

## «مقاله پژوهشی»

بررسی عملکرد پروموتور *AtPHT1;1* در سیستم هترولوگ کلزازهرا فتحی<sup>۱</sup>، کتایون زمانی<sup>۲\*</sup>، سولماز خسروی<sup>۳</sup>، محمدعلی ملبوبی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی مقطع دکتری تخصصی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، تهران، ایران.

۲. استادیار، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، مؤسسه تحقیقاتی ژنتیک گیاهی و گیاهان زراعی لایپنیز، IPK، آلمان.

۴. استاد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۰)

Functional Analysis of *AtPHT1;1* promoter in rapeseed (*Brassica napus* L.) heterologous systemZahra Fathi<sup>1,2</sup>, Katayoun Zamani<sup>2\*</sup>, Solmaz Khosravi<sup>3</sup>, Mohammad Ali Malboobi<sup>4</sup>

1. Ph.D. Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajooesh, Tehran, I.R. Iran.

2. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Ph.D. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, IPK Gatersleben, Germany.

4. Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajooesh, Tehran, I.R. Iran.

(Received: 11, May, 2022 - Accepted: Sep. 11, 2022)

## Abstract

Breeding crops with a higher ability in using soil minerals is one of the biotechnology researchers' goals. Genetic engineering methods provide considerable advances in crop breeding by transferring and creating desired traits for further production under normal or stress conditions. In these procedures, Design of efficient gene constructs is of particular importance and requires promoters with proper function to specifically express the gene of interest in the target tissue and at the appropriate time to develop desired traits such as tolerance to biotic and abiotic stresses or other aims. Specific expression of phosphate-transporter genes in the roots and their induced levels in phosphate deficiency shows the potential of this gene-family promoters utilization in transgenic plants, particularly for the use in phosphate absorption from soil. Bioinformatics analysis showed that the 1826-bp promoter fragment of *AtPHT1;1* gene carries several motifs leading to root-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. The expression of a secretory acid phosphatase gene, *AtPAP17*, as a reporter gene in rapeseed transgenic plants indicated that the *AtPHT1;1* promoter retains its root-specific criteria in rapeseed such that it could be used as a regulatory region for the specific expression of desired genes in transgenic rapeseed plant roots.

**Keywords:** *AtPHT1;1* promoter, canola, Purple acid phosphatase, Phosphate stress, root

## چکیده

اصلاح گیاهان زراعی با قابلیت بیشتر استفاده از مواد معدنی موجود در خاک از اهداف پژوهشگران حوزه زیست‌فناوری است. روش‌های مهندسی ژنتیک پیشرفت‌های چشمگیری را در اصلاح گیاهان زراعی با انتقال و ایجاد صفات مفید جهت تولید بیشتر در شرایط عادی و یا تحت تنش را فراهم می‌آورند. طراحی سازه‌های ژن کارآمد دارای پروموتورهایی با عملکرد مناسب به‌منظور بیان اختصاصی ژن‌های مورد نظر در بافت‌های هدف و در زمان مناسب جهت ایجاد صفات مطلوب مانند تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی یا اهداف دیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بیان اختصاصی ژن‌های ناقل فسفات در ریشه و القای آنها با تنش کمبود فسفات، قابلیت پروموتورهای اعضای این خانواده ژن را جهت بهره‌برداری در گیاهان تراریخت به‌ویژه برای جذب فسفات از خاک نشان می‌دهد. در این پژوهش یک قطعه ۱۸۲۶ جفت بازی مربوط به پروموتور ژن *AtPHT1;1* گیاه آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana* L.) مورد بررسی بیوانفورماتیکی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این پروموتور دارای موتیف‌های متعدد مربوط به بیان اختصاصی در ریشه است. بیان اسید فسفات از ترشحی *AtPAP17* به‌عنوان یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتور *AtPHT1;1* در گیاهان تراریخت کلزا نشان داد که پروموتور مذکور ویژگی بیان بافتی خود را در گیاه کلزا حفظ کرده و به‌طور اختصاصی در ریشه بیان می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک ناحیه تنظیم‌کننده برای بیان اختصاصی ژن‌های مطلوب در ریشه گیاهان تراریخت کلزا مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** اسید فسفات از ارغوانی، پروموتور *AtPHT1;1*، تنش فسفات، ریشه، کلزا

## مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) دومین گیاه زراعی تامین‌کننده روغن در جهان است و کمبود فسفات از عوامل اصلی محدود کننده عملکرد در این گیاه است. فسفر به صورت یون آزاد فسفات، قابل جذب ریشه گیاه است. بنابراین، در عمل کارایی افزودن کودهای شیمیایی فسفات پایین بوده و بخش عمده‌ای از آن (بیش از ۸۰ درصد) به صورت ذخیره ترکیبات فسفر در خاک تثبیت می‌شود که برای گیاهان به سختی قابل دسترس و جذب است (Sharpley et al., 2005). اصلاح گیاهان زراعی با کارایی بیشتر جهت استفاده از مواد معدنی موجود در خاک از اهداف پژوهشگران زیست‌فناوری است. روش‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی پیشرفت‌های چشمگیری را در اصلاح گیاهان زراعی با انتقال و ایجاد صفات مفید جهت تولید بیشتر در شرایط عادی و یا تحت تنش را فراهم می‌آورند. در این روش‌ها طراحی سازه‌های ژن کارآمد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و نیازمند داشتن پروموتورهایی با عملکرد مناسب جهت بیان اختصاصی ژن در بافت هدف و در زمان مناسب است تا ایجاد صفات مورد نظر را برای غلبه بر تنش‌های زیستی و غیر زیستی یا اهداف دیگر امکان‌پذیر سازند.

مهم‌ترین عامل تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها، پروموتورها هستند. پروموتورها مناطق تنظیمی بالادست ناحیه رمزکننده هستند که توسط عوامل رونویسی شناسایی شده و میزان نسخه‌برداری از یک ژن را تضمین می‌کنند و بر اساس نحوه بیان ژن‌ها به دو دسته با بیان دائمی و بیان تنظیم‌شونده تقسیم می‌شوند. ژن‌های با بیان دائمی یا ژن‌های خانه‌دار<sup>۱</sup> در همه بافت‌ها و در سراسر زندگی گیاه بیان می‌شوند ولی ژن‌هایی که بیان تنظیم‌شونده دارند تحت تأثیر یک محرک محیطی بیان آنها تا چند هزار برابر در بافت‌های

مختلف، شرایط محیطی متفاوت و مراحل تکوینی خاص تغییر می‌کند. لذا این ژن‌ها خود به دو دسته ویژه بیان بافتی (در یک بافت خاص بیان می‌شوند) یا ژن‌های القایی (که بیان آنها در اثر زخم، تنش‌های زیستی و غیر زیستی، هورمون‌ها و ... القا می‌شود) تقسیم‌بندی می‌شوند (de Melo et al., 2021). ریشه اندام اصلی برای جذب مواد معدنی توسط گیاه است و ژن‌های متعددی با بیان اختصاصی در ریشه شناخته شده‌اند که از آن جمله می‌توان به خانواده ناقل‌های فسفات (PHT1)<sup>۲</sup> در آراییدوپسیس اشاره نمود. این خانواده در آراییدوپسیس ۹ عضو دارد که در بین گونه‌های مختلف گیاهی حفظ شده‌اند. وظیفه اصلی آنها جذب فسفات از ریزوسفر و همچنین جابه‌جایی فسفات در بافت‌های مختلف است. تعدادی از اعضای این خانواده در اپیدرم ریشه و به‌ویژه در شرایط تنش کمبود فسفات بیان می‌شوند (Nussaume et al., 2011; Mudge et al., 2002). بنابراین اعضای این خانواده ژنی کاندیدهای مناسبی جهت جداسازی پروموتورهای القا شونده با تنش فسفات و همچنین با بیان اختصاصی در ریشه جهت استفاده در پروژه‌های مهندسی ژنتیک هستند. در این پژوهش، پس از تجزیه و تحلیل توالی پروموتور *AtPHT1;1*، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، قطعه مورد نظر از گیاه آراییدوپسیس تالیانا همسانه‌سازی و برای تنظیم بیان یک ژن رمزکننده اسیدفسفاتاز به نام *AtPAP17* استفاده شد و عملکرد آن در گیاهان تراریخت کلزا بررسی شد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی نحوه بیان پروموتور *PHT1;1* در گیاه کلزا و معرفی یک ناحیه تنظیم‌کننده جهت بیان اختصاصی ژن‌های مطلوب در گیاهان تراریخت کلزا به منظور افزایش تحمل به تنش‌های کمبود مواد مغذی به‌ویژه کمبود فسفات بوده‌است.

(Zare *et al.*, 2019) (P-DNA) این ناقل فاقد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جهت انتخاب گیاهان تراریخت است. از این رو یک کاست بیانی دارای ژن فسفیت اکسیدوردوکتاز (*ptxD*)<sup>1</sup> از باکتری *Pseudomonas stutzeri* با شماره دسترسی (AF061070) طراحی و برای انتخاب گیاهان تراریخت استفاده شد (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2013). توالی این ژن پس از اصلاح کدونی توسط شرکت ProteoGenix فرانسه ساخته شد. سازه نهایی با روش ذوب و انجماد وارد آگروباکتریوم تومه‌فاشنس سویه GV3101 شد و برای تراریختی کلزا مورد استفاده قرار گرفت.

#### مواد گیاهی و تراریختی کلزا

در این پروژه که در سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۷ به‌طور مشترک در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام شده است، از گیاه کلزا، رقم نیما استفاده شد (دریافتی از بخش دانه‌های روغنی، مؤسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر). جداکشت‌های برگ کوتیلدونی از دانه‌رست‌های ۵ تا ۷ روزه جدا و به‌مدت ۲ تا ۴ روز بر روی محیط باززایی پیش‌کشت شدند. محیط باززایی دارای نمک‌های MS ویتامین‌های B5، ساکارز ۳ درصد، ۱ mg/L BA، ۱ mg/L NAA، ۰/۰۴ و ۰/۷ درصد است. کشت شبانه‌ای از آگروباکتریوم تومه‌فاشنس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه GV3101 حاوی سازه مورد نظر تهیه شد پس از رسیدن به OD مناسب ۰/۸-۰/۳ OD، باکتری رسوب داده شد و در محیط هم‌کشتی شامل MS پایه (در این مرحله عناصر ماکرو محیط کشت تنها شامل MgSO<sub>4</sub> می‌باشد)، ساکارز ۳ درصد، گلوکز ۵ درصد، استوسرینگون ۲۰۰ μM،

#### مواد و روش‌ها

**بررسی بیوانفورماتیکی توالی پروموتور *AtPHT1;1* از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا**  
بررسی بیوانفورماتیکی توالی *AtPHT1;1* با استفاده از نرم‌افزارهای PLACE (Higo *et al.*, 1999)، PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) و همچنین جستجو در منابع انجام شد. در کلیه موارد اطلاعات مربوط به توالی‌های موردنظر از پایگاه NCBI دریافت شد. مهندسی ژنتیک و کلونینگ توالی در نرم‌افزار SeqBuilder از مجموعه نرم‌افزارهای Lasergene (شرکت DNASTAR، Madison) انجام شد. با بررسی این نقشه آغازگرهای مناسب با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد (جدول ۱).

#### همسازسازی پروموتور ژن *AtPHT1;1* و ژن *AtPAP17* و ساخت سازه بیانی

جهت تکثیر قطعات پروموتور و ترمیناتور، DNA ژنومی با استفاده از روش Dellaporta *et al.* (1983) از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جدا شد و توالی‌های مورد نظر با روش PCR و با استفاده از آنزیم Expand High Fidelity شرکت Thermofisher تکثیر و در ناقل pTZ57R/T همسازسازی شدند و پس از تایید با توالی‌یابی، سازه نهایی ساخته شد. آغازگرهای پروموتور ژن *AtPHT1;1* (*PHT1;1F/R*) براساس توالی DNA ژنومی (GeneID:834353)، آغازگرهای ترمیناتور ژن *AtHSP18* (*HSP18F/R*) براساس توالی DNA ژنومی (GeneID:836093) و آغازگرهای مربوط به همسازسازی طول کامل mRNA مربوط به ژن *AtPAP17* (*PAP17F/R*) بر طبق توالی رفرنس mRNA (Accession No. NM\_112660) طراحی شدند. برای ساخت سازه نهایی از وکتور pAPCUFi استفاده شد که کلیه قطعات سازنده ناحیه T-DNA آن منشأ گیاهی دارد

1. Phosphite oxidoreductase

تکثیر ژن VirB6 و با استفاده از آغازگرهای VirB6-F/R انجام شد (جدول ۱). برنامه PCR، یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بوده‌است. در آخرین مرحله حضور ژن انتقال یافته با استفاده از دو آغازگر درون ژن مربوط به ژن *AtPAP17* به نام UniPAP17-R و AP29-F بررسی شد (جدول ۱). برنامه PCR، یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بوده‌است.

#### رنگ‌آمیزی بافتی ریشه گیاهان تراریخت با استفاده از سوپسترای 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)

در آزمون رنگ‌سنجی (Colorimetric Assay) ریشه گیاهان تراریخت که نتایج PCR آنها مثبت شده‌بود، با استفاده از سوپسترای BCIP شرکت سیگما بررسی شدند. محلولی از سوپسترای BCIP در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شد و سپس بر روی ریشه هر گیاه تراریخت، ۱ میلی‌لیتر از سوپسترای مورد نظر ریخته شد و بعد از مدت‌زمان ۵ دقیقه عکس‌برداری انجام شد.

#### بررسی بیان ژن *AtPAP17* در برگ و ریشه با روش RT-PCR

استخراج RNA کل از نمونه‌های ریشه و برگ سه نمونه منتخب از گیاهان تراریخت با استفاده از بافر RNX-Plus Solution for total RNA isolation شرکت سینا کلون انجام شد. جهت حذف آلودگی ژنومی از تیمار DNase I شرکت سینا کلون

فاقد هورمون و با  $\text{pH}=5/6$  تعلیق شد و به مدت ۳ ساعت در rpm ۱۸۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مرحله جداکشت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با باکتری آغشته شدند و سپس بر روی کاغذ صافی قطرات اضافی سوسپانسیون باکتری حذف و تمامی جداکشت‌ها به محیط هم‌کشتی منتقل شدند و به مدت ۲ تا ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس جداکشت‌ها به محیط انتخاب محیط بازرایی اصلاح‌شده دارای فسفات با غلظت ۰/۰۵ mM و فسفات با غلظت ۰/۲۵ mM منتقل شدند. ریزنمونه‌های تلقیح‌شده هر ۷ روز یک‌بار در محیط جدید واگشت شدند و پس از گذشت حدود ۱۰ روز از تلقیح، جوانه‌های متعددی روی بعضی از جداکشت‌ها به وجود آمد که جوانه‌های سبز جدا و به محیط فاقد هورمون منتقل شدند. گیاهان سبزی که رشد مناسب داشتند به محیط ریشه‌زایی شامل نمک‌های MS ویتامین‌های B5، ساکارز ۳ درصد، NAA ۰/۵ mg/L و آگار ۰/۷ درصد منتقل شدند.

#### تایید تراریخته با استفاده از آزمون‌های PCR

استخراج DNA ژنومی از برگ کلزا به روش CTAB (Keb-Ilanes *et al.*, 2002) انجام شد. کیفیت DNA ژنومی استخراج‌شده با تکثیر ژن درونی گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز و با استفاده از آغازگرهای GAPDH-F/R<sup>۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت. برنامه PCR، یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بوده‌است (جدول ۱). در مرحله بعد عدم آلودگی DNA ژنومی گیاه با آگروباکتری و جلوگیری از خطا با بررسی

1. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

همان 5'UTR است. بعد از اگزون اول، یک اینترون به طول ۲۱۶ bp قرار گرفته است. این ژن همچنین دارای یک ناحیه 3'UTR به طول ۱۴۹ bp است. توالی ۱۹۸۶bp بالادست رمز شروع ترجمه ژن *AtPHT1;1* با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی PlantCARE و PLACE و یا جستجو در اطلاعات موجود در منابع و با تأکید بر عناصر تنظیمی مربوط به بیان در ریشه و تنش فسفات مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). همان‌گونه که انتظار می‌رفت این پرموتر دارای تعداد زیادی از عناصر TATA-box است که هسته اصلی پرموتر را تشکیل می‌دهد. در یوکاریوت‌ها معمولاً TATA-box در ناحیه ۱۰ تا ۴۰ جفت باز بالادست جایگاه شروع رونویسی قرار می‌گیرد. نرم‌افزار PlantCARE حضور ۷۳ TATA-box را در هر دو رشته نشان می‌دهد که ۲۳ عدد بر روی رشته مثبت و ۵۰ عدد بر روی رشته منفی قرار دارند و تنها یکی از آنها در موقعیت -۵۷ در رشته مثبت قرار گرفته است. در همین مکان توالی TATAAAAT قرار گرفته است که در پستانداران و مخمر مطلوب‌ترین عنصر TATA به لحاظ عملکردی شناخته شده است (Wobbe & Struhl, 1990). جالب‌توجه اینکه اغلب TATA-boxهایی که بر روی رشته مثبت قرار دارند در فاصله ۹۰۰- تا ۹۱۳- قرار دارند. بررسی با نرم‌افزار PLACE نشان داد این پرموتر همچنین دارای چهار توالی آغازکننده Inr<sup>۱</sup>، YTCANTYY است که معمولاً در پرموترهای<sup>۲</sup> فاقد TATA-box وجود دارد. سه‌تای آنها در رشته منفی و تنها یکی از این توالی‌های Inr در رشته مثبت و در نخستین اگزون قرار دارد.

استفاده (DNase I.Rnase-free500U. 1u/μl) گردید. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس غیرفعال‌سازی آنزیم با اضافه کردن EDTA (۲۵mM) و قرارگیری نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. همچنین جهت ارزیابی کمیت RNA از آنها رقت ۰/۰۱ تهیه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، غلظت (ng/μl) و میزان آلودگی مواد فنولی و پروتئینی در طول موج ۲۶۰/۲۸۰nm به دست آمد. واکنش رونویسی معکوس با به‌کارگیری آنزیم M-MuLV شرکت فرمنتاز انجام شد. ساخت cDNA توسط ترکیبی از آغازگرهای Oligo dT و Random Hexamer انجام شد. جهت ممانعت از تشکیل ساختارهای ثانویه در RNA نمونه‌های مورد نظر ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۵ دقیقه دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. غیر فعال‌سازی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سنجش صحت و میزان سنتز cDNA با واکنش PCR با آغازگر کنترل داخلی GAPDH تایید و بررسی بیان ژن *AtPAP17* با به‌کارگیری آغازگر اختصاصی *AtPAP17* (pap17-F/R) (جدول ۱) انجام شد.

## نتایج و بحث

بررسی بیوانفورماتیکی توالی پرموتر ژن *AtPHT1;1* ژن *AtPHT1;1* آرآیدوپسیس به طول ۲۳۹۰ bp دارای سه اگزون و دو اینترون، با یک قالب خواندنی باز ۲۰۱۲ bp است. که ناحیه رمزکننده پروتئین از ابتدای اگزون دوم آغاز می‌شود. اگزون اول و ابتدای اگزون دوم به طول ۲۸۹ bp ترجمه نمی‌شود که

1. Un-Translated Region  
2. Initiator element  
3. Core promoter

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در ساخت سازه pAPCUFi-PHT1-PAP17 و تشخیص گیاهان تراریخت.

| نام آغازگر | توالی آغازگر                             |
|------------|--|
| UBQF2*     | 5-GAGCTCTTTCGTATACATAAAAAATAAGGAT-3      |
| UBQR2      | 5-GGTACCTTGAGGATTTGTTGAGA-3              |
| Pht1.1F    | 5-GTCGACCTATGAACATA\GTGTA-3              |
| Pht1.1R    | 5-CTCGAGTTCCTAGAGCTATATAAT-3             |
| PAP17 F    | 5-CTCGAGCCTACCTAATTCATC-3                |
| PAP17 R    | 5-CTCGAGTCAAACAGGAATGAAG-3               |
| HSPF       | 5-AGGTACCATATGAAGATGAAGATGAA-3           |
| HSPR       | 5-AGAGCTCGAGGAAGGGAGTTTA-3               |
| VirB6F     | 5-CGTTTACGGCATTTCATACGATC-3              |
| VirB6R     | 5-GACTCCGAAGGCAGACCAGAG-3                |
| GAPDH-F    | 5-TATGTTTGTGTTGGTGTCAACGAGCAGCAATACAAG-3 |
| GAPDH-R    | 5-ATGTTAAATGATGCAGCCCTCCACCTCTC-3        |
| AP29F      | 5-CGAGTCTGAGTTTGCTGTTGT-3                |
| UniPAP17R  | 5-AGAGCTTTGACATAAGAGTTGCGAGAT-3          |
| pap17F     | 5-ATTCTGGTCGTCGATCGTTAATG-3              |
| pap17R     | 5-CCATCTGATAAGCAACGAGAGAC-3              |

\* توالی‌های زیر خطدار برای ایجاد جایگاه آنزیم‌های محدودگر اضافه شده‌اند.

جدول ۲. بخشی از موتیف‌های موجود در پروموتور ژن *AtPHT1;1* آراییدوپسیس که با استفاده از نرم‌افزارهای Place، PlantCARE و یا با جستجو در منابع به‌دست آمده‌است.

| نام                       | توالی            | تعداد       | عملکرد  | منابع                |
|---------------------------|------------------|-------------|---|----------------------|
| TATA-box                  | TATA             | 23(+),50(-) | Core promoter element around -30 of transcription start         | PlantCare DB         |
| CAAT-box                  | GGCAAT/CAAT/CAAT | 14(+),13(-) | Common cis-acting element in promoter and enhancer regions      | PlantCare DB         |
| TATA                      | TATAAAAT         | 1(+),1(-)   |   | PlantCare DB         |
| Inr                       | YTCANTYY         | 1(+),3(-)   | Initiator element, core promoter element                        | Place DB             |
| CCCAT-motif               | CCCAT            | 1(+)        | Putative core element   | Scranton et al; 2016 |
| CGATT                     | CGATT            | 2(+)        | IME signals like motif involved in high expression levels       | Rose et al; 2016     |
| DOFCOREZM                 | AAAG             | 7(+),16(-)  | Binds dof-proteins and enhances transcription in many promoters | Place DB             |
| GATA-box                  | GATA             | 7(+),14(-)  | High level, light regulated, tissue specific expression         | Place DB             |
| HD-ZIPIII                 | GTAAT(G/C)ATTAC  | 1(+)        | Protein binding site  | PlantCare DB         |
| MARTBOX                   | TTWTWTWTT        | 2(+),4(-)   | Enhances expression   | Place DB             |
| MARABOX1                  | AATAAAYAAA       | 1(+)        | Enhances expression   | Place DB             |
| ROOTMOTIFTAPOX1           | ATATT            | 14(+),10(-) | Root specific   | Place DB             |
| OSE1ROOTNODULE/ NODCON1GM | AAAGAT           | 1(+),2(-)   | Root specific   | Place DB             |
| OSE2ROOTNODULE/ NODCON2GM | CTCTT            | 2(+),3(-)   | Root specific   | Place DB             |
| RHERPATEXPA7              | KCACGW           | 2(+),1(-)   | Root hair specific  | Place DB             |
| ARFAT                     | TGTCTC           | 1(+)        | Auxin response factor   | Place DB             |
| P1BS                      | GNATATNC         | 3(+),3(-)   | PHR1-binding sequence   | Place DB             |
| PHL2                      | AAATATCC         | 1(+)        | P-responsive elements   | Wang et al; 2018     |
| NIT2                      | TATC(A/T)(A/T)   | 6(+)        | P-responsive elements   | Muller et al; 2007   |
|                           | AGTTTT           | 2(+)        | P-responsive elements   | Muller et al; 2007   |
|                           | GAATAT           | 2(+)        | P-responsive elements   | Muller et al; 2007   |
| W box                     | (C/T)TGAC(T/C)   | 2(+)        |   | Muller et al; 2007   |
| C2H2                      | A[AG/CT]CNAC     | 1(+)        |   | Liu et al; 2022      |
|                           | TGCTANNATTG      | 0           |   |                      |
| ZAT6 (C2H2)               | TACAAT           | 2(+)        |   | Liu et al; 2022      |
| NIGT1.2 activator         | AGANNNA AAA      | 1(+)        |   | Wang et al; 2020     |
|                           | AAACNNAACC       | 0           |   |                      |
| NIGT1.2 repressor         | AANNAGA          | 4(+)        |   | Wang et al; 2020     |
|                           | TGGGA            | 0           |   |                      |
|                           | GAGA             | 7(+)        |   |                      |

0 عدد صفر به معنای عدم حضور موتیف مذکور در توالی پروموتور است.

این عنصر تنظیم‌گر است (Reyes *et al.*, 2004). از این موتیف نیز ۷ عدد بر روی رشته مثبت و ۱۶ عدد بر روی رشته منفی وجود دارد. همچنین یک موتیف محل اتصال HD-ZIPIII در پروموتور *AtPHT1;1* شناسایی شد. در آراییدوپسیس پروتئین‌های تنظیم‌گر HD-ZIPIII کوچک‌ترین خانواده فاکتورهای رونویسی هستند که در شکل‌گیری جنین، اندام هوایی، ریشه و بافت آوندی دخالت دارند و جزئی از مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی و راه‌اندازی رشد هستند (Brandt *et al.*, 2014).

بررسی بیشتر پروموتور *AtPHT1;1* جهت یافتن عناصر مربوط به بیان اختصاصی در ریشه نشان می‌دهد که این پروموتور دارای عناصر OSE1ROOTNODULE، ROOTMOTIFTAPOX1 و OSE2ROOTNODULE است که هر سه آنها بیان اختصاصی در بافت ریشه را سبب می‌شوند. حضور چهار نسخه از موتیف ROOTMOTIFTAPOX1 در یک پروموتور سینتتیک موجب بیان اختصاصی ژن *GUS* در ریشه‌های گیاهان تراریخت توتون شد (Mohan *et al.*, 2017). تحقیقات پیشین نشان داد که اتصال یک قطعه DNA شامل ۴ موتیف ROOTMOTIFTAPOX1، SP8BFIBSP8AIB و OSE1ROOTNODULE به پروموتور حداقلی OSE2ROOTNODULE در ریشه‌های گیاهان تراریخت توتون شده است (Cui *et al.*, 2020). جالب‌توجه است که پروموتور *AtPHT1;1* دارای ۱۴ ROOTMOTIFTAPOX1 است که اصلی‌ترین عنصر بیان اختصاصی در ریشه است. همچنین دارای یک OSE1ROOTNODULE و دو OSE2ROOTNODULE در رشته مثبت است که عملکرد اختصاصی این پروموتور در بافت ریشه را تضمین می‌کنند. بررسی پروموتور ژن‌های Expansin

پروموتور *AtPHT1;1* ۲۷ موتیف CAAT-box دارد که از این ۲۷ موتیف ۱۴ عدد آنها در رشته مثبت جای گرفته‌است. این توالی که از فراوان‌ترین موتیف‌ها در نواحی پروموتوری است، در هر دو جهت دارای فعالیت است و به دلیل حساسیت آن به جهش، به‌عنوان توالی تعیین‌کننده کارایی پروموتور در نظر گرفته شده است (Porto *et al.*, 2014). پروموتور *AtPHT1;1* همچنین دارای یک موتیف CCCAT در موقعیت ۱۵۰- است که از عناصر تشکیل‌دهنده هسته پروموتور در پروموتورهای مصنوعی در جلبک کلامیدوموناس است. این موتیف بیشتر در موقعیت ۶۵- در بالادست جایگاه شروع رونویسی مشاهده شده است (Scranton *et al.*, 2016) و می‌تواند در پایداری کمپلکس آغازی رونویسی (Transcription initiation complex) و به‌دنبال آن بیان پایه بالاتر نقش داشته باشد. در این توالی همچنین دو موتیف CGATT وجود دارد که هر دو آنها خارج از اینترون و در بالادست اگزون اول قرار گرفته‌اند. این توالی در اینترون ژن *UBQ10* آراییدوپسیس شناخته شده و نقش تنظیمی مهمی در افزایش بیان با واسطه اینترون IME دارد (Rose *et al.*, 2016). اهمیت این موتیف به‌اندازه‌ای است که با دست‌ورزی آزمایشی یک اینترون و افزایش تعداد این عنصر در آن می‌توان میزان بیان یک پروموتور را افزایش داد (Parra *et al.*, 2011).

از عناصر قابل‌توجه دیگری که در این پروموتور شناخته شد، DOFCORZEM با توالی AAAG است که سبب افزایش رونویسی می‌شود. از این موتیف ۷ عدد بر روی رشته مثبت و ۱۴ عدد بر روی رشته منفی وجود دارد. GATA-box موتیف دیگری که در پروموتور CaMV35S شناخته شده است و بیان بالا، تنظیم بیان با نور و بیان اختصاصی بافت از ویژگی‌های

تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تنش کمبود فسفات از اهمیت کمتری برخوردارند (Wang *et al.*, 2018). بررسی پروموتور *AtPHT1;1* برای موتیف‌هایی که توسط Müller *et al.* (2007) ارائه شده است حضور تنها سه نوع موتیف دیگر علاوه بر P1BS را نشان می‌دهد. پروموتور *AtPHT1;1* دارای ۶ موتیف NIT2، دو موتیف AGTTTT و دو موتیف GAATAT است که عملکرد دو موتیف آخر هنوز شناخته نشده است. پروتئین‌های انگشت روی C2H2 گروهی از عوامل رونویسی هستند که علاوه بر تنظیم رشد و نمو، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌ها به‌ویژه تنش‌های غیر زیستی دارند. توالی اتصال احتمالی این پروتئین‌ها در پروموتور شامل A[AG/CT]CNAC، TGCTANNATTG و TACAAT است (Liu *et al.*, 2022).

در پروموتور *AtPHT1;1* دو جایگاه TACAAT شناسایی شد که محل اتصال فاکتور رونویسی ZAT6 است. ZAT6 یک رپرسور رشد ریشه‌های اولیه است و از طریق کنترل رشد ریشه، هموستازی فسفات را تنظیم می‌نماید (Devaiah *et al.*, 2007). همچنین یک جایگاه A[AG/CT]CNAC در پروموتور *AtPHT1;1* وجود دارد. یکی دیگر از عوامل رونویسی پروتئین‌های خانواده انگشت روی است که به‌طور مثبت بیان ژن‌های مربوط به طویل شدن ریشه‌های مویین را در پاسخ به تنش کمبود فسفات و پتاسیم در آراییدوپسیس تنظیم می‌نماید (Huang *et al.*, 2020).

<sup>۲</sup>NIGT1.2 یا <sup>۳</sup>HHO2 یک فاکتور رونویسی وابسته به خانواده myb است که جذب فسفات و نیترات را در طی تنش کمبود فسفات تعدیل نموده و تعادل بین این دو عنصر را در گیاه حفظ می‌نماید.

از گیاهان مختلف که بیان اختصاصی در ریشه مویین دارند و همچنین دیگر ژن‌های با بیان اختصاصی در ریشه‌های مویین از گیاه آراییدوپسیس حضور یک تا ۳ عنصر RHERPATEXPA7 در بالادست ناحیه 5'UTR یعنی فاصله ۳۰- تا ۸۰۰- را نشان داده شده است (Kim *et al.*, 2006). پروموتور *AtPHT1;1* نیز دارای سه عدد RHERPATEXPA7 است که دو تا آنها در رشته مثبت و یکی از این دو در ناحیه 5'UTR در آگزون نخست قرار دارد که از این جهت با بقیه تفاوت دارد (شکل ۱ بالا).

پروموتور *AtPHT1;1* برای حضور عناصر مرتبط با تنش کمبود فسفات نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ پایین). یک فاکتور رونویسی کلیدی است که در پاسخ به تنش کمبود فسفات فعال می‌شود (Rubio *et al.*, 2001) و متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی MYB-CC است که ۱۵ عضو دارد. نقش تنظیمی اعضای دیگر این خانواده مانند PHL1، PHL2، PHL3 و PHL4 نیز در پاسخ به تنش فسفات شناخته شده است. پروموتور اغلب ژن‌های پاسخ به تنش کمبود فسفات دارای توالی پالیندرومی (GNATATNC) است که جایگاه اتصال PHR1 است. جایگاه اتصال PHL1 با PHR1 یکسان است (Bustos *et al.*, 2010) و در پروموتور *AtPHT1;1* سه جایگاه اتصال PHR1 شناسایی شده است که یکی از آنها در اینترون نخست قرار دارد.

برخلاف PHR1 و PHL1، رونویسی ژن‌های مربوط به PHL2 و PHL3 با تنش کمبود فسفات افزایش می‌یابد. PHL2 به موتیف AAATATCC و PHL3 به موتیف ACATATTC متصل می‌شود (Sun *et al.*, 2016). در پروموتور *AtPHT1;1* یک جایگاه اتصال PHL2 شناسایی شد. PHL3 و PHL4

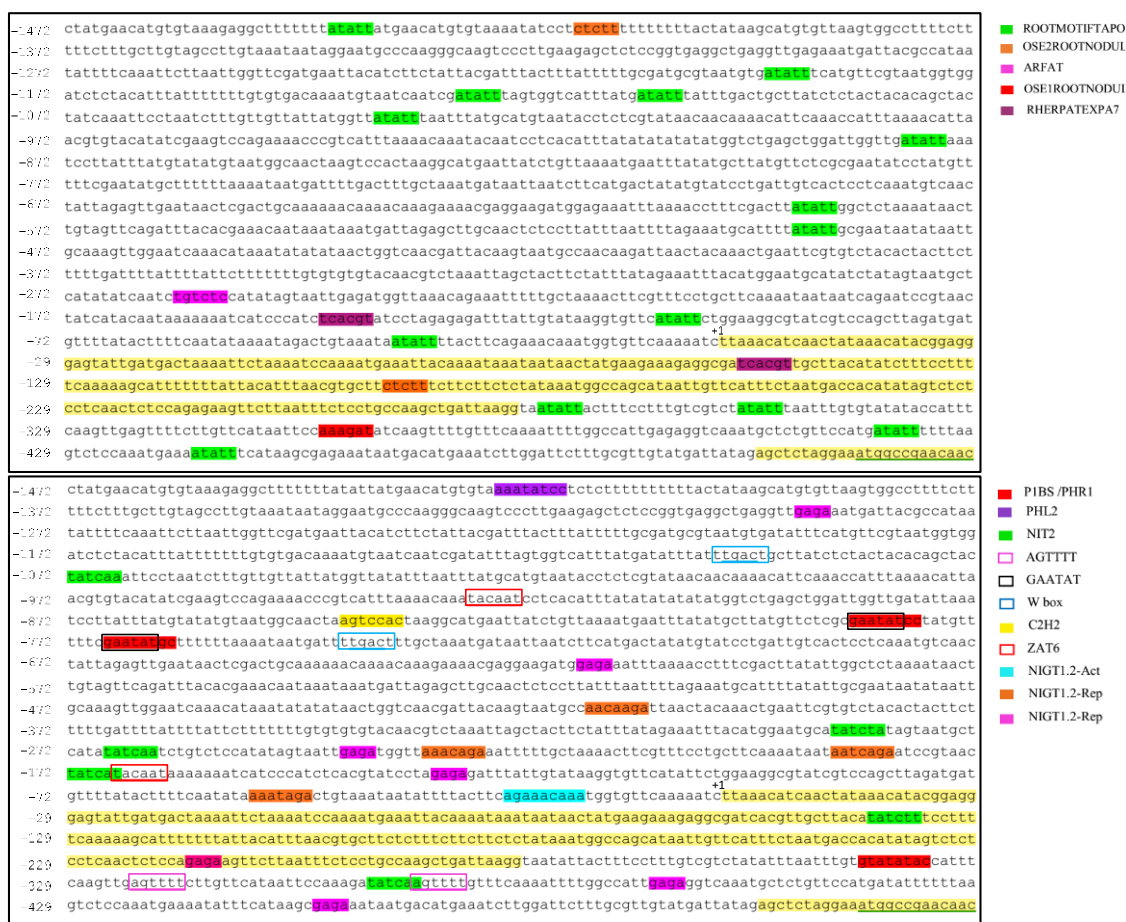
2. Nitrate-Inducible, Garp-Type Transcriptional Repressor1.2  
3. Hypersensitivity to Low Phosphate-Elicited Primary Root Shortening1 Homolog2

1. Phosphate starvation response 1



و *AtPHT1;4* فاکتور رونویسی NIGT1.2 به دو موتیف AGANNNAAA و AAACNNAACC متصل می‌شود که یک نسخه از AGANNNAAA موتیف در پروموتور *AtPHT1;1* وجود دارد.

تحقیقات نشان داده‌است که NIGT1.2 به‌طور مستقیم بیان *AtPHT1;1* و *AtPHT1;1* را افزایش و بیان ژن ناقل نیترات *NRT1.1* را کاهش می‌دهد. در آرایه‌دوپسیس NIGT1.2 همچنین رشد ریشه‌های اولیه و جانبی را در پاسخ به تنش فسفات تعدیل می‌کند. در پروموتور ژن‌های *AtPHT1;1*



شکل ۱. بررسی توالی پروموتور *AtPHT1;1* برای موتیف‌های مربوط به بیان در ریشه (بالا) و مرتبط با تنش کمبود فسفات (پایین). اگزون اول و بخشی از اگزون دوم به‌رنگ زرد روشن نشان داده شده‌است. زیر ناحیه شروع ترجمه خط کشیده شده‌است.

که این پروموتور دارای ۴ موتیف AANNAGA و ۸ موتیف GAGA است. حضور هر دو نوع موتیف نشان می‌دهد که تنظیم بیان *AtPHT1;1* از پیچیدگی‌های بیشتری برخوردار است به‌عنوان مثال اتصال فاکتور رونویسی NIGT1.2 به پروموتور *AtPHT1;4* به توالی‌های اختصاصی دیگری نیاز دارد که پس از موتیف فعال‌کننده قرار می‌گیرند.

NIGT1.2 در پروموتور ژن *NRT1.1* به موتیف‌های متفاوت دیگری AANNAGA، TGGGA و GAGA متصل شده و نقش رپرسور را دارد. بررسی پروموتور ژن *AtPHT1;1* نشان می‌دهد

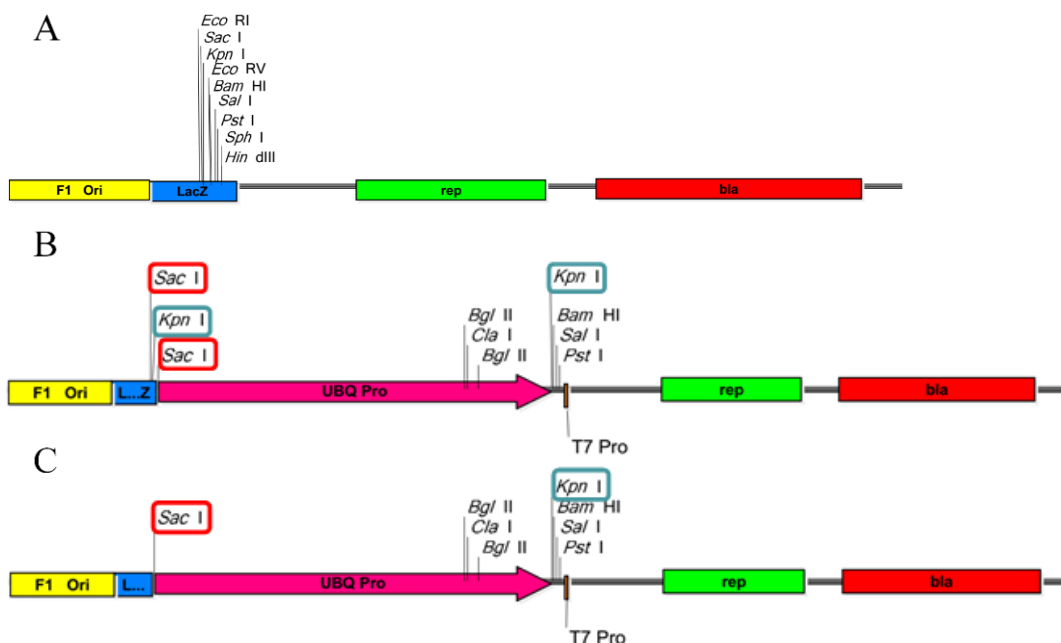
بنابراین چگونگی تنظیم بیان ژن *AtPHT1;1* در ارتباط با فاکتور رونویسی NIGT1.2 تحقیقات بیشتری نیاز دارد (Wang et al., 2020).

### طراحی و ساخت سازه بیانی

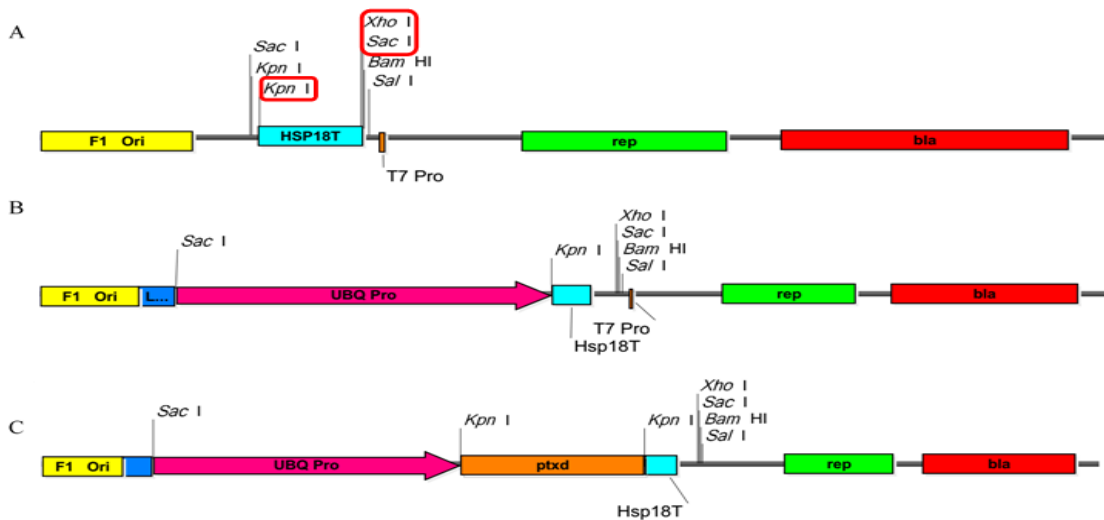
#### ساخت کاست بیانی ژن *PTXD* به‌عنوان عامل انتخابگر در یک ناقل حدواسط

یک سازه دارای ژن *AtPAP17* با پروموتور *AtPHT1;1* طراحی شد. در طراحی سازه از ناقل pAPCUFi استفاده شد که کلیه قطعات سازنده آن از جمله مرزهای چپ و راست ناحیه T-DNA منشأ گیاهی دارند و بدین لحاظ آن را ناقل P-DNA نیز می‌نامند. از آنجا که این کاست فاقد ژن انتخابگر آنتی‌بیوتیکی است (Zare et al., 2019)، برای انتخاب گیاهان تراریخت از ژن فسفیت اکسیدردوکتاز (*PTXD*) به‌عنوان عامل انتخابگر (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2013) تحت کنترل پروموتور یوبی‌کوئیتین ۱۰ از گیاه نخود استفاده شد (Peykari & Zamani, 2019). جهت ساخت سازه نهایی با توجه به محدودیت جایگاه‌های برش آنزیمی در وکتور pAPCUFi، یک کاست بیانی برای ژن *PTXD* در ناقل حدواسط pTZ57R ساخته شد. ۱۵۰۰ جفت باز از پروموتور یوبی‌کوئیتین ۱۰ گیاه نخود در ناقل حدواسط pTZ57R/T با کمک PCR با آغازگرهای UBQF2/R2 (جدول ۱) همسانه‌سازی شد. جهت قرارگیری قطعه در ناقل با استفاده همضم آنزیمی تعیین و کلون که در جهت

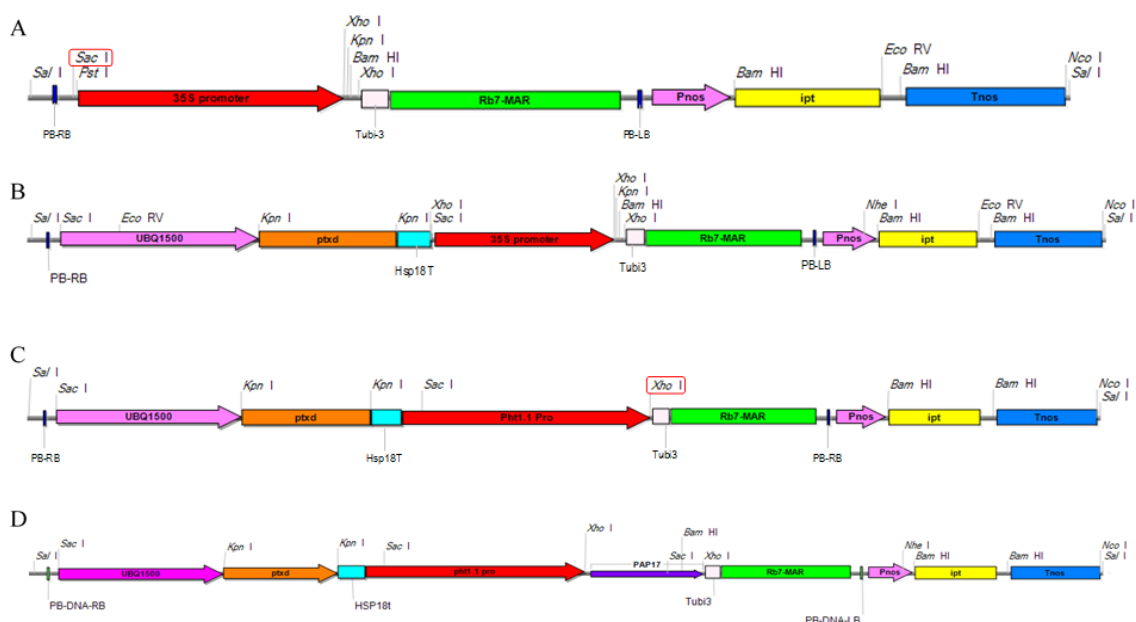
مورد نظر قرار گرفته بود برای ادامه کار انتخاب شد. در طراحی آغازگر برای پروموتور یوبی‌کوئیتین جایگاه آنزیم‌های *KpnI* در ناحیه ۳' و *SacI* در ناحیه ۵' قرار داده شد. از آنجا که وکتور pTZ57R/T خود دارای این دو جایگاه است جایگاه‌های اضافه با همضم توسط *SacI* (جایگاه *KpnI* بین دو جایگاه *SacI* قرار گرفته است) و اتصال مجدد حذف شد (شکل ۲). در مرحله دوم ترمیناتور ژن *AtHSP18* از ژنومیک DNA گیاه آراییدوپسیس تالیانا با آغازگرهای HSPF/R (جدول ۱) تکثیر و در وکتور pTZ57R/T همسانه‌سازی شد (شکل ۳A). در طراحی آغازگر برای ترمیناتور جایگاه آنزیم‌های *SacI* در ناحیه ۳' و *KpnI* در ناحیه ۵' قرار داده شد. همسانه‌ای که در جهت موردنظر قرار گرفته بود جهت استفاده از جایگاه *SalI* موجود در T/A وکتور برای ادامه کار انتخاب شد. در طراحی آغازگر معکوس برای ترمیناتور قبل از جایگاه *SacI* یک جایگاه *XhoI* قرار داده شد تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد (جدول ۱). ترمیناتور در جایگاه‌های *KpnI* و *SalI* کنار پروموتور قرار داده شد (شکل ۳B). در آخرین مرحله ژن *PTXD* در جایگاه *KpnI* بین پروموتور و ترمیناتور قرار داده شد (شکل ۳C). کاست حاوی کدون‌های ژن سنتز *PTXD* بهینه‌شده برای بیان در گیاه، در ناقل pAPCUFi (شکل ۴A) در جایگاه *SacI* قرار داده شد (شکل ۴B).



شکل ۲. همسانه‌سازی پرموتور یوبی کوئیتین نخود در ناقل حدواسط *pTZ57R/T*: A. ناقل *pTZ57R/T*: B. ناقل *pTZ57R/T* با پرموتور یوبی کوئیتین، C: حذف سایت اضافی *Kpn*I.



شکل ۳. ساخت کاست دارای ژن *PTXD* در ناقل حدواسط *pTZ57R/T*: A. همسانه‌سازی ترمیناتور ژن *HSP18* از گیاه آراییدوپسیس تالیانا در ناقل *pTZ57R/T*. B. قراردادن ترمیناتور در کنار پرموتور یوبی کوئیتین (شکل ۲C). C. همسانه‌سازی ژن *PTXD* بین پرموتور و ترمیناتور.



شکل ۴. ساخت سازه نهایی دارای ژن *AtPAP17* تحت کنترل پروموتور *AtPHT1;1*: A: ناقل pAPCUFi، B: کاست *PTXD* که در ناقل pAPCUFi بالادست پروموتور 35S در جایگاه *SacI* قرار داده شد. C: جایگزینی پروموتور 35S با پروموتور *AtPHT1;1* که در ناقل pAPCUFi بالادست پروموتور 35S در جایگاه *SacI* قرار داده شد. D: همسانه‌سازی *AtPAP17* در جایگاه *XhoI* و ساخت سازه نهایی.

با آغازگرهای Pht1F/R (جدول ۱) تکثیر و همسانه‌سازی شد و پس از تایید، جایگزین پروموتور CaMv35S در ناقل pAPCUFi شد (شکل ۴C). در طراحی آغازگر برای پروموتور *AtPHT1;1* در سمت ۵' جایگاه *SalI* و در سمت ۳' آن جایگاه *XhoI* گذاشته شد. در این مرحله ناقل pAPCUFi دارای دو جایگاه *XhoI* است که یکی از آنها از ابتدا در وکتور موجود بوده‌است و دیگری همان‌گونه که در بالا ذکر شد با ترمیناتور وارد ناقل می‌شود. از آنجا که دو آنزیم *SalI* و *XhoI* انتهای چسبنده یکسانی ایجاد می‌کنند، پروموتور در سایت *XhoI* وکتور قرار داده شد. بدین ترتیب در سمت ۵' یا بالادست پروموتور، با اتصال *SalI* و *XhoI*، هر دو جایگاه آنزیمی حذف شده و تنها یک *XhoI* باقی می‌ماند. در پایان ژن *AtPAP17* پس از همسانه‌سازی با آغازگرهای PAP17F/R (جدول ۱) و تایید توالی در پایین‌دست پروموتور *AtPHT1;1* و در تنها جایگاه *XhoI* قرار داده شد (شکل ۴D) و جهت سنس و آنتی‌سنس آن با هضم آنزیمی تایید شد.

#### ساخت سازه بیانی گیاهی دارای ژن *AtPAP17* تحت کنترل پروموتور *AtPHT1;1*

تحقیقات نشان داده‌است بیان ژن تحت کنترل یک پروموتور دائمی اغلب سبب تغییرات فنوتیپی ناخواسته همانند کاهش رشد گیاه می‌شود. اثر منفی این پدیده ناشی از تجمع مولکول‌ها در طی فرایند سلولی در اندام یا سلول غیر هدف و زمان نامناسب است که موجب از دست رفتن انرژی گیاه می‌شود. استفاده از پروموتورهای ویژه بیان بافتی و یا القایی باعث می‌شود تا ژن مورد نظر فقط در محلی که به آن نیاز است و در زمان مناسب بیان شود (Jeong & Jung, 2015). پروموتور *AtPHT1;1* علاوه بر اینکه یک پروموتور القایی با تنش کمبود فسفات است ویژگی بیان بافتی نیز دارد و در ریشه بیان می‌شود (Liao et al., 2019). اگرچه عدم بیان آن در بافت‌های دیگر غیر از ریشه و همچنین ویژگی‌های بیانی این پروموتور تاکنون در گیاه کلزا بررسی نشده است. بنابر این قطعه‌ای به طول ۱۹۸۶ جفت باز بالادست نقطه شروع ترجمه ژن *AtPHT1;1* از گیاه آراییدوپسیس

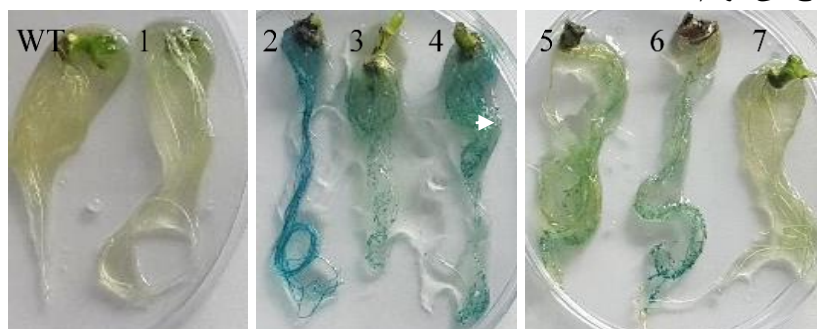
تایید حضور ژن *AtPAPI7* تحت کنترل پروموتور *ATPHT1;1* در گیاهان تراریخت احتمالی از گیاهچه‌های سبز حاصل از فرآیند تراریخته استخراج DNA ژنومی برای آزمون‌های مولکولی با هدف تایید تراریخته استفاده شد تعیین کیفیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی به نام GAPDH-F/R و مشاهده باند ۳۰۰bp و عدم آلودگی گیاهان تراریخته احتمالی به آگروباکتریوم با آغازگرهای اختصاصی ژن *VIRB6* آگروباکتری به نام *VIRB6-F/R* و عدم مشاهده باند ۴۵۰bp انجام شد. حضور ژن *AtPAPI7* نیز با استفاده از جفت آغازگرهای (*AP29-F* و *UniPAPI7-R*) با باند ۵۵۳ جفت‌باز در ژنوم هفت رخداده گیاه کلزا در مرحله نخست تایید شد.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این گیاهان قابلیت بیشتری در مقایسه با گیاهان معمولی جهت استفاده از فسفات نامحلول خاک دارند. پس از آن، از بین ۷ رخداده تایید شده سه رخداده با بیشترین میزان بیان برای مراحل بعدی کار انتخاب شدند.

### تایید حضور ژن *AtPAPI7* تحت کنترل پروموتور *ATPHT1;1* در گیاهان تراریخت احتمالی

غربالگری رخدادهای تراریخت با بررسی بیان اختصاصی *AtPAPI7* در ریشه با استفاده از سوبسترای BCIP

بررسی فعالیت اسید فسفاتازی در ریشه رخدادهای تراریخت بیان‌کننده ژن *AtPAPI7* با استفاده از سوبسترای BCIP است که علاوه بر جایگیری در واکوئل‌های لیزکننده، به خارج سلول نیز ترشح می‌شود (O'Gallagher et al., ۲۰۰۷).



شکل ۵. بررسی فعالیت اسید فسفاتازی در ریشه رخدادهای تراریخت بیان‌کننده ژن *AtPAPI7* با استفاده از سوبسترای BCIP. WT: گیاه غیرتراریخت، ۲، ۴ و ۶: گیاهان تراریخت با رنگ‌پذیری بالا و ۱، ۳ و ۷: گیاهان با رنگ‌پذیری کم.

عملکرد و افزایش کارایی استفاده از مواد معدنی بستگی به القای بیان تراژن مورد نظر در بافت و زمان مناسب دارد. بنابراین پروموتورهای ویژه بیان بافتی مناسب‌ترین پروموتور برای تنظیم بیان تراژن‌ها

### تایید بیان اختصاصی پروموتور *AtPHT1;1* در ریشه‌های کلزا با استفاده از RT-PCR

دست‌ورزی موفقیت‌آمیز یک گیاه با هدف بهبود صفات زراعی آن همچون تحمل تنش‌ها، افزایش

بالادست ژن *AtPHT1;1* بررسی شد و نتایج نشان داد که این ژن در گیاه برنج نیز بیان اختصاصی در ریشه دارد به‌ویژه در سلول‌هایی که ریشه‌هایی مویین را تولید می‌کنند (Koyama *et al.*, 2005). نتایج ما نیز نشان داد که این توالی ۱۹۸۶ bp عملکرد مشابه دارد و موتیف‌های اختصاصی بیان در ریشه و در تنش کمبود فسفات در این ناحیه قرار دارند. نتایج نشان داد که پروموتور *AtPHT1;1* مستقل از نوع گیاه در ریشه کاملاً اختصاصی عمل می‌کند و در برگ به میزان بسیار ناچیز بیان می‌شود، از این رو می‌تواند انتخاب مناسبی جهت دست‌ورزی گیاهان زراعی برای بیان هدفمند اسید فسفات‌ها در ریشه جهت افزایش کارایی جذب فسفات بوده و از آثار ناخواسته بیان این آنزیم در بافت‌های غیر هدف جلوگیری نماید. اهمیت این موضوع به‌خصوص در دست‌ورزی‌های متابولسمی دوچندان می‌باشد زیرا مانع از اختلال در سایر واکنش‌های بیوشیمیایی حساس همچون واکنش‌های دخیل در هموستازی فسفات می‌شود.

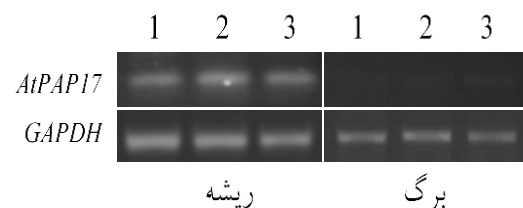
### سپاسگزاری

از حمایت‌های پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر اجرای این پژوهش، تقدیر و تشکر می‌گردد.

### REFERENCES

- Brandt, R., Cabedo, M., Xie, Y., & Wenkel, S. (2014). Homeodomain leucine-zipper proteins and their role in synchronizing growth and development with the environment. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(6), 518-26.
- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M. I., Rubio, V., Pérez-Pérez, J., Solano, R., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 6(9): e1001102.
- Cui, W., Chi, J., Feng, Y., Geng, L., & Liu, R. (2020). Construction and function of a root-specific promoter SRSP. *Chinese Journal of Biotechnology*, 36(4), 700-706.
- de Melo, B. P., de Moura, S. M., Morgante, C. V., Pinheiro, D. H., Alves, N. S. F., Rodrigues-Silva, P. L., Lourenço-Tessutti, I. T., Andrade, R. V., Frago, R. R., & Grossi-de-Sa, M. F. (2021). Regulated promoters applied to plant engineering: an insight over promising

هستند تا با صرف حداقل انرژی برای گیاه حاصل بیشترین اثر در صفت هدف را داشته‌باشند. پس از انتخاب سه رخداد تراریخت بر اساس بیشترین میزان رنگ‌پذیری، از برگ و ریشه آنها استخراج RNA انجام شد و اختصاصی بودن بیان در ریشه در سطح RNA و با روش RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *AtPAP17* (pap17-F/R) به‌طور دقیق‌تری بررسی شد (شکل ۶).



شکل ۶. آزمون RT-PCR از نمونه‌های ریشه و برگ سه رخداد تراریخت کلزا و تایید عملکرد اختصاصی پروموتور *AtPHT1;1* در ریشه. گیاهان شماره ۱ تا ۳ مربوط به رخدادهای منتخب با تولید بیشترین رنگ آبی در مواجهه با سوبسترای BCIP هستند. الگوی بیان ژن‌های *GUS* و *GFP* تحت کنترل یک قطعه ۲۷۶۶ جفت بازی از منطقه بالادست ژن *AtPHT1;1* در گیاه آراییدوپسیس القایی بودن این پروموتور با تنش فسفات را نشان داده‌بود، همچنین بیانگر بیان اختصاصی این پروموتور در ریشه بود (Mudge *et al.*, 2002). در پژوهش دیگری بیان ژن *GUS* تحت کنترل قطعه ۳۸۹۱ جفت بازی

- soybean promoters under biotic stress and their cis-elements. *Biotechnology Research and Innovation Journal*, 5(1), 0-0.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A rapid method for DNA extraction from plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Devaiah, B. N., Nagarajan, V. K., & Raghothama, K. G. (2007). Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant physiology*, 145(1), 147-159.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999.) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297-300.
- Huang, L., Jiang, Q., Wu, J., An, L., Zhou, Z., Wong, C., Wu, M., Yu, H., & Gan, Y. (2020.) Zinc finger protein 5 (ZFP5) associates with ethylene signaling to regulate the phosphate and potassium deficiency-induced root hair development in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 102(1-2), 143-158.
- Jeong, H. J., & Jung, K. H. (2015). Rice tissue-specific promoters and condition-dependent promoters for effective translational application. *Journal of integrative plant biology*, 57(11), 913-924.
- Keb-llanes, M., Gonzalez, G., ChiManzanero, B., & Infante, D. (2002). A Rapid and Simple Method for Small Scale DNA Extraction in Agavaceae and Other Tropical Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 299a-299e.
- Kim, D. W., Lee, S. H., Choi, S. B., Won, S. K., Heo, Y. K., Cho, M., Park, Y. I., & Cho, H. T. (2006). Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *The Plant cell*, 18(11), 2958-2970.
- Koyama, T., Ono, T., Shimizu, M., Jinbo, T., Mizuno, R., Tomita, K., Mitsukawa, N., Kawazu, T., Kimura, T., Ohmiya, K., & Sakka, K. (2005). Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(1), 38-42.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Liao, Y. Y., Li, J. L., Pan, R. L., & Chiou, T. J., (2019). Structure-Function Analysis Reveals Amino Acid Residues of *Arabidopsis* Phosphate Transporter *AtPHT1;1* Crucial for Its Activity. *Frontiers in plant science*, 10, 1158.
- Liu, Y., Khan, A. R., & Gan, Y. (2022). C2H2 Zinc Finger Proteins Response to Abiotic Stress in Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2730.
- López-Arredondo, D. L., & Herrera-Estrella, L. (2013). A novel dominant selectable system for the selection of transgenic plants under in vitro and greenhouse conditions based on phosphite metabolism. *Plant biotechnology journal*, 11(4), 516-525.
- Mohan, C., Jayanarayanan, A. N., & Narayanan, S. (2017). Construction of a novel synthetic root-specific promoter and its characterization in transgenic tobacco plants. *3 Biotech*, 7(4), 234.
- Mudge, S. R., Rae, A. L., Diatloff, E., & Smith, F. W. (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for*

- cell and molecular biology*, 31(3), 341-353.
- Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L., & Nielsen, T. H. (2007). Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant physiology*, 143(1), 156-171.
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., Nakanishi, T. M., & Thibaud, M. C. (2011). Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Frontiers in plant science*, 2, 1-12.
- O'Gallagher, B., Ghahremani, M., Stigter, K., Walker, E. J., Pyc, M., Liu, A. Y., MacIntosh, G. C., Mullen, R. T., & Plaxton, W. C. (2021). Biochemical and molecular characterization of *AtPAP17*: a dual-localized, low molecular weight Arabidopsis purple acid phosphatase upregulated during phosphate deprivation, senescence, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 73(1), 382-399.
- Parra, G., Bradnam, K., Rose, A. B., & Korf, I. (2011). Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic acids research*, 39(13), 5328-5337.
- Peykari, N., & Zamani, K. (2019). Cloning and characterization of a constitutive promoter of polyubiquitin gene from *Cicer arietinum*. *Crop Biotechnology*, 9(25), 35-45. (in Persian)
- Porto, M. S., Pinheiro, M. P., Batista, V. G., dos Santos, R. C., Filho, P., & de Lima, L. M. (2014). Plant promoters: an approach of structure and function. *Molecular biotechnology*, 56(1), 38-49.
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I., & Florencio, F. J. (2004). The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant physiology*, 134(4), 1718-1732.
- Rose, A. B., Carter, A., Korf, I., & Kojima, N. (2016). Intron sequences that stimulate gene expression in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 92(3), 337-346.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & development*, 15(16), 2122-2133.
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Georgianna, D. R., Lofgren, S. M., Li, D., Ellis, R. C., Carruthers, D. N., Dräger, A., Masica, D. L., & Mayfield, S. P. (2016). Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*, 15, 135-142.
- Sharpley, A. N., Withers, P. J. A., Abdalla, C. W., & Dodd, A. R. (2005). Strategies for the sustainable management of phosphorus. In: *JT. Sims*, AN. Sharpley, eds. Phosphorus, agriculture and the environment. *American Society for Agronomy*, Madison, USA, pp.1069-1101.
- Sun, L., Song, L., Zhang, Y., Zheng, Z., & Liu, D. (2016). Arabidopsis PHL2 and PHR1 Act Redundantly as the Key Components of the Central Regulatory System Controlling Transcriptional Responses to Phosphate Starvation. *Plant physiology*, 170(1), 499-514.
- Wang, L., & Liu, D. (2017) Analyses of root-secreted acid phosphatase activity in Arabidopsis. *Bio-protocol*, 7(7), 1-11.
- Wang, X., Wang, H. F., Chen, Y., Sun, M. M., Wang, Y., & Chen, Y. F. (2020). The Transcription Factor NIGT1.2 Modulates Both Phosphate Uptake and Nitrate Influx during Phosphate Starvation in Arabidopsis and Maize. *The Plant cell*, 32(11), 3519-3534.



- Wang, Z., Zheng, Z., Song, L., & Liu, D. (2018). Functional Characterization of Arabidopsis PHL4 in Plant Response to Phosphate Starvation. *Frontiers in plant science*, 9, 1432.1-19.
- Wobbe, C. R., & Struhl, K. (1990). Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro. *Molecular and cellular biology*, 10(8), 3859-3867.
- Zare, B., Malboobi, M. A., Jahromi, M. S., & Norouzi, P. (2019). inventors; National Institute of Genetic Engineering, assignee. Binary vectors with minimized biosafety concerns and high transformation rates by engineered plant-derived transfer-DNA. United States patent US 10,370,671. 2019 Aug 6.