

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

سعیده کی ارسالان^{۱*}، سیدالیاس 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
گلايسين
بنائين

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 بدور 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 ب‌گزینش شدند. به صورتی که غلظت آنتی بیوتیک از ۶۰ میلی‌گرم در لیتر به ۸۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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. H. 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 از جمله برنج بسیار مهم و ضروری به نظر می‌رسد.

یکی از راه‌های احتمالی افزایش تحمل شوری در گیاهان تجمع مواد اسمولیت سازگار نظیر گلیسین‌بتائین است. شواهد تجربی نشان می‌دهد که گلیسین‌بتائین می‌تواند قابلیت تحمل چند تنش غیرزنده مثل شوری، خشکی، سرما و گرما را بهبود ببخشد. گلیسین‌بتائین 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 گلیسین‌بتائین 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 "گلیسین‌بتائین" بدون نیاز به کاربرد بیرونی "کولین" یا ماده حد واسط "گلیسین‌بتائین 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؛ pCyt ۱.۷۵kb + 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 نو ترکیب حاصل موسوم به pABRII-Chl (دارای پپتید راهنما در ژن *cod A*، برای تجمع گلیسین‌بتائین در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پپتید راهنما، برای تجمع گلیسین‌بتائین در سیتوزول)، ژن *cod A* توسط پیشبر دائمی 35S و 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 میلی‌گرم 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 آماده‌سازی بافت هدف برای بمباران،

درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، کالوس‌های بمباران شده به محیط کشت انتخابی N6 حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومیسین، 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 تغییر یافته (وانگ و همکاران، ۱۹۸۷) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومیسین به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کانتین و ۳ میلی‌گرم در لیتر 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.

کالوس‌های جنین‌زا در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت N6 به قطر تقریبی ۱/۵ سانتی‌متر به صورت کاملاً متراکم جمع‌آوری شدند.

تراریزش با تفنگ ژنی

پلاسمیدهای نو ترکیب pABRII-Chl و pABRII-Cyt هر کدام به طور جداگانه به همراه پلاسمید pTRA132 (حامل ژن هیگرومیسین فسفوترانسفراز (*hph*) عامل مقاومت به هیگرومیسین ب) به نسبت ۱:۱ در روش تراریزش توأم کالوس جنین‌زای 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 هیگرومیسین (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 دوره استراحت، به محیط کاملاً تاریک و دمای ۲۵±۱

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

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

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

به جز دی.ان.ای الگو) بر روی ژل آغازز 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 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 تراریخته 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.

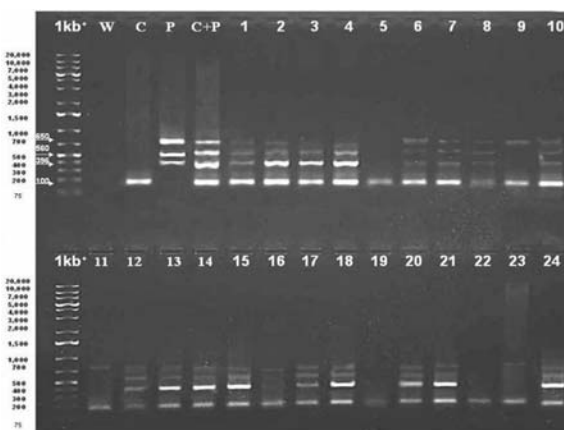
آغازگر *hyg* در گیاهان تراریخته احتمالی، تراریخته مصنوعی (C+P) و نیز در پلاسمید (P) ایجاد باند کرد که این نتیجه نیز مورد انتظار است زیرا در تمامی این نمونه‌ها ژن مقاومت به هیگرومایسین وجود دارد. آغازگرهای *CodA4* و *CodA5* نیز در همین نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید کرده‌اند که به دلیل وجود ژن کولین 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.

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 دومرحله‌ای قرار گرفت.

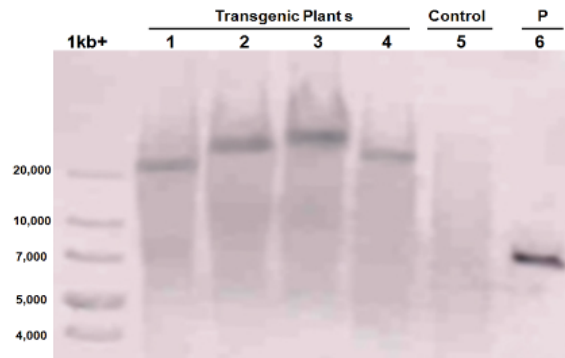
نتایج و بحث

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 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



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 واکنش 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 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.

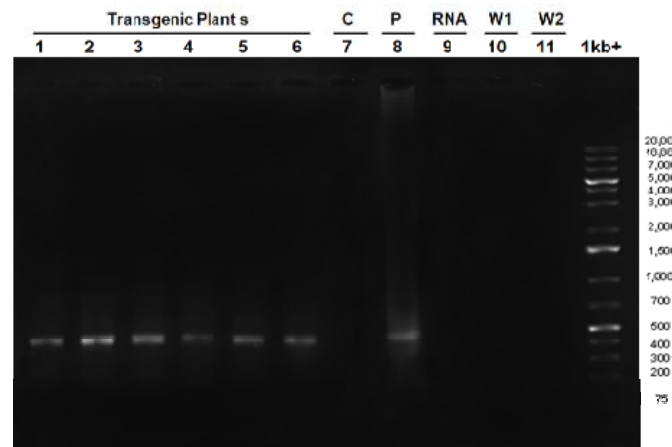
استفاده از روش دورگ‌گیری سادرن و کاوشگر اختصاصی و هضم دی.ان.ای استخراج شده از لاین‌های تراریخته با آنزیم *HindIII* در هر چهار گیاه تراریخته، یک باند ایجاد کرد. تفاوت در الگوی دورگ‌سازی در همه لاین‌ها نشان می‌دهد که ژن *codA* در مکان‌های مختلفی از ژنوم این گیاهان الحاق شده‌است. در نتیجه، این لاین‌ها به عنوان لاین‌های مستقل از هم در نظر گرفته می‌شوند. تعداد نوارها در هر کدام از لاین‌ها، 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 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 دو مرحله ای شش گیاه تراریخته با ژن کولین اکسیداز: ۱-۶: گیاهان تراریخته؛ C: گیاه شاهد (غیر تراریخته)؛ 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