مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره دوم، بهار و تابستان ۱۳۹۱ (۴۷-۳۹)

Crop Biotech.
Vol.2, No. 2, Spring and Summer 2012

انتقال ژن *EXPA1* به گیاه آرابیدوپسیس تالیانا از طریق غوطه‌وری گل آذین

مسعود قادری مظفری[۱]، علیرضا عباسی[۲]* و علی هاتف سلمانیان[۳]
۱، ۲، دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی‌ژنتیک و زیست و فناوری
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

Floral dip Transformation of EXPA1 to *Arabidopsis thaliana*

M. GHADERI MOZAFARI[1], A. R. ABBASI[2]* AND A.H. SALMANIAN[3]
1, 2, M.Sc. Student, and Assistant Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran, 3, Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

چکیده

خشکی مهم‌ترین تنش محیطی است که تاکنون به محصولات کشاورزی خسارت وارد کرده است. تاکنون تلاش‌های زیادی در جهت بهبود محصول در شرایط کمبود آب صورت گرفته است. اکسپنسین‌ها یک ابرخانواده پروتئینی هستند که در گیاهان آوندی از چهار خانواده تشکیل شده‌اند. اکسپنسین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های دیواره‌سلولی هستند که زمینه نرم شدن وابسته به اسیدیته دیواره‌سلولی از طریق شکستن پیوندهای هیدروژنی بین سلولز و شبکه گلیکان‌ها را فراهم می‌کنند. در این تحقیق برای به‌دست آوردن گیاهان تراریختی که دارای ریشه توسعه یافته‌تری باشند ابتدا از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا RNA کل استخراج گردید و رشته اول cDNA ساخته شد و به‌کمک آغازگرهای اختصاصی برای ژن *EXPA1* تکثیر گردید و در ناقل‌های حدواسط همسانه گردید و سپس سازه‌ژنی pBIEXPA1 ساخته شد. از این سازه که حاوی ژن *nptII* و ژن *AtEXPA1* تحت کنترل راه‌انداز CaMV35s بود در مرحله انتقال ژن جهت تراریختی آرابیدوپسیس استفاده گردید. عمل تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم و تکنیک غوطه‌وری گل‌آذین صورت گرفت که این تکنیک به مراحل وقت‌گیر کشت‌بافت نیاز ندارد و گیاهان به‌دست‌آمده از آن نسل T_1 می‌باشند. در نتیجه واردشدن سازه‌ژنی به برخی از بذرها، گیاهچه‌های حاصل از آن‌ها بر روی محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین سبز باقی ماندند. تراریختی گیاهان حاصل با ظهور دو باند ۷۵۳ و ۱۰۸۰ جفت بازی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در سطح DNA تائید گردید. بررسی تغییرات فنوتیپی در ریشه و شاخساره گیاهان حاصل در آینده به‌همراه دیگر لاین‌های حاصل از سایر ژن‌های خانواده اکسپنسین مورد بررسی و تجزیه تحلیل قرار خواهد گرفت.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس، پروتئین اکسپنسین، خشکی دیواره سلولی، غوطه‌وری گل‌آذین، AtEXPA1

Abstract

Drought is by far the most important environmental stress in agriculture and many efforts have been made to improve crop productivity under water-limiting conditions. Expansin is a protein super family consisting of 4 families in vascular plants. Expansions are cell wall proteins which mediate acidic cell wall loosening through breaking hydrogen bonds between cellulose and glycan matrix. In this study, a construct named pBIEXPA1 containing *nptII* and AtEXPA1 genes under the control of CaMV35s promoter was designed and fabricated. Arabidopsis plants were then transformed by pBIEXPA1. Transformation was done by floral dip which did not need any tissue culture process. Transformed seedlings were able to remain green on MS medium containing 50mg/L kanamycin. Transgenic plants were confirmed by PCR and as expected two bands of 753 and 1080 bp were observed for transgenic plants.

Keywords: Arabidopsis, Cell wall, Drought, Expansin Protein, Floral dip and AtEXPA1

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

مقدمه

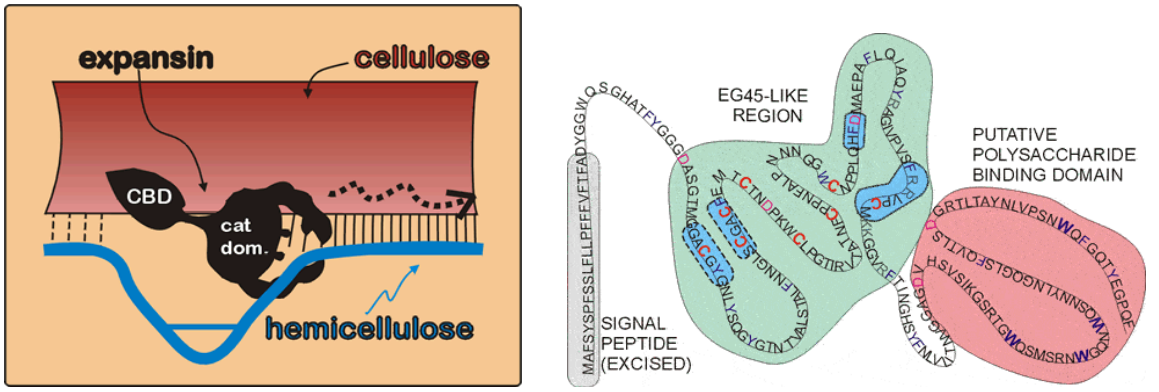
خشکی مهم‌ترین تنش محیطی است که تاکنون به محصولات کشاورزی خسارت وارد کرده است. تاکنون تلاش‌های زیادی در جهت بهبود محصول در شرایط کمبود آب صورت گرفته است و از یک طرف انتخاب طبیعی در جهت گزینش مکانیسم‌های سازگاری و بقا بوده است، و از طرف دیگر فعالیت‌های اصلاحی در جهت افزایش عملکرد اقتصادی گونه‌های تحت کشت انجام گرفته است. بیش از ۸۰ سال فعالیت اصلاحی منجر به افزایش عملکرد بسیاری از گونه‌های زراعی در شرایط خشکی شده است. در همین حال تحقیقات پایه یافته‌های ارزشمندی از چگونگی پاسخ مولکولی و فیزیولوژیکی گیاه به کمبود آب به‌دست آورده‌اند اما کماکان فاصله زیادی بین عملکرد در شرایط ایده‌آل و شرایط تنش وجود دارد. به حداقل‌رساندن این فاصله و افزایش پایداری عملکرد در شرایط تنش جهت تضمین غذا برای آینده بسیار ضروری است (Cattivelli *et al*. 2008). بشر در طول تاریخ خسارت‌های بسیاری را در مواجهه با خشکسالی متحمل شده است. کشور ایران نیز از این قاعده مستثنا نبوده است. به‌خصوص در سال‌های اخیر این بحران جدی‌تر شده است. از این رو گیاهان مقاوم یا متحمل به خشکی دارای اهمیت بسزایی می‌باشند. گیاهان با ریشه حجیم و طولانی دارای تحمل بیشتری نسبت به خشکی هستند از این رو گیاهان با چنین خصوصیاتی همیشه مطلوب اصلاح‌کنندگان بوده‌اند. اما در برخی گونه‌ها ارقام با ریشه‌های حجیم یا وجود ندارند و یا دارای کیفیت مطلوب نمی‌باشند. به همین دلیل به‌کمک مهندسی‌ژنتیک می‌بایست این چنین ارقامی را ایجاد کرد. از جمله کارهایی که در این راستا می‌توان انجام داد انتقال ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های دخیل در رشد سلول‌ها است. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان خانواده EXPANSIN را ذکر کرد (Ghaderi. 2010).

سلول‌های در حال رشد به‌طور مشخص رشد اسیدی[1] نشان می‌دهند (Rayle *et al*. 1970; Cosgrove. 1989). اکسپنسین‌ها[2] دسته‌ای از پروتئین‌های دیواره‌سلولی هستند که زمینه نرم‌شدن وابسته به اسیدیته دیواره‌سلولی از طریق شکستن پیوندهای هیدروژنی بین سلولز و شبکه گلیکان‌ها را فراهم می‌کنند (McQueen Mason *et al*. 1992). تجزیه و تحلیل توالی اکسپنسین نشان می‌دهد که این پروتئین دارای سه دمین[3] می‌باشد. دمین پپتید نشانه[4] که پروتئین را به دستگاه‌گلژی هدایت می‌کند بعد از خارج‌شدن پروتئین از دستگاه گلژی و ورود آن به شبکه‌آندوپلاسمی از پروتئین جدا می‌شود. دمین انتهای آمینی (15KDa) دارای تشابه دوری با دمین کاتالیتیکی خانواده ۴۵ اندوگلوکانازها می‌باشد و دمین انتهای کربوکسیلی (10KDa) که مربوط به خانواده آلرژن‌های دانه‌گرده گیاهان علفی می‌باشد که هنوز کنش آن‌ها شناخته نشده است (شکل ۱–الف). اکسپنسین‌ها یک ابرخانواده پروتئینی هستند که در گیاهان آوندی از چهار خانواده تشکیل شده‌اند. دو خانواده اکسپنسین آ و اکسپنسین ب قابلیت گسترش دیواره را دارند، درحالی‌که کنش دو خانواده دیگر شبه‌اکسپنسین آ و شبه اکسپنسین ب به خوبی شناسایی نشده است. با وجود شباهت به اندوگلوکانازها تاکنون فعالیت آنزیمی برای اکسپنسین شناخته نشده است. در واقع اکسپنسین با آزادکردن گلوکان‌ها از سطح میکروفیبریل‌های سلولزی آن‌ها را برای حمله آنزیمی آماده می‌سازد (شکل۱–ب) (Sampedro *et al*. 2005). کاهش بیان ژن اکسپنسین آ با استفاده از روش آنتی‌سنس منجر به ممانعت از رشد می‌گردد (Cho and Cosgrove. 2000)، درحالی‌که تشدید بیان اکسپنسینآ بر روی مریستم انتهایی ساقه منجر به تسهیل رشد و آغازش

1. Acid Growth
2. EXPANSINS
3. Domain
4. Signal peptide

برگ می‌گردد (Pien *et al*. 2001). Zenoni *et al*. (2004) با کاهش بیان *PhEXP1* در گیاه اطلسی مشاهده کردند که اندازه گلبرگ‌ها و سطح سلول‌های اپیدرم کاهش یافته است و شکل و ترکیب دیواره‌سلولی نیز دچار تغییر شده است.

ژن *EXPA1* معروف‌ترین عضو ابرخانواده اکسپنسین می‌باشد که تحقیقات گذشته بر روی گیاهان مختلف نشان می‌دهد که این ژن در طویل‌شدن ریشه نقش دارد و در نتیجه انتظار می‌رود در جهت تحمل بیشتر به خشکی بتواند موثر باشد (Wu *et al*. 2001). بنابراین در این پژوهش انتقال ژن *EXPA1* به گیاه آرابیدوپسیس مدنظر قرار گرفت تا با انجام کارهای تکمیلی که در پژوهش‌های بعدی صورت می‌گیرد نقش آن در توسعه ریشه و افزایش تحمل به خشکی گیاه مورد مطالعه قرار گیرد.



الف ب

شکل ۱– الف) پروتئین اکسپنسین و دمین‌های تشکیل‌دهنده آن. ب) نحوه عمل پروتئین اکسپنسین در دیواره سلولی. شکسته‌شدن پیوندهای هیدروژنی بین سلولز و همی‌سلولز موجود در دیواره سلولی. http://homes.bio.psu.edu/expansins

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده

در این تحقیق گیاه آرابیدوپسیس[1] رقم کلمبیا مورد استفاده قرار گرفت. جهت شکست خواب بذر، بذرهای آرابیدوپسیس در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی کاغذ صافی خیس قرار گرفتند پس از آن بذور در گلدان حاوی پیت–ماس قرار داده شد و سپس در اتاقک رشد در دمای ۲۳ درجه و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به‌مدت ۲ ماه نگه‌داری شدند. از آن‌جایی‌که آرابیدوپسیس یک گیاه روز بلند است پس از رسیدن به رشد رویشی دلخواه، جهت به گل‌رفتن آن طول روز به ۱۶ ساعت رسید.

سویه‌های باکتریایی و ناقل‌ها و آغازگرهای مورد استفاده

باکتری *E.coli* سویه $DH_5\alpha$ برای همسانه‌سازی سازه‌ژنی موردنظر و تراریختی‌های پلاسمیدی و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 جهت انتقال ژن به آرابیدوپسیس استفاده شد. در این تحقیق از ناقل pGEMT-Easy (ساخت شرکت پرومگا) حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین به‌عنوان یک ناقل همسانه‌سازی T/A استفاده شد و ناقل pBI121 حاوی ژن مقاومت به

1. *Arabidopsis thaliana*

کانامایسین[1] به‌عنوان ناقل بیانی در سیستم گیاهی استفاده گردید.

توالی کدکننده[2] ژن AtEXPA1 با شماره دسترسی[3] AT1G69530.3 و طول ۱۶۶۵ نوکلئوتید از این بانک‌اطلاعاتی NCBI دریافت شد. آغازگرها بر اساس بازهای انتهای ´۳ و انتهای ´۵ توالی کدکننده آغازگرها ساخته شدند. با استفاده از نرم‌افزار NEBCutter مشخص شد توالی شناسایی آنزیم‌های *EcoRI*، *Bam*HI و *Sac*I در طول توالی کدکننده وجود ندارد. در نتیجه به انتهای ´۵ آغازگر پیشرو توالی شناسایی آنزیم *Bam*HI و به انتهای ۵ آغازگر برگشتی توالی شناسایی آنزیم *SacI* اضافه گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده به این شرح می‌باشد F-EXPA1: ggATCCATggCTCTTgTCACCTTCTTg و R-EXPA1: gAgCTCCTAACgTAgCTgCgCACCTg که این آغازگرها از شرکت سیناژن تهیه گردیدند.

جداسازی DNA، RNA، ساخت cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[4]

از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت شاخساره آرابیدوپسیس با استفاده از کیت استخراج RNAx plus محصول شرکت سیناژن RNA استخراج گردید. از RNA به‌دست‌آمده با استفاده از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس[5] محصول شرکت فرمنتاز cDNA ساخته شد. قطعه cDNA ساخته‌شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AtEXPA1 توسط آنزیمHigh fidelity در طی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر گردید. به انتهای ´۳ قطعه تکثیریافته در طی واکنشی دیگر با استفاده از آنزیم تک پلی‌مراز نوکلئوتید A اضافه گردید (Sambrook, miniprep 2004). استخراج DNA نیز با استفاده از ۱۰۰ میلی گرم بافت شاخساره به روش دلاپورتا[6] صورت گرفت.

انتقال ژن به گیاه آرابیدوپسیس از طریق غوطه‌وری گل‌آذین

دو روز قبل از اینکه گیاهان با باکتری تیمار شوند، یک تک کلونی از آگروباکتریوم حامل سازه موردنظر در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) کشت گردید. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و در دما ۲۸ °C و با ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس در دو ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع به اضافه آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده برای محیط قبل تهیه گردید. سپس در زیر هود ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت‌شده قبلی به هر محیط اضافه شد و ارلن‌ها در انکوباتور و در شرایط قبل قرار داده شدند. زمانی که OD_{600} باکتری‌ها تقریباً بین ۱/۷۵ تا ۲ بود باکتری‌ها آماده استفاده بودند. آن‌ها در دور ۵۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع‌رویی دور ریخته شد. سپس رسوب باقی‌مانده در محلول حاوی ۵٪ سوکروز و ۰/۰۵٪ سورفکتانت سیلوت‌ال –۷۷ به گونه‌ای حل شدند که OD_{600} نهایی باکتری حدود ۰/۸ شد. برای تلقیح گیاهان آرابیدوپسیس از روش غوطه‌وری گل‌آذین استفاده شد. با این روش باکتری‌های آماده‌شده، در یک بشر ریخته شد و سپس گلدان‌ها به‌طور وارونه بالای بشر قرار گرفتند، به‌طوری‌که تمام گل‌آذین گیاه در داخل باکتری غوطه‌ور شد. گلدان‌ها به‌مدت ۴۰–۳۰ ثانیه در همین حالت نگه داشته شدند. در هنگام غوطه‌وری گیاهان چندین بار تکان داده شدند تا گل‌ها به‌خوبی با محلول حاوی آگروباکتریوم آغشته شوند سپس گیاهان به‌مدت ۲۴ ساعت در زیر پوشش نایلونی و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت گیاهان به فیتوترون منتقل شدند. بعد از رسیدن بذرهای گیاهان، آن‌ها برداشت‌شده و به‌منظور گزینش جهت

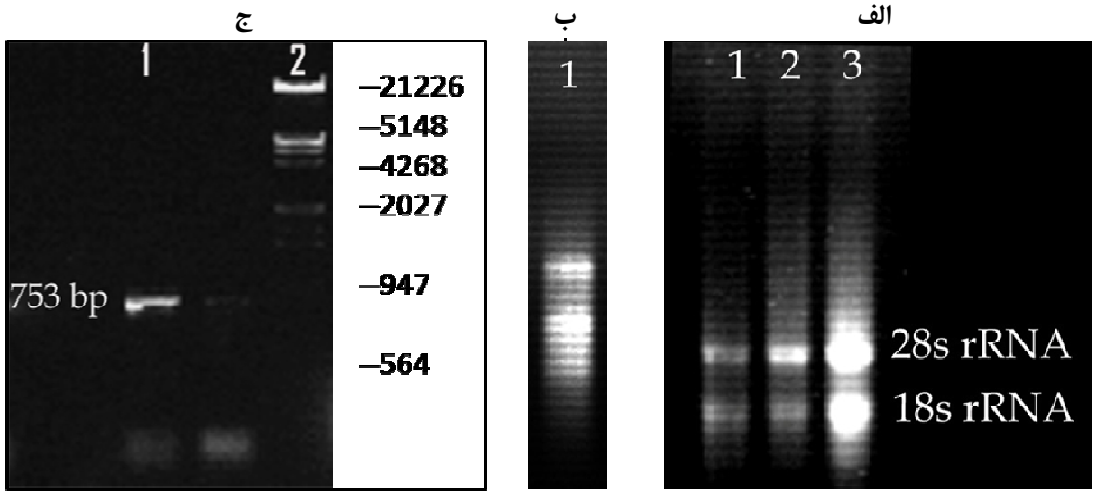
1. *nptII*
2. Coding sequence
3. Accession number
4. Polymerase Chain Reaction(PCR)
5. RevertAid™ M-MulV Reverse Transcriptase
6. Dellaporta

دستیابی به گیاهان تراریخت استفاده شد.

نتایج و بحث

ساخت و تکثیر cDNA ژن EXPA1

ابتدا RNA از بافت‌های رویشی گیاه آرابیدوپسیس استخراج گردید. RNA استخراج‌شده از شاخساره آرابیدوپسیس بر روی ژل یک درصد آگارز بارگذاری شد نتایج آن در شکل ۲-الف آورده شده است. نتایج ساخت cDNA از RNA موجود با استفاده از آغازگرهای الیگو dT در شکل ۲-ب آورده شده است قطعه موردنظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *AtEXPA1* از روی cDNA ساخته‌شده تکثیر گردید که نتایج آن در شکل ۲-ج آورده شده است. محصول واکنشی که در چاهک شماره یک قرار دارد جهت خالص‌سازی از روی ژل انتخاب گردید. چاهک شماره ۲ نشان‌دهنده نشانگر وزن مولکولی است. قطعه تکثیریافته حدود ۷۵۳ جفت باز طول دارد که با طول قطعه CDS ژن *AtEXPA1* که در سایت داده‌ها ارایه شده است، مطابقت دارد.



شکل ۲- (الف) نتایج بارگذاری RNA بر روی ژل یک درصد آگارز. چاهک‌های شماره ۱، ۲ و ۳ نتایج استخراج RNA از شاخساره آرابیدوپسیس را نشان می‌دهد. 28s rRNA و 18srRNA به‌دلیل وجود مقادیر بالا در سلول کاملاً مشخص می‌باشند. (ب) نتایج بارگذاری cDNA بر روی ژل آگارز یک درصد. چاهک شماره ۱ نتایج ساخت cDNA را نشان می‌دهد و (ج) نتایج بارگذاری محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل یک درصد آگارز. قطعه‌ای به طول حدود ۷۵۳ جفت باز که در چاهک شماره ۱ مشخص است سایز مارکر مورد استفاده ambdaDNA/EcoRI+HinDIII می‌باشد.

تهیه سازه بیان‌شونده در سیستم گیاهی

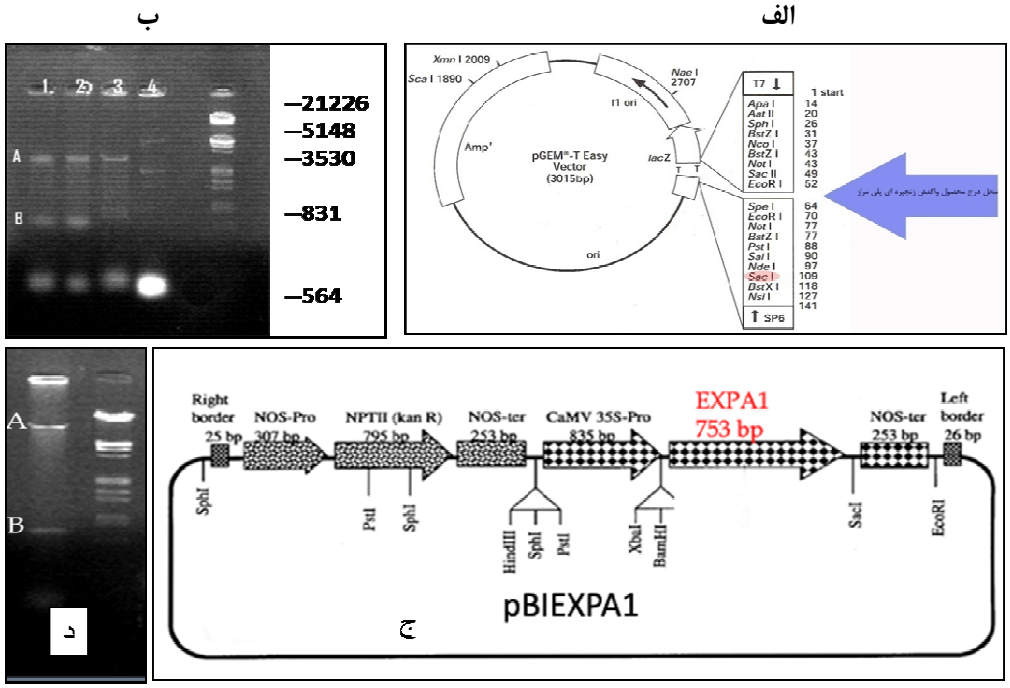
از آن‌جایی‌که ناقل pGEMT-easy Vector محل برش اختصاصی آنزیم *SacI* را در داخل خود دارا بوده (شکل ۳-الف) و جهت واردشدن محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ناقل pGEMT-easy vector مشخص نبوده است، بنابراین ابتدا پلاسمیدهای حاوی قطعه موردنظر با آنزیم *SacI* خطی‌شده و سپس با آنزیم *BamHI* بریده شدند که نتایج برش پلاسمید در شکل ۳-ب آورده شده است. چاهک شماره ۱، ۲ و ۳ پلاسمید بریده‌شده است که حاوی قطعه موردنظر (۷۵۳ جفت بازی) بوده است. باند A پلاسمید برش‌خورده است و باند B قطعه برش‌یافته را نشان می‌دهد. چاهک ۴ پلاسمید قبل از برش را نشان می‌دهد.

پلاسمید pBI121 موجود دارای ژن بتاگالاکتورونیداز است که برش آن با دو آنزیم

BamHI و *SacI* ژن بتاگالاکتورونیداز حذف و پلاسمید حاصل آماده پذیرش قطعه برش‌یافته از پلاسمید pGEMTEXPA1 گردید. پس از انجام واکنش اتصال و انتقال به *E.coli*، جهت تائید حضور قطعه موردنظر در پلاسمید pBI121، پلاسمید pBI121 با دو آنزیم برشی *SacI* و *BamHI* بریده شد که نتایج آن در شکل۳-د آورده شده است. باند A پلاسمید برش‌یافته با طول حدود ۱۳۰۰۰ جفت باز و باند B قطعه موردنظر با طول ۷۵۳ جفت باز را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۳-ج قطعه موردنظر جایگزین ژن بتا گالاکتورونیداز شده است. در واقع در این مرحله سازه‌ژنی ساخته شده و آماده انتقال به آگروباکتریوم می‌باشد.

نتایج انتقال‌ژن به آرابیدوپسیس به روش غوطه‌وری گل‌آذین

در این تحقیق انتقال‌ژن با روش غوطه‌وری گل‌آذین انجام شد. پس از تشکیل بذر و اتمام دوره پرشدن دانه و رسیدن بذور برداشت صورت گرفت و بذور حاصل ضدعفونی و بر روی محیط MS جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شدند. در ابتدای آزمایش تمام بذرها جوانه زدند اما چون در محیط انتخابی کشت صورت گرفته بود نتایج به‌دست‌آمده از کشت بذرها در محیط انتخابی نشان داد که بعضی از گیاهچه‌ها در این محیط بعد از مرحله ۲ برگی سبز باقی ماندند که نشان‌دهنده تراریختی آنان و بعضی گیاهچه‌ها سفید شدند. در این روش کارایی تراریختی پایین است اما چون تعداد بذر زیادی تولید می‌شود تعداد لاین‌های تراریخت قابل توجهی حاصل می‌گردد. در این مرحله از آزمایش ۱۲ گیاه توانایی تحمل ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را داشتند که به‌نظر می‌رسد لاین‌های تراریخت باشند.



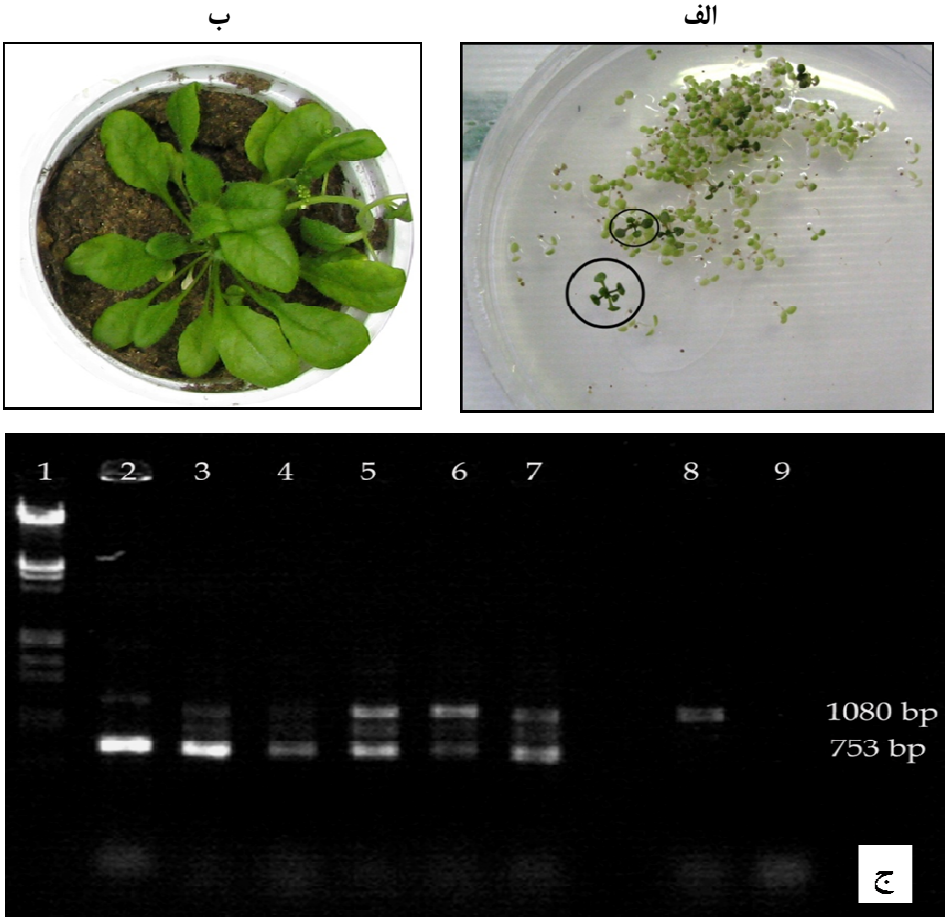
شکل ۳- (الف) نقشه پلاسمید pGEMT و محل‌های برش موجود در آن. محل برش آنزیم *SacI* مشخص شده است. (ب) نتایج بارگذاری برش پلاسمید pGEM-ET روی ژل آگارز یک درصد. باند A پلاسمید برش‌خورده. باند B قطعه موردنظر با طول ۷۵۳ جفت باز. چاهک ۴ پلاسمید قبل از برش را نشان می‌دهد. (ج) سازه تهیه‌شده pBI:EXPA1 را نشان می‌دهد که در آن محل برش آنزیم‌های برشی نیز نشان داده شده است. (د) برش پلاسمید pBI121 حاوی قطعه موردنظر. باند A پلاسمید برش‌یافته و باند B قطعه موردنظر با طول ۷۵۳ جفت باز را بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می‌دهد.

در روش‌های معمول انتقال‌ژن با استفاده از کشت‌بافت در طی مراحل کار تغییرات سوماکلونال دیده می‌شود. گیاهان به‌دست آمده نسل صفر (T_0) می‌باشند و همچنین نیاز به صرف زمان بیشتری نسبت به روش‌های *in planta* می‌باشد. روش‌های انتقال ژن *in planta* نیاز به کشت‌بافت را حذف یا به حداقل رسانده است. این روش‌ها شامل معرفی DNA، به‌وسیله آگروباکتری یا انتقال مستقیم، به گیاهان سالم است. این روند در زمان مناسبی از چرخه زندگی گیاه صورت می‌گیرد به‌طوری‌که DNA با سلول‌های جنسی ادغام می‌شود و یا با جنین تازه نمو یافته ترکیب می‌شود. در کل این روش کارایی پائینی دارد اما از آن‌جا که آرابیدوپسیس در هر گیاه حدود ۱۰۰۰۰ بذر تولید می‌کند در نهایت انجام این عمل را مقدور می‌سازد. این روش انتقال‌ژن به دلیل عدم نیاز به مراحل کشت‌بافتی دارای مزیت‌های زیادی است. در این روش تغییرات سوموکلونال که در روش کشت‌بافت دیده می‌شود وجود نخواهد داشت و همچنین نیاز به زمان کمتری نسبت به روش کشت‌بافت است. به‌علاوه گیاهان حاصل از این روش نسل T_1 را تشکیل می‌دهند (Primrose *et al*. 2001).

برای تایید بیشتر تراریختی گیاهان رشدکرده در ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین از گیاهان حاصل استخراج DNA انجام شد و تکثیر قطعه موردنظر با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از DNA گیاهچه‌های سبز آرابیدوپسیس که به خاک منتقل شده بودند (شکل۴–ب) با استفاده از آغازگرهای ژن *AtEXPA1* در شکل ۴–ج آورده شده است که در این شکل باند ۱۰۸۰ جفت بازی مربوط به ژن اولیه موجود در گیاه می‌باشد که این باند در گیاه شاهد هم دیده می‌شود اما یک باند ۷۵۳ جفت بازی در بعضی گیاهان دیده می‌شود که مربوط به سازه‌ژنی وارد شده است و در نمونه شاهد دیده نمی‌شود. در این واکنش از آگروباکتری حاوی سازه‌ژنی موردنظر جهت واکنش کنترل مثبت استفاده گردید. این تفاوت اندازه در باندها به‌دلیل طراحی آغازگرها بر اساس توالی کدکننده[1] ژن *AtEXPA1* می‌باشد چرا که اندازه ژن موجود در ژنوم هسته‌ای ۱۶۶۵ جفت باز می‌باشد اما به‌دلیل تکثیرنشدن نواحی 3’ UTR و 5’ UTR با آغازگرهای مذکور در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اندازه قطعه تکثیریافته ۱۰۸۰ جفت باز می‌باشد. ناقل pBIEXPA1 حاوی نواحی کدکننده ژن AtEXPA1 می‌باشد که طبق انتظار اندازه باند تکثیریافته ۷۵۳ جفت باز بود.

از آن‌جا که ژن *GmEXPA1* در سویا به‌صورت اختصاصی در منطقه طویل‌شدن ریشه‌های اولیه و ثانویه بیان می‌شود (Lee *et al*. 2003) و تشدید بیان *GmEXPA1* در توتون به‌طور قابل توجهی رشد ریشه را افزایش داده است که نتیجه افزایش طول سلول‌های اپیدرم ریشه می‌باشد، بنابراین با توجه به این مطلب و چون در این تحقیق از راه‌انداز CaMV35s جهت کنترل رونویسی ژن *AtEXPA1* استفاده شده است انتظار می‌رود در گیاهان تراریخت ریشه‌های طویل‌تری نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شود. با توجه به اینکه ژن *AtEXPA1* در سازه‌ژنی ساخته شده، تحت کنترل راه‌انداز CaMV35s می‌باشد انتظار می‌رود که تغییرات فنوتیپی نیز در شاخساره گیاهان تراریخت مشاهده شود. بررسی تغییرات فنوتیپی در ریشه و شاخساره گیاهان تراریخت حاصل در ادامه پروژه و به‌همراه دیگر لاین‌های حاصل از سایر ژن‌های خانواده اکسپنسین مورد بررسی و تجزیه تحلیل قرار خواهد گرفت. در صورت تائید تأثیر مثبت تشدید بیان ژن *AtEXPA1* بر طویل‌شدن ریشه می‌توان این ژن را به گیاهان زراعی هم خانواده آرابیدوپسیس مانند کلزا نیز منتقل کرد.

1. Coding Sequence (CDS)



شکل ۴- (الف) گیاهچه‌های تراریخت احتمالی آرابیدوپسیس که در محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین سبز باقی مانده‌اند و با دایره سیاه‌رنگ مشخص شده‌اند. گیاهچه‌های غیرتراریخت سفید شده‌اند. (ب) گیاهچه‌های سبز در محیط حاوی کانامایسین پس از انتقال به خاک و (ج) نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از DNA آرابیدوپسیس. چاهک۱. سایز مارکر چاهک ۲. کنترل مثبت چاهک‌های۳،۴،۵،۶و ۷ لاین‌های تراریخت چاهک ۸ نمونه شاهد چاهک ۹. کنترل منفی. باند ۱۰۸۰ جفت بازی مربوط به ژن اولیه موجود در گیاه است و باند ۷۵۳ جفت بازی مربوط ژن نوترکیب وارد شده به گیاه است.

REFERENCES

Cattivelli L, Rizza F, Badeck W, Mazzucotelli E, Mastrangelo A, Francia E, Marè C, Tondelli A, Stanca A (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics, Field Crops Research. 105(1-2): 1-14.

Cho HT, Cosgrove DJ (2000) Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 97: 9783–9788.

Cosgrove DJ (1989) Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. Planta. 177: 121–130

Ghaderi M (2010) Overexpression of At. EXPA1 into *Brassica napus*.

Lee DK, Ahn JH, Song SK, Choi YD, Lee JS (2003) Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. Plant Physiology. 131: 985–997.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. Plant Cell. 4: 1425–1433.

Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C, Fleming AJ (2001) Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 98: 11812–11817.

Primrose SB, Twyman RM (2001) Principle of gene manipulation and genomics. Blackwell publishing.

Rayle DL, Cleland RE (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol. 46: 250–253.

Sambrook J, Russell D (2004) Molecular cloning: a laboratory manual.

Sampedro J, Cosgrove DJ (2005) The expansin superfamily. Genome Biology, 6, 242.

Wu J, Meeley RB, Cosgrove DJ (2001) Analysis and expression of the_-expansin and _-expansin gene families in maize. Plant Physiology. 126: 222–232.

Zenoni S, Reale L, Tornielli GB, Lanfaloni L, Porceddu A, Ferrarini A, Moretti C, Zamboni A, Speghini A, Ferranti F, Pezzotti M (2004) Downregulation of the Petunia hybrida _-expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. Plant Cell. 16: 295–308.