

غربالگری موتاسیونی آراییدوپسیس ترا ریخته در مسیر ژنتیک فعالیت

نواھی کنترلی ڙن متالو تاپونین جو

سعید نواب پور^۱* و حسین صبوری^۲

- ۱- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
 - ۲- استادیار، گوه؛ اعت و اصلاح نباتات دانشگاه گند

* نویسنده مسئول مکاتبات، سمت الکتر و نیک: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

جگده

واژه‌های کلیدی

جو زراعی
نوترون پرسرعت
موتاسیون
بیشبر متالو تاینین
ڈن گاس

به منظور بررسی تغییرات عوامل انتقال پیام در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین جو از روش غربالگری موتابیونی استفاده شد. با شناسایی ناچیه پیشبر ژن مزبور در گیاه جو و ترکیب آن با ژن گزارشگر گاس، انتقال ترکیب حاصل به گیاه مدل آراییدوپسیس صورت گرفت. بدئور M₀ تواریخته حاصله توسط ۴ دوز (۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ واحد) نوترون پرسرعت بمباران شدند. بر اساس نتایج آماری در یک طرح کاملاً تصادفی ترکیب شیمیابی تری آمینوترایزول (3-AT) در غلظت ۲۰ میلی مولار به عنوان بهترین محرك فعالیت ژن گاس (پیشبر متالوتایونین) شناسایی شد. گیاهچه های نسل ۲۸ M₂ ساخت پس از محلول پاشی با 3-AT ۲۰ میلی مولار برای تفرق نسبت ۳ به ۱ بیان ژن گاس با کمک روش سنجش بیوشیمیابی پروتئین گاس ارزیابی شدند. از مدل ممانتع که نسبت ۷۵ درصد بیان گاس و ۲۵ درصد عدم بیان را شامل می شد، جهت شناسایی عوامل کنترلی استفاده شد. طی چندین نوبت ارزیابی تعداد ۳۰ گیاهچه ۱۵۰۰ لاین جهیده M₂ بررسی شد. در نهایت ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسب برای جهیده مورد نظر در مسیر فعالیت پیشبر مزبور معرفی شد. ترکیب لاین های کاندید شامل ۳، ۹، ۵ و ۳ بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای ۳۰، ۲۰، ۰ و ۴۰ واحد نوترون پرسرعت بودند. لاین های مزبور جهت بررسی دقیق تر با استفاده از روش طیف سنجی فعالیت پروتئین گاس مورد ارزیابی قرار گرفته و به عنوان جهیده های احتمالی در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین جهت انجام پژوهش های بعدی معرفی شدند.

مقدمه

ژن‌های گزارشگر^۶ بسیار مفید و مؤثر است (Fukuzawa *et al.* 2004).

معرفی جهیده‌های *cpr1* و *npr1* آراییدوپسیس که با استفاده از پیشبر ژن *PRla* که با ژن گزارشگر *gus* ترکیب شده بودند، از Cao *et al.* 1994; Glazebrook 1997 مانع بیان ژن مقاومت PR به عامل بیماری زا شده و افزایش حساسیت به بیماری را موجب می‌شود. در مقابل جهیده *cpr1* با تداوم بیان پروتئین PR مقاومت پایداری را ایجاد می‌کند. استفاده از جهیده‌های مزبور منجر به معرفی مسیرهای کترل ژنتیک توسط اسید سالیسیک به عنوان یک عامل انتقال پیام شد (OLD and Primrose 1994; Pieterse and Van Loon 1999). در این پژوهش پیشبر ژن متالوتاییونین در گیاه جو شناسایی و پس از همسانه سازی ضمن ترکیب با ژن گزارشگر *gus*، به گیاه مدل آراییدوپسیس منتقل شد. بذور جهیده M2 به منظور یافتن نسبت جهشی^۷ به ۱ (برای بیان و عدم بیان *gus*) در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر مزبور ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

بذور M₀ گیاهان تراریخته آراییدوپسیس (رقم کلمبیا) واجد پیشبر متالوتاییونین ترکیب شده با ژن گزارشگر گاس توسط چهار دوز نوترон پرسرعت (d)، پرتوتابی شدنند. دوزهای اعمال شده شامل ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گری^۸ بود. با کشت بذور M₀ در شرایط اتاق رشد کترل شده، بذور M₁ برداشت و پس از آن بذور M₁ جداگانه کشت و بذور M₂ به طور جداگانه برداشت شدند. با ارزیابی تصادفی گیاهان M₂ از تأثیر پرتوتابی در بروز جهش اطمینان حاصل شد. بازه‌ای از عوامل شیمیایی احتمالی فعال کننده پیشبر متالوتاییونین (بیان ژن گاس) مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت ترکیب تری آمینوتراپیزول (3-AT) به عنوان بهترین محرك شناسایی شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی مولار مورد استفاده قرار گفت. با انجام یک سری آزمایش‌های تکرار دار و تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد نتایج حاصل از اثر (3-AT) بر بیان

گروه ژن‌های متالوتاییونین (MTs) رمز کننده پروتئین‌های با خصوصیاتی چون وزن مولکولی پائین، غنی از اسید آمینه سیستئین، وفور در محیط سلولی و اغلب اندامکها و وجود یک Colye یا چند ناحیه حساس در واکنش به یون‌های فلزی هستند (Cobbett Goldsbrough. 2002; Zhou *et al.* 2005). از حدود ۵۰ سال گذشته که متالوتاییونین از کلیه موجودات مختلف پست و عالی شناسایی شده‌اند (Chatthai *et al.* 2004; Liu *et al.* 2000). تقسیم‌بندی‌های متفاوتی بر اساس ساختمان و نوع فعالیت این چرخه از صورت گرفته است (Akashi *et al.* 2004; Wong *et al.* 2004) در عین حال شواهد انکار ناپذیری دال بر نقش این ژن در کمک به بقای سلول در مرحله پیری به منظور امکان انتقال مواد و ماکرومولکول‌ها به اندام‌های ذخیره‌ای بهویژه دانه گزارش شده است (Navabpour *et al.* 2003). بررسی نواحی ژن متالوتاییونین در برخی موجودات از جمله انسان، موش، مخمر و آراییدوپسیس با ژن گزارشگر گاس *et al.* 2003; Navabpour *et al.* 2003; Wong *et al.* 2004). Haq *et al.* 2004

استفاده از غربالگری جهشی یک روش قوی جهت شناسایی و در پی آن همسانه کردن ژن یا گروهی از ژن‌ها که در سطح پیش رونویسی^۹ فعالیت می‌کنند، است. در اساس در بیشتر موارد امکان شناسایی ژن‌هایی که به عنوان عوامل انتقال پیام^{۱۰} یا عوامل رونویسی^{۱۱} عمل می‌کنند، با استفاده از روش‌های مرسوم مولکولی مثل روش شناسایی تفرقی^{۱۲} یا دورگسازی کاهشی^{۱۳} وجود ندارد (Hsing *et al.* 2007; Lee *et al.* 2005). در عین حال روش غربالگری موتاسیونی معمولاً روشی طولانی و وقت‌گیر است، به منظور افزایش کارآیی و سرعت عمل در این روش استفاده از

1 -Pre-transcription

2 -Signaling factors

3 -Transcription factors

4 -Differential screen

5 -Subtractive hybridization

6 -Reporter gene markers
7 -Pathogen resistance
8 -Grays

سانتریفیوژ شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول فوکانی برداشت و با ۴۴ میکرولیتر بافر سنجش گاس به خوبی مخلوط شد. واکنش با افزودن مقدار ۵۰ میکرولیتر متیل آمیلی فریل گلوکورناید (MUG) (MUG) ۱۰ mM آغاز شد. توضیح اینکه ترکیب MUG بوسیله فعالیت آنزیم ژن گاس به MU و X-Gluc تجزیه می‌شود. ترکیب MU یک ماده فلورسنت بوده و توسط فلورسنت اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بالا بودن میزان MU نشان دهنده فعالیت بالاتر گاس بوده که به نوبه خود نشانه فعالیت پیشبر متالوتایونین است. میزان جذب براساس طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر توسط Prink Elmer 3000 Fluorescence (Spectrometer) اندازه گیری شد. نتایج بر حسب منحنی استاندارد بر حسب واحد (nmoles MU/min/mg protein) تنظیم شد.

نتایج و بحث

تعداد ۳۰ گیاهچه از حدود ۱۵۰۰ لاین M_2 با استفاده از روش سنجش بیوشیمیابی گاس برای نسبت ۳ به ۱ (فعالیت و عدم بیان ژن گاس) ارزیابی شد. از مدل ممانعت (Inhibition Model) در جهت شناسایی جهیده‌های مورد نظر استفاده شد (شکل ۱). نتایج بررسی آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور تعیین بهترین سطح غلظت (3-Amino-1,2,4-Triazole) ۳-AT در دو شرایط اتفاق رشد (A: 22 ± 2 درجه سلسیوس و B: 22 ± 2 درجه سلسیوس) نشان داد که غلظت ۲۰ میلی مولار در شرایط A بهترین و یکنواخت‌ترین نتایج را برای القاء فعالیت پیشبر متالوتایونین فراهم می‌آورد. ترکیب ۳-AT به عنوان یک محدود کننده فعالیت آنزیم کاتالاز معرفی شده است (Sanchez-Casas and Klessig 1994). آنزیم کاتالاز در فرآیند احیا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به آب و اکسیژن نقش مهمی دارد (Kindle 1982). بر این اساس به نظر می‌رسد کنترل سطح H_2O_2 در روند تحریک فعالیت گاس و به بیان دقیق‌تر القای فعالیت پیشبر متالوتایونین، نقشی کلیدی دارد. در روند انجام غربالگری به منظور افزایش دقت، لاین‌های جهیده‌ای که شانس احتمالی داشتند طی ۴ مرحله ارزیابی شدند و در نهایت تعداد ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسبی برای داشتن جهیده دلخواه در مسیر فعالیت پیشبر متالوتایونین شناسایی شد. ترکیب تعداد لاین‌های کاندید شامل ۳، ۴، ۵ و ۳ بود که به ترتیب

گاس در گیاه کامل شباهت قابل توجهی به روند بیان آن در گیاهچه‌های مربوطه دارد، بر این اساس به منظور سرعت عمل بیشتر از گیاهچه‌های نسل M_2 استفاده شد. تعداد ۳۰ گیاهچه ۲۰ روز پس از کشت، توسط محلول پاشی AT-3 با غلظت ۲۰ میلی مولار تیمار شد. میزان فعالیت ژن گاس ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی توسط روش بیوشیمیابی برای نسبت ۳ به ۱ (بیان و عدم بیان گاس) ارزیابی شد.

سنجدش بیوشیمیابی فعالیت گاس^۹

نمونه‌های برگ به طور جداگانه در محلول بافر X-Gluc (باfer Fسفات سدیم ۵۰ mM، $1mM$ X-Gluc، $100X$ -تیریتون، فریسیاناید پتاسیم ۴ mM و کلروم فنیک $100g/mL$) قرار گرفت. در همین وضعیت به مدت ۴ دقیقه اینفیلتر^{۱۰} شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس بافر حذف شد و اتانول مطلق به منظور از بین بردن رنگ سبز برگ‌ها جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت اتانول حذف و گلیسرول ۵۰٪ جایگزین شد و در نهایت میزان فعالیت گاس (میزان رنگ آبی ظاهر شده) با لنز بزرگ‌نما بررسی شد. هم‌چنین در صد سلول‌های مرده نیز به وسیله میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت مارکر گاس ژن^{۱۱}

سنجدش میزان فعالیت آنژیمی ژن گاس که نشان دهنده میزان فعالیت پیشبر متالوتایونین است، توسط روش جفرسون و همکاران (Jefferson et al. 1987) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد.

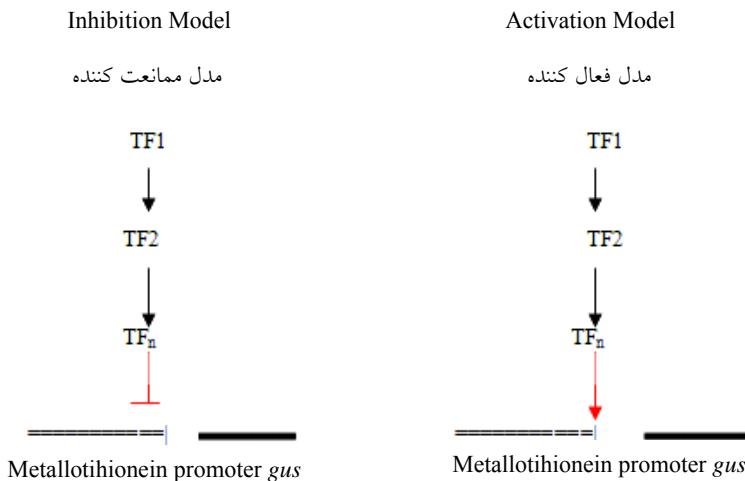
نمونه کوچک بافت برگ گیاه کامل جهیده‌های (M_2) کاندید (انتخابی با استفاده از سنجش بیوشیمیابی) برداشت و میزان ۵۰۰ mM میکرولیتر بافر سنجش گاس (باfer سدیم $50mM$ (pH=۷/۲)، $10EDTA$ ، $10Sarkozil$ ^{۱۲} درصد، تیریتون ۱۰۰ بار ۱/۰ درصد، $10mM$ اضافه و به طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط هموژنیزه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه

9 - Histochemical analysis

10 - In filter

11 - Fluorometric analysis of β -glucuronidase activity

12 - Sarcosyl



شکل ۱- مدل‌های فرضی روش ارزیابی فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین. در مدل ممانعت (Inhibition Model) در آخرین مرحله با جلوگیری از ساخت عامل رونویسی بیان ژن رخ می‌دهد و در مدل فعال کننده (Activation Model) در مرحله آخر با ساخت عامل رونویسی فعالیت پیشبر محقق می‌شود.

Figure 1- Putative models for expression of metallothionein promoter. In the inhabitation model transcription changes result in lifting the repression and in activation model transcription changes that result in the activation.

مریبوط به اعمال تیمارهای با غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ واحد نوترن پرسرعت (d) بودند. لاین‌های مزبور برای انجام بررسی دقیق‌تر تا مرحله گیاه کامل با مقابله ویژه نگهداری شدند. در مرحله حداکثر رشد رویشی (آغاز گلدهی) با نمونه‌برداری از ۳۰ گیاه کامل هر لاین، طیف سنجی میزان MU صورت گرفت. نتایج مریبوط در جدول ۱ برای هر یک از ۲۰ لاین کاندید انتخابی ارائه شده است. چنانچه اشاره شد محدوده نسبت ۳ به ۱ برای بیان GUS (مقدار نسبتاً بالای MU) به عدم بیان (مقدار نسبتاً پایین MU) می‌تواند دلیل موجهی بر وقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک بیان ژن متالوتایونین تلقی شود.

تعداد ۵ جهیده که با علامت ستاره در جدول ۱ مشخص شده است با اطمینان آماری معنی‌داری ($\alpha=1\%$) نسبت ۳ به ۱ را برای میزان MU (فعالیت گاس) و عدم بیان گاس نشان می‌دهد. این مسئله نشانگر شناس بیشتر این جهیده‌ها برای وقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین است. بر این اساس جهیده‌های مزبور به نسل بعد برده شده و ارزیابی‌های انجام شده و یکنواختی نتایج به دست آمده نشان داد دو جهیده

غربالگری موتاسیونی آراییدوپسیس ترا ریخته در هسیر ژنتیک...

جدول ۱- میزان بیان ژن گاس (nmoles MU/min/mg protein) در جهیده های تراویخته نسل M₂ گیاه آرابیدوپسیس ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی، با AT-3 (۲۰ میلی مولار)

Table 1- Levels of GUS expression (nmoles MU/min/mg protein) in *Arabidopsis* M₂ Leaves 48 hour after sprayed by 3-AT (20 mM)

داده های پر رنگ نشان دهنده کاهش معنی دار بین گاوس (MU) است. d_{10} , d_{20} , d_{30} و d_{40} به ترتیب نشان دهنده دوز پرستایی بیوتون پر سرعت شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ واحد است.

عالیات ستاره بر روی جهیده‌های استخوابی که شناس پیشتری برای احرار نسبت ۳:۱ دارند درج شده است. مقادیر MU در دو شاهد منقی (آب) و مثبت (AT-3) بر روی گیاه ترا ریخته شاده

Bold digits show a significant decline in GUS expression (MU) d_{10} , d_{20} , d_{30} and d_{40} are dosage of fast neutron radiation correspondingly to 10, 20, 30 and 40 grays.

The star sign (*) show M₂ mutants that have more chance for 3:1 ratio. The amount of MU presented in negative control (water) and in positive control (3-AT) on non-disposal transgenic *Arabidopsis* plant in 2_{nd} and 3_{rd} column respectively.

منابع

1. Akashi K. Nishimura N. Ishida Y. Yokota A (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323: 72–78.
 2. Cao H. Bowling S.A. Gordon A.S. and Dong X.N (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired-resistance. *Plant Cell* 6: 1583–1592.
 3. Chatthai M. Osusky M. Osuska L. Yevtushenko D. Misra S (2004) Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco. *Planta* 220:118–128.
 4. Cobbett C. Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159–182.
 5. Coyle P. Philcox J.C. Carey L.C. Rofe A.M (2002) Metallothionein: the multipurpose Protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 627–647.
 6. Fukuzawa H. Yu L.H. Umeda-Hara C. Tagawa M. Uchimiya H (2004) The rice metallothionein gene promoter does not direct foreign gene expression in seed endosperm. *Plant Cell Report* 23: 231–235
 7. Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280–286.
 8. Haq F. Mahoney M. Koropatnick J (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533: 211–226.
 9. Hsing Y.I. Chern C.G. Fan M.J. Lu P.C. Chen K.T. Lo S.F. Sun P.K. Ho S.L. Lee K.W. Wang Y.C. Huang W.L. Ko S.S. Chen S. Chen J.L. Chung C.I. Lin Y.C. Hour A.L. Wang Y.W. Chang Y.C. Tsai M.W. Lin Y.S. Chen Y.C. Yen H.M. Li C.P. Wey C.K. Tseng C.S. Lai M.H. Huang S.C. Chen L.J. Yu S.M (2007) A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Molecular Biology Reporter* 63: 351–364.

10. Jefferson R.A. Kavanagh T.A. Bevan M.W (1987) GUS fusions:bglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
11. Kindle H. Lazarow (eds) P.B (1982) Peroxisomes and glyoxisomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 385: 1-550.
12. Lee J.Y. Levesque M. Benfey P.N (2005) High-throughput RNA isolation technologies. New tools for high-resolution gene expression profiling in plant systems. *Plant Physiology* 138: 585–590.
13. Liu J.Y. Lu T. Zhao N.M (2000) Classification and nomenclature of plant metallothionein-like proteins based on their cysteine arrangement patterns. *Acta Botanica Sinica* 42:649–652.
14. Lü S. Gu H. Yuan X. Wang X. Wu A.M. Qu L. Liu J.Y (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissuespecific and inducible expression in transgenic Arabidopsis. *Transgenic Research* 16: 177–191.
15. Navabpour S. Morris K. Allen R. Harrison E. Mackerness S. and Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence –enhanced genes in response to oxidative stress. *Experimental Botany* 54(391) :2285 -2292.
16. Obertello M. Wall L. Laplaze L. Nicole M. Auguy F. Gherbi H. Bogusz D. and Franche C (2007) Functional analysis of the metallothionein gene cgMT1 isolated from the actinorhizal tree Casuarina glauca. *Mol. Plant Microbe Interact* 20: 1231-1240.
17. OLD R.W. and Primrose S.B (1994) Principles of gene manipulation and introduction to genetic engineering P 474.
18. Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Sciences* 4: 52-58.
19. Ren Y. and Zhao J (2009) Functional analysis if the rice metallothionein gene OsMT2b promoter in transgenic Arabidopsis plants and rice germinated embryos. *Plant Sciences* 176: 528-538.
20. Sanchez-Casas P. and Klessig D.F (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology* 106: 1675-1679.
21. Vasak M. Hasler D (2000) Metallothioneins: new functional and structural insight. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 177–183.
22. Wong H.L. Sakamoto T. Kawasaki T. Umemura K. Shimamoto K (2004) Down-regulation of Metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* 135: 1447–1456.
23. Zhou G.K. Xu Y.F. Liu J.Y (2005) Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J. Plant Physiology* 162: 686–696.