. ان.ای برنج رقم کاسالاس و تکثیر ژن *PSTOL1* ؛ ۲: واکنش PCR بدون استفاده از دی ان ای الگو. (ب) هضم ناقص پلاسمید نوترکیب pTZ-35SP-PSTOL1-nosT با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI؛ ۳:پلاسمید نوترکیب هضم شده؛ ۴: پلاسمید نوترکیب هضم‌نشده. (ج) هضم آنزیمی به منظور تایید پلاسمید نوترکیب نهایی pUEs-PSTOL1 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I؛ ۵: پلاسمید حاوی کاست ژنی EPSPS هضم شده؛ ۶: پلاسمید چاهک ۵ هضم نشده؛ ۷: پلاسمید نوترکیب pTZ-35S-*PSTOL1*-nosT هضم شده؛ ۸: پلاسمید چاهک ۷ هضم نشده؛ ۹: پلاسمید pUES-*PSTOL1* هضم شده؛ ۱۰: پلاسمید چاهک ۹ هضم نشده.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]



شکل ۳- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی یونی (IC) به منظور اندازه گیری جذب فسفر توسط باکتری‌های حاوی ناقل نوترکیب ساخته شده در این تحقیق حاوی ژن *PSTOL1* در مقایسه با باکتری‌های فاقد این سازه.

Fig 3- Ion chromatography (IC) to measure the absorption of phosphorus by bacteria containing a recombinant vector constructed in this study(pUEs-*PSTOL1*) harbouring *PSTOL1* gene compared with the control bacteria.

نتایج حاصل از میزان فسفر موجود در (الف) محیط کشت مایع LB، (ب) محیط کشت مایع حاوی اگروباکتریوم سویه GV و دارای ژن *EPSPS* (پ) محیط کشت مایع حاوی اگروباکتریوم سویه LBA4404 (ت) محیط کشت مایع حاوی اگروباکتریوم سویه LBA و دارای ژن های *EPSPS* و *PSTOL1* (ث) محیط کشت مایع حاوی اگروباکتریوم سویه GV3101 (ج) محیط کشت مایع حاوی اگروباکتریوم سویه GV3101 و دارای ژن‌های *EPSPS* و *PSTOL1*

باند مورد انتظار ۱۰۱۴ جفت بازی از روی ژن خالص‌سازی و در محل متناظر در حامل pBI121 همسانه‌سازی شد. سازه نوترکیب حاصل موسوم به pBI-*PSTOL1* که ژن *PSTOL1* را تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos به همراه دارد، دارای کاست ژنی *nptII* در ناحیه T-DNA بوده و باعث مقاومت به کانامایسین خواهد شد. در نهایت نیاز بود کاست کامل ژنی *PSTOL1* با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI طوری برش یابد که انتهای چسبنده این دو آنزیم را در دو سوی کاست دربرداشته باشد ولی به دلیل اینکه هر دو آنزیم مذکور داخل توالی ژن نیز دارای جایگاه برش آنزیمی بودند، هضم آنزیمی ناقص در پیش گرفته شد. انتظار می‌رفت در صورت هضم کامل باندهای ۱۱۷۲۸، ۱۰۵۰، ۱۰۰۸ و ۱۰۲ جفت بازی ظاهر شوند و برش ناقص بیش از ۱۰ باند را ایجاد می‌کرد. از بین باندهای حاصل باند ۲۱۶۰ بازی باند مورد انتظار بود. از آنجایی که هضم ناقص آنزیمی در سازه‌ای با نسخه شمار بسیار کم همچون pBI121 ممکن بود با مشکلاتی مواجه باشد و باند مورد انتظار برای همسانه‌سازی بعدی غلظت مناسبی نداشته باشد، کل کاست ژنی *PSTOL1* با اندازه ۲۲۱۲ جفت باز توسط آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب *M13* جداسازی و داخل پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. کلنی‌های مثبت pTZ-35SP-PSTOL1-nosT با کلنی PCR تایید شدند. هضم ناقص بر روی پلاسمیدهای نوترکیب با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III با مشاهده قطعه ۲۱۶۰ جفت بازی تایید شد (شکل ۲-ب). قطعه حاصل پس از جداسازی از ژل در پلاسمید pUEs (شکل ۱) حاوی کاست ژنی *EPSPS* همسانه‌سازی شد و همسانه‌های مثبت با کلنی PCR تایید شدند و بدین ترتیب پلاسمید نوترکیب دوژنی pUEs-*PSTOL1* حاوی کاست کامل ژن *PSTOL1* و کاست کامل ژن *EPSPS* ساخته شد. مشاهده باند حدود ۱۰۰۰ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I حضور ژن *PSTOL1* را در پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pUEs-*PSTOL1* به اثبات رساند (شکل ۲-ج). بدین ترتیب کاست ژنی *PSTOL1* در سازه بدون نشانگر انتخابی و دارای ژن مقاومت به علفکش *EPSPS*، قرار داده شد.

نتایج توالی‌یابی ژن *PSTOL1* در سازه pUEs-*PSTOL1* پس از آنالیز BLAST نوکلئوتیدی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، به طور کامل با توالی ژن *PSTOL1* دارای

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

انطباق بود و عدم تغییر در توالی ژن را در چند مرحله همسانه-سازی تایید کرد.

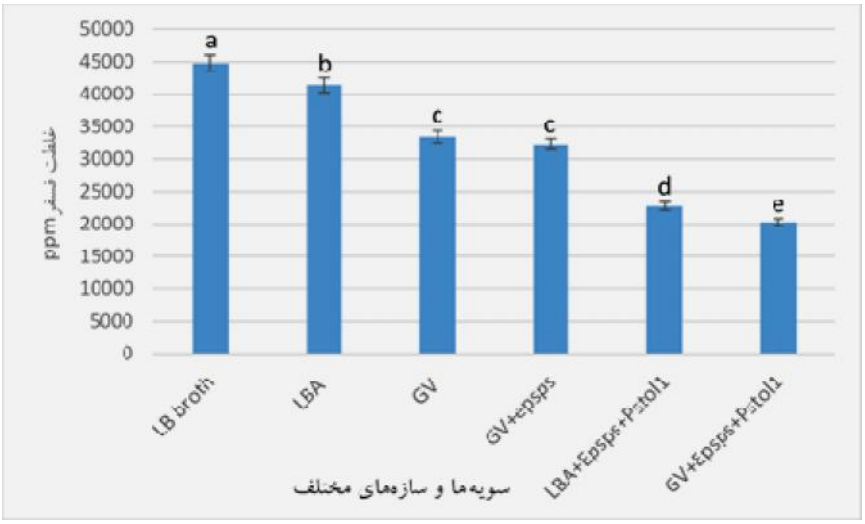
۳-نتایج بررسی عملکرد ژن *PSTOL1*

با توجه به این که انتظار بر این است ژن *PSTOL1* باعث افزایش جذب فسفر شود و به دلیل اینکه ژن مذکور تحت پیشبر CaMV35S همسانه‌سازی شده است و امکان شناسایی این پیشبر توسط عوامل رونویسی باکتریایی وجود دارد، بنابراین میزان جذب فسفر توسط باکتری با اندازه‌گیری این عنصر در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با دو تکرار نشان داد که باکتری‌های حاوی سازه نوترکیب *PSTOL1* بیشترین جذب فسفر را داشته و نسبت به باکتری‌های فاقد این ناقل حدود دو برابر فسفر بیشتری را از محیط کشت جذب کردند و محتوای فسفر باقیمانده آن‌ها از بقیه باکتری‌ها کمتر بود. بدین ترتیب بیان ژن و عمل آن تایید شد (جدول ۳ و شکل ۳ و ۴). بررسی آماری این تحقیق با برنامه excel و نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد و مقایسه میانگینها نشان داد که داده‌ها بطور معنی‌داری از هم فاصله دارند و آن‌ها را در ۵ گروه مختلف تقسیم بندی کرد (شکل ۴).

جدول۳- میزان غلظت فسفر در محیط کشت باکتری‌های مورد مطالعه

Table 3- Concenteration of phosphate in medium culture of studied bacteria

تیمارها (Treatments) محیط کشت مایع	غلظت (Concenteration) ppm	نام ماده (Component)
باکتری (LB broth)	۴۵۶۵۲ /۱۸۱	فسفات
حاوی اگروباکتریوم سویه LBA	۴۲۱۸۹ /۵۷۹	فسفات
حاوی اگروباکتریوم سویه GV	۳۴۱۰۴/۸۸۵	فسفات
حاوی اگروباکتریوم سویه GV و دارای ژن *EPSPS*	۳۲۹۰۵/۹۲۱	فسفات
حاوی اگروباکتریوم سویه LBA و دارای ژن های *EPSPS* و *PSTOL1*	۲۳۱۶۱/۷۱۷	فسفات
حاوی اگروباکتریوم سویه GV و دارای ژن های *EPSPS* و *PSTOL1*	۲۰۶۵۶/۵۳۶	فسفات



شکل ۴- میزان غلظت فسفر در محیط کشت باکتری‌های مورد مطالعه.

Fig 4- Concenteration of phosphate in medium culture of studied bacterai

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

بر اساس نتایج جدول ۳ و شکل ۴ صحت فرایند جداسازی ژن، کلون‌سازی، بیان و عملکرد آن در جذب فسفر اثبات شد. در این پژوهش میزان فسفر اندازه‌گیری شده در محیط کشت مایع LB (LB Broth) به میزان ۴۵۶۵۲/۱۸۱ppm اندازه گیری شد و پس از رشد دو سویه اگروباکتریوم LBA4404 (LBA) و GV3301 (GV) فاقد پلاسمید این میزان به ترتیب به ۴۲۱۸۹/۵۷۹ و ۳۴۱۰۴/۸۸۵ رسید (جدول ۳) که نشان‌دهنده مصرف فسفر محیط کشت توسط باکتری به منظور رشد است. سویه باکتری GV نسبت به LBA سریع‌تر رشد می‌کند و بنابراین با توجه به مشاهدات ما و نتایج این پژوهش جذب ۱۱۵۴۷/۹۲۵ppm فسفر از محیط کشت توسط باکتری GV، نسبت به باکتری LBA که ۳۴۶۳/۲۳۱ppm فسفر را در مدت زمان یکسانی جذب کرده است، مورد انتظار و توجیه پذیر است. حضور پلاسمید حاوی کاست بیانی ژن *PSTOL1* باعث شد تا باکتری LBA نوترکیب به میزان ۱۹۰۲۷/۸۶۲ppm فسفر بیشتری را نسبت به باکتری فاقد پلاسمید از محیط کشت جذب نماید که این میزان ۱/۸۲ برابر افزایش جذب فسفر را نشان می‌دهد. بر همین اساس، باکتری GV حاوی کاست ژنی *PSTOL1* نیز نسبت به باکتری فاقد پلاسمید ۱/۶۵ برابر فسفر بیشتری را از محیط کشت جذب کرده است. لازم به ذکر است پلاسمید نوترکیب وارد شده به هر دو سویه اگروباکتریوم، کاست ژنی *PSTOL1* را در کنار کاست ژنی *EPSPS* به همراه داشت و به همین دلیل این احتمال وجود داشت که وجود پلاسمید فاقد کاست ژنی *PSTOL1* نیز در میزان مصرف فسفر توسط باکتری موثر باشد و به دلیل اثبات اینکه این میزان افزایش جذب فسفر که بین ۱/۵ تا ۲ برابر در آزمایشات ما اثبات شد را به عملکرد ژن *PSTOL1* نسبت دهیم، میزان جذب فسفر توسط باکتری GV حاوی پلاسمیدی که دارای کاست *EPSPS* بوده و فاقد ژن *PSTOL1* است نیز نسبت به جذب فسفر توسط باکتری GV مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج نشان دهنده تفاوت ناچیز (۱/۰۳ برابر) بود. بنابراین کارکردی بودن ژن *PSTOL1* جدا شده در این پژوهش و عملگرا بودن نواحی تنظیمی آن در بیان ژن تایید شد. با توجه به اینکه فسفر یکی از عناصر پرمصرف غذایی است که دارای نقش‌های متعددی در ساختار سلول و سوخت و ساز گیاهان است (Hawkesford *et al.*, 2012) و کمبود آن به میزان زیادی سبب کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌شود، ایجاد ارقام گیاهان زراعی با بهره وری بالا تحت فسفر کم و دیگر شرایط تنش، هدفی ضروری و موثر برای بهبود محصول و افزایش غذاست (Gamuyao *et al.*, 2012). در گزارش Heuer و همکاران (۲۰۰۹) ژن *PSTOL1* عامل اصلی ژنتیکی افزایش جذب فسفر در برنج معرفی شده است (Heuer *et al.*, 2009). انتظار بر این است که استفاده از اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب ساخته شده در این تحقیق (pUEs-PSTOL1) در انتقال ژن به گیاهان مختلف بتواند با افزایش کارایی جذب فسفر سبب افزایش عملکرد شده و نیز با بهبود ساختار ریشه در افزایش تحمل به خشکی موثر باشد. علاوه بر این تحمل به علفکش نیز صفت اقتصادی با ارزشی خواهد بود که باعث جایگزینی گلایفوسیت با علف‌کش‌های خطرناک‌تر رایج در زراعت گیاهان مختلف و کاهش دفعات سمپاشی با علف کشها خواهد شد. انتقال این سازه دو ژنی به برنج، با توجه به بحران آب پیش رو مزیت‌های زیادی را به همراه دارد. روش خشکه کاری برنج، یک جایگزین مناسب برای برنج نشایی است و از تخریب خاک و تشکیل لایه فشرده در خاک زراعی در اثر شخم زدن مکرر جلوگیری می‌کند (Joshi et al. 2013; IRRI 2006). علاوه براین خشکه‌کاری برنج می‌تواند بحران آب قریب‌الوقوع، مسایل در حال ظهور مانند کمبود نیروی انسانی و هزینه‌های تولید مرتبط با کشت برنج نشا شده را برطرف کند (Farooq et al. 2011). کنترل علف‌های هرز بزرگترین محدودیت در خشکه‌کاری برنج است و حفظ و یا افزایش عملکرد، برداشت با کیفیت بالا بدون بذرعلف‌های هرز یک نیاز اساسی است. شرایط کنترل نشده علف‌های هرز منجر به کاهش عملکرد از ۷۰ تا ۷۶ درصد در خشکه‌کاری برنج می‌شود (Singh et al. 2005). تحمل به علف‌کش یک صفت مهم زراعی است که راهی موثر و قابل انعطاف برای کنترل علف‌های هرز فراهم می‌کند. انتظار بر این است تولید گیاهان تراریخته متحمل به علفکش به همراه بهبود ساختار ریشه امکان کشت غیر غرقاب برنج را در شرایط کم آبی فراهم کند. سازه ژنی ساخته شده در حال حاضر برای انتقال به برنج‌های ایرانی هاشمی و شیرودی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی شرکت دانش‌بنیان زیست فناوران پردیس و صندوق حمایت از سرمایه‌گذاری زیست‌فناوری ستاد توسعه زیست‌فناوری وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

منابع

An, G. 1987. "Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis." Methods in Enzymology 153: 292-305.

Bajaj, Sh and Mohanty, A. 2005. Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice: A review. *Plant Biotechnology Journal,3:* 275–307.

Chandrasekhar, K., Reddy, G.M., Singh, J., Vani, K., Vijayalakshmi M., Kaul, T., Reddy, M.K. 2014. Development of Transgenic Rice Harbouring Mutated Rice 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase (Os-mEPSPS) and Allium sativum Leaf Agglutinin (ASAL) Genes Conferring Tolerance to Herbicides and Sap-Sucking Insects. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 1146-1157.

Chin, Joong Hyoun, Rico Gamuyao, Cheryl Dalid, Masdiar Bustamam, Joko Prasetiyono, Sugiono Moeljopawiro, Matthias Wissuwa, and Sigrid Heuer. 2011. "Developing Rice with High Yield under Phosphorus Deficiency: Pup1 Sequence to Application." *Plant physiology* 156(3): 1202–16.

Chin, Joong Hyoun, Xiaochun Lu, Stephan M. Haefele, Rico Gamuyao, Matthias Wissuwa, Sigrid Heuer .2010. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. *Theor Appl Genet* 120:1073–1086.

Farooq, M., Siddique, K.H.M., Rehman, H., Aziz, T., Lee, D., Wahid, A. 2011. Rice direct seeding: experiences, challenges and opportunities. Soil Tillage Res, 111:87–98.

Gamuyao, Rico, Joong Hyoun Chin, Juan Pariasca-tanaka, Paolo Pesaresi, Sheryl Catausan, Cheryl Dalid, Inez Slamet-loedin, Evelyn Mae Tecson-mendoza, Matthias Wissuwa and Sigrid Heuer. **2012**. "The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency." *Nature*, 488(7412): 535–39.

Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Skrumsager Moller, I. White, P. 2012. Functions of macronutrients. In: Marschner's mineral nutrition of higher plants (ed. Marschner, P.) 135–189. Academic Press, London, U.K.

Heuer S, Lu X, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Kanamori H, Matsumoto T, De Leon T, Ulat VJ, Ismail AM, Yano M, Wissuwa M .2009. Comparative sequence analyses of the major QTL Phosphate uptake 1 (Pup1) reveal a complex genetic structure. Plant Biotechnol J 7:456–471.

IRRI (International Rice Research Institute) .2006. Direct seeded rice: a low cost establishment technology. IRRI Rice factsheet. Available at http://www.narc.org.np/rice_knowledge_bank/fact.

Joshi, E., Kumar, D., Lal, B., Nepalia, V., Gautam, P., Vyas, A.K. 2013. Management of direct seeded rice for enhanced resource-use efficiency. Plant Knowledge Journal, 2:119–134.

Miyasaka, S and Habte, M. 2007. Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7-8): 1101–1147.

Pariasca-Tanaka, Juan, Joong Hyoun Chin, Khady Nani Dramé, Cheryl Dalid, Sigrid Heuer, and Matthias Wissuwa. 2014. "A Novel Allele of the P-Starvation Tolerance Gene OsPSTOL1 from African Rice (Oryza Glaberrima Steud) and Its Distribution in the Genus Oryza." *Theoretical and applied genetics.* 127(6): 1387–98.

Sánchez, Pedro A. and José G. Salinas. 1981. Low-Input Technology for Managing Oxisols and Ultisols in Tropical America. *Advances in Agronomy*, 34: 279-406.

Schachtman, D. P. 1998. "Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell." *plant physiology.* 116(2): 47–53.

Singh, S., Singh, G., Singh, VP., Singh, AP. 2005. Effect of establishment methods and weed management practices on weeds and rice in rice-wheat cropping system. Indian J Weed Sci, 37:51–57.

Sambrook, J and Russel, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Shahbazi, K and Besharati, H. 2013. Overview of agricultural soils fertility status. Journal management system. 1 (1): 1-15. In Farsi with English abstract.

Wissuwa M. 2005. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. Plant Soil 269:57–68.

Wissuwa, M., Wegner, J., Ae, N and Yano, M. 2002. "Substitution Mapping of Pup1: A Major QTL Increasing Phosphorus Uptake of Rice from a Phosphorus-Deficient Soil. 2002. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6-7):890-897.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]

Isolation and functional analysis of *PSTOL1* from wild species of rice

Fatemeh Chamani Mohasses[1], Mahmood Soluki[1], Behzad Ghareyazie*[2], Fatemeh Farshad[3], Leila Fahmideh[1], Akram Ghafari[2], Motahhareh Mohsenpour*[2]

1- Ph.D. student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol. Iran
2- Professor, MSc. and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.
3- Zist Fanavaran Pardis Company, Iran

*Corresponding Author: **ghareyazie@yahoo.com** or **mthrhm@yahoo.com**

Abstract

After nitrogen, phosphorus (P) is the most essential element in plants. With recent advances in molecular biology, an opportunity for manipulation of plants to increase P uptake is provided. Construction of multipurpose vectors to enhance the efficiency of phosphorus uptake conferring improved plant yield as well as conferring herbicide tolerance will be valuable in plant genetic engineering of economically important crops. In this study the *PSTOL1* gene from the wild rice Kasalas variety was isolated and cloned next to the glyphosate herbicide tolerance gene, each under independent promoters and terminators. Uptake efficiency of P and *PSTOL1* function were confirmed by measuring phosphorus uptake in the bacteria culture medium. It was expected that the *PSTOL1* gene would improve the plant's root structure and be effective in developing drought-tolerant plants. As *PSTOL1* was cloned behind the CaMV 35S promoter and this promoter is recognizable by bacterial transcription factors, analysis of gene function could be performed by measurement of P uptake from the bacterial culture medium. The results showed that, compared to the control, bacteria containing *PSTOL1* absorbed two times more phosphorus from the culture medium. Thus, the function and expression of this gene was confirmed. It is expected that *Agrobacterium* containing the recombinant plasmid (pUEs-*PSTOL1*) constructed in this study can be used in the genetic engineering of different crops and lead to increase yield, improved root structure, and drought tolerance by increasing efficiency of phosphorus uptake as well as providing resistance to glyphosate herbicides. The resulting recombinant plasmid is without a selectable marker for antibiotic resistance which would be a biosafety advantage.

Keywords: Gene isolation, Phosphorus uptake, Transgenic, Glyphosate, Genetic engineering.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.12.4]