مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۱۵۶-۱۴۹)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 149-156

تشدید بیان ژن توکوفرول سیکلاز (At.TC) در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.)

ناهید رعناییان [۱]، علیرضا عباسی [۲*] و حسن زینالی خانقاه [۳]
۱، دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی‌کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲، ۳، استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۴ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Overexpression Tochopherol Cyclase (At.TC) in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants

N. RAANAIAN[1], A. R. ABBASI[2*] AND H. ZEYNALI-KHANGHAH[3]
1, M.Sc. student of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran; 2, 3, Assistant Professor and Associated Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: May 4, 2013 - Accepted: Áugust 26, 2013)

چکیده

قرارگرفتن گیاهان در معرض تنش‌های زنده و غیر زنده منجر به القای تنش اکسیداتیو در آن‌ها می شود. مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های متفاوت در گیاهان افزایش‌یافته که این امر منجر به افزایش ظرفیت پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. ویتامین E شامل یک دسته از آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی است که سنتز این گروه از ویتامین‌ها محدود به ارگانیسم‌های فتوسنتزی شامل گیاهان، جلبک‌ها و بعضی سیانوباکترها است. در این تحقیق ناحیه کدکننده ژن توکوفرول‌سیکلاز آرابیدوپسیس (که تبدیل ۲و۳-دی متیل-۵-فیتیل-۱و۴- بنزوکوئینون را به گاما – توکوفرول کاتالیز می‌کند) وارد ناقل pBin گردید. سپس این سازه ژنی با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه توتون انتقال داده شد. برای تراریختی توتون از برگ‌های گیاهچه‌های ۳-۲ هفته‌ای به‌عنوان ریزنمونه و روش باززایی مستقیم استفاده شد. به‌منظور تأیید تراریختی از آزمون PCR و با توجه به اینکه سازه مورد استفاده دارای ژن مقاومت به کانامایسین است، از کشت بذور گیاهان تراریخت نسل اول در محیط دارای کانامایسین استفاده شد. سپس گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک حاصل به گلدان منتقل و با استفاده از آزمون PCR تراریختی گیاهان مجدداً تأیید گردید. به‌منظور بررسی اثر ژن روی پارامتر فیزیولوژیک محتوای آب نسبی، گیاهان تراریخته و شاهد در معرض تنش خشکی قرار گرفته و محتوای آب نسبی آن‌ها اندازه‌گیری شد. که نتایج نشان داد محتوای آب نسبی گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد کمتر کاهش یافته است.

واژه‌های کلیدی: تراریختی توتون، توکوفرول سیکلاز، آنتی‌اکسیدان، ویتامینE، استرس اکسیداتیو

Abstract

Exposing plants to both biotic and abiotic stresses could lead to increased reactive oxygen species and in turn could induce oxidative stress. In order to increase scavenging capacity of oxidative agents, the different plant antioxidant activities also are arising. Among those, vitamin E includes a group of Fat-soluble antioxidants, which their synthesis is limited to photosynthetic organisms including plants, alga and cyanobacteria. In this study, the coding region of Arabidopsis Tocopherol cyclase gene; which catalyzes 2,3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone (DMPBQ) into γ –tocopherol; was introduced into pBin vector containing the coding region of GFP protein. Then, the obtained construct was transformed into tobacco plant through *agrobacterium*-mediated method. Leaves of 2-3 weak old seedlings were selected as explant and direct regeneration was performed. In order to confirmation of transgenic plants, PCR by using specific primers was carried out. Due to the fact that the pBin vector contains the kanamycin resistant gene, seeds belonging to the T0 transgenic plants were planted on medium containing kanamycin and green seedling were selected as transgenic T1 plant. In order to evaluate the effects of transferred gens on physiological parameters, mature T1 transgenic plant as well as the wild type plants were subjected to drought stress and relative water content was measured.

Keywords: Tobacco transformation, Tocopherol Cyclase, Antioxidant, Vitamin E, Oxidative stress

نویسنده مسئول: علیرضا عباسی
E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir

مقدمه

هشت دسته از توکوکرومانول‌های وابسته از نظر ساختمانی از جمله توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها تحت عنوان ویتامینE خطاب می‌شوند. توکوفرول‌ها خود به ۴ دسته آلفا، بتا، گاما و دلتا-توکوفرول تقسیم می‌شوند که در بیشتر گیاهان عالی آلفا و گاما-توکوفرول بیشتر حضور دارند. در مراحل سنتز توکوفرول‌ها، ابتدا از طریق مسیر شیکیمات در بیوسنتز اسیدهای‌آمینه آروماتیک p-هیدروکسی‌فنیل‌پیروات سنتز شده سپس از طریق آنزیم p-هیدروکسی‌فنیل‌پیروات‌داکسیژناز (HPPD)، هموجنتیسات ساخته می‌شود (Norris *et al.*, 1998). سپس با اضافه‌شدن فیتیل‌دی فسفات (Cheng *et al.*, 2003; Van Eenennaam *et al.*, 2003) و پیوستگی زنجیره جانبی آب‌گریز توسط آنزیم هموجنتیسات فیتیل ترانسفراز (HPT) (Collakova *et al.*, 2001; Savidge *et al.*, 2002) به ۲-متیل۶-فیتیل بنزوکوئینون تبدیل شده و در اثر متیلاسیون بعدی ۲ و۳ دی متیل-۵-فیتیل-۱و۴-بنزوکوئینون تشکیل می‌گردد. با تأثیر آنزیم توکوفرول‌سایکلاز (TC)، این ماده به γ -توکوفرول تبدیل شده (Porfirova *et al.*, 2002; Sattler *et al.*, 2003) و در نهایت بادخالت آنزیم γ -توکوفرول، متیل ترانسفراز(γ-TMT) α توکوفرول ساخته می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که کاهش بیان ژن TC در سیب‌زمینی تراریخته منجر به کاهش رشد و تجمع کربوهیدرات‌ها می‌شود (Hofius *et al.*, 2004). جهت مطالعه تنظیم بیوسنتز توکوفرول و نقش آن در شبکه آنتی‌اکسیدانتی آرابیدوپسیس، گیاهان ترانسژنیک تشدید بیان یافته در ژن *TC* تولید شدند و به‌منظور آنالیز توکوفرول تحت بررسی قرار گرفتند و لاین‌های ناکارا در سنتز آسکوربات (vtc1) یا گلوتاتیون (cad2) نیز تولید شدند. از این مطالعات روشن شد که توکوفرول سایکلاز محدودکننده سنتز توکوفرول در برگ‌ها است و از دست‌دادن همزمان توکوفرول و گلوتاتیون بر فتوسنتز و رشد در یک مسیر متفاوت از آنچه برای لاین‌های والدینی مشاهده شد تأثیر داشت. همچنین تشدید بیان *TC* نیز منجر به تجمع توکوفرول و یک جابجایی در ترکیب توکوفرول در برگ‌ها شد (Kanwischer *et al.*, 2005). در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که آلفا توکوفرول نقشی را در فتوسنتز و هموستازی مواد مغذی ماکرو در سیانوباکتریوم *Synechocystis* sp. PCC 6803 که مستقل از عملکرد آنتی‌اکسیدانتی است بازی می‌کند (Sakuragi *et al.*, 2006). همچنین یک مطالعه روی تأثیر α-توکوفرول بر پیام‌رسانی درون سلولی به‌وسیله تغییر سطوح جاسمونیک‌اسید انجام گرفت. در این مطالعه موتانت‌های vte1 دارای کمبود توکوفرول تهیه شدند. این موتانت‌های دارای کمبود توکوفرول، سطوح توکوفرول پایین‌تر، کاهش رشد و افزایش تجمع آنتوسیانین را در مقایسه با گونه وحشی نشان دادند. همچنین سطوح جاسمونیک‌اسید در گیاه تغییر کرده بود که قبل از تجمع آنتوسیانین و کاهش رشد در گیاهان دیده شد. در نتیجه به تأثیرات بالقوه توکوفرول‌ها روی پیام‌رسانی درون سلولی که ممکن است بر رشد گیاه و تجمع آنتوسیانین اثر بگذارد پی برده شد (Munne-Bosch *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای که روی نقش‌های اختصاصی آلفا و گاما-توکوفرول در واکنش به تنش‌های غیرزنده گیاه تنباکو تراریخت توسط (Abbasi *et al.*, 2007) انجام شد، خاموشیHPT منجر به کاهش بیش از ۹۸٪ تجمع توکوفرول در مقایسه با گونه وحشی گردید. در این گزارش ذکرشده از کار انداختن γ-TMT منجر به یک کاهش بیش از ۹۵٪ α-توکوفرول در برگ‌های گیاهان تراریخت شد که تقریباً از نظر کمی به‌وسیله یک افزایش در گاما-توکوفرول جبران شد. کاهش محتوای توکوفرول کل افزایش حساسیت تراریخت‌های HPT:RNAi نسبت به تمام شرایط تنش مورد آزمون را باعث شد. در این مطالعه همچنین قید شده در حالی‌که که گیاهانی که در آن‌ها γ-TMT خاموش شده بود یک بهبود عملکرد را وقتی با سوربیتول یا متیل‌ویولوژن رقابت می‌کردند، نشان دادند. اگرچه تحمل به نمک در تراریخت‌های γ-TMT شدیداً کاهش یافت. خسارت غشاء در گیاهان تراریخت γ-TMT بعد از تنش‌هایی که به‌واسطه سوربیتول و متیل‌ویولوژن ایجاد شده بود، کاهش یافت به‌طوری‌که از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید و یا نشت الکترولیت مشهود بود. در نتیجه با توجه به نقش مهم توکوفرول‌ها به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در تحمل به انواع تنش‌ها که منجر به خسارت اکسیداتیو می‌شوند، هدف از این مطالعه انتقال ژن *TC* از آرابیدوپسیس به توتون و سپس بررسی تأثیرات آن بر پارامتر فیزیولوژیک محتوای آب نسبی گیاه شاهد و تراریخت تحت تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذور یک رقم توتون (*Nicotiana tabacum* L.) با نام تجاری سامسون از کشور آلمان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از اگروباکتریوم تومفاسینس سویه LBA4404 و *E.coli* سویه DH5α موجود در گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران استفاده شد. پلاسمید

pBin حاوی ناحیه کدکننده ژن توکوفرول سیکلاز آرابیدوپسیس، برای انتقال ژن به اگروباکتریوم استفاده شد. این ژن تحت کنترل عمومی پروموتر CaMV-35S و خاتمه‌دهنده OCS در ناقل قرار دارد [سازه ژنی ذکر شده در بالا در دانشگاه Erlangen آلمان قبلاً توسط (Abbasi *et al.*, 2007) تهیه شده بود و در این مطالعه استفاده شد]. این سازه ژنی وارد سلول‌های مستعد باکتری *E.coli* و سپس سلول‌های مستعد اگروباکتریوم گردید. کلنی‌های مثبت اگروباکتریوم که روی محیط دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد کرده بودند توسط انجام واکنش PCR مورد تأیید قرار گرفتند. استخراج پلاسمید، تهیه سلول‌های مستعد، تراریخته‌کردن باکتری‌ها با استفاده از روش حرارتی و واکنش اتصال مطابق دستورالعمل‌های سمبروک و راسل Sambrook and Rusell (2001) انجام شد. از محیط LB برای رشد باکتری‌ها استفاده و تراریخته‌کردن اگروباکتریوم به روش انجماد و ذوب‌کردن انجام گرفت (Walker. 2006). انتقال سازه به گیاه توتون به روش آگروایفکشن (Ohta *et al.*, 1990) انجام شد. پس از اینکه گیاهان به رشد رویشی مناسب در گلدان رسیدند استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Doyle and Doyle. 1990) از آن‌ها انجام شد. برای آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت از آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی: پیش‌رونده (5'-GGTACCGCATATTTCTTCTTCTTCTTCC ATTATGG-3') و پس‌رونده (5'-GGATCCCAGACCCGGTGGCTTGAAGA AAGG-3') که ژن *At.TC* انتقال‌یافته به گیاهان تراریخت با اندازه تقریبی bp ۱۴۸۵ را تکثیر می‌کند، استفاده شد. پس از تأیید تراریختی این گیاهان از طریق آنالیز PCR، بذور نسل اول کشت شدند تا تراریختی گیاهان از طریق کشت بذور آن‌ها نیز روی محیط دارای کانامایسین نیز تأیید شود. پس از اینکه گیاهان به نسل بعد برده شدند به‌منظور بررسی تأثیر ژن منتقل‌شده بر روی پارامتر فیزیولوژیکی محتوای آب نسبی گیاه، با توجه به نقش این ژن در شرایط تنش به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، گیاهان موردمطالعه در معرض تنش خشکی قرار گرفتند. دو لاین شاهد و تراریخت و از هر کدام سه تکرار استفاده شد. تنش در سه سطح ۴۰، ۶۰ و ۸۰٪ ظرفیت زراعی مزرعه و یک سطح بدون تنش (نرمال) ۱۰۰ اعمال شد که در مجموع ۲۴ نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC) به روش Ritchie *et al.*, (1990) و به شرح زیر انجام شد: نمونه‌برداری با استفاده از قیچی از برگ رفرنس (آخرین برگ توسعه‌یافته) از تمامی تیمارهای آزمایشی انجام و نمونه‌ها بلافاصله درون یخ قرار گرفته و در آزمایشگاه وزن‌تر آن‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید (برگ‌ها نباید دچار شکستگی و پارگی باشند). سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر قرار داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در سردخانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (در صورت در اختیارنداشتن سردخانه می‌توان از یخچال استفاده نمود). بعد از ۲۴ ساعت وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری و برگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفته و وزن‌خشک هر کدام اندازه‌گیری شد. با قراردادن اعداد حاصل از توزین با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ در فرمول زیر میزان RWC محاسبه گردید:

$$RWC = [FW- DW/ TW – DW] \times 100$$

که در آن:

FW: وزن‌تر

DW: وزن‌خشک

TW: وزن اشباع

جدول ۱- نوع محیط های کشت مورد استفاده در تحقیق

نام محیط کشت	نوع محیط کشت‌های مورد استفاده شده
تلقیح	نمک‌های محیط کشت MS + ۰/۲ میلی‌مولار استوسیرینگان
کشت توأم	نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS + ۳۰ گرم در لیتر گلوکز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول + ۸-۶ گرم در لیتر آگار
محیط‌کشت القاء شاخساره (غیر انتخابی)	نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS + ۳۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول + ۸-۶ گرم در لیتر آگار + ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم
محیط‌کشت القاء ساخساره (انتخابی)	نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS+ ۳۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میواینوزیتول + ۸-۶ گرم در لیتر آگار + ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP +۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین
محیط‌کشت افزایش شاخساره (انتخابی)	نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS +۳۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول + ۸-۶ گرم در لیتر آگار + ۴۰۰ میلی‌گرم در لیترسفوتاکسیم +۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین
محیط‌کشت ریشه زایی	نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت ½MS + ۱۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول + ۸-۶ گرم در

(انتخابی)	لیتر آگار + ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم

نتایج و بحث

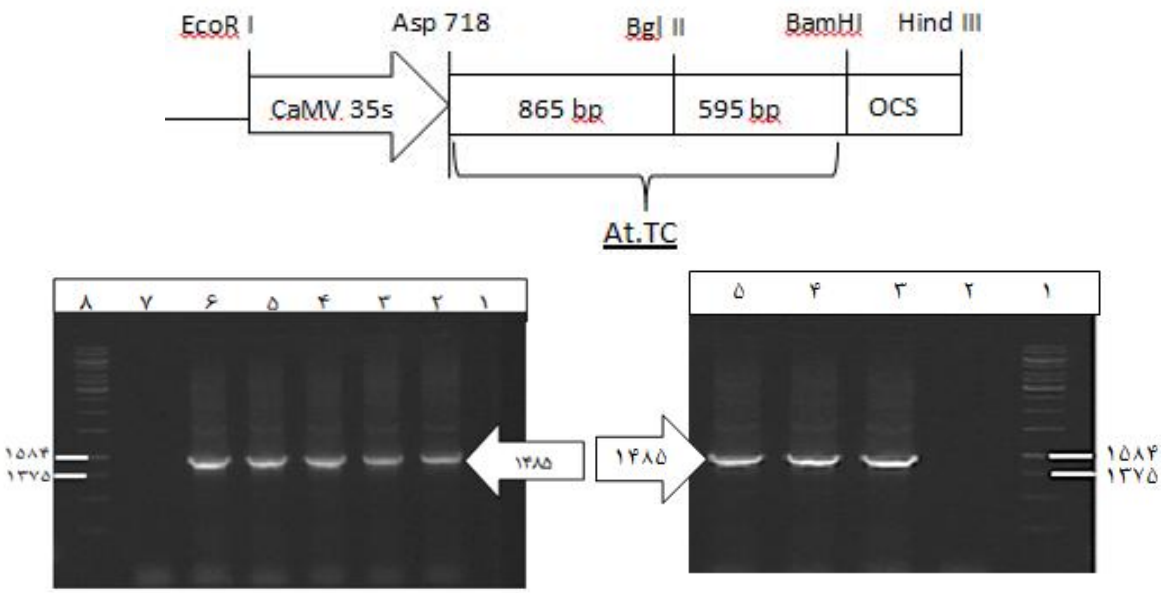
انتقال سازه‌ژنی pBin:AT:TC به گیاه توتون

ابتدا پلاسمید حاوی ژن *TC* از سلول‌های *E. coli* استخراج گردید. سپس به‌منظور تأیید پلاسمیدهای نوترکیب قبل از انتقال آن‌ها به اگروباکتریوم یک واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن انجام گرفت تا حضور سازه ژنی در آن‌ها به تأیید برسد. همچنین پس از انتقال وکتور به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم با استفاده از کلنی‌های مثبت رشدیافته بر روی محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین به‌منظور تأیید نهایی حضور سازه‌ژنی در سلول‌های اگروباکتریوم برای انجام تراریختی یک کلنی PCR انجام گرفت. نتایج PCR در شکل ۱ قسمت ب و ج نشان داده شده است.

در مرحله بعد انتقال اگروباکتریوم حاوی pBin:At.TC به گیاه توتون با استفاده از روش اگروایفکشن شرح داده شده در بخش مواد و روش‌ها انجام گرفت. به‌منظور افزایش تراریختی به محض اینکه گیاهچه‌ها به حد کافی از رشد رسیدند، از برگ‌های جوان ریزنمونه گرفته شد. ریزنمونه ها به‌منظور حمله اگروباکتریوم و انتقال سازه‌ژنی به درون آن از ۴ طرف بریده شده و زخمی شدند. مناسب‌ترین غلظت اگروباکتریوم برای آلوده‌سازی ریزنمونه‌های برگی با OD_{600nm}:0.8 قرائت شد. طول زمان مجاورت ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم ۴۰ ثانیه در نظر گرفته شد. همچنین غلظت ۰/۲ میلی‌مولار استوسیرینگون جهت تحریک‌کننده ژن‌های *vir* برای تراریختی انتخاب گردید.

گزینش و شناسایی گیاهان تراریخت با استفاده از غلظت‌های مختلف کانامایسین

پس از تراریختی ریزنمونه‌های توتون و حذف اگروباکتریوم با استفاده از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ریزنمونه‌ها به محیط القاء نوساقه منتقل شدند. این مرحله به رشد بیشتر ریزنمونه‌ها در محیط جدید و افزایش مقاومت سلول‌های تراریخت در مقابل عامل انتخابی کانامایسین در مراحل بعدی کمک می‌نماید. طی ۱۰ روز تعدادی از ریزنمونه‌ها به‌طور کامل باززایی شده و در تعدادی نیز باززایی به میزان کم مشاهده شد. پس از گذشت ۷ روز ریزنمونه‌ها به محیط اولیه انتخابی (دارای ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم) برای شروع گزینش نمونه‌های تراریخت از غیرتراریخت منتقل شدند. در این وضعیت تعدادی از ریزنمونه‌ها، باززایی را شروع کرده، در تعداد دیگری بخش‌های بریده‌شده متورم شدند و همچنین در تعدادی دیگر از نمونه ها نیز نکروز مشاهده و از بین رفتند. پس از رشد بیشتر ریزنمونه‌ها، این گیاهان به محیط انتخابی با کانامایسین بیشتر (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌منظور اعمال فشار تنش بیشتر برای حذف نمونه‌های غیرتراریخت منتقل شدند.

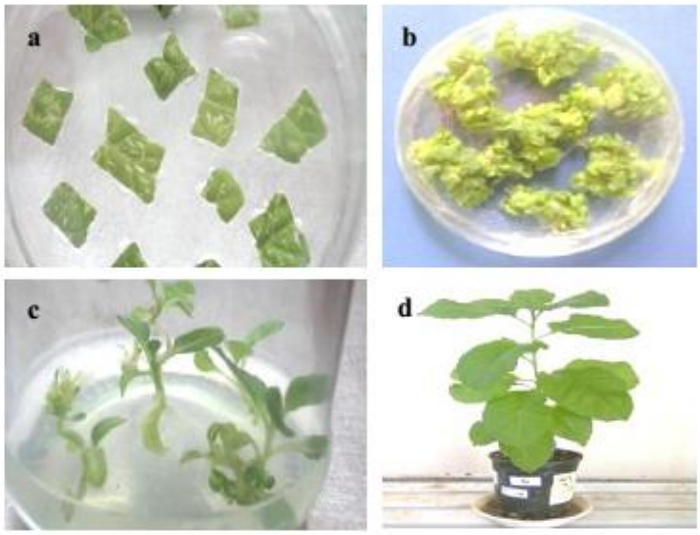


شکل ۱- مشخصات سازه‌ژنی PBin:TC:GFP مورد استفاده و تأیید انتقال به باکتری *E. coli*؛ الف: نقشه شماتیکی سازه‌ژنی PBin:TC:GFP؛ ب: انجام PCR پلاسمید استخراج‌شده از *E. coli*؛ چاهک۱. نشانگر وزن‌مولکولی (DNA فاژ لاندا) ؛ چاهک ۲. پلاسمید

غیرنوترکیب، چاهک ۳، ۴ و ۵ پلاسمید نوترکیب؛ ج: نتایج کلنی PCR اگروباکتریوم به‌منظور تأیید حضور سازه‌ژنی در آن؛ چاهک ۱و ۷: محصول PCR کلون غیرنوترکیب؛ چاهک ۲ ،۳، ۴، ۵ و ۶ کلون نوترکیب؛ چاهک ۸: نشانگر وزن مولکولی (DNA فاژ لاندا).

سلول‌های تراریخت برگ در مقابل غلظت بالاتر کانامایسین محیط مقاومت کرده و سبز باقی ماندند.

نمونه‌ها پس از باززایی و رسیدن به اندازه حدود یک تا دو سانتی‌متر به محیط طویل‌شدن نوساقه در شرایط *in vitro*، منتقل شدند (شکل۴، ج). در این محیط که میزان کانامایسین آن ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود تعدادی از ریزنمونه‌ها سبز باقی ماندند (مقاوم) و تعداد دیگری همزمان با رشد سفید شدند که این وضعیت نشانه غیرتراریخت‌بودن یا قرارگیری ژن در مکان‌های نامناسب است. پس از رشد گیاهچه تراریخت و تبدیل شده آن به یک گیاه مستقل، گیاهچه‌های کوچک به محیط ریشه‌زایی منتقل و پس از ریشه‌دهی به درون لیوان‌های خاک محتوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ انتقال یافتند. پس از رشد کافی، گیاهچه‌ها آمادگی لازم را برای انتقال به شرایط خاک و درون گلدان‌های بزرگتر را پیدا کردند. رشد در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در شب انجام شد تا گیاهان مورد مطالعه به مرحله بذردهی رسیدند (شکل ۲).

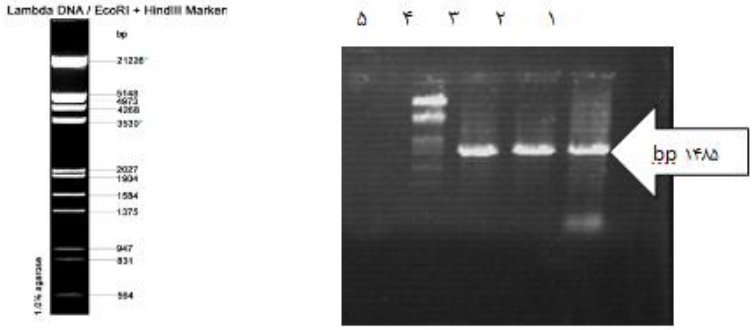


شکل ۲- مراحل مختلف رشد و باززایی ریزنمونه‌ها در محیط‌های مختلف. a: ایجاد هاله‌ای از باکتری پیرامون ریزنمونه‌ها در محیط هم‌کشت که نشان‌دهنده حمله باکتری به ریزنمونه است. b: باززایی ریزنمونه‌ها در محیط غیرانتخابی (بدون کانامایسین). c: انتقال ریزنمونه‌هایی که در محیط انتخابی سبز باقی ماندند به محیط طویل‌شدن نوساقه با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین. d: انتقال گیاهان به گلدان‌های بزرگتر و رشد در شرایط فیتوترون.

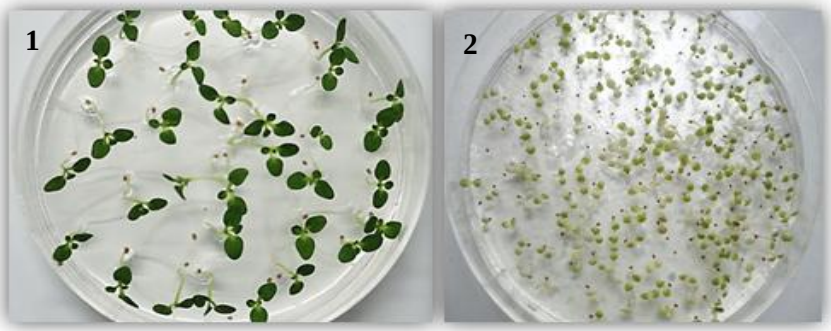
بررسی مولکولی گیاهان حاصل با استفاده از DNA آن‌ها

پس از انتخاب و رشد کامل گیاه تراریخت (که یک لاین بود)، بررسی مولکولی بر روی آن‌ها انجام گرفت. DNA ژنومی گیاهان مورد بررسی از برگ‌های جوان و سبز گیاه توتون استخراج گردید. سپس غلظت و کیفیت آن‌ها به‌وسیله دستگاه نانودراپ سنجیده شد. برای استفاده از DNA استخراج‌شده در PCR، بعد از تعیین غلظت DNA حدود ۵۰ نانوگرم به‌عنوان الگو در واکنش PCR به‌کار رفت. PCR واکنش انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است محصول PCR و الکتروفورز منجر به تولید یک قطعه با طول حدود ۱۴۸۰bp می‌گردد که با طول ژن *TC* که حدود ۱۴۸۰ می‌باشد، برابر است. این امر نشان می‌دهد که گیاه حاصل تراریخت می‌باشد (شکل۳، a). سپس در ادامه که گیاه وارد مرحله زایشی و گلدهی و تشکیل بذر شد، بذور لاین یادشده که از طریق PCR، تراریختی آن تأیید شد، استحصال و پس از ضدعفونی بذور نسل اول بر روی محیط دارای کانامایسین کشت شدند. اگر این بذور تراریخت باشند باید در محیط دارای کانامایسین نسبت ۳:۱ (۳ تراریخت در مقابل ۱غیرتراریخت) جوانه‌زنی بذور دیده شود. به‌عبارت دیگر بذور تراریخت در محیط دارای کانامایسین جوانه‌زده، به مرحله ۴ برگی رسیده و سبز می‌مانند. اما بذور غیرتراریخت پس از

جوانه‌زنی و رسیدن به مرحله ۲ برگی شروع به سفیدشدن کرده و از رشد باز می‌مانند. پس از ضدعفونی و کشت بذور نسل اول در محیط دارای کانامایسین همچنان که انتظار می‌رفت این نسبت‌ها دیده شد (شکل۳، b).



(الف)

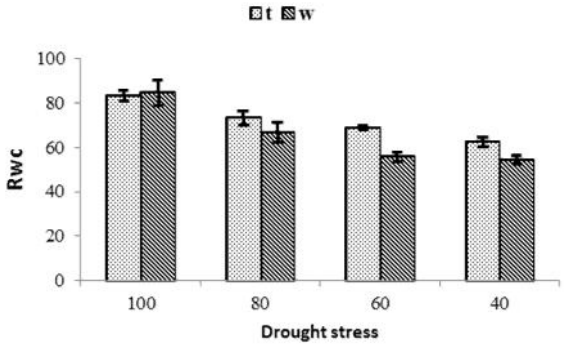


(ب)

شکل ۳- الف: آزمون PCR برای تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از DNA ژنومی، چاهک۱. محصول PCR گیاه تراریخت. چاهک۲. محصول PCR کلنی اگروباکتریوم نوترکیب. چاهک۳. محصول PCR پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت). چاهک۴. نشانگر وزن‌مولکولی (DNA فاژ لاندا). چاهک۵. محصول PCR گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی). ب: تأیید تراریختی گیاهان نسل اول با استفاده از کشت بذور آن‌ها در محیط دارای کانامایسین- ۱. گیاهان تراریخت ۴ برگی در محیط انتخابی با کانامایسین ۲. گیاهان تیپ وحشی ۴ برگی در همان محیط.

بررسی محتوای آب نسبی گیاه تراریخت و غیرتراریخت در شرایط نرمال و تنش خشکی

برای اندازه‌گیری و کمی‌کردن وضعیت آب گیاه می‌توان از پارامترهای پتانسیل آب گیاه (Ψ_w) و محتوی آب نسبی (RWC) استفاده نمود. میزان و سرعت کاهش محتوی آب نسبی در شرایط تنش در ارقام مختلف متفاوت است. در بسیاری آزمایشات در شرایط تنش خشکی (Chandrasekar *et al.*, 2000)، ارقام مقاوم نسبت به تنش خشکی دارای محتوی آب نسبی بالاتری بودند. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، محتوای آب نسبی گیاهان شاهد و تراریخت در ظرفیت کامل زراعی در شرایط مزرعه تفاوتی با هم ندارند. با اعمال تنش، در هر دو لاین تراریخت و شاهد یک روند کاهشی را در محتوای آب نسبی شاهد هستیم.



شکل ۴- نمودار درصد محتوای نسبی آب گیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت مزرعه) و یک سطح نرمال (۱۰۰) ستون‌های خاکستری روشن که با حرف T نمایش داده شده است، گیاهان تراریخت توتون و ستون‌های خاکستری تیره که با حرف W نمایش داده شده است، نشانگر گیاهان غیرتراریخت توتون می‌باشد.

اما این کاهش در دو لاین دارای میزان یکسانی نبوده و بین لاین شاهد و تراریخت از نظر میزان این کاهش تفاوت وجود دارد. در ۸۰٪ ظرفیت زراعی مزرعه گرچه بین شاهد و گیاه تراریخت تفاوت دیده می‌شود اما این تفاوت معنی‌دار نیست. در تنش ۶۰٪ ظرفیت مزرعه بین لاین شاهد و تراریخت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی محتوای آب نسبی گیاه تراریخت ۲۰٪ بیشتر از شاهد بود. همچنین در سطح تنش ۴۰ اختلاف بین شاهد و تراریخت معنی‌دار بوده و گیاه تراریخت دارای ۱۳٪ محتوای آب نسبی بالاتر از گیاه شاهد می‌باشد. به عبارتی محتوی آب نسبی در شرایط تنش ۴۰ و ۶۰٪ ظرفیت مزرعه به‌طور معنی‌داری در گیاه تراریخته بیشتر از شاهد می‌باشد. در مجموع این احتمال وجود دارد که به‌دلیل همبستگی توکوفرول‌ها با هورمون‌های استرس مثل اسیدآبسیزیک، سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید (Munne Bosch. 2005)، با افزایش میزان توکوفرول‌ها و اثرگذاری آن روی میزان آبسیزیک‌اسید موجب بسته‌شدن بیشتر روزنه‌ها در گیاهان تراریخت می‌گردد و آب گیاه را حفظ می‌کند و در برابر تنش خشکی باعث تحمل بیشتر گیاه می‌گردد.

سپاسگزاری

از گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران که امکانات و فضای آزمایشگاهی مناسب جهت انجام این تحقیق را در اختیار گذاشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abbasi AL, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Lars M (2007) Specific roles of a- and g-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic Tabacco. Plant Physiol. 143: 1720-1738.

Chandrasekar V, Sairam RK, Srivastava GC (2000) Physiological and Biochemical Responses of Hexaploid and Tetraploid Wheat to Drought Stress. Crop Sci. 185: 219–222.

Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, Della Penna D (2003) Highly divergent met hyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquin one synthesis in Cyanobacteria and photosynthetice ukaryotes. Plant Cell. 15: 2343–2356.

Collakova E, Della Penna D (2001) Isolation and functional an alysis of homogentisate phytyltra- nsferase from Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis. Plant Physiol. 127: 1113–1124

Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus. 12: 13-15.

Hofius D, Hajirezaei MR, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, Sonnewald U (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. Plant Physiol. 135: 1256–1268.

Kanwischer M, Por Wrova S, Bergmüller E, Dörmann P (2005) Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of Arabidopsis affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. Plant Physiol. 137: 713–723.

Munne-bosch S (2005) The role of a-tocopherol in plant stress tolerance. Plant Physiol. 162: 743-748.

Munne-Bosch S, Weiler E, Alegre L, Muller M, Duchting P, Falk J (2007) a-Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. Planta 225: 681–691.

Norris SR, Shen X, Della Penna D (1998) Complementation of the Arabidopsis pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Plant Physiol. 117: 1317–1323.

Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K (1990) Construction and expression in tabacco of a b-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiol. 31: 805-813.

Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, Lemke R, Dormann P (2002) Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. Proc Natl. Acad.

Sci. USA. 99: 12495–12500.

Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS (1990) Leaf water content and gas exchanges parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Sci. 30:105-111.

Sakuragi Y, Maeda H, Dellapenna D, Bryant DA (2006) A-Tocopheroplays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 that is independent of itantioxidant function. Plant Physiol. 141: 508–521.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, Della Penna D (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and Cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. Plant Physiol. 132: 2184–2195.

Savidge B, Weiss JD, Wong YHH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from Synechocysts p.PCC 6803 and Arabidopsis. Plant Physiol. 129: 321–332

van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Aasen ED, Hao M, Stein JC, Norris SR, Last RL (2003) Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. Plant Cell. 15: 3007–3019.

Walker JM (2006) *Agrobacterium* Protocols. Human Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite. 208.