

## انتقال همزمان ۳ ژن باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژناز به گیاه آرابیدوپسیس

فاطمه علیزاده آریمی<sup>۱</sup>، ویدا چالوی<sup>۲\*</sup> و علی دهستانی<sup>۳</sup>

۱ و ۲. کارشناس ارشد و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

۳. دانشیار پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳)

### چکیده

بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه‌شده (PCBs)، ترکیبات حلقوی کلرداری هستند که به دلیل خواصی چون مقاومت به حرارت و پایداری، در سطح گسترده در دهه‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۸۰ در صنایع گوناگون کاربرد داشته‌اند. همین ویژگی پایداری و مقاوت به تجزیه شدن همراه با تأثیرات زیانبار بر سلامت انسان، سبب شد که تولید آنها از دهه ۱۹۸۰ میلادی متوقف شود. در حال حاضر، آلودگی آب‌ها و خاک‌های سراسر جهان به PCBs، یکی از مشکلات مهم محیط زیست به‌شمار می‌آید. یکی از راه‌های کاهش آلودگی به PCBs انتقال و بیان ژن‌های باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژناز (BPDO) که دارای توانایی تجزیه PCBs هستند به گیاهان است. هدف پژوهش حاضر، یافتن روشی برای انتقال همزمان ژن‌های *bph A*، *bph E* و *bph G*، که اجزای رمزدهنده آنزیم BPDO هستند به گیاه آرابیدوپسیس بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده، ۳ ژن *bph A*، *bph E* و *bph G* که در ناقل pGreen کلون شده بودند به باکتری‌های *E. coli* و اگروباکتریوم‌های LBA4404 و C58C1 و در انتها به گیاه آرابیدوپسیس انتقال یافتند. از لحاظ کارایی انتقال ژن به گیاه، بین دو سویه اگروباکتریوم LBA4404 و C58C1 به‌کاررفته در این پژوهش اختلاف وجود داشت. بیشترین تعداد گیاهان تراریخته (۰/۸۵ درصد) با سویه LBA4404 به‌دست آمد. تراریخت بودن گیاهچه‌های آرابیدوپسیس با انتخاب گیاهان کاملاً سبز در محیط دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و همچنین آزمون PCR تأیید شد. گیاهان تراریخت با موفقیت به خاک انتقال یافتند و به رشد خود ادامه دادند.

**واژه‌های کلیدی:** بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه، گیاه آرابیدوپسیس، ناقل pGreen.

### مقدمه

سمی بودن این ترکیبات و تجمع آنها در بافت‌های چربی موجودات زنده و به‌دلیل آثار سوء آنها بر انسان، مانند بروز سرطان، ناهنجاری‌های ژنتیکی در نوزادان و تومورهای کبدی و تیروئیدی، حذف و تجزیه PCBs از محیط ضروری است. یکی از آنزیم‌های مؤثر برای تجزیه PCBs، آنزیم باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژناز (BPDO) است. این آنزیم دارای سه جزء اکسیژناز با دو زیرواحد *bph A* و *bph E* یک فرودوکسین *bph F* و یک

گیاه‌پالایی فناوری بهره‌گیری از گیاهان برای آلودگی‌زدایی از خاک و آب‌های زیرزمینی است. بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه‌شده (PCBs) از ترکیبات معطر کلردار با فرمول شیمیایی عمومی  $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$  هستند که به‌دلیل مقاومت زیاد به حرارت و عدم اشتعال‌پذیری، از سال‌های ۱۹۲۹ تا ۱۹۸۰ به‌صورت گسترده در صنعت کاربرد داشتند (Van Aken et al., 2010). با توجه به

پژوهش‌هایی صورت گرفته است. در پژوهشی با انتقال ژن‌های *bphA+bphE*، *bphF* و *bphG* به صورت مجزا به گیاهان توتون، لاین‌های متفاوتی از گیاهان تراریخته توتون ایجاد کردند (Mohammadi et al., 2007). آنان با انتقال همزمان ژن‌های *bphA+bphE+bphG* در یک ناقل و ژن *bphF* در ناقل دیگر، لاین‌های تراریخته‌ای از گیاهان توتون را تولید کردند. در دو پژوهش جداگانه، ژن *bphC* به گیاهان توتون انتقال یافت و تراریخته بودن گیاهان نیز با آزمون PCR (Francova et al., 2003) و وسترن بلات (Novacova et al., 2010) تأیید شد. تا کنون، گزارشی در زمینه انتقال همزمان ژن‌های دی‌اکسیژناز باکتریایی به واسطه آگروباکتریوم‌های LBA4404 و C58C1 به گیاه مدل آرابیدوپسیس منتشر نشده است. در این پژوهش، امکان انتقال همزمان ژن‌های بی‌فنیل دی‌اکسیژناز باکتریایی به گیاهان آرابیدوپسیس به روش غوطه‌وری گل‌آذین بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

#### کشت و شرایط رشد گیاه آرابیدوپسیس

این پژوهش در آزمایشگاه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گرفت. برای اجرای آزمایش‌های انتقال ژن از گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) رقم کلمبیا استفاده شد. گیاهچه‌های آرابیدوپسیس از طریق کشت بذر در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد به‌دست آمدند.

#### تهیه پلاسמיד نوترکیب

ژن‌های دی‌اکسیژناز از باکتری *B. xenovorans* سویه LB400 را دکتر Jean-François Laliberté از مؤسسه ملی پژوهش‌های استان کبک کانادا در اختیار این پژوهش قرار دادند. ژن‌های *bphA*، *bphE* و *bphG* به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و از ژل خالص شدند. سپس هر کدام از این ژن‌ها بین تقویت‌کننده 35S و پایانه PolyA ویروس موزائیک کلم در کاست 35S-2 کلون شدند (شکل ۱-۱). ابتدا، کاست خالص‌شده

فرودوکسین ردوکتاز *bphG* است. ژن‌های رمزدهنده این آنزیم در باکتری *Burkholderia xenovorans* شامل *bphA*، *bphE*، *bphF* و *bphG* هستند (Mohammadi et al., 2007).

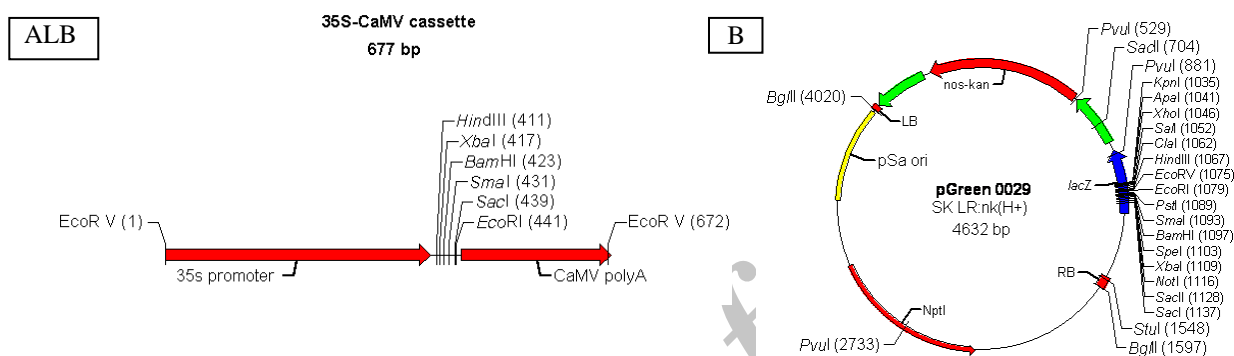
سیستم انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم، یکی از کارآمدترین روش‌های انتقال ژن در گیاهان شناخته شده است. یکی از ناقل‌های دوگانه که برای انتقال ژن به گیاه به‌واسطه آگروباکتریوم به کار می‌رود، ناقل pGreen است که با ویژگی‌هایی نظیر کاهش سایز پلاسمید و داشتن چندین مکان کلون کردن ژن به‌عنوان حامل مناسب انتخاب شده است. pGreen برای همانندسازی در آگروباکتریوم، نیاز به عملکرد ژن RepA از لوکوس همانندسازی pSa دارد که این لوکوس در پلاسمید کمکی pSoup مستقر شده است (Hellens et al., 2000). برای انتقال این دو پلاسمید به آگروباکتریوم، می‌توان از دو روش انتقال همزمان و انتقال پی‌درپی ناقل‌ها با استفاده از روش‌های الکتروپوریشن یا ذوب و انجماد استفاده کرد (Hellens et al., 2000). انتقال همزمان پلاسمیدهای pGreen و pSoup به آگروباکتریوم با روش الکتروپوریشن کارایی زیادی دارد، ولی در صورت نداشتن دستگاه و مواد لازم برای الکتروپوریشن، باید از روش ساده و کم‌هزینه ذوب و انجماد استفاده کرد.

بیشتر آزمایش‌های انتقال ژن به گیاهان شامل انتقال و بیان یک ژن تنهاست و انتقال همزمان چندین ژن به گیاهان برای یک مسیر بیوشیمیایی همچنان کاری دشوار به‌شمار می‌آید. راهکارهای گوناگونی برای انتقال چند ژن خارجی به داخل سلول‌های گیاهی وجود دارند. یکی از این روش‌ها، ایجاد یک ساختمان پلی‌پروتئینی است که در آن ترتیب رمزدهنده چندین پروتئین به یکدیگر ملحق شده و یک واحد نسخه‌برداری به‌وجود آورده‌اند. همچنین می‌توان از انتقال پی‌درپی یا همزمان چندین ناقل حامل ژن‌های مختلف استفاده کرد (Dafny-Yelin et al., 2007). از روش‌های دیگر برای بیان چندین ژن در یک گیاه، تلاقی گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های مختلف یا کلون کردن چندین ژن در یک ناقل به‌وسیله سرهم کردن کاست‌هاست (Dafny-Yelin et al., 2007).

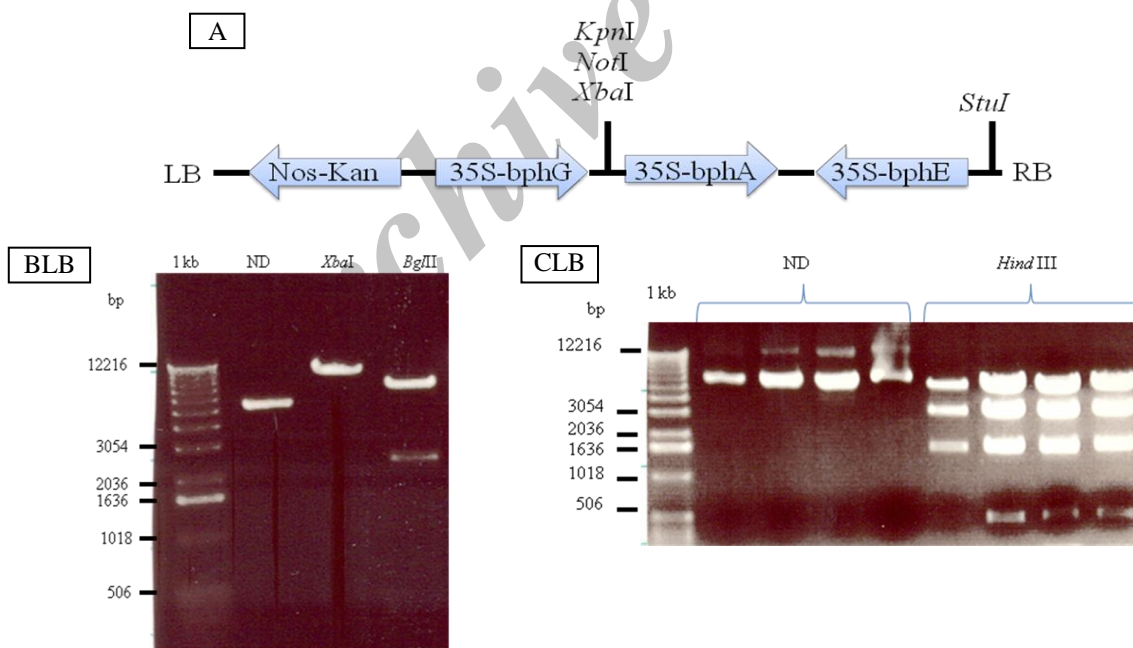
برای انتقال ژن‌های بی‌فنیل دی‌اکسیژناز به گیاهان

پژوهش را تولید کرد (شکل ۲- A). درستی کلون‌های انجام‌گرفته، به‌دقت به‌وسیلهٔ نقشهٔ محدودکننده و با استفاده از الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Xba* I، *Hind* III و *Bgl* II بررسی شد (شکل ۲- B و C). در ضمن، در ناحیهٔ T-DNA ناقل pGreen0029 ژن گزینش‌گر کانامایسین (Kan) بین پیش‌بر و پایان‌بر Nos قرار دارد (شکل ۱- B).

*35S-bphE* در محل *Stu* I پلاسمید pGreen0029 کلون شد (شکل ۱- B). در مرحلهٔ بعدی کاست خالص‌شده-*35S-bphE* در محل *Kpn*I پلاسمید، *bphA* کلون شد. در نهایت، کاست خالص‌شدهٔ *35S-bphG* در محل *Not* I پلاسمید *bphE+bphA* کلون شد (شکل ۱- B) و پلاسمید pGreen0029-*bphE+bphA+bphG* (pG-AEG) مورد استفاده در این



شکل ۱- (A) ساختمان کاست 35S-2; (B) ناقل pGreen



شکل ۲. پلاسمید نو ترکیب به‌کاررفته در این آزمایش و نتیجهٔ هضم آنزیمی آن

A: ساختار شماتیک T-DNA پلاسمید حاوی ژن‌های *bph* E، *bph* A و *bph* G که در آن مرز چپ (LB)، مرز راست (RB)، به علاوه جایگاه آنزیم‌های برشی *Kpn* I و *Xba* I مشخص شده‌اند. B: نتیجهٔ هضم آنزیمی همین پلاسمید با آنزیم *Xba* I (با یک محل برش) که اندازهٔ قطعهٔ ۹۹۶۴ bp مورد انتظار را تولید کرد و آنزیم *Bgl* II (با دو محل برش) که اندازهٔ قطعات ۲۴۹۵ و ۷۴۷۴ bp مورد انتظار را تولید کرد، پلاسمید هضم‌نشده با ND مشخص شده است. C: نتیجهٔ هضم آنزیمی، این پلاسمید را با استفاده از آنزیم *Hind* III نشان می‌دهد که با چهار محل برش، قطعاتی با اندازه‌های ۴۶۱، ۱۵۲۶، ۲۹۶۷ و ۵۰۱۵ bp مورد انتظار را تولید کرد. پلاسمید هضم‌نشده با ND مشخص شده است.

شده و بعد از این مدت گیاهان از سوسپانسیون باکتری خارج و برای حفظ رطوبت با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند.

#### بهینه‌سازی انتقال ژن به آراییدوپسیس

برای بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن، سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، غلظت‌های متفاوت کانامایسین و تیمارهای تاریکی و نور بررسی شدند. از سویه‌های اگروباکتریوم، سویه‌های LBA4404 و C58C1 برای تراریخته‌سازی آراییدوپسیس به‌روش غوطه‌وری گل‌آذین ارزیابی شدند. پس از کشت بذره‌های آغشته‌شده با محیط تلقیح، تعداد گیاهچه‌های سبز رشدیافته مربوط به هر سویه در محیط MS حاوی کانامایسین شمارش شد. در انتها نیز درصد فراوانی گیاهان تراریخت مربوط به هر سویه محاسبه شد.

#### تیمارهای تاریکی و نور

برای تیمار تاریکی، بذره‌های کشت‌شده در محیط انتخابی به‌مدت سه روز در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. در تیمار روشنایی، بذره‌های کشت‌شده در محیط انتخابی از ابتدا به اتاقک رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

#### غلظت‌های مختلف کانامایسین

غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت ارزیابی شدند. پس از رشد بذره‌های آزمایشی بر روی محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت کانامایسین، میزان فشار انتخابی اعمال‌شده با هر یک از سطوح کانامایسین بررسی شد.

#### انتخاب و انتقال گیاهان بالقوه تراریخت

برای انتخاب گیاهان تراریخت، بذره‌های گیاهان تلقیح‌شده با دو سویه اگروباکتریوم در محیط کشت انتخابی حاوی ۱/۲ نمک‌های MS، ۸ گرم در لیتر آگار و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شدند. پس از

انتقال سازه‌های پلاسمیدی خالص‌شده به اگروباکتریوم از سویه‌های LBA4404 و C58C1 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. پس از تهیه سلول‌های مستعد از اگروباکتریوم با استفاده از کلرید کلسیم با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، انتقال پلاسمیدها با استفاده از تکنیک ذوب و انجماد با دو روش انتقال همزمان و انتقال پی‌درپی صورت گرفت. در روش انتقال همزمان pGreen حامل ژن‌های *bphA*، *bphE* و *bphG* (pGreen/bphAEG) به‌همراه پلاسمید pSoup به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم اضافه شد و بر روی محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین کشت شدند. در روش انتقال پی‌درپی ناقل‌ها، ابتدا ۵ میکرولیتر پلاسمید pSoup، به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم اضافه شد و درستی تراریخته بودن کلونی‌های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین رشد کرده بودند با آزمون کلونی PCR تأیید شد. سپس، پلاسمید pGreen/bphAEG به سلول‌های مستعد حامل پلاسمید pSoup اضافه شد و دوباره درستی تراریخته بودن کلونی‌های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی رشد کرده بودند با آزمون کلونی PCR به تأیید رسید.

#### تراریخته‌سازی گیاهان آراییدوپسیس به روش

##### غوطه‌ورسازی گل‌آذین (floral-dip)

برای تلقیح گیاه آراییدوپسیس از اگروباکتریوم‌های سویه‌های LBA4404 و C58C1 استفاده شد. سویه‌های اگروباکتریوم حامل پلاسمید مورد نظر ابتدا در حجم یک لیتر محیط کشت LB رشد داده شدند. زمانی که تراکم باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ تا ۱ رسید (بعد از ۴۸-۲۴ ساعت)، باکتری‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب باکتری‌ها در محیط تلقیح (حاوی ۱/۲ نمک‌های محیط کشت MS، ۱x ویتامین B5، ساکارز ۵ درصد و ۰/۳ درصد سیلوت ال-۷۷) حل شدند. تمامی گل‌آذین‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه در داخل سوسپانسیون نگه داشته

10 سیناژن)، ۱۴۹ نانوگرم DNA الگو، ۰/۸ میکرولیتر  $MgCl_2$  (سیناژن)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (سیناژن) و ۰/۲ میکرولیتر Taq (سیناژن) انجام گرفت. برای تکثیر قطعه ژنی *bphA* ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس، واسرشته‌سازی، اتصال و طویل شدن به ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و هر کدام به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه، ۱:۳۰، ۱:۳۰ در ۳۵ سیکل انجام شد. در نهایت طویل شدن نهایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج به دست آمده نشان دادند که انتقال پی‌درپی دو ناقل pSoup و pGreenAEG به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم موفقیت‌آمیز بود و کلونی‌های نوترکیب بر روی محیط انتخابی مشاهده شدند، که با آزمون PCR تاریخته بودن و وجود پلاسمیدها در اگروباکتریوم اثبات شد. بعد از انتقال پلاسمید pSoup به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم، کلونی‌های نوترکیب در سطح محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشاهده شد و سپس با آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای ژن pSoup، وجود باند ۱۰۵۰ جفت بازی که تأییدکننده حضور قطعه ژنی pSoup در کلونی‌های نوترکیب بوده است، تأیید شد (شکل ۳). در ادامه ناقل pGreen/*bphA*EAG به سلول‌های اگروباکتریوم مستعد حامل pSoup منتقل شد و کلونی‌های رشدیافته با آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA* بررسی شدند که با حضور باند ۱۳۸۰ bp، وجود قطعه ژنی *bphA* تأیید شد (شکل ۴).

اعمال تیمارهای تاریکی و نور، گیاهچه‌های سبز کاملاً رشدیافته برای هر سویه اگروباکتریوم به‌طور جداگانه برای استخراج DNA و آنالیز بعدی به خاک منتقل شدند. اثبات تراریخت بودن گیاهانی که در محیط کشت انتخابی به کانامایسین مقاومت نشان داده بودند به کمک آزمون PCR صورت گرفت.

### طراحی آغازگرهای اختصاصی

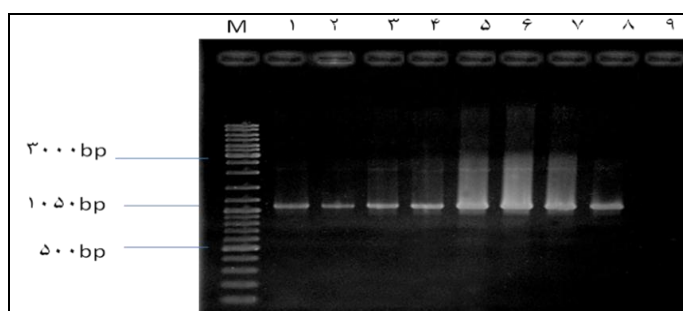
طراحی توالی آغازگرهای رفت و برگشت *bphA* براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *bphA* از باکتری *B. xenovorans* سویه LB ۴۰۰ به‌وسیله نرم‌افزار oligo انجام گرفت. این دو آغازگر از منطقه ابتدایی و انتهایی ژن انتخاب شدند تا پس از تکثیر، ژن به‌صورت کامل به دست آید. شایان ذکر است که طول محصول واکنش PCR مورد انتظار برای ژن *bphA* حدود ۱۳۸۰ bp است. طراحی توالی آغازگرهای رفت و برگشت pSoup نیز به‌وسیله نرم‌افزار oligo انجام گرفت. طول محصول واکنش PCR مورد انتظار برای قطعه pSoup حدود ۱۰۵۰ bp است. تمامی آغازگرها توسط شرکت ژن فن‌آوران سنتز شدند (جدول ۱).

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده

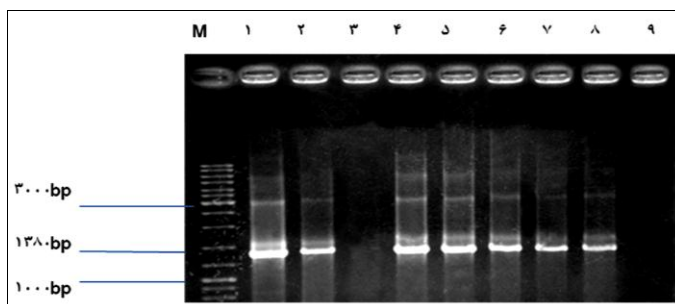
نام آغازگر	توالی
<i>bphA</i> – forward	5' - ATG AGT TCA GCA ATG AAA - 3'
<i>bphA</i> – reverse	5' - GGG CTC GGA CAT CAT GCG - 3'
pSoup - forward	3' - GACCCGATGCCCTTGAGA - 5'
pSoup – reverse	5' - TGCCCTTATTCCTGATTGAC - 3'

### شرایط PCR

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر به‌منظور تکثیر قطعه ژنی *bphA* به کمک ۲ میکرولیتر از بافر ( PCR )



شکل ۳. نتیجه واکنش PCR کلونی‌های ترانسفورم‌شده با ناقل pSoup توسط آغازگرهای pSoup. M: مارکر وزنی ۱۰ kb. شماره‌های ۱ تا ۷ کلونی‌های ترانسفورم‌شده با ناقل pSoup. شماره ۸: کنترل مثبت (پلاسمید pSoup). شماره ۹: کنترل منفی



شکل ۴. نتیجه آزمون PCR کلونی‌های LBA4404 حامل pSoup ترانسفورم شده با ناقل نو ترکیب pGreen AEG با آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA*. M: مارکروزی 10kb. شماره ۱: کنترل مثبت. ۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹: کلونی‌های ترانسفورم شده با pGreenAEG. شماره ۳: کنترل منفی. شماره ۳: کلون تراریخت را نشان می‌دهد که واجد پلاسمید pGreenAEG نبود.

سویه‌های آگروباکتریوم از نظر نفوذ، قدرت انتقال ژن و تولید نتایج تراریخته، تفاوت وجود دارد (Bechtold *et al.*, 1993). در پژوهشی دیگر، سویه GV3101 به دلیل فعالیت شدید تهاجمی، برای تراریخته‌سازی گیاهان آرابیدوپسیس پیشنهاد می‌شود (Bechtold *et al.*, 1993). گزارش شده است که سویه LBA4404 برای تراریخته‌سازی آرابیدوپسیس با روش غوطه‌وری مناسب نیست و بهتر است از نژادهایی با قدرت تهاجمی بیشتر استفاده شود (Weigel *et al.*, 2002). همچنین گزارش می‌شود که در بین سویه‌های GV3101، LBA4404 و GV3850، سویه GV3850 بیشترین و سویه LBA4404 کمترین مقدار تولید گیاهان تراریخته را دارند (Dehestani *et al.*, 2010). در بررسی انتقال ژن به کلزا به روش غوطه‌ورسازی گل‌آذین مشاهده می‌شود که بین نژادهای آگروباکتریوم از لحاظ میزان انتقال ژن تفاوت وجود دارد (Young-Seok *et al.*, 2003). در عین حال برخی از پژوهشگران، از لحاظ کارایی تراریخته‌سازی، اختلافی بین سویه‌های آگروباکتریوم پیدا نکردند (Zhang *et al.*, 2006). براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش و بررسی‌های انجام‌گرفته در گذشته می‌توان نتیجه گرفت که اختلاف بین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر قدرت نفوذ، ممکن است ناشی از اثر متقابل نوع گیاه و سویه باکتری باشد.

#### تأثیر تیمارهای نور و تاریکی بر تغییرات مورفولوژیک گیاهچه

نتایج حاصل از تیمارهای تاریکی و نور حاکی از آن است که گیاهانی که پیش از انتقال به اتاقل رشد، برای سه

پلاسمید pGreen بدون پلاسمید کمکی خود (pSoup) قادر به همانندسازی در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم نیست. از آنجا که pGreen برای همانندسازی نیاز به عملکرد ژن *RepA* از لوکوس همانندسازی pSa دارد، ابتدا باید pSoup در سویه آگروباکتریوم مورد نظر مستقر شود و با تکثیر pSoup، کپی‌های زیادی از لوکوس همانندسازی pSa تولید شود تا در نهایت ژن *RepA* قادر به اجرای عملکرد خود باشد. بنابراین با انتقال پی‌درپی و کتور می‌توان کارایی بیشتری در ترانسفورماسیون انتظار داشت، بدین صورت که پلاسمید کمکی زمان کافی برای تکثیر لوکوس همانندسازی خواهد داشت و متعاقباً توانایی تکثیر پلاسمید توسط پلاسمید کمکی افزایش خواهد یافت (Hellens *et al.*, 2000).

#### تأثیر سویه‌های آگروباکتریوم بر تراریختی

نتایج انتقال ژن به آرابیدوپسیس با استفاده از سویه‌های LBA4404 و C58C1 به روش غوطه‌وری گل‌آذین نشان داد که بین دو سویه آگروباکتریوم به‌کاررفته در این پژوهش، از نظر میزان نفوذ، آلوده‌سازی گیاه و تولید گیاهان تراریخت تفاوت وجود دارد. همچنان که در جدول مشاهده می‌شود، نسبت گیاهان تراریخت به‌دست‌آمده از آرابیدوپسیس تیمار شده توسط سویه LBA4404 نسبت به گیاهان تراریخت به‌دست‌آمده از آرابیدوپسیس تیمار شده توسط سویه C58C1 حدود ۱/۶ برابر بود و بیشترین تعداد گیاهان تراریخته به میزان ۰/۸۵ درصد با سویه LBA4404 به‌دست آمد (جدول ۲).

در پژوهش بر روی میزان کارایی سویه‌های آگروباکتریوم در فرایند انتقال ژن مشخص شد که بین

استاندارد با شرایط نوری مداوم قرار داشتند، برگ‌های کوتیلدونی بزرگ‌تر و ریشه‌های کوتاه‌تری داشتند (شکل ۵).

روز در تاریکی تیمار شده بودند، دارای برگ‌های کوتیلدونی کمتر توسعه‌یافته و هیپوکوتیل و ریشه‌های طولی‌تری بودند. در مقابل گیاهانی که در تیمار

جدول ۲. نتایج حاصل از بهره‌گیری دو سویهٔ آگروباکتریوم در روش غوطه‌وری گل‌آذین

سویه	تعداد بذور	تعداد گیاهچه‌های سبز بعد از ۱۰ روز انتقال به گلخانه	تعداد گیاهان	درصد گیاهان تراریخت
LBA4404	۳۵۳	۴	۳	۰/۸۵٪
C58C1	۳۸۲	۳	۲	۰/۵۲٪

حذف تراریخته‌های واقعی و کاهش کارایی انتخاب می‌شود. تحقیقات بسیاری غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت مناسب می‌دانند (Bechtold *et al.*, 1993; Bent, 1998 & Zhang *et al.*, 2006). از طرف دیگر، گروهی غلظت‌های بیشتر و کمتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را پیشنهاد می‌کنند (Bechtold *et al.*, 2000). کانامایسین به دلیل مهار ریبوزوم‌های ۷۰S از سنتز پروتئین در اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری جلوگیری می‌کند و در نهایت سبب رنگ‌پریدگی و مرگ گیاه می‌شود (Norelli *et al.*, 1994).

#### فرایند انتخاب گیاهان تراریخت

پس از ۷-۱۰ روز انتقال بذرهای کشت‌شده به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، گیاهانی با برگ‌های کوتیلدونی سبز تیره در چمنی از گیاهان سفید به‌عنوان گیاهان بالقوه تراریخت در نظر گرفته شدند (شکل ۶-۱). سپس گیاهچه‌های سبز حاصل از کشت بذور در محیط حاوی کانامایسین، به گلدان منتقل و از آنها DNA استخراج شد (شکل ۶-۲).



شکل ۵. تغییرات مورفولوژیک گیاهچه‌های آراییدوپسیس در محیط انتخابی که با شرایط نوری متفاوت تیمار شده بودند. گیاهچه سمت راست شکل در شرایط نوری مداوم رشد کرده و گیاهچه سمت چپ شکل تیمار شده در شرایط تاریکی است.

#### اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر تراریختی

نتایج ارزیابی غلظت‌های مختلف کانامایسین برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت نشان داد که غلظت‌های ۲۵mg/L کانامایسین به دلیل کم بودن فشار انتخابی و افزایش میزان تراریخته‌های غیرواقعی مناسب نبود. در مقابل در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، هیچ گیاه تراریخت کاذبی تولید نشد. غلظت ۱۰۰mg/L کانامایسین به دلیل فشار انتخابی زیاد، سبب



B



A

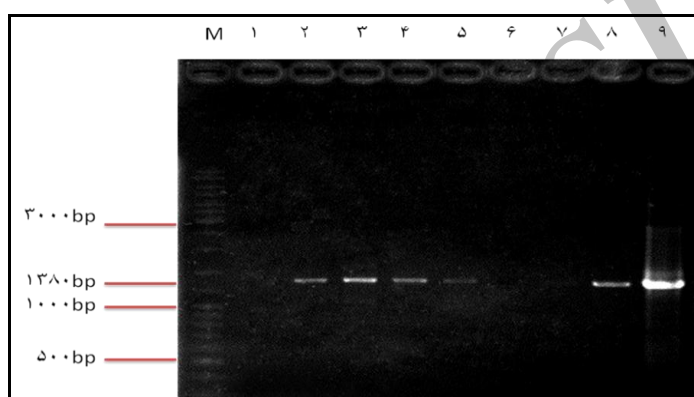
شکل ۶-۱ (A) گیاهچه‌های انتخاب‌شده در محیط انتخابی با غلظت ۵۰ mg/L کانامایسین و تیمار ۳ روز تاریکی و ۷-۱۰ روز در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی. شکل ۶-۲ (B) انتقال گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین به گلدان



استخراج DNA از این گیاه به منظور بررسی انتقال و بیان ژن امری ضروری است.

### واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و DNA ژنومیک

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA* و DNA ژنومیک به‌عنوان الگو، در شکل ۵ نشان داده شده است. طول محصول PCR که توسط این آغازگرها تکثیر شد حدود ۱۳۸۰ bp بود که دقیقاً برابر با طول قطعه ژنی *bphA* بود (شکل ۷).



شکل ۷. آزمون گیاهان بالقوه تراریخت به روش PCR و با آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA* که گیاهان تراریخت قطعه ۱۳۸۰ bp را نشان داده‌اند. M: مارکر وزنی (۱۰۰۰ bp، شماره ۱) کنترل منفی (گیاه آرابیدوپسیس شاهد)؛ شماره‌های ۲، ۳ و ۴ گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ شماره‌های ۵ و ۸ گیاهان تراریخت با سویه C58C1؛ شماره‌های ۶ و ۷ گیاه آرابیدوپسیس غیر تراریخت؛ شماره ۹ کنترل مثبت.

شود. همچنین باید از سویه آگروباکتریوم با قدرت تهاجمی بیشتر برای انتقال ژن استفاده کرد که در این تحقیق سویه LBA4404 نسبت به سویه C58C1 برای انتقال ژن‌های بی‌فیل به گیاه آرابیدوپسیس کارآمدتر بوده است. استخراج DNA به روش کاساجیما (Kasajima et al., 2004) به دلیل خلوص زیاد و نیاز به مقدار ناچیز نمونه برگ، روش مناسبی برای استخراج DNA از گیاه آرابیدوپسیس است.

### نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که امکان بهینه‌سازی انتقال همزمان چند ژن کلون‌شده در ناقل pGreen به گیاه مدل آرابیدوپسیس وجود دارد. برای انتقال ناقل pGreen به روش ذوب و انجماد، ابتدا باید پلاسمید کمکی pSoup به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم منتقل شود و در مرحله بعد ناقل pGreen به سلول‌های مستعد حامل pSoup اضافه

### REFERENCES

1. Bechtold, N., Ellis, J. & Piletier, G. (1993). In Planta Agrobacterium Mediated gene transfer by Infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Science Paris*, 316, 1194-1199.
2. Bechtold, N. Jaudeau, B. Jolivet, S. Maba, B. Vezon, D. Voisin, R. & Pelletier, G. (2000). The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana* *Genetics*, 155, 1875-1887.
3. Bent, A. F. (1998). Arabidopsis in Planta Transformation uses Mechanism and Prospects for of other species. *Plant Physiology*, 124, 1540- 1547.



4. Dafny-Yelin, M. & Tzfira, T. (2007). Focus issue on vector system for plant research and biotechnology. *Plant Physiology*, 145(4), 1118-1128.
5. Dehestani, A., Ahmadian, G., Salmanian, H., Jelodar, N.B. & Kazemitabar, K. (2010). Transformation efficiency enhancement of *Arabidopsis* vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. *Trakia Journal of Sciences*, 19-26.
6. Francova, K., Sura, M., Macek, T., Szekere M., Bancos, S., Demnerova, K., Sylvestre, M.D. & Mackova, M. (2003). Preparation of plants containing bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 309-313.
7. Hellens, R. Edwards, A., Leyland, N., Bean, S. & Mullineaux, P. (2000). pGreen: a vector and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819-832.
8. Kasajima, L., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. & Fujiwara, T. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 42-59.
9. Mohammadi, M., Chalavi, V., Novakova-Sura, M., Laliberte, JF. & Sylvestre, M. (2007). Expression of bacterial biphenyl-chlorobiphenyl dioxygenase genes in tobacco plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 496-505.
10. Novacova, M. Mackova, M. Antosova, Z. Victorova, J. Szekeres, M. Demnerova, K. & Macek, T. (2010). Cloning the bacterial bphC gene into *Nicotiana tabacum* to improve the efficiency of phytoremediation of polychlorinated biphenyls. *Biotechnology and Bioengineering*, 1(6), 419-423.
11. Norelli, J. L. Aldwinckle, H. S. Beltran, L. D. & Jaynes, J. M. (1994). Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica*. 77, 123-128.
12. Van Aken, B. A., Correa, P. & Schnoor, L. (2010). Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises. *Environmental science and Technology*, 44(8), 2767-2776.
13. Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
14. Young-Seok, J., Joon-seul, L., Byeony-choon, C., Yoon-jeong, N. & Yoon-hi, C. (2003) Development of a method for in planta transformation in *Brassica napus* L. 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, BP3, 23, 148-151.
15. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W. & Chua, N.H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Natural Protocols*, 1, 641-646.