مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۴۲-۳۷

استفاده از روش تراریزش توأم برای انتقال ژن *کولین‌اکسیداز* به برنج

سعیده کی ارسلان*[۱]، سیدالیاس مرتضوی[۲]، بهزاد قره‌یاضی[۳]، سکینه مهرانی[۴]

۱ و ۴- به‌ترتیب کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات
۲ و ۳- به‌ترتیب 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

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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر به ۶۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. گیاهان برنج تراریخته‌ی احتمالی به روش آنالیز زنجیره‌ای پلیمراز، 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 جنبه‌ایمنی زیستی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی

برنج رقم‌هاشمی
تراریزش توأم
ریزپرتابه
ژن *hph*
کولین اکسیداز
گلایسین
بتائین

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 زنده‌است. در این میان، خسارت ناشی تنش‌های غیر زنده‌ای مانند شوری، خشکی، سرما و گرما در گیاه برنج بسیار بیشتر از اثر تنش‌های زنده‌است (Roozitalab, M. H. 1987). تخمین زده می‌شود که بین ۱۶ تا ۲۳ ملیون 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 گلایسین‌بتایین است. شواهد تجربی نشان می‌دهد که گلایسین‌بتایین می‌تواند قابلیت تحمل چند تنش غیرزنده مثل شوری، خشکی، سرما و گرما را بهبود ببخشد. گلایسین بتائین یک ترکیب آمونیومی قطبی چهارواحدی است که در pH فیزیولوژیک خنثی بوده و می تواند 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 گلایسین 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 "گلایسین بتائین" بدون نیاز به کاربرد بیرونی "کولین" یا ماده حد واسط "گلایسین 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 روش ها

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن *کولین اکسیداز*

به منظور تهیه ژن *کولین اکسیداز* (*cod A*)، دو پلاسمید pChl و pCyt جداگانه با سه آنزیم *Hin*DIII، *Bam*HI و *Eco*RI، و ناقل pTRA132 نیز با دو آنزیم *Hin*DIII و *Eco*RI هضم شد و سپس قطعات تشکیل دهنده ژن *Cod A* (pChl: kb۱.۹ kb + ۲.۹ ؛ pCyt: kb۱.۷۵kb + ۲.۹) 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 نوترکیب حاصل موسوم به pABRII-Chl (دارای پپتید راهنما در ژن *cod A*، برای تجمع گلایسین بتائین در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پپتید راهنما، برای تجمع گلایسین بتائین در سیتوزول)، ژن *cod A*، توسط پیشبر دائمی 35S ویروس موزائیک کلم موجود در پلاسمید pTRA132 هدایت می‌شود. صحت ساخت این حامل‌های پلاسمیدی نوترکیب با استفاده از آنالیز هضم ساده و دوگانه دی.ان.اِ با آنزیم‌های *Hin*DIII و *Bam*HI و *Eco*RI و *Xba*I و *Sac*I و *Hin*DIII- *Eco*RI و آزمون پی.سی.آر (با آغازگرهای اختصاصی ژن *cod A* مورد تأیید قرار گرفت. سپس وکتورهای مذکور تعین توالی شدند.

مواد گیاهی، القا کالوس وگزینش کالوس جنین‌زا برای بمباران

در این بررسی از بذور رسیده رقم‌هاشمی برنج به عنوان ریزنمونه در محیط کشت این- ویترو استفاده شد. برای کالوس‌زایی نیز محیط‌کالوس‌زای N6 (چو و همکاران، ۱۹۷۶) به همراه۲ میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی به عنوان تنظیم‌کننده رشد بکارگرفته شد. بذور بعد از پوست‌گیری و ضدعفونی در ظروف پتری حاوی محیط‌کشت 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 *etal*, 2006). به منظور آماده سازی بافت هدف برای بمباران،

کالوس‌های‌جنین‌زا در مرکز ظروف پتری حاوی محیط‌کشت N6 به قطر تقریبی ۱/۵سانتی‌متر به صورت کاملا متراکم جمع‌آوری شدند.

تراریزش با تفنگ ژنی

پلاسمیدهای نوترکیب pABRII-Chl و pABRII-Cyt هرکدام به طور جداگانه به همراه پلاسمید pTRA132 (حامل ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hph*) عامل مقاومت به هیگرومایسین ب) به نسبت ۱:۱ در روش تراریزش توام کالوس‌جنین‌زای برنج با استفاده از تفنگ ژنی مورد استفاده قرار گرفت.

در هر بمباران جهت تراریزش همزمان و امکان حذف ژن نشانگر انتخابی پس از یک نسل تفرق صفات و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر، ۱۰ میکروگرم از پلاسمید حاوی ژن کولین اکسیداز (pABRII-Chl و یا pABRII-Cyt) به همراه ۱۰ میکروگرم از پلاسمید حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین (pTRA132) بر روی ذرات طلا رسوب داده شد و با استفاده از تفنگ ژنی بایوراد مدل PDS-1000/He دو بار با خلا معادل ۲۰ بار و با فشار ۱۱۰۰ psi و در فواصل ۶ و ۹ سانتی‌متری، به سمت بافت هدف پرتاب شدند. بلافاصله پس از بمباران، پتری‌ها برای طی کرده دورهٔ استراحت، به محیط کاملاً تاریک و دمای ۱±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، کالوس‌های بمباران شده به محیط کشت انتخابی N6 حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین، منتقل شدند. کالوس‌های موجود در این پتری‌ها در فواصل ۲ تا ۳ هفته‌ای و جمعاً سه بار در محیط کشت انتخابی واکشت شدند. در انتهای دوره گزینش، کالوس‌هایی که قهوه‌ای و سیاه شده و یا آبکی و لزج بودند حذف شده و تنها کالوس‌های جنین‌زای کاملاً سفید، ترد و تازه به محیط کشت باززایی منتقل شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و انتقال آن‌ها به محیط کشت آبی یوشیدا

محیط باززایی مورد استفاده، محیط کشت انتخابی MS تغییریافته (وانگ و همکاران، ۱۹۸۷) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین و ۳ میلی‌گرم درلیتر نفتالین استیک اسید (NAA)، ۲۰ گرم در لیتر مالتوز و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میو- اینوزیتول بود. کالوس‌های تراریخته احتمالی هر ۳۰ روز یکبار در محیط کشت انتخابی واکشت می‌شدند. پس از آنکه طول گیاهچه‌های تراریخته احتمالی در محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک به حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر رسید، گیاهچه‌ها به لوله‌های آزمایش حاوی محیط آبی یوشیدا (یوشیدا و همکاران، ۱۹۷۶) منتقل شدند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در آزمون پی.سی.آر گیاهان تراریختهٔ احتمالی

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

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

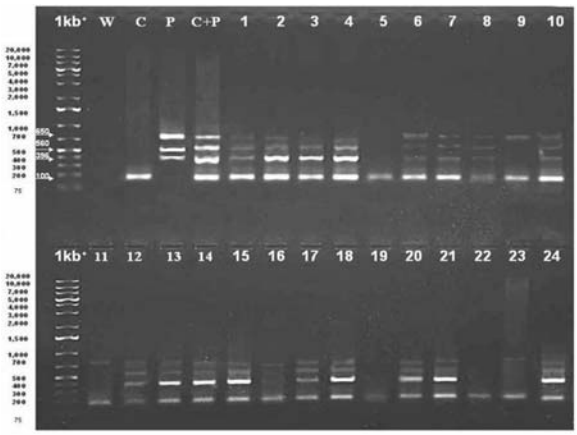
استخراج دی.اِن.اِ از بافت گیاهی وآنالیز گیاهان تراریخته احتمالی

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دی.ان.اِی ژنومی گیاهان تراریخته احتمالی به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای CodA4، CodA5، hyg و18s (جدول ۱) و در سه دمای اتصال متفاوت انجام شد. جهت اثبات این که ژن‌ها به طور کامل در دی.ان.اِی گیاه ادغام شده‌اند، روش استاندارد لکه‌گذاری سادرن مورد استفاده قرار گرفت (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱). برای اثبات بیان ژن در گیاهان تراریخته، آر.ان.اِی گیاهی از گیاهان تراریخته‌استخراج شد و مورد آنالیز RT-PCR دومرحله‌ای قرار گرفت.

نتایج و بحث

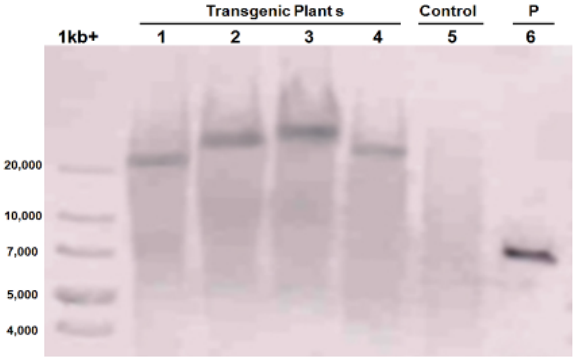
شکل ۱ نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از چهار جفت آغازگر را نشان می‌دهد. در این شکل محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ۲۴ گیاه تراریختهٔ احتمالی که برای وجود یا عدم وجود ژن انتقالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند به همراه گیاه غیرتراریخته، تراریختهٔ مصنوعی، پلاسمید اولیه pChl و نیز کنترل منفی (دارای کلیهٔ مواد مورد نیاز به جز دی.اِن.اِی الگو) بر روی ژل آگارز بارگذاری شده‌اند. آغازگر hyg قطعه‌ای به طول حدود ۶۵۰ باز، آغازگر CodA5 قطعه‌ای به طول 560 باز، آغازگر cod A4 قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز و آغازگر18s 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 ناحیهٔ مکمل است و بنابراین باندی تولید نمی‌کند (شکل ۱) ولی در تراریختهٔ مصنوعی (اختلاط پلاسمید و دی.ان.اِی گیاه غیرتراریخته) به دلیل وجود ژنوم برنج در آن دارای ناحیهٔ مکمل بوده و همان باند را تولید می‌کند.

آغازگر hyg در گیاهان تراریختهٔ احتمالی، تراریختهٔ 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. آغازگرهایCodA4 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* (*codA4* و *codA5*)؛ hph و 18s: Master Mix(W) بدون دی.ان.اِی الگو؛ (C⁻) گیاه غیرتراریخته؛ (P)پلاسمید؛ (C+P) تراریختهٔ مصنوعی؛ (۱ تا ۲۴) گیاهان تراریختهٔ 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: ۴-۱: دی.ان.اِی ژنومی گیاهان تراریخته، هضم شده با آنزیم *Hin*DIII ؛ ۵: دی.ان.اِی ژنومی گیاه شاهد غیرتراریخته هضم شده با آنزیم *Hin*DIII ؛ ۶: پلاسمید نوترکیب pABRII-Chl با آنزیم *Hin*DIII.

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

شکل ۲ نتایج آنالیز سادرن برای چهار لاین تراریخته به همراه گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی) و سازه نوترکیب (کنترل مثبت) را نشان می‌دهد. مطابق انتظار، کاوشگر اختصاصی ژن *codA* با دی.ان.اِی 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.اِی استخراج شده از لاین‌های تراریخته با آنزیم *Hin*DIII 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 هرکدام از لاین‌ها، نشان دهنده 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 کلیهٔ مواد مورد نیاز به جز دی.ان.اِی الگو) برای مرحله اول و دوم پی.سی.آر روی ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید را نشان می‌دهد.

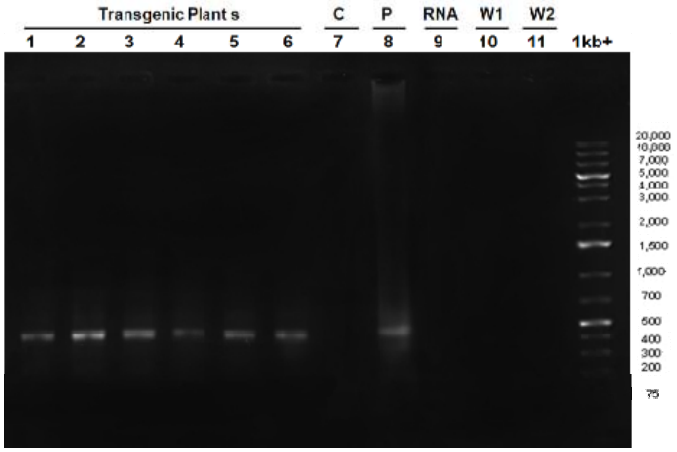
در مرحله دوم آنالیز که نتایج آن در شکل آمده‌است، آغازگر codA4 که قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز تکثیر می‌کند، برای تشخیص وجود ژن، نسخه سی.دی.ان.اِی ژن *کولین اکسیداز* به کار برده شد. این آغازگر در تمام نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید کرده است که این امر، نشان‌دهنده‌ی وجود ام.آر.ان.اِی ژن کولین اکسیداز در 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 بااستفاده‌از روش غیر مستقیم تفنگ‌ژنی، همچنان نیازمند پژوهش و بررسی‌است 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[1] آن‌ها با گیاه والد غیرتراریخته باید مورد

1 -Substantial Equivalence

بررسی‌های بیشتر قرار گیرد.



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

1. 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
2. Kovad, V. 1970. Prevention or salinity and reclamination of saline soil of Iran. Soil Institutr of Iran. Puplication No.227.
3. Roozitalab, M. H. 1987. National soil policy and its technical and administrative organization in Iran, Soil and Water Research Ins. Publ. No. 725.
4. 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.
5. 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.
6. 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

.