مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
صفحه ۱۲۳-۱۱۵

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

ارزیابی سریع پیشبرهای بذری در برگ با استفاده از فاکتور رونویسی LEC2

Rapid assessment of seed promoters in leaves by using LEC2 transcriptional factor

محمد افشارشاندیز[۱،۲]، حسن رهنما*[۲]، حسین آذرنیوند[۲]

Mohammad Afshar Shandiz[1,2], Hassan Rahnama*[1], Hossein Azarnivand[2]

۱- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- گروه مستقل بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- کرج- ایران

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
2. Department of Natural Resource and Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲)

چکیده

فاکتور رونویسی LEC2 یکی از فاکتورهای رونویسی است که با اتصال به توالی پیشبرهای بذری سبب بیان ژن‌های پایین دستی می‌شود. استفاده از این فاکتور رونویسی در کنار روش آگروواینفیلتریشن می‌تواند زمان ارزیابی پیشبرهای بذری را با توجه به حذف زمان طولانی مدت انتقال دائم تا بذردهی کاهش دهد. در این تحقیق اختصاصی بودن بیان بذری ژن تحت کنترل پیشبر *FAD2-1* پس از جداسازی از گیاه گلرنگ با استفاده از آنالیز بیان ژن *GUS* در برگهای توتون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی پیشبر *FAD2-1* نشان داد که این قطعه جدا شده از بالادست ژن *FAD2-1* حاوی عناصر اساسی برای بیان اختصاصی در بذر است. جهت ارزیابی سریع اختصاصی بودن بیان بذری در پیشبر ژن *FAD2-1* دو کاست ژنی طراحی گردید: کاست ژنی اول pFAD2-GUS (ژن *GUS* و پیشبر ژن *FAD2-1*) و کاست ژنی دوم pBI-LEC2 (ژن *LEC2* و پیشبر 35S). کاست‌های ژنی به صورت جداگانه در وکتور pBI121 کلون شده و در نهایت به سویه EHA105 آگروباکتریوم منتقل شدند. به منظور بررسی سریع عملکرد این پیشبر، آگروباکتریوم‌های حاوی دو سازه بصورت جداگانه آماده و کشت شده و پس از تنظیم غلظت هر دو کشت بر روی $OD_{600}=0.6$ به نسبت مساوی با هم مخلوط و به برگهای توتون تزریق شد. با آبی شدن برگهای تزریق شده با سازه یک+سازه دو و عدم مشاهده رنگ در برگهای تزریق شده با سازه یک یا سازه دو اختصاصی بودن بیان بذری این پیشبر تایید شد. نتایج نشان داد که فاکتور رونویسی LEC2 با شناسایی توالی‌های خاص در بالادست ژنهای بذری سبب بیان ژنهای پایین دستی می‌شود. از اینرو این تحقیق پیشنهاد می‌کند که فاکتور رونویسی LEC2 به همراه روش آگروینفیلتریشن می‌تواند به عنوان ابزاری کارا و سریع در تایید قطعاتی که بالقوه به عنوان پیشبر بذری جداسازی می‌شوند، استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

آگروواینفیلتریشن،
بررسی پیشبر،
پیشبر بذری،
LEC2

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

مقدمه

پیشبرها دارای انواع متفاوتی هستند. مفیدترین پیشبرها در مهندسی ژنتیک آن‌هایی هستند که در بافت خاص و مرحله یا مراحل رشدی خاصی در گیاه فعال می‌شوند. تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های بذری در گونه‌های گیاهی مختلف شناسایی شده و پیشبر مربوط به آنها منجر به شناسایی عناصر فعال سیس (Cis-acting) و عناصر فعال ترانس (Trans-acting) درگیر در بیان ژن شده است. پیشبرهای مختص بذر در مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخته به منظور افزایش تولید ترکیبات دارویی یا صنعتی و همچنین برای افزایش کیفیت تغذیه ای دانه استفاده می‌شود (SabooriRobat *et al.*, 2017).

فاکتورهای رونویسی یکی از عوامل اصلی دخیل در افزایش/کاهش و یا بیان/عدم بیان یک ژن در یک بافت خاص هستند. اختصاصی بودن بیان ژن‌های گیاهی در یک بافت خاص بستگی به وجود همین فاکتورهای رونویسی دارد. فاکتورهای رونویسی که پلی‌مراز II را فعال می‌کنند، قادر به اتصال به نواحی متنوعی در پایین یا بالا دست محل شروع رونویسی (Transcription Start Site یا TSS) هستند. وقتی این نواحی نزدیک (±۱۰۰bp) به نقطه TSS باشند، به عنوان پیشبرهای مجاور و پایین دست طبقه‌بندی می‌شوند. در حالی‌که اگر این فاصله زیاد باشد (بین ±۱۰۰bp تا ±۱۰۰۰۰bp) به عنوان عنصر افزایش‌دهنده (Enhancer) پایین دست/بالادست خوانده می‌شوند. تاکنون توافقی در مورد حداقل یا حداکثر فاصله نوکلئوتیدی بین محل اتصال فاکتور رونویسی و ناحیه TSS (که فاکتوررونویسی آن را کنترل می‌کند) صورت نگرفته است. این فاصله عمدتا وابسته به ساختار سه بعدی کروماتین است (Carlberg *et al.*, 2016)

ژن *LEC2* (Leafy Cotyledon2) نقش‌های تنظیمی بسیار مهمی هم در مراحل اولیه و هم در مراحل انتهایی توسعه جنین در گیاه آرابیدوپسیس دارد (Sandra *et al.*, 2001). فاکتور رونویسی LEC2 جدا شده از آرابیدوپسیس باعث بیان ژن‌های پروتئین بذری این گیاه شده و نقش کلیدی در جنین‌زایی سوماتیکی و رسیدگی بذور آرابیدوپسیس ایفا می‌کند (Sandra *et al.*, 2007). همچنین ژن *LEC2* از کرچک نیز جدا شده و بیان (Ectopic) این ژن در آرابیدوپسیس نیز باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب و در نتیجه تشکیل بیشتر اندامک‌های روغنی در آرابیدوپسیس‌های تراریخته شده است (Hyun *et al.*, 2013).

از انتقال موقت ژن‌ها در مهندسی ژنتیک اهداف متنوعی دنبال می‌شود. یکی از این اهداف ارزیابی سریع سازه‌های ژنی است (Nishiuchi *et al.*, 2004). انتقال موقت ژن فاکتور رونویسی LEC2 به برگ‌های توتون به همراه ژن‌هایی که در بالادست‌شان پیشبرهای بذری داشتند نشان داد که آگروباینفیلتراسیون همزمان این فاکتور رونویسی به همراه سازه‌ای که ژن‌های مسیر ساخت امگا۳ را دارد (همه‌ی ژن‌ها دارای پیشبرهای بذری بودند) منجر به ساخت دو اسید چرب دوکوزاهگزائنوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتائنوییک اسید (EPA) در برگ‌های تزریق شده می‌شود (James *et al.*, 2010). همچنین آن‌ها نتیجه گرفتند که می‌توان از این سیستم به عنوان یک روش قابل اطمینان برای یک هدف اساسی بهره گرفت آنهم اینکه از این ژن می‌توان جهت آنالیز صحت ساخت سازه‌هایی که دارای پیشبرهای بذری هستند قبل از شروع فرآیندهای زمانبر انتقال دائم بهره برد (James *et al.*, 2010).

هدف این پژوهش این است که با استفاده از یک سیستم ساده و سریع، بیان اختصاصی پیشبرهای بذری را با استفاده از روش بیان موقت و بهره گیری از ژن *LEC2* در برگ‌ها مورد ارزیابی قرار دهیم. بدین منظور از فاکتور رونویسی *LEC2* (که باعث القای بیان ژن‌های دارای پیشبر بذری می‌شود) و آگروباینفیلتریشن (جهت انتقال موقت سازه‌های ژنی) جهت اثبات اختصاصی بودن بیان بذری پیشبر ژن *FAD2-1* که برای اولین بار از گلرنگ جدا شده، استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در اولین گام به منظور جداسازی و مشخصه‌یابی توالی تنظیمی ژن *FAD2-1* کتابخانه Genome walker ساخته شد. این روش یکی از روش‌های مهم برای شناسایی ناحیه ژنومی ناشناخته

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

اطراف یک ناحیه شناخته‌شده مبنی بر استفاده از آنزیم‌های برشی و اتصال آداپتور است. در این روش ابتدا DNA ژنومیک استخراج شده از گیاه گلرنگ توسط آنزیم‌های محدودگر مورد برش قرار گرفته و سپس به آداپتورها برای ساخت کتابخانه ژنومی متصل می‌شود. نهایتا تکثیر پیشبر برای ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ناحیه ابتدایی ژن (اگزون اول) و آغازگرهای مبتنی بر آداپتور صورت می‌گیرد. مراحل این روش مبتنی بر ساخت کتابخانه‌ای از DNA برش خورده و اتصال به آداپتور و سپس تکثیر توالی است (Khakdan *et al*., 2017).

استخراج DNA ژنومی: به منظور استخراج DNA ژنومی با کیفیت از برگ‌های جوان گلرنگ با استفاده از کیت کیاژن استخراج شد. کیفیت DNA نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای تعیین کمیت از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

برش DNA ژنومی: برای ساخت کتابخانه‌ای از DNA برش خورده به کمک آنزیم برشی *Eco*RI برای ایجاد انتهای چسبنده در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس برای تایید برش حاصله از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. خالص‌سازی DNA برش خورده نیز با استفاده از کیت (شرکت ترموفیشر) و براساس دستورالعمل مربوط انجام شد.

آداپتور دو رشته‌ای با توالی $3'H_2N$ CCCGACCAAATT-$5'$ و 5'-ACTATAGTGACTGCTGGTCGAGGGCCCGGGCTGGT-$3'$ به DNA برش‌خورده متصل شد. لازم به ذکر است که از آنجایی‌که انتهای آداپتور کوچکتر فاقد OH است لذا هیچ‌گونه اتصال آداپتوری صورت نمی‌پذیرد. بدین منظور برای یک واکنش ۱۵ میکرولیتری از DNA ژنومیک برش خورده (150ng) مقدار ۶ میکرولیتر، آنزیم T4 لیگاز (10 units/µl) به مقدار ۱ میکرولیتر، بافر آنزیم ۲ میکرولیتر و از آداپتور (10pmol) مقدار ۸ میکرولیتر برداشته و سپس به مدت ۱۶–۱۸ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی مدت زمان ذکر شده ابتدا تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و در پایان به حجم ۷۰ میکرولیتر رسانیده و در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در این مرحله از DNA متصل به آداپتور به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول از آداپتور آغازگر به عنوان آغازگر برگشت و آغازگرهای اختصاصی به عنوان آغازگر رفت استفاده شد. مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی است که از رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۳۰ محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله اول به عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ۲ به عنوان آغازگر رفت، آداپتور آغازگر به عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. توالی آغازگرهای آشیانه‌ای مورد استفاده به ترتیب به صورت زیر بود:

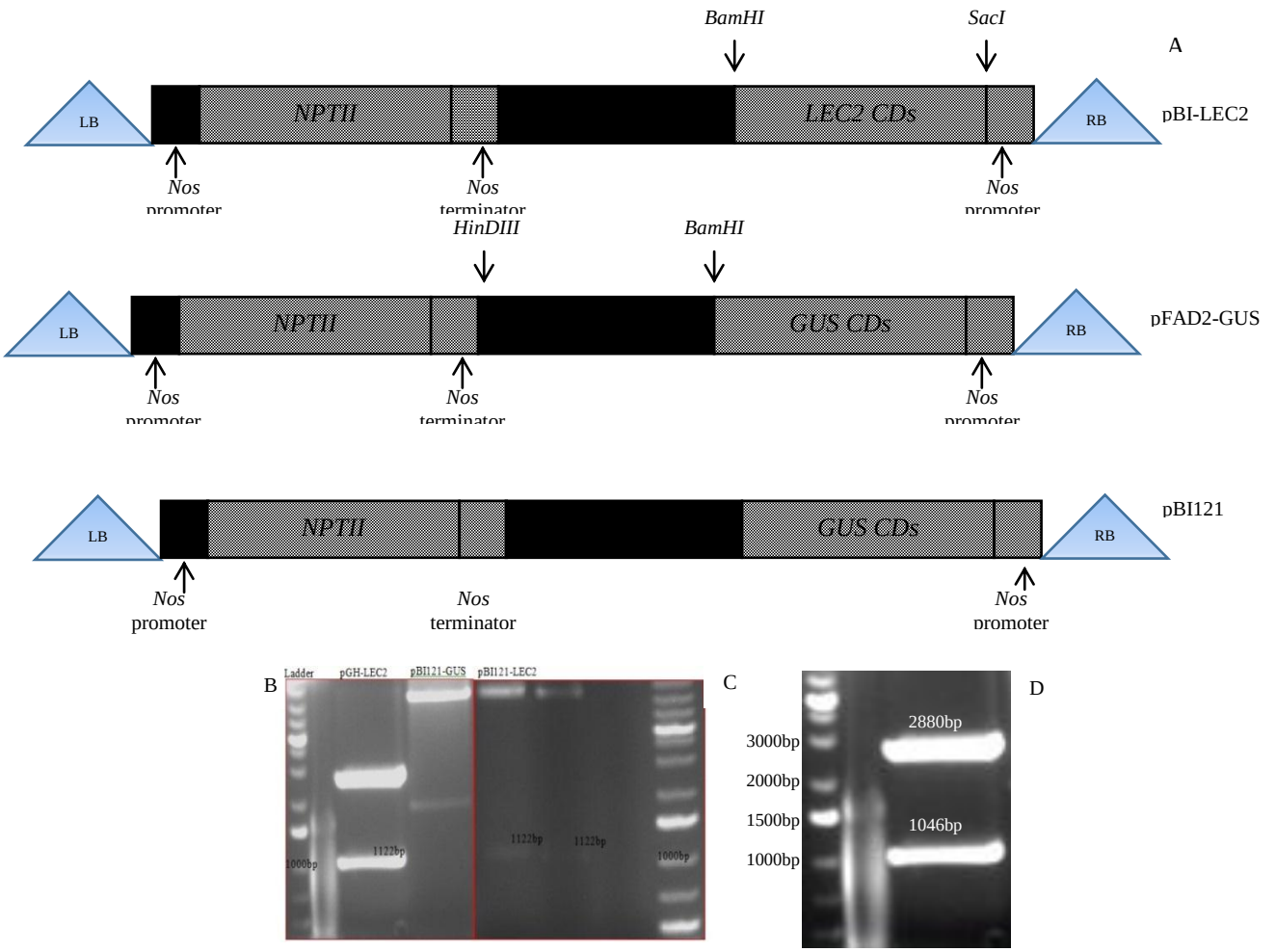
Fad2-1R:CAGCTTTGGTCTCGGAGGCAGACATAC

و Fad2-1L: CCCTCCTCCTCCCATCTTGCTTTCAAC

همسانه‌سازی در T/A vector : محصولات تکثیرشده حاصل از واکنش PCR دوم در ناقل کلونینگ pTG19-T PCR cloning vector شرکت ویوانتیس همسانه‌سازی شدند.

ساخت سازه های نهایی pBI-LEC2 و pFAD-GUS: جهت ساخت سازه pBI-LEC2، برش پلاسمید pGH-LEC2 که حاوی قطعه سنتز شده LEC2 به طول ۱۱۲۲جفت باز است به همراه پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Bam*HI-*Sac*I انجام شد (شکل ۱). پس از به دست آوردن قطعه ۱۱۲۲ جفت بازی و pBI121 خطی شده و فاقد GUS، اتصال بین قطعه LEC2 و پلاسمید با استفاده از T_4DNA ligase انجام شد و سازه حاصل pBI-LEC2 نامگذاری شد. جهت تایید حضور قطعه ۱۱۲۲ جفت بازی LEC2 در pBI-LEC2 از هضم آنزیمی *Bam*HI-*Sac*I استفاده شد. جهت ساخت سازه pFAD-GUS هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Hind*III-*Bam*HI انجام شد تا قطعه ۸۷۱ جفت بازی حاوی پیشبر CaMV35s از پلاسمید خارج شود. پلاسمید pTG19-pFAD نیز با *Hind*III-*Bam*HI برش یافته و قطعه ۱۰۴۶ جفت بازی حاوی پیشبر pFAD2-1 درون پلاسمید خطی شده pBI121 آماده شده در مرحله قبل کلون و با PCR تایید شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]



شکل ۱- طرح شماتیک (A) و تائید سازه‌های ژنی (B, C, D). برش پلاسمیدهای pGH-LEC2 (حاوی قطعه سنتز شده LEC2 به طول ۱۱۲۲جفت باز) و پلاسمید pBI121-GUS با آنزیم‌های *BamHI-SacI* جهت کلون قطعه ۱۱۲۲ جفت بازی LEC2 به جای ژن GUS(B)، تایید کلون قطعه ۱۱۲۲ جفت بازی LEC2 در pBI-LEC2 با آنزیم‌های *BamHI-SacI* (C) ، برش پلاسمید pTG19-pFAD با *Hind*III-*Bam*HI جهت کلون قطعه ۱۰۴۶ جفت بازی پیشبر pFAD2-1 به جای پیشبر 35s در pBI121 (D)

Figure 1- Final schematic figure (A) and confirmation of gene constructs (B,C,D). Digestion of pGH-LEC2 plasmid (including LEC2 synthesized fragment, 1122bp) and pBI121-GUS plasmid with *BamHI-SacI* for cloning of 1122bp LEC2 fragment instead of GUS gene (B), approving 1122bp LEC2 fragment in pBI121 with *BamHI-SacI* digestion (C). pTG19-pFAD digestion with *Hind*III-*Bam*HI for cloning of 1046bp pFAD2-1 promoter fragment instead of 35s in pBI121 (D)

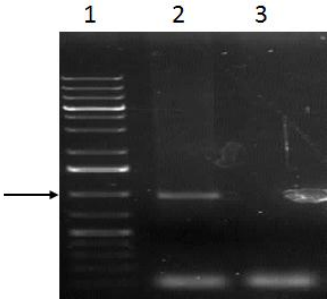
اینفیلتراسیون و آزمون سنجش GUS: آگروباکتریوم‌های (سویه EHA105) کشت شبانه در محیط LB مایع پس از رسیدن به OD=0.6 را رسوب داده و سپس به میزان حجم برابر در محیط اینفیلتراسیون (D-D-Glucose=5gr/L,MES=500mM, Na_2HPO_4=50mM, pH5) حل شده و با استفاده از سرنگ انسولین به برگ‌های جوان و شاداب توتون اینفیلتره گردید. سپس بعد از سه روز قرارگیری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قطعات برگی آماده سنجش GUS قرار گرفت. جهت آزمون سنجش GUS قطعات برگ‌های اینفیلتره شده به مدت ۲۴ساعت در محلول X-Gluc قرار گرفته و سپس به مدت سه روز جهت حذف رنگ سبز زمینه با اتانول مطلق شستشو شد.

نتایج و بحث

آنالیز بیوانفورماتیکی پیشبر ژن *FAD2-1*: ژن *FAD2-1* گیاه گلرنگ یکی از ۱۱ ایزوفرم ژن اسید چرب دساچوراز۲ است که

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

فقط در بذر گلرنگ بیان می‌شود (Cao *et al.*, 2013). توالی حاصل از توالی‌یابی قطعه جدا شده در بانک‌های اطلاعاتی PlantPan2.0, PlantCare و PLACE آنالیز شد (جدول۱). نتیجه آنالیز ما نشان داد که قطعه ۱۰۰۳bp (شکل ۲) شامل نقطه آغاز ترجمه (ATG) و عناصر پایه پیشبرها مانند جعبه CAAT (۴ تکرار) (Forde *et al.*,1985) و جعبه TATTA در محدوده ۴۵- تا ۵۰- می‌باشد. موتیف‌های مختص بذر مانند توالی‌های تکراری RY (Bob *et al.*,1995)، جعبه GATA (Milisavljević *et al.*, 2004)، موتیف SEF4 (Allen *et al.*,1989)، DOFCORE (Yanagisawa and Schmidt 1999) و EBOX (Stålberg *et al.*,1996) در این توالی نیز شناسایی شد. در جدول ۱ کارکرد سایر موتیف‌های شناسایی شده در توالی پیشبر ژن *FAD2-1* با استفاده از پایگاههای PlantPan2.0, PlantCare و PLACE آورده شده است.



شکل ۲- شناسایی پیشبر ژن *FAD2-1* گلرنگ. ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ،۲: تکثیر پیشبر ژن *FAD2-1* در دومین PCR ۳: تکثیر قطعات با استفاده از آداپتور متصل شده به DNA الگو در اولین PCR (به طور معمول اسمیر در ناحیه تکثیر شونده).

Figure 1- Identification of *FAD2-1* gene promoter from safflower. 1: 1kb DNA ladder (Fermentase company), e 2: *FAD2-1* gene promoter amplification in second PCR, 3: amplification of the fragments with DNA-adaptor sample in first PCR (usually as smear)

آنالیز قطعه ۱۰۰۳ جفت بازی در بانک‌های اطلاعاتی PlantPan2.0, PlantCare و PLACE نشان داد که این قطعه دارای عناصر پیشبرهای بذری است اما با توجه به اینکه این قطعه تنها ۱۰۰۳ جفت باز از بالادست ژن *FAD2-1* را شامل می‌شود، پس آنالیز کارکرد این قطعه در شرایط *In Vivo* نیز ضروری است. بر همین اساس انتقال موقت ژن *GUS* با قطعه ۱۰۰۳ جفت بازی (پیشبر بذری) به همراه فاکتور رونویسی LEC2 انجام شد تا در صورت بیان ژن *GUS*، بیان بذری قطعه ۱۰۰۳جفت بازی تایید گردد.

نتایج آزمون سنجش GUS : همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، پیشبرجدا شده دارای عناصر مورد نیاز برای بیان بذری ژن‌های پایین دست خود می‌باشد اما جهت اثبات کارکرد موثر این پیشبر، برگ‌های جوان توتون با سازه pFAD2-GUS (ژن GUS و پیشبر ژن *FAD2-1*) و سازه دوم pBI-LEC2 (ژن LEC2 و پیشبر 35S) به طور همزمان تزریق شد. پس از گذشت دو روز و حذف رنگ زمینه برگ با اتانول مطلق نواحی که رنگ آبی گرفته بودند ظاهر گردیدند. نتایج سنجش GUS نشان داد که فاکتور رونویسی LEC2 می‌تواند سبب بیان ژن‌هاای پایین‌دستی پیشبرهای بذری و بدنبال آن بیان ژن GUS شود. همانطور که در شکل۳ نیز مشاهده می‌شود قطعات برگ تزریق شده با این دو سازه (به صورت همزمان) سبب بیان ژن GUS شد در حالی‌که اینفیلتراسیون pFAD2-GUS به عنوان شاهدی مبنی بر عدم نشت پیشبر (Promoter leakage) در بافت برگی انجام گردید (Shah *et al.*, 2015). عدم بیان ژن GUS پس از اینفیلتره همزمان pFAD2-GUS این اطمینان را به ما داد که این پیشبر هیچگونه بیانی را در اندام برگی سبب نمی‌شود. این آزمون نشان داد که آگروانفیلتره کردن همزمان (Coinfiltration) برگ‌های جوان با دو نوع آگروباکتریوم (آنهایی که حامل ژن *LEC2* با پیشبر 35S هستند به همراه آنهایی که حامل پیشبر بذری با ژن GUS هستند) می‌تواند سبب بیان ژن GUS و آبی شدن برگ‌ها شوند. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان با احتمال زیاد در اولین گام به راحتی اختصاصیت بیان بذری یک پیشبر را بدون نیاز به انجام مراحل زمان‌بر انتقال دائم تا بذرگیری تنها در چند روز و با روشی بسیار آسان انجام داد.

مطالعات اولیه نشان داده است که فاکتور رونویسی LEC2 بیشترین شباهت را به فاکتورهای رونویسی ناحیه B3 که در مراحل اولیه توسعه بذور نقش دارند را داراست (Sandra *et al.*, 2001) بطوری‌که این ژن به طور مستقیم برنامه رونویسی درگیر در مرحله نموی رسیدگی دانه را کنترل می‌کند (Siobhan *et al.*, 2005). نتایج آزمایش‌های اتصال در سلول‌های مخمر و سنجش-های مربوط به انتقال تحرک الکتریکی نشان داد که فاکتور

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

رونویسی LEC2 به طور اختصاصی به عناصر RY متصل می‌شود (Che *et al.*, 2009). آنالیزهای بیوانفورماتیکی این تحقیق نیز وجود یک عنصر RY را در ناحیه ۲۷۰- تا ۲۷۶- قطعه جدا شده نشان می‌دهد.

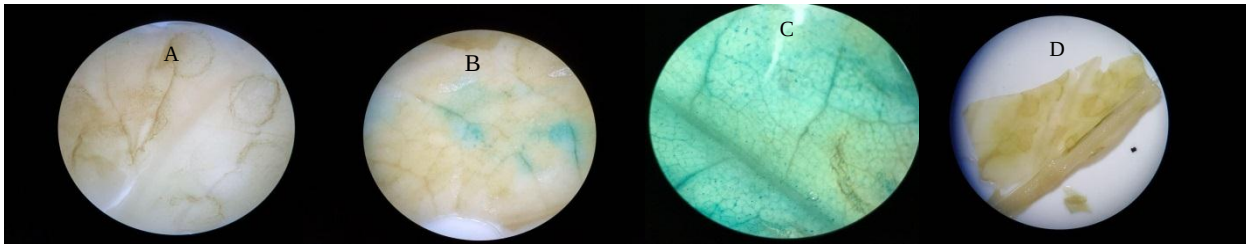
جدول۱- موتیف‌های مرتبط با بیان بذری، شناسایی شده در توالی پیشبر ژن *FAD2-1*

Table1- Identified motifs for seed expression from *FAD2-1* gene promoter sequence.

کارکرد موتیف	نام موتیف	توالی موتیف	تعداد	PUBMED ID
اجزای هسته مرکزی شروع رونویسی	TATABOX	TATTA		
موتیف بیان مختص بذر در ژن *napA*	RYREPEATBNNAPA	CATGCA	1	10480393 11029704
یکی از موتیف‌هایی است که در پیشبر باعث بیش بیان ناحیه پایین دست پیشبر گردیده، با نور تنظیم گردیده و در بیان مختص بافت نقش دارد. شکل گیری ساختار سه بعدی بین HvMYB3 و دیگر فاکتورها در کنترل رونویسی در بذور جو درگیرند.	GATABOX	GATA	8	2535536 2152164 2651885 12139008 15084732 16762033
توالی توافقی یافت شده در ناحیه‌ی '5 ژن بتا کانگلایسینین سویا که فقط در بذور سویا تولید می‌شود	SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	2	2535514 1893110
ناحیه مرکزی برای اتصال پروتئین‌های Dof ذرت. برخی از این پروتئین‌ها (مثل PBF) فقط در آندوسپرم بذر بیان دارند.	DOFCOREZM	AAAG	1	10074718 10758479
موتیف موجود در پیشبر پروتئین‌هایی که به صورت ترانس بر تولید پروتئین‌های مختص دیواره سلولی اثر می‌گذارند.	TAAAGSTKST1	TAAAG	6	11737782
	TATABOXOSPAL	TATTTAA	1	11971135
عنصر موقعیت II در ناحیه پیشبری ژن‌های سیتوکروم. محل اتصال دومین TCP و درگیر در بیان مختص مریستم و بساک	SITEIIATCYTC	TGGGCY	1	16113211 16760496
جعبه پریمیدینی که با القا توسط GA باعث تولید آلفا آمیلاز در لایه‌های آلورونی بذر می‌گردد.	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	2	9506846 12226491
موتیف دارای نقش در اختصاصیت بیان در اندام	ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	1	7581519
توالی مسئول برای فعالیت پیشبری مختص بافت ژن لگومین نخود	CAATBOX1	CAAT	4	2710102
درگیر در افزایش فعالیت بیانی ژن و اختصاصیت بیان ژن ZM13 در گرده ذرت	QELEMENTZMZM13	AGGTCA	1	9747811
موتیف ضروری برای اتصال GT-1 به جعبه II از rbcs. درگیر در مکانیسم کنترلی بیان ژن در یک سلول خاص	GT1CORE	GGTTAA	2	8955086
حذف این موتیف از پیشبر ژن *extA* منجر به بیان دائمی آن در تمام بافت‌ها گردید.	NRRBNEXTA	TAGTGGAT	1	9687071
موتیف E-box ژن پروتئین ذخیره‌ای در *Brassica napus*	EBOXBNNAPA	CANNTG	2	8818291 15821875
یکی از موتیف‌های القا شونده با نور	SORLIP1AT	GCCAC	1	16284311 14681527
یکی از دو عنصر تنظیمی وابسته به هم برای فعالیت اختصاصی ژن *lat52* در گرده گوجه	POLLEN1LELAT52	AGAAA	2	9678581 14976239
عنصر مورد نیاز برای بیان مختص بافت و القا با اکسین	NTBBF1ARROLB	ACTTTA	1	10072394

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]



شکل۳- سنجش GUS در برگ‌های تزریق شده. برگ‌هایی که با سازه‌ی pFAD2-GUS اینفیلتره شدند (A)، برگ‌های که با سازه pFAD2-GUS +pBI-LEC2 تزریق شدند (B)، برگهایی که با سازه pBI121 تزریق شدند (C) و برگ‌های که با آب تزریق شده اند (D)

Figure 3- GUS assay in infiltrated leaf. Infiltrated leaf with pFAD2-GUS construction (A), Infiltrated leaf with pFAD2-GUS +pBI-LEC2 (B) infiltrated leaf with pBI121 (C) and infiltrated leaf with water (D)

استفاده از فاکتور رونویسی LEC2 در آنالیز مسیرهای متابولیکی حاوی چندین ژن، قبل از انجام مراحل طولانی مدت انتقال دائم قبلا گزارش شده است (James *et al.*, 2010). جیمز و همکاران ۲۰۱۰ از این فاکتور رونویسی برای ارزیابی سازه پنج ژنی (حاوی پیشبرهای بذری) خود که آنزیم‌های جدیدی برای مسیر ساخت اسیدهای چرب زنجیره بلند را کد می‌کردند، استفاده کردند (James *et al.*, 2010). آنان نشان دادند که بیان موقت سازه آنها به همراه ژن LEC2 می‌تواند سبب ساخت اسیدهای چرب زنجیره بلند جدید در برگ‌های توتون شود.

روش متداول تعیین اختصاصیت بیان بذری یک قطعه جدا شده این است که پس از توالی‌یابی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی (جدول۱)، این قطعه در بالادست یک ژن نشانگر مثل GUS قرار گرفته و سپس به یک گیاه مدل انتقال داده شده و در نهایت سنجش GUS در اندام مختلف و بذور نسل F1 تراژن انجام شود. یکی از معایب اصلی این روش زمانبر بودن فرآیند انتقال سازه‌ی فوق تا نسل F1 است. همچنین در این روش ارزیابی قابلیت بیان بذری یک قطعه صرفا به یک گیاه مدل محدود بوده در حالی‌که معمولا کاربرد این پیشبرهای بذری در مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخته به منظور افزایش تولید ترکیبات دارویی یا صنعتی و همچنین برای افزایش کیفیت تغذیه‌ای دانه است (SabooriRobat et al., 2017). باید به این نکته نیز توجه داشت که فرآیند ارزیابی توانایی ایفای نقش صحیح یک پیشبر بذری در گیاهان زراعی بدلیل مشکلات مربوط به انتقال ژن و نسل‌گیری بسیار مشکل است (Shah *et al.*, 2015). به نظر می‌رسد که بیان موقت این فاکتور رونویسی به همراه سازه حاوی قطعه مورد نظر تحت شرایطی می‌تواند سبب حذف محدودیت‌های آنالیز قطعات با بیان بالقوه بذری چه در گیاهان مدل و چه در گیاهان زراعی شود هرچند که قابلیت و کارایی این روش برای مورد دوم نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. از اینرو نتایج ما برای اولین بار نشان داد که با اطمینان بالایی می‌توان از این فاکتور رونویسی برای بررسی صحت کارکرد موثر پیشبرهای بذری بالقوه که از ژنوم گیاهان استخراج می‌شوند قابل استفاده کرد.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران-کرج به جهت در اختیار نهادن امکانات و بودجه این تحقیق و همچنین از آقای دکتر هوشنگ علیزاده عضو هیئت علمی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به جهت در اختیار قرار دادن برخی مواد ساخت کتابخانه ژنومی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Allen, R. D., F. Bernier, P. A. Lessard and R. N. Beachy. 1989. Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. The Plant Cell 1(6): 623-631.

Bobb, A. J., H. G. Eiben and M. M. Bustos. 1995. PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

and phytohemagglutinin promoters. The Plant Journal 8(3): 331-343.

Cao, S., X. Rong, C. C Wood, A. G Green, S. P Singh, L. Liu and Q. Liu. 2013. A large and functionally diverse family of FAD2 genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). BMC Plant Biology 13:5.

Carlberg, C. and F. Molnár. 2016. Mechanisms of Gene Regulation. Springer Press pp 57-73.

Che, N. Y., Y. Yang, L. YanDong, W. LiLi, H. Ping, G. Yin and A. ChengCai. 2009. Efficient LEC2 activation of OLEOSIN expression requires two neighboring RY elements on its promoter. Science China Series C-Life Science 52(9):854-863.

Forde, B., A. Heyworth, J. Pywell and M. Kreis. 1985. Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. Nucleic Acids Research 13(20): 7327-7339.

Hyun, U. K., J. Su-Jin, L. Kyeong-Ryeol, K. Eun-Ha, L. Sang-Min, R. Kyung-Hee and J. B. Kim. 2013. Ectopic overexpression of castor bean LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) in Arabidopsis triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues. Federation of European Biochemical Sciences Open Biology 4:25-32.

James, R. P., P. Shrestha1, Q. Liu, M. P. Mansour, C. C. Wood, X. Zhou, P. D. Nichols, A. G. Green and S. P. Singh. 2010. Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. Plant Methods 6:8.

Khakdan F, AhmadiShahriari F, Ranjbar M, Bagheri AR and Alizadeh H. 2017. Study of gene expression pattern of chavicole o-methyl transferase gene (CVOMTs), sequencing and caracterization of promoter of CVMOTs gene of basil (*Ocimum basilicum*) under water deficit stress. Modern Genetic Journal 12, 1-10 (In Farsi with English abstract)

Milisavljević, M., M. Konstantinović, J. Brkljačić and V. Maksimović. 2004. Cloning and computer analysis of the promoter region of the legumin-like storage protein gene from buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. Archives of Biological Sciences 56: 1-7.

Nishiuchi, T., H. Shinshi and K. Suzuki. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves possible involvment of NtWRKYs and autorepression. Journal of Biological Chemistry 279(53): 55355-55361.

SabooriRobat E, Habashi AA, Solouki M, Mohsenpour M, Emamjomeh A. 2017. Identification, isolation and sequence analysis of a β-Conglycinin seed specific promoter. Genetic Engineering and Biosafety Journal 5:2 187-196.

Sandra, L. S., W. K. Linda, M. Y. Kelly, P. Julie, L. Loï¨c, L. F. Robert, B. G. Robert and John J. H. 2001. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. Proceeding og the National Academy of Science 98(20):11806-11811.

Sandra, L. S., A. B. Siobhan, L. P. Stephanie, W. K. Linda, M. Jonathan, P. Julie, H. Tzung-Fu, L. F. Robert, B. G. Robert and J. H. John. 2007. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. Proceeding og the National Academyy of Science 105(08):3151-3156.

Shah, S. H., S. A. Jan, N. Ahmad, S. U. Khan, T. Kumar, A. Igbal, F. Nasir, M. Noman,U. Ali and A. Ali. 2015. Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future prospectives. American-Eurasian Journal of Agricultural and Enviromental Science 15(4):664-675.

Siobhan, A. B., S. L. Stone, S. Park, A. Q. Bui, B. H. Le, R. L. Fischer, R. B. Goldberg and J. J. Harada. 2005. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. Proceeding of the National Academyy of Science 103(9):3468-3473.

Stålberg, K., M. Ellerstöm, I. Ezcurra, S. Ablov and L. Rask. 1996. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. Planta 199 (4): 515-519.

Yangisawa, S and Schmidt RJ. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. The Plant Journal 17(2):209-14.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

Rapid assessment of seed promoters in leaves by using LEC2 transcriptional factor

Mohammad Afshar Shandiz[1,2], Hassan Rahnama[*1], Hossein Azarnivand[2]

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran; Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
2. Department of Natural Resource and Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

*Corresponding Author Email: hrahnama@abrii.ac.ir

LEC2 as a transcriptional factor attaches to seed-specific promoters and induces the expression of downstream genes. Analysis of permanent gene transfer in plants is time-consuming and has long process. Using this transcription factor along with the agroinfiltration method can reduce significantly the time of seed specific promoter evaluation. In this research, seed specificity of *FAD2-1* promoter, isolated from safflower plants, was studied by *GUS* expression analysis in tobacco leaves. *Fad2*-1 promoter sequence analysis indicated that this promoter is containing essential elements for seed-specific function. For analyzing *FAD2-1* promoter function, we constructed two gene cassettes: pFAD2-GUS (*GUS* gene under the control of *FAD2-1* promoter) and pBI-LEC2 (LEC2 gene under the control of CaMV35S promoter). These cassettes were cloned in pBI121 vector and transferred to *Agrobacteriun tumefacience* EHA105, separately. For seed-specific function analysis of *FAD2-1* promoter in tobacco leaves, the overnight culture of Agrobacteriums were adjusted to OD_{600}=0.6, mixed equally and then used to infiltrate into tobacco leaves. GUS assay analysis of infiltrated leaves indicated the specific expression of the reporter gene (*GUS*). Therefore, *FAD2*-1 promoter is suggested as a seed specific promoter. Our results suggest that LEC2 along with agroinfiltration method can use as a rapid and confident tool for verifying seed specific expression of any seed-specific promoters.

Key words: Agroinfilteration, promoter analysis, seed promoter, LEC2

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.2.3]