Crop Biotech.
Winter (2015) 12: 67-78.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دوازدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۷۸-۶۷)

فرابیان ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز-٦ در گیاه *Arabidopsis thliana*

امین عابدی[۱]، محمدمهدی سوهانی[۲*]، رضا شیرزادیان خرم‌آباد[۲]
۱. دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۲۲)

Overexpression of Strictosidine Synthase Like-6 Gene in *Arabidopsis thaliana*

Amin Abedi[1], Mohammad Mehdi Sohani[2*], Reza Shirzadian Khoramabad[3]
1. Ph.D Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
(Received: Nov. 30, 2015- Accepted: Mar. 12, 2016)

Abstract

The monoterpenoids comprise a family of structurally and pharmaceutically diverse alkaloids. Strictosidine synthase is a key enzyme in monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway. In spite of the apparent lack of complex alkaloids in Arabidopsis, a gene family called Strictosidine synthase like (*SSL*) has been found in the genome. *SSL6*, a member of *SSL* family, has been induced significantly by various stresses and signaling molecules. An overexpressed mutant is a powerful tool for functional characterization of an unknown gene. In view of that, *SSL6* overexpressed mutant have been generated in order to study the possible role of the gene in Arabidopsis defense against biotic and abiotic stresses. The open reading frame from *SSL6* was amplified and cloned into intermediate pJET vector before subcloning into pPZPY122 plant vector. Plant transformation was made by floral dip method using *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (PMP90). The putative transgenic plants were isolated on selective MS medium containing gentamycin. Transgene integration was further analyzed by PCR using *SSL6* and gentamycin resistance gene specific primers. The transcription level of *SSL6* in the T_2 plants was measured using q-PCR and indicated an overexpression in transgenic compared to wild type Col-0 plants. Segregation ratio of plants in T_2 and T_3 generation on selection medium proved that some of the genotypes contain single T-DNA insert. The *SSL6* Expression level in response to salt stress was measured in Col-0 and indicated an up-regulation of the gene 3, 6 and 12 hrs after treatment.

Keywords: *in planta* Transformation, Floral Dip, Gentamycin assay.

چکیده

استریکتوسیدین سینتاز یک آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول الکالوئیدهای مونوترپنی می‌باشد. آرابیدوپسیس قادر به تولید ترکیبات آلکالوئیدی نیست اما، ژن‌هایی مشابه استریکتوسیدین سینتاز در آن شناسایی شده است. ژن *SSL6* از اعضاء خانواده ژنی شبه استریکتوسیدین سینتاز آرابیدوپسیس می‌باشد که در این تحقیق پاسخ ژن آن به تیمار شوری بصورت کمی بررسی و سپس در گیاه آرابیدوپسیس فرابیان شد. بمنظور تولید موتانت فرابیان ژن *SSL6* RNA کل استخراج و رشته اول cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن ساخته شد. کلون سازی ابتدایی در ناقل pJET انجام و متعاقبا به سازه فرابیانی گیاهی (pPZPY:SSL6) منتقل شد. در ترانسفورماسیون آرابیدوپسیس از اگروباکتریوم نژاد (GV3101(PMP90 و تکنیک غوطه‌وری گل‌آذین استفاده شد. آنالیز گیاهان تراریخت احتمالی در ابتدا با کشت بذرهای حاصل از گیاهان تلقیح شده بر روی محیط گزینشی حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین و گزینش گیاهچه‌های مقاوم انجام شد. در ادامه گیاهان تراریخت احتمالی در طی واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *SSL6* با تولید الگوهای باندی متفاوت در الکتروفورز در مقایسه با گیاهان وحشی و همچنین پرایمرهای اختصاصی ژن مارکر جنتامایسین جداسازی شدند. میزان افزایش بیان ژن انتقال یافته نسبت به گیاه مادری با واکنش Real-Time PCR بر روی گیاهان نسل T_2 انجام و نتایج نشان داد افزایش بیان ژن *SSL6* در گیاهان تراریخته به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از گیاه مادری بوده است. تعدادی لاین تراریخت حاوی یک نسخه تراژن از طریق تفرق صفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در محیط کشت انتخابی در نسل T_2 و T_3 انتخاب شدند. بررسی کمی بیان ژن *SSL6* در گیاهان وحشی Col-0 نیز نشان داد که تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن، شش ساعت پس از اعمال تیمار شد.

واژه‌های کلیدی: ترانسفورماسیون *In Planta*، فرابیان ژن، غوطه‌وری گل آذین، جنتامایسین.

* نویسنده مسئول: محمدمهدی سوهانی
E-mail: msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

مسیر بیوسنتز ایندول الکالوئیدهای مونوترپنی یکی از مهمترین مسیرهای متابولیکی در گیاهان است که موجب تولید بیش از ۲۰۰۰ ترکیب آلکالوئیدی مختلف در گیاهان می‌شود. بسیاری از این ترکیبات دارای خواص درمانی برای انسان می‌باشند. وین‌بلاستین[1]، وین‌کریستین[2] و کامپوتسین[3] سه عضو معروف ایندول الکالوئیدهای مونوترپنی می‌باشند که دارای خاصیت ضد سرطانی هستند. مسیر بیوسنتز ایندول الکالوئیدهای منوترپنی با تولید استریکتوسیدین آغاز می‌شود (Stockigt *et al.*, 2008). این ماده شیمیایی از ترکیب سوبستراهای تریپتامین[4] و سکلوگانین[5] و فعالیت آنزیمی استریکتوسیدین سینتاز (Str) (EC 4.3.3.2) تولید می‌شود. آنزیم مذکور اولین بار از گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*) جداسازی شده است و لذا بیشترین مطالعات مربوط به همین گیاه است. مطالعات نشان داده است که بسیاری از محرک‌های زیستی و غیر زیستی و نیز تنظیم کننده‌های رشد بیان این ژن را القاء می‌کنند و در نتیجه مقدار متابولیت‌های ثانوی در گیاه افزایش می‌یابد. در مطالعه تاثیر سرما، شوری و نیتریک اکسید بر روی فعالیت این آنزیم معلوم شد که بیان این ژن بوسیله آبشار کینازی و با میانجیگری کلسیم تنظیم می‌شود (Dutta *et al.*, 2013). اگرچه عموماً آرابیدوپسیس به گیاهی معروف است که توانایی تولید ترکیبات آلکالوئیدی پیچیده را ندارد اما، پس از کامل شدن پروژه توالی‌یابی ژنوم این گیاه ژن‌هایی شبیه استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*) در آن یافت شده است (Facchini *et al.*, 2004). تاکنون بر اساس مطالعات انجام گرفته ۱۵ ژن دارای دومین استریکتوسیدین سینتاز در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که نقش بسیاری از آن‌ها و نوع فعالیت‌شان در پاسخ به تنش‌ها و نیز در مراحل نموی به طور کاربردی مشخص نشده است. در آزمایشی که برای شناسایی ژن‌های کاندید در پیری آرابیدوپسیس با استفاده از لکه گذاری RNA انجام گرفته، پروتئینی تحت عنوان YLS2[6] از خانواده ژنی *SSL* شناسایی شد. که بوسیله اتیلن و ABA القا و دارای بیان اختصاصی در مراحل پیری گیاه در گل بوده و در ریشه و ساقه قابل شناسایی نیست (Yoshida *et al.*, 2001). همچنین ژن LAP3[7] که از همین خانواده می‌باشد نقش مهمی در نمو دانه گرده داشته و خاموشی این ژن سبب تولید دانه‌های گرده فاقد اگزین و در نهایت نر عقیمی گردید (Dobritsa *et al.*, 2009).

روابط فیلوژنتیکی برخی از اعضاء این خانواده ژنی بررسی و نتایج نشان داد که این ژن‌ها دارای رابطه تکاملی با پروتئین هومیوسین مگس سرکه می‌باشند. پروتئین هومیوسین یک پذیرنده لکتین است و در سیستم ایمنی مگس سرکه نقش دارد (Fabbri *et al.* 2000). یک کلاس خاص از خانواده *SSL* آرابیدوپسیس که بیشترین شباهت را به هومیوسین مگس سرکه در درخت فیلوژنتیکی دارند ژن‌های *AtSSL4-AtSSL7* می‌باشند که پشت‌سرهم در یک کلاستر بر روی کرموزوم شماره سه آرابیدوپسیس دارند (Sohani *et al.*, 2008). مطالعاتی که بر روی القاء بیان ژن *SSL6* آرابیدوپسیس انجام گرفت مشخص کرد که این ژن در اثر زخم، تیمار با ویروس CMV و قارچ *Alternaria brassicicola* و نیز تیمار با ترکیبات فعال کننده پیام دفاعی نظیر سالسیلیک اسید،

1. Vinblastine
2. Vincristine
3. Camptothecin
4. Tryptamine
5. Secologanin

6. Yellow Leaf Specific Gene 2
7. Less adherent pollen

جازمونات و اتیلن به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد که نشان دهنده نقش احتمالی این ژن‌ها در مکانیسم دفاعی القائی در گیاه می‌باشد (Sohani *et al*., 2008). مقدار بیان ژن *SSL6* در تمامی تیمارهای ذکر شده چندین برابر افزایش یافته است. ضمن اینکه بر اساس داده‌های ریزآرایه میزان بیان این ژن در پاسخ به تنش‌های شوری، نور ماوراء بنفش و سالسیلیک اسید چند برابر بیان در شرایط شاهد بوده است. افزایش بیان ژن *SSL6* در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیر زیستی، دلالت بر نقش احتمالی این ژن در مقاومت به تنش‌های مذکور در گیاهان است (Kibble *et al*., 2009).

استفاده از جهش یافته‌های گیاه آرابیدوپسیس که ژن هدف از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک خاموش یا فرابیان شده باشد برای بررسی دقیق نقش هر ژن در فرایندهای بیولوژیکی امری متداول است. جهش‌زایی با استفاده از درج T-DNA و یا ترانسپوزون عموماً باعث تولید فنوتیپ مغلوب می‌شود که برای آنالیزهای کارکردی در مورد خانواده‌های ژنی می‌تواند با اشکالاتی همراه باشد (Pelaz *et al*., 2000). علاوه بر این، ۲/۳ ژنوم آرابیدوپسیس حاصل مضاعف شدگی می‌باشد (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). به‌عبارتی؛ در خانواده‌های ژنی خاموشی یک ژن با فعالیت سایر ژن‌های خانواده پوشش[1] داده می‌شود. بنابراین، علی‌رغم تولید بسیاری از لاین‌های جهش یافته که با تلفیق T-DNA یا ترانسپوزان تولید شده‌اند؛ بدون تکنولوژی‌های تکمیلی بررسی کامل و صحیح نقش ژن تنها بر اساس جهش‌زایی تلفیقی امکان پذیر نیست. رونوشت برداری یک ژن در نسخه‌های بسیار بالا که در نتیجه آن فراوانی mRNA بالاتر از مقدار آن در شرایط نرمال باشد فرابیان[2] نامیده می‌شود. این وضعیت در سلول‌های گیاهانی مشاهده می‌شود که معمولا با وکتور همسانه سازی حامل ژن هدف و یک پروموتر قوی تراریخت می‌شوند. مزیت مهم این رهیافت اثر غالب آن است که می تواند در موجودات دیپلوئید به آسانی تظاهر یابد و یک ارتباط کارکردی را حتی برای خانواده‌های چند عضوی به دست آورد (Prelich, 2012). ژن *SSL6* از لحاظ کاربردی تاکنون مطالعه نشده است لذا لازم است بدین منظور موتانت‌های مرتبط با کارکرد مانند موتانت T-DNA و یا موتانت فرابیان آن تولید و همزمان واکنش ژنوتیپ‌های نامبرده در مقایسه با گیاه مادری مطالعه شود.

در این تحقیق به منظور مطالعه الگوی بیانی ژن *SSL6* در گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش شوری آزمایشی طراحی و اجرا و تغییرات بیانی با استفاده از تکنیک Real Time-PCR اندازه‌گیری شد. جهت فرابیان *SSL6* در آرابیدوپسیس نسخه cDNA این ژن تحت کنترل پروموتر 35S CaMV همسانه-سازی شده و از طریق غوطه‌ور کردن گل‌آذین و به روش *in planta* به گیاه آرابیدوپسیس منتقل شد. آنالیزهای مختلفی بر روی گیاهان تراریخته فرضی انجام شد تا انتقال تراژن به گیاه تایید شود.

مواد و روش‌ها

بررسی بیان ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری

در این تحقیق از گیاه آرابیدوپسیس اکوتیپ کلمبیا (Col-0) استفاده شد. بذرهای ژنوتیپ Col-0 ضدعفونی و در محیط کشت MS حاوی یک درصد ساکارز کشت شدند. به منظور یکدستی در جوانه‌زنی و ورنالیزاسیون پتری‌های کشت شده به مدت ۳ روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به مدت دو هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/ تاریکی ۸/۱۶ نگهداری شدند. بمنظور اعمال تیمار شوری، ابتدا کاغذهای واتمن در محیط MS حاوی یک درصد ساکارز و غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار

1. Functional Redundancy
2. Overexpression

NaCl اشباع شده پتری گیاهچه‌ها در دو هفته‌گی با دقت از محیط کشت جدا شده و به محیط تیمار انتقال یافتند. نمونه برداری گیاهچه‌های کامل در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام گرفت. نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای بعدی در فریزر ۷۰- انتقال یافتند. جهت استخراج RNA از کیت RNXPlus (سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب بوسیله الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی نمونه‌های استخراج شده با DNaseI (Thermo Fisher) تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از Oligo dT و کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher) انجام گرفت. برای انجام واکنش Real Time-PCR پرایمر برای ژن‌های *SSL6* و ژن مرجع *Actin*-2 با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real Time-PCR و همسانه سازی ژن *SSL6*

نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
SSL6-For	5'-GCGGCTAAGTACGGCTATGA-3'	56.9	176 bp
SSL6-Rev	5'-CGGAGAATGTGTGAATGCCA-3'		
Act2-For	5'-CTTGTTCCAGCCCTCGTTTG-3'	56.9	149 bp
Act2-Rev	5'-CGATACCTGAGAACATAGTGG-3'		
F-SSL6-For	5'-GGATCCATGCCTGTATTCCTCTCTTC-3'	60	1100 bp
F-SSL6-Rev	5'-GTCGACTCAAAGCTTCTTGTTTTGTG-3'		
GenR-For	5'-ACTTCTTCCCGTATGCCCAA-3'	58	392 bp
GenR-Rev	5'-CAAGTCAAATCCATGCGGGC-3'		

هر واکنش Real Time-PCR شامل ۱ میکرولیتر cDNA رقیق شده (نسبت ۱ به ۱۰)، ۰/۳ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۳ میکرومول، ۶/۲۵ میکرولیتر Master Mix (Thermo Fisher) و ۴/۶۵ میکرولیتر آب بود. برای انجام واکنش Real Time-PCR از دستگاه Bio-Rad CFX96 استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

تهیه سازه بیانی گیاهی pPZPY:SSL6

استخراج و سنتز cDNA مطابق روش ارائه شده در بخش بررسی بیان ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری انجام گرفت. جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن *SSL6* برای تکثیر نسخه cDNA از نرم‌افزار Primer3 استفاده شد. جهت همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی از جایگاه‌های برشی *BamH*I و *Sal*I در پایانه '5 به ترتیب برای پرایمرهای پیشرو و معکوس *SSL6* استفاده شد (جدول ۱). شرایط تکثیر ژن شامل؛ دمای واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و بدنبال آن ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شده است. تکثیر ژن با استفاده از آنزیم *pfu* (Thermo Fisher) و cDNA با رقت 10X انجام شد. محصول واکنش PCR جهت همسانه‌سازی در وکتور کلونینگ با استفاده از کیت استخراج از ژل (Thermo Fisher) خالص‌سازی گردید. برای همسانه‌سازی از CloneJET PCR Cloning Kit حاوی وکتور حدواسط pJET (Thermo Fisher) استفاده شد. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T_4 لیگاز انجام شد. سلول‌های مستعد *E. coli* برای الکتروپوریشن مطابق توصیه شرکت Bio Rad تهیه شده بود. ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* سویه DH5α با روش الکتروپوریشن (Bio Rad, MicroPluser) در شرایط ۱/۸ کیلووات و در مدت ۵ میلی‌ثانیه انجام گرفت. ترانسفورماسیون با استفاده از روش کلنی

PCR تایید و از کلنی‌های مثبت استخراج پلاسمید انجام شد. تایید نهایی کلونینگ با استفاده از هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sal*I و توالی‌یابی پلاسمیدهای نوترکیب انجام شد (Bioneer, Korea).

برای همسانه‌سازی ژن کلون شده در وکتور بیانی گیاهی از وکتور pPZPY122 به شماره دسترسی U10459.1 (اهدایی از موسسه ABRC[1]) استفاده شد. ژن مقاومت به کلرامفنیکل برای غربالگری باکتری ترانسفورم شده و ژن مقاومت به جنتامایسین برای غربالگری گیاهان تراریخته در وکتور مذکور وجود دارد. پروموتر موجود در این وکتور از نوع 35S CaMV و ترمیناتور آن از نوع نوپالین سینتاز (NOS) می‌باشد (شکل ۱).

به منظور همسانه‌سازی وکتور pJET حامل ژن کلون شده و پلاسمید بیانی pPZPY122 با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sal*I هضم شدند. قطعه ژن جداشده از وکتور pJET از ژل اگارز استخراج و برای همسانه‌سازی در وکتور بیانی گیاهی در یک واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T_4 استفاده شد. واکنش الحاق بوسیله الکتروپوریشن در داخل باکتری *E. coli* ترانسفورم و صحت آن بوسیله PCR تائید گردید. برای انتقال ژن به گیاهان از باکتری اگروباکتریوم تومفاسینس سویه GV3101 (PMP90) استفاده شد. این سویه دارای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین و جنتامایسین می‌باشد. وکتور نوترکیب بوسیله الکتروپوریشن در شرایط ۲/۲ کیلو وات و مدت ۵ میلی‌ثانیه به اگروباکتریوم انتقال یافت. تهیه سلول مستعد اگروباکتریوم مطابق دستورالعمل توصیه شده توسط شرکت Bio Rad انجام شد. ابتدا تک کلونی اگروباکتریوم رشد کرده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه تکثیر شدند. در مرحله بعد این محیط کشت اولیه به ۰/۵ لیتر محیط LB انتقال یافته و پس از رسیدن OD_{600} باکتری به حدود ۰/۵ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد و با سرعت ۳۰۰۰ g رسوب داده شد. در مراحل بعدی باکتری در گلیسرول ۱۰ درصد سرد شستشو، در ۰/۵ تا یک میلی‌لیتر سوربیتول حل و در مقادیر ۲۰ میکرولیتر داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر اپندورف توزیع شد. سلول‌های مستعد آماده شده به فریزر ۷۰- انتقال یافتند.

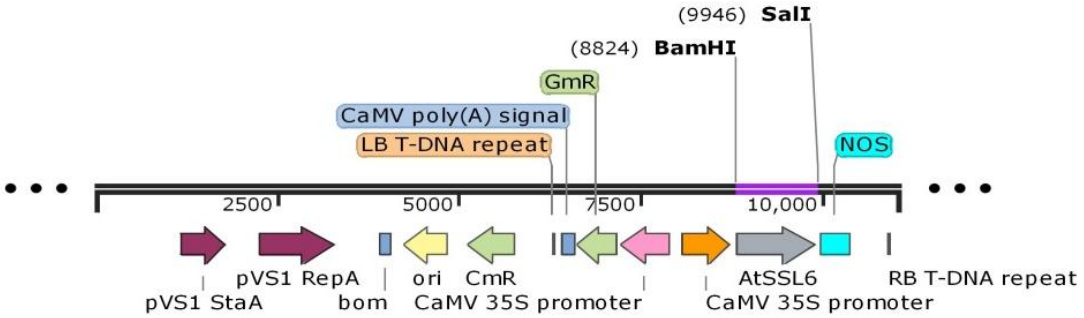
تراریزش گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از روش غوطه‌وری گل‌آذین[2]

دو روز قبل از زمان انجام ترانسفورماسیون، تک کلونی اگروباکتریوم تازه حاوی سازه ژنی انتخاب و به لوله فالکون دارای ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین و ریفامپسین انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه با ۲۲۰ دور در دقیقه در شیکر قرار گرفت. سوسپانسیون مذکور سپس به محیط LB به حجم ۲۰۰ میلی لیتر اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت و زمانی که OD_{600} باکتری به حدود ۱/۵ تا ۲ رسید برای ترانسفورماسیون استفاده شد. به منظور تلقیح گیاهان با اگروباکتریوم، سوسپانسیون در ۶۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شد. این رسوب در ساکارز ۵ درصد حل و سوسپانسیون باکتریایی آماده ترانسفورم گیاهان شد. غلظت باکتری در این سوسپانسیون OD_{600} برابر ۰/۵ تا ۱ بوده است. قبل از انجام عمل غوطه‌وری مقدار ۱۰۰ میکرولیتر (۰/۰۵٪) Silwet L-77 سوسپانسیون اضافه گردید (Zhang *et al*., 2006). برای تراریزش آرابیدوپسیس از روش غوطه‌وری

1. Arabidopsis Biological Resource Center

2. Floral dip

گل‌آذین استفاده شد (Zhang *et al.*, 2006). گیاهان به مدت یک ماه در شرایط روز بلند رشد کردند. بعد از رشد گیاهان گل‌آذین‌های اولیه چیده شدند تا گل‌آذین‌های جدید رشد کند و تعداد آن‌ها افزایش یابد. عمل غوطه‌ور سازی با فرو بردن گل‌آذین گیاهان در سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه انجام گرفت. گلدان‌های حاوی گیاهان تلقیح شده در پوشش پلاستیکی و در جای تاریک قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت پوشش پلاستیکی برداشته و گیاهان به اتاقک رشد انتقال یافتند. حدوداً یک ماه بعد با شروع زرد شدن غلاف‌ها آبیاری قطع و بذر گیاهان آماده برداشت شد.



شکل ۱. نمای شماتیک کاست فرابیان ژن *SSL6*. ژن هدف (فلش خاکستری) تحت کنترل پروموتر قوی CaMV35S و ژن مقاومت گیاه به جنتامایسین در داخل مرزهای چپ و راست T-DNA قرار دارد. ژن مقاومت به کلرامفنیکل به منظور انتخاب باکتریایی در بدنه وکتور قرار دارد (طراحی شده با نرم افزار SnapGene).

غربالگری گیاهان تراریخته

برای شناسایی گیاهان تراریخته، بذرها ضدعفونی و در محیط MS ½ حاوی ۱ درصد ساکارز و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین کشت شدند. گیاهان تراریخته احتمالی دو هفته بعد از کشت به خاک منتقل شدند و بعد از رشد کافی استخراج DNA از برگ‌ها با روش CTAB انجام شد. برای تائید تراریختگی واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *SSL6* و ژن مقاومت به جنتامایسین (جدول ۱) انجام گرفت. تکثیر ژن به صورت؛ واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و بدنبال آن ۳۵ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت بمدت ۷ دقیقه انجام شده است. بررسی میزان بیان ژن *SSL6* در گیاهان تراریخته ۳ هفته‌ای نسل T_2 با استفاده از واکنش Real Time-PCR و ژن مرجع اکتین-۲ (*Actin2*) انجام گرفت.

تعیین تعداد نسخه‌های تراژن در گیاهان تراریخت

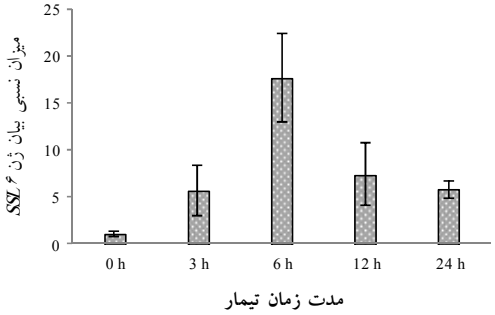
برای تعیین نسخه‌های درج شده تراژن درگیاهان تراریخته از آزمون کای اسکور و صفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین در نسل‌های در حال تفرق T_2 استفاده شد. بر این اساس، بذرهای حاصل از گیاهان نسل T_2 در محیط انتخابی MS ½ حاوی یک درصد ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جنتامایسین کشت و پس از دو هفته تعداد گیاهان زنده و غیرزنده شمارش شدند. از آنجا که آرابیدوبسیس دیپلوئید و صفت مقاومت غالب است لذا، گیاهان مادری که نتاج آنها بر اساس آزمون کای اسکور نسبت ۳:۱ نشان دادند انتخاب و برای تولید بذر T_3 در گلدان کشت شدند. بذرهای نسل T_3 نیز بر اساس آزمون کای اسکور بررسی شده و در نهایت

گیاهان که در این نسل تفرق نشان ندادند لاین هموزیگوس تراژن تک نسخه‌ای شناخته شدند.

نتایج و بحث

بیان ژن *SSL6* در شرایط تنش شوری

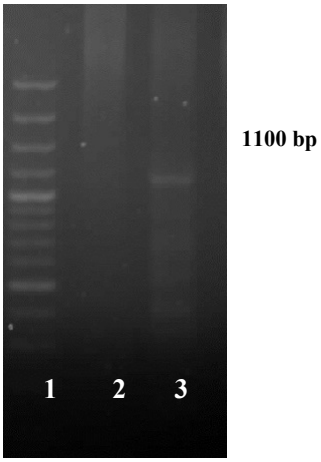
بررسی کمی بیان ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن می‌باشد. در ساعت‌های پس از اعمال تیمار بیان ژن *SSL6* نسبت به زمان صفر افزایش معنی‌دار نشان داده و بیشترین مقدار آن مربوط به زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار می‌باشد که در حدود ۱۸ برابر افزایش بیان نشان می‌دهد. در حالت کلی الگوی بیان این ژن به دو مرحله افزایشی در ۶ ساعت ابتدایی و مرحله کاهشی در ساعت‌های بعدی می‌باشد (شکل ۲). این آنالیز نشان‌دهنده نقش ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری می‌باشد.



شکل ۲. الگوی بیان ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری؛ میزان بیان ژن در تمام زمان‌ها نسبت به زمان صفر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند).

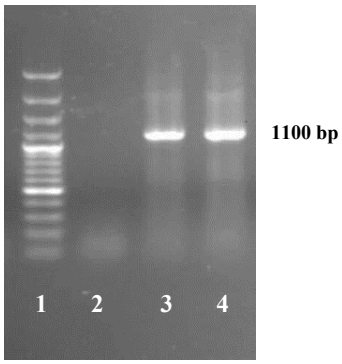
تهیه سازه بیانی گیاهی

به‌منظور تولید گیاه تراریخت، نسخه cDNA ژن *SSL6* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و بوسیله آنزیم *pfu* تکثیر شد. حاصل واکنش PCR تکثیر یک قطعه ۱۱۱۶ جفت بازی بوده است که معادل اندازه cDNA ژن *SSL6* می‌باشد (شکل۳).



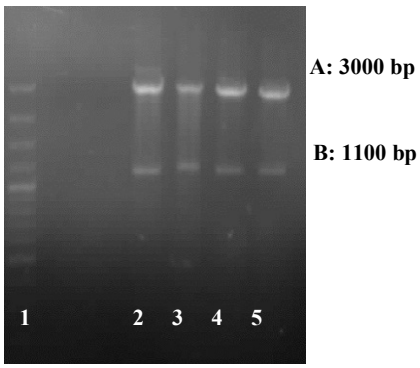
شکل ۳. تکثیر ژن *SSL6* بوسیله آنزیم *pfu* ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲: واکنش PCR با cDNA رقیق نشده ۳: واکنشPCR با cDNA رقیق شده به میزان ۵ برابر.

آنزیم *pfu* یک آنزیم با خاصیت تصحیح کنندگی می‌باشد که احتمال خطا در آن حدود یک در ۱۰ میلیون نوکلئوتید بوده و لذا امکان اشتباه در محصول تکثیر شده کاهش می‌یابد (Cline *et al*., 1996). از آنجایی که *pfu* توانایی اضافه کردن نوکلئوتیدهای A به انتهای قطعات تکثیر شده را ندارد لذا برای همسانه‌سازی از کیت CloneJET PCR Cloning Kit حاوی وکتور حد واسط pJET استفاده شد. مزیت این کیت نسبت به کیت‌های بر مبنای T/A وکتور بی‌نیاز به نوکلئیک اسید A در انتهای قطعات PCR تکثیر شده بوده و لذا می‌توان قطعات با انتهای صاف را در آن کلون کرد. در این تحقیق باکتری‌ها از طریق الکتروپوریشن ترانسفورم شده و به دلیل وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در وکتور pJET در محیط LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شدند. بعد از ۱۶ ساعت کلنی‌های دارای وکتور نوترکیب در محیط کشت مشاهده شدند. تعدادی از کلنی‌ها انتخاب و برای تائید ترانسفورماسیون کلنی PCR مورد استفاده قرار گرفتند. مشاهده باند به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز تائید کننده وجود وکتور نوترکیب در این باکتری‌ها بود (شکل ۴).



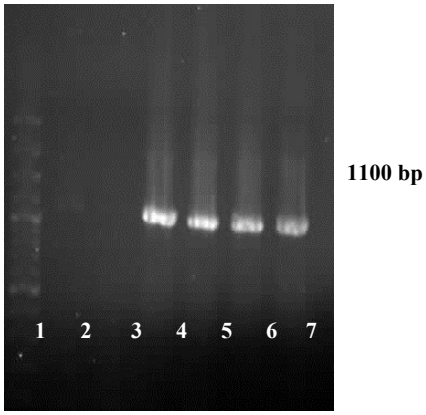
شکل ۴. تائید ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* با وکتور pJET:SSL6 با استفاده از کلنی PCR ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲: کنترل منفی ۳-۴: محصول کلونی PCR.

جهت تائید نهایی حضور ژن در وکتور، پلاسمید از باکتری‌های ترانسفورم شده استخراج و هضم آنزیمی آن‌ها با آنزیم‌های *BamH*I و *Sal*I انجام گرفت. باندهای حدود ۱۱۰۰ و ۳۰۰۰ جفت باز بر روی ژل آگارز مشاهده شد که به ترتیب مربوط به قطعه ژن کلون شده و بدنه وکتور pJET بوده است که بدین وسیله صحت همسانه‌سازی را مورد تائید قرار می‌دهد (شکل ۵).



شکل ۵. تائید هضم آنزیمی سازه ژنی pJET:SSL6 ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲-۵: سازه نوترکیب بعد از هضم آنزیمی- قطعه A بدنه وکتور pJET و قطعه B ژن *SSL6* هضم شده با آنزیم برشی

توالی یابی ژن کلون شده نشان داد که آنزیم *pfu* به درستی تکثیر را انجام داده و هیچ جهشی در نسخه cDNA توالی ژن *SSL6* ایجاد نشده است. وکتور بیانی pPZPY122 از جمله وکتورهای سری pPZP می‌باشد که در سال ۱۹۹۴ معرفی شد. مزیت این وکتورها اندازه نسبتاً کوچک و وجود چندین جایگاه برشی در مولتی کلونینگ سایت آن می‌باشد که باعث انتخاب راحت‌تر جایگاه‌ها و آنزیم‌های برشی شده است. این وکتور دارای پروموتر قوی و با بیان دائمی 35S CaMV و ترمیناتور NOS می‌باشد (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). کلون شدن ژن *SSL6* در این وکتور بیانی با کلنی PCR تائید شد (شکل ۶).



شکل ۶. تائید ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* با وکتور pPZPP:SSL6 با استفاده از تکنیک کلنی PCR ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲ و ۳: کنترل منفی ۴-۷: محصول کلونی PCR

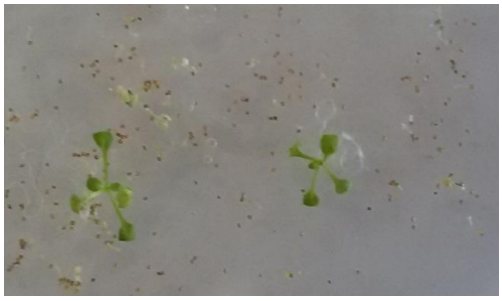
تراریخت‌سازی گیاه آرابیدوپسیس با سازه گیاهی حامل ژن *SSL6*

اگروباکتریوم تومفاسینس ناقل طبیعی قطعات DNA به گیاهان معرفی شده است. سویه GV3101 (PMP90) یکی از پرکاربردترین سویه این باکتری برای ترانسفورماسیون آرابیدوپسیس می‌باشد. این سویه دارای مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین و جنتامایسین می‌باشد. این سویه توانایی بیشتری در ترانسفورماسیون آرابیدوپسیس از روش غوطه‌ور سازی گل‌آذین نسبت به سایر سویه‌های اگروباکتریوم دارد (Ghedira *et al.*, 2013). روش غوطه‌ورسازی

گل‌آذین روش متداول در ترانسفورماسیون آرابیدوپسیس به حساب می‌آید. مزیت این روش نسبت به روش‌های دیگر انتقال ژن، قابلیت انتقال قطعات بزرگ T-DNA، عدم نیاز به تجهیزات کشت بافت و فرآیند تولید کالوس یا باززایی بوده و با توجه به تعداد زیاد بذر که آرابیدوپسیس تولید می‌کند کارایی انتقال در حد قابل قبول است. از مزایای دیگر این روش صرف زمان کمتر برای ترانسفورماسیون و نیز عدم‌نیاز به نیروی متخصص کشت بافت می‌باشد. نرخ انتقال ژن در این روش ۰/۵ تا ۳ درصد می‌باشد (Zhang *et al*., 2006).

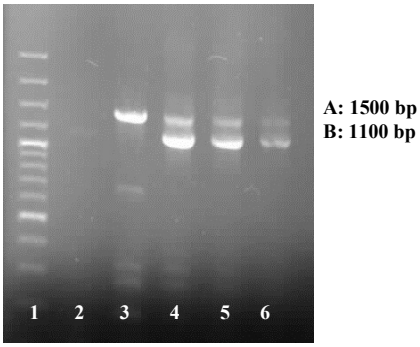
آنالیز گیاهان تراریخت

پس از انتقال سازه ژنی pPZPY:SSL6 به گیاه آرابیدوپسیس، بذرهای این گیاهان برای گزینش اولیه گیاهان تراریخته بر روی محیط ½ MS حاوی غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین کشت شدند. گیاهان تراریخته دو هفته بعد از کشت دارای برگ‌های سبز و طبیعی و ریشه آن‌ها توسعه یافته بودند در حالی‌که غالب گیاهچه‌ها دارای برگ‌های سفید و فاقد ریشه بودند (شکل ۷).



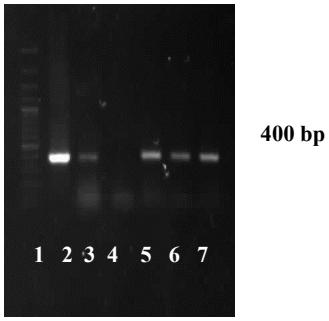
شکل ۷. گیاهچه‌های تراریخته مقاوم در محیط کشت ½ MS حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین. دو هفته بعد از کشت بذرها در محیط انتخابی، گیاهچه‌های مقاوم در محیط انتخابی رشد کرده و ریشه‌های توسعه یافته تولید کردند.

گیاهان تراریخته احتمالی به گلدان انتقال داده شدند. این گیاهان نسبت به گیاهان تیپ وحشی هیچ تفاوت فنوتیپی نداشتند. پس از رشد از نمونه‌های برگی DNA استخراج و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *SSL6* و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین انجام شد. از آنجایی‌که منشاء ژن *SSL6* از خود گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد لذا در ژل آگارز دو باند برای گیاهان تراریخته مشاهده شد که یک باند با اندازه حدود ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به ژن *SSL6* با منشاء گیاه آرابیدوپسیس شامل اگزون و اینترون و باند با اندازه حدود ۱۱۰۰ جفت باز مربوط به تراژن *SSL6* و فاقد اینترون بوده است. در گیاهان غیرتراریخته فقط باند ۱۵۰۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۸).



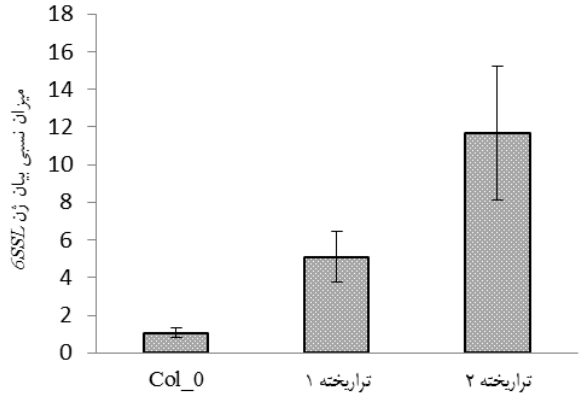
شکل ۸. واکنش PCR برای ژن *SSL6* در گیاهان تراریخته و غیر تراریخته ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲: کنترل منفی ۳: DNA ژنومی گیاه غیر تراریخته ۴-۶: DNA ژنومی گیاهان تراریخته باند A: ژن *SSL6* حاوی اگزون و اینترون باند B: ژن *SSL6* حاصل از تکثیر cDNA

نتیجه PCR ژن مقاومت به جنتامایسین تولید یک باند ۴۰۰ جفت بر روی ژل آگارز در گیاهان تراریخته احتمالی بوده است (شکل ۹).



شکل ۹. واکنش PCR برای ژن مقاومت به جنتامایسین در گیاه تراریخته ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲: کنترل مثبت (باکتری *E. coli* حاوی سازه بیانی) ۳: کنترل مثبت (باکتری اگروباکتریوم حاوی سازه بیانی) ۴: گیاه غیر تراریخته ۵-۷: گیاهان تراریخته

به منظور ارزیابی میزان افزایش بیان ژن *SSL6* در گیاهان تراریخته از روش Real Time-PCR استفاده گردید. آنالیز داده‌های حاصل از Real Time-PCR نشان داد که میزان بیان ژن *SSL6* در دو لاین T_2 مورد آزمایش در مقایسه با ژنوتیپ وحشی Col-0 به ترتیب ۴/۷ و ۱۰/۲۵ برابر افزایش یافته‌است (شکل۱۰).



شکل ۱۰. مقایسه میزان بیان ژن *SSL6* در دو گیاه تراریخته مستقل نسبت به گیاه تیپ وحشی Col-0
(داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.)

این نتایج نشان‌دهنده کارآمد بودن پروموتر 35S CaMV در افزایش بیان تراژن در گیاهان تراریخته می‌باشد. پروموتر 35S ویروس موزائیک گل کلم (CaMV) احتمالاً گسترده‌ترین پروموتر گیاهی مورد استفاده می‌باشد (Odell *et al*., 1985). تفاوت در میزان بیان *SSL6* در دو لاین تراریخته T_2 می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد کپی‌های درج شده، خاموشی ژن و یا تفاوت در جایگاه درج ژن در ژنوم گیاه باشد (Butaye *et al.,* 2005).

تعیین تعداد نسخه‌های تراژن

در گیاه دیپلوئید آرابیدوبسیس برای ژن تک نسخه غالب مقاومت به آنتی بیوتیک جنتامیسین برخی از ژنوتیپ‌ها نسبت تفرق صفت فنوتیپی ۳:۱ به ترتیب مرده: زنده را در نسل T_2 نشان دادند (شکل ۷). در نهایت در نسل T_3 تعدادی از لاین‌ها در محیط انتخابی تفرق صفت نشان ندادند که تک نسخه تراژن هموزیگوس شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری نهایی

این تحقیق نشان داد که بیان ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. برای بررسی نقش کارکردی این ژن گیاه آرابیدوپسیس تراریخت با فرابیان ژن *SSL6* تولید شد. آنالیز این گیاهان نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن در گیاهان تراریخته می‌باشد. استفاده از این موتانت گیاه آرابیدوپسیس احتمالاً می‌تواند در درک بهتر نقش ژن مذکور در برابر تنش‌های غیر زیستی نظیر شوری راه‌گشا باشد.

REFERENCES

Ayliffe MA, Pryor AJ (2007) Activation tagging in plants-generation of novel, gain- of-function mutations. Aust. J. Agric. Res. 58: 490-597.

Butaye KM, Cammue BP, Delauré SL, De Bolle MF (2005) Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. Molecular Breeding. 16(1): 79-91.

Cline J, Brman JC, Hogrefe HH (1996)

PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 24(18): 3546-3551.

Dobritsa AA, Nishikawa SI, Preuss D, Wochniak EU, Summer L W, Hammond A, Carson AL, Swanso RJ (2009) LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. Sex Plant Reprod. 22(3): 167-177.

Dutta A, Sen J, Deswal R (2013) New evidences about strictosidine synthase (Str) regulation by salinity, cold stress and nitric oxide in Catharanthus roseus. J. PLANT BIOCHEM. BIOT. 22(1): 124-131.

Fabbri M, Delp G, Schmidt O, Theopold U (2000) Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271: 191-196.

Facchini PJ, Bird DA, St-Pierre B (2004) Can Arabidopsis make complex alkaloids?. Trends Plant Sci. 9(3): 116-122.

Ghedira R, Buck SD, Nolf JN, Depicker A (2013) The Efficiency of Arabidopsis thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the Agrobacterium Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant. Mol. Plant Microbe Interact. 26(7): 823-832.

Gynheung A, Jeong DH, Jung KH, Lee S (2005) Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. Plant Mol. Biol. 59: 111-123.

Hajdukiewicz P, Syab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation Plant Mol. Biol. 25: 989-994.

Kibble NA, Sohani MM, Shirely N, Byrt C, Roessner U, Bacic A, Schmidt O, Schultz CJ (2009) Phylogenetic analysis and functional characterization of strictosidine synthase-like genes in Arabidopsis thaliana. Funct. Plant Biol. 36: 1098-1109.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods. 25(4): 402-408.

Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. nature. 313: 810-812.

Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADSbox genes. Nature. 405: 200-203.

Prelich G., 2012, Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation, *Genetics*. 190: 841-854.

Sohani MM, Schenk PM, Schultz CJ, Schmidt O (2009) Phylogenetic and transcriptional analysis of a srictosidine synthase-like gene family in Arabidopsis thaliana reveals involvement in plant defence responses. Plant Biol. 11: 105-117.

Stockigt J, Barleben L, Panjikar S, Loris EA (2008) 3D-structure and function of strictosidine synthase -the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. Plant Physiol. Biochem. 46: 340-355.

Teshima K, Innan H (2008) Neofunctionalization of Duplicated Genes Under the Pressure of Gene Conversion. Genetics. 178(2): 1385-1398.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature. 408: 796-815.

Walden R, Fritze K, Hayashi H, Miklashevichs E, Harling H, Schell J (1994) Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. Plant Mol. Biol. 26: 1521-1528.

Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in Arabidopsis. Plant Physiol. 122: 1003-1013.

Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A (2001) Isolation and RNA Gel Blot Analysis of Genes that Could Serve as Potential Molecular Markers for Leaf Senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 42(2): 170-178.

Zhang J (2003) Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol. Evol. 18(6): 292-298.