SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)

Archive of SID

اولین کنگره بین المللی
و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات
و سومین همایش علوم وتکنولوژی بذر
1st International and
13th Iranian Crop Science Congress
3rd Iranian Seed science and Technology Conference

ژن فسفومانوز ایزومراز (*pmi*) به عنوان یک نشانگر انتخابی برای تراریختی توتون بواسطه آگروباکتریوم

مریم احساسات وطن[1]، مراد جعفری[1,2]

[1] گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

[2] گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

m_ehsasatvatan@yahoo.com

چکیده

یک سیستم گزینشی مثبت با استفاده از ژن فسفومانوز ایزومراز برای تراریختی با واسطه *Agrobacterium tomefaciens* در توتون (*Nicotiana tabacum*) بکار گرفته شد. در مطالعه حاضر، غلظت‌های مختلف مانوز (g/l ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰) در ترکیب با ساکارز (g/l ۰، ۵) برای تعیین کارایی سیستم گزینشی مبتنی بر مانوز برای غربال گیاهان تراریخته احتمالی در گیاه توتون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که غلظت بهینه مانوز برای گزینش سلول‌های تراریخته g/l ۲۰ مانوز بدون ساکارز بود، زیرا در این غلظت حداقل رشد برای سلول‌های غیر تراریخته در مقایسه با سلول‌های تراریخته با ژن *pmi* مشاهده شد. وضعیت تراریختی گیاهچه‌های گزینش شده با استفاده از آنالیز PCR تایید شد. نتایج حاصل نشان داد که سیستم گزینشی مانوز در گیاه توتون با کارایی تراریختی ۲۱/۷۵٪ و کارایی گزینش ۹۴/۵۶٪ بسیار کارآمد است.

کلمات کلیدی: توتون، فسفو مانوز ایزومراز، *pmi*، کارایی تراریختی

مقدمه

تکنولوژی تراریختی گیاهی معمولاً متکی بر استفاده از یک ژن نشانگر انتخابی برای تسهیل شناسایی و انتخاب سلول‌های تراریخته از سلول‌های غیر تراریخته می‌باشد. اخیراً سیستم‌های گزینشی جایگزین برای بازیابی گیاهان تراریخته با استفاده از ژن‌های نشانگر مثبت به جای استفاده از ترکیبات سمی در محیط‌های کشت با موفقیت توسعه یافته‌اند (۳). سیستم‌های گزینشی مثبت با استفاده از مانوز، گزیلوز و یا داکسی‌گلوکز به عنوان عامل گزینشی موثر در برخی از محصولات شناخته شده‌اند (۹). ژن *pmi* رمز کننده آنزیم فسفومانوز ایزومراز (PMI) است که در باکتری *E. coli*، مخمر و پستانداران (از جمله انسان) وجود دارد، اما وجود آن فقط در تعداد کمی از گونه‌های گیاهی مانند سویا و چند لگوم دیگر نیز گزارش شده است (۹). فعالیت PMI در کشت سوسپانسیون سلولی *Nicotiana tabacum* و همچنین در برگ‌های توتون نسبتا پایین است که منجر به متابولیسم آهسته مانوز می‌شود (۲). در سلول‌های تراریخته مانوز توسط یک هگزوکیناز به مانوز ۶-فسفات فسفریله می‌شود که حاصل آن تولید فسفات و ATP و در نتیجه تولید انرژی مورد نیاز برای فعالیت‌های مهم سلولی از جمله تقسیم سلولی می‌باشد. چنانچه سلول‌های گیاه بر روی محیط کشتی که تنها منبع کربن آن مانوز است کشت شوند سلول‌های تراریخت نشده قادر به رشد و تکثیر بر روی این محیط نخواهند بود. سیستم گزینشی مانوز/PMI به طور موفقیت‌آمیزی در باززایی گیاهان تراریخته از محصولات مهم از جمله چغندرقند، گندم، ذرت، برنج، نیشکر، کتان، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، مرکبات، سورگوم و ارکیده مورد استفاده قرار گرفته است (۹). طبق بررسی‌های انجام گرفته، PMI به راحتی در دستگاه گوارش ساختگی هضم شده، هیچ‌گونه اثرات مضر در آزمایشات سمیت خوراکی موش نشان نداده است، هیچ تغییر قابل تشخیص بیوشیمایی در مسیر مرتبط با مانوز ایجاد نمی‌کند، فاقد بسیاری از نشانه‌های مرتبط با حساسیت‌های خوراکی است و بنابراین به عنوان یک پروتئین نشانگر ایده‌آل برای تراریختی گیاهان در نظر گرفته شده است (۷).

توتون یک سیستم مدل برای مطالعات کشت بافت و مهندسی ژنتیک بوده وهم چنین منشا بسیاری از اکتشافات در زمینه کشت بافت و سلول گیاهی و همچنین زیست‌شناسی مولکولی ناشی از آزمایش بر روی گیاه توتون می‌باشد. به طور معمول از این گیاه در

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran
۲۴-۲۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

www.agrobreedcongress.ir
www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات مربوط به تولید پروتئین‌های نوترکیب، آنتی‌بادی‌ها و مواد شیمیایی خاص برای کاربرد در پزشکی و صنعت استفاده می‌شود (۵). اخیرا باهاریا و همکاران (۱) در مطالعه خود از توتون به عنوان یک گیاه مدل برای بررسی اثر بخشی سیستم گزینشی مبتنی بر مانوز در ترانسفورماسیون به روش ریزپرتابی استفاده کردند. بر اساس منابع علمی در دسترس، استفاده از این سیستم گزینشی در تراریختی توتون بواسطه آگروباکتریوم گزارش نشده است. در این تحقیق کارآیی سیستم گزینشی مبتنی بر مانوز در تراریختی بواسطه آگروباکتریوم در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تراریختی آگروباکتری با پلاسمید نوترکیب،در این مطالعه سازه pBCAMBIA-PMI حاوی ژن *pmi* از منشا باکتری *E. coli* به روش ذوب و انجماد به باکتری *Agrobacterium tomefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت. حضور سازه مورد نظر در کلونی‌های حاصل از تراریختی آگروباکتریوم به روش Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *pmi* تایید گردید.

تعیین حساسیت به مانوز برای باززایی شاخساره،حساسیت ریزنمونه‌ها نسبت به مانوز با کشت ریزنمونه‌های تراریخت نشده در محیط کشت باززایی حاوی غلظت‌های مختلف مانوز (۰ g/l، ۱۰، ۲۰، ۳۰) در ترکیب با ساکارز (۰ g/l، ۵) تعیین شد. برای هر ترکیب مانوز/ساکارز از سه تکرار و در هر تکرار از ۹ ریزنمونه استفاده شد. پس از سه هفته، درصد ریزنمونه‌های باززا شده، میانگین تعداد شاخساره‌های تولید شده در هر تیمار و میانگین طول شاخساره‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌های این آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز شد و پس از تست نرمال بودن داده‌ها تبدیل جذری آنها انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

تراریختی، ریزنمونه‌های برگ به واسطه آگروباکتری حاوی پلاسمید نوترکیب جهت انتقال ژن از ریزنمونه‌های برگی جوان و چهار هفته‌ای گیاه توتون استفاده شد. باکتری *Agrobacterium tomefaciens* سویه LBA4404 حاوی سازه مورد نظر به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ mg/l ریفامپسین و ۵۰ mg/l کانامایسین رشد کرد. ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند، پس از خشک کردن نسبی ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل، ریزنمونه‌ها به محیط کشت هم‌کشت شامل محیط MS (۶) حاوی سینامیک اسید (۱۵۰ mg/l)، BAP (۱ mg/l)، IBA (۰,۱ mg/l)، مانوز (۲۰ g/l) و آگار (۷ g/l) منتقل شده و در اتاق رشد با دمای ۲۵ ℃ در شرایط نور کم قرار گرفتند. ۴ روز پس از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط شستشو شامل محیط ½MS حاوی ۵۰۰ mg/l سفوتاکسیم شستشو داده شده و در محیط کشت انتخابی شامل محیط کشت MS حاوی BAP (۱ mg/l)، IBA (۰,۱ mg/l)، مانوز (۲۰ g/l) و آگار (۷ g/l) کشت شدند. پس از باززایی ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌های ۳-۲ میلی‌متری از ریزنمونه جدا شده و برای رشد بیشتر در محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد کشت شدند. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در همان محیط انجام شد. تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور $۱۶۰\mu Em^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۴±۲ °C قرار داده شدند.

تایید حضور ژن *pmi* درگیاهان با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، برای آنالیز PCR، DNA ژنومی از برگ‌های تازه گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۹۳) استخراج شد. به منظور شناسایی گیاهان تراریخته احتمالی، آنالیز PCR برای نمونه‌های DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *pmi* برای تکثیر یک قطعه ۸۳۶ bp استفاده شد. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با دمای اتصال ۵۲ °C و طی ۳۵ چرخه انجام شد. کارایی گزینش (SE) به صورت تعداد گیاهچه‌های تراریخته در تعداد کل گیاهچه‌های باززا شده محاسبه گردید و به صورت درصد بیان شد. کارایی تراریختی (TE) به صورت تعداد گیاهچه‌های تراریخته باززا شده در تعداد کل ریزنمونه‌ها محاسبه شده و به صورت درصد بیان شد.

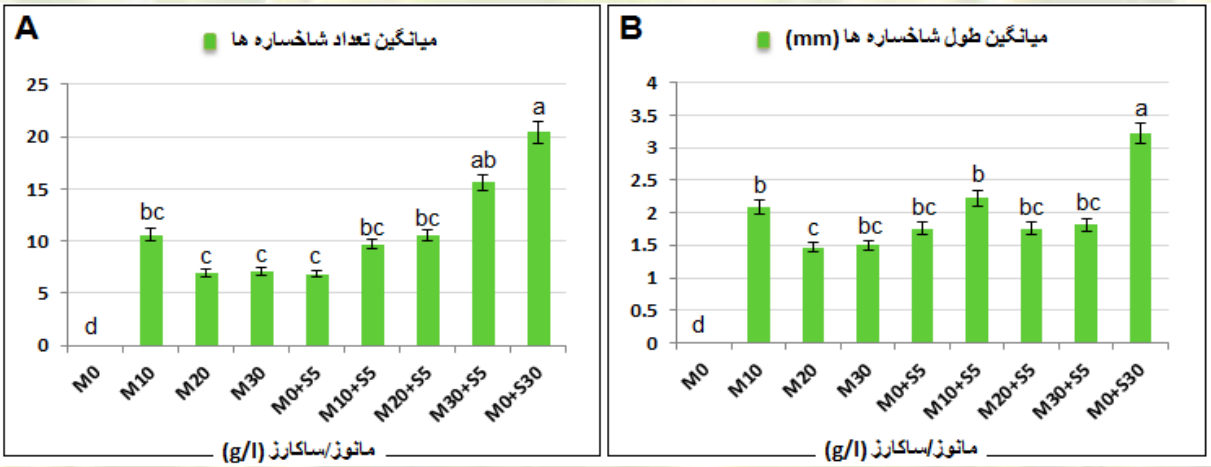
www.SID.ir

Archive of SID

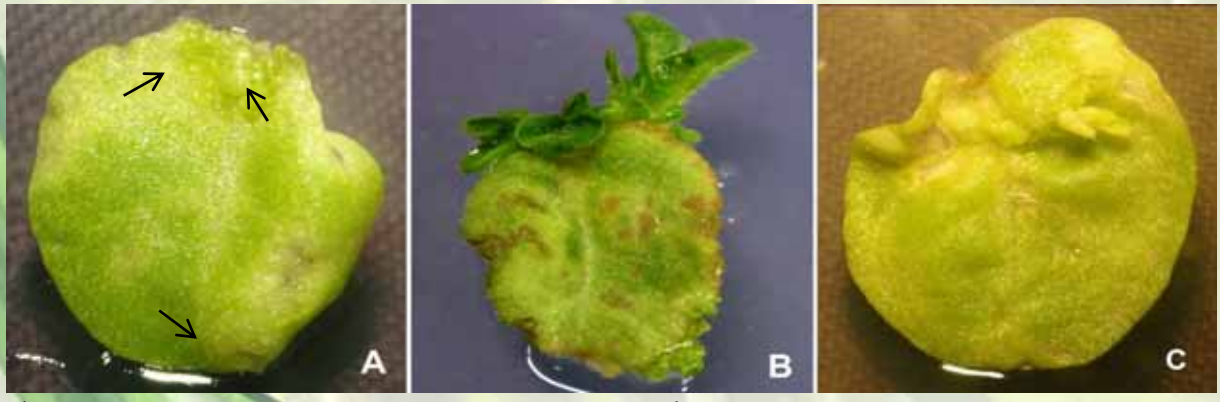
نتایج و بحث

تعیین غلظت مناسب مانوز برای انتخاب گیاهچه‌های تراریخته توتون

نه ترکیب مختلف مانوز/ساکارز در محیط باززایی برای ارزیابی تاثیر مانوز بر روی اندام‌زایی در ریزنمونه‌های برگی توتون مورد استفاده قرار گرفت. تیمار مانوز به طور معنی‌داری باززایی و طول شاخساره‌ها در ریزنمونه‌های برگ توتون را تحت تاثیر قرار داد. هیچ گونه باززایی در محیط کشت عاری از منبع کربن مشاهده نشد. اگرچه با افزایش غلظت مانوز تعداد و طول شاخساره‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت، با این حال افزودن ۵ g/l ساکارز در تمام غلظت‌های مانوز باعث افزایش تعداد و طول شاخساره‌ها شد (شکل ۱). بنابراین، این نتایج نشان می‌دهد که گیاهچه‌های تراریخته توتون می‌توانند در محیط حاوی غلظت‌های بالای مانوز مورد انتخاب قرار گیرند (شکل ۲). در مطالعه‌ای دیگر، موثر بودن غلظت ۳۰ g/l مانوز در بازدارندگی از تشکیل شاخساره در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ تراریخت نشده توتون نیز گزارش شد (۱). نتایج مشابهی در مطالعه بر روی مرکبات (۳) و ارکید (۱۰) به دست آمد.



شکل ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف مانوز/ساکارز بر اندام‌زایی از ریزنمونه‌های برگ در گیاه توتون (*N. tabacum*). A) میانگین تعداد شاخساره‌های تشکیل شده در ریزنمونه‌های برگی تراریخت نشده سه هفته بعد از کشت، B) میانگین طول شاخساره‌های تشکیل شده در ریزنمونه‌های برگی تراریخت نشده سه هفته بعد از کشت. ستون‌ها، SE ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. اعداد دارای حروف غیر مشترک از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۱$) بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.



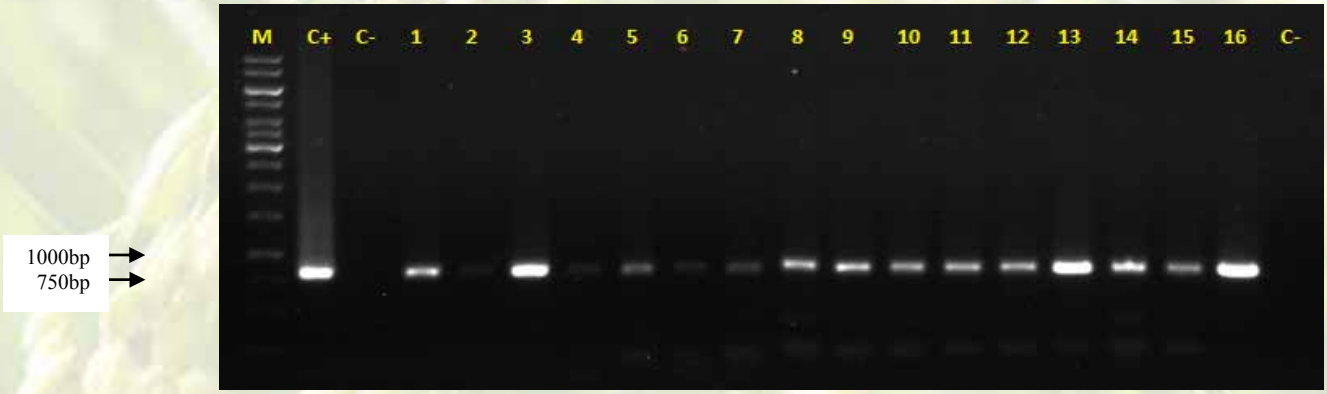
شکل ۲. باززایی جوانه‌های نابه‌جای القا شده بر روی ریزنمونه‌های برگ توتون تراریخته با ژن *pmi* بواسطه *Agrobacterium tumefaciens* در محیط گزینش (محیط MS پایه حاوی ۲۰ g/l مانوز). A) القای جوانه‌های نابه‌جا (علامت‌های پیکان) در ریزنمونه برگ کشت شده در محیط گزینش، B) رشد گیاهچه‌های تراریخته بالقوه در محیط گزینش، C) کشت ریزنمونه بدون انجام عملیات تراریختی در محیط گزینش (جوانه‌ها قادر به رشد نبودند).

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran
۲۴-۲۶ شهریور ماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران
www.SID.ir

Archive of SID

تایید تراریختی توتون با استفاده از آنالیز PCR

حضور ترانسژن در گیاهچه‌های گزیش شده در حضور مانوز توسط واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *pmi* وجود قطعه ۸۳۶ bp را نشان داد که برابر با اندازه مورد انتظار قطعه تکثیر شده در کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ترانسژن مورد استفاده در تراریختی) بود. در گیاهان شاهد هیچ‌گونه تکثیری مشاهده نشد. در برخی از گیاهچه‌های گزیش شده نیز قطعه مورد نظر مشاهده نشد (شکل ۳)، که می‌تواند به دلیل کیفیت نامناسب در نمونه DNA یا مشکل در واکنش PCR باشد و نیاز به تکرار PCR در این نمونه‌ها دارد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز PCR، کارایی تراریختی پس از گزینش در محیط کشت انتخابی حاوی g/l ۲۰ مانوز بدون ساکارز ۲۱/۷۵٪ و کارایی گزینش ۹۴/۵۶٪ بدست آمد. این نتایج نشان دهنده کارآمدی بالای سیستم گزینشی PMI در مقایسه با سیستم‌های گزینشی مبتنی بر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کانامایسین است (۱ و ۱۰). علاوه بر عامل انتخابی مورد استفاده در محیط گزینش، کارایی تراریختی بستگی به ژنوتیپ گیاه، نوع سازه پلاسمیدی، نوع ریزنمونه و نحوه باززایی دارد (۸). مطابق با نتایج این تحقیق، در مطالعات دیگر در گیاهان مختلف نیز کارآمدی این سیستم گزینشی ثابت شده است، از جمله ۳۱٪ کارایی تراریختی در ذرت، ۲۵٪ در گندم، ۲۴٪ در سیب و بیش از ۵۳٪ در سیب‌زمینی گزارش شده است (۴).



شکل ۳. آنالیز PCR برای گیاهچه‌های توتون تراریخته با ژن *pmi* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *pmi*، M: نشانگر وزن مولکولی (1 kb DNA Ladder)، C+: ناقل پلاسمیدی *pmi* (کنترل مثبت)، C-: گیاهچه غیر تراریخته (کنترل منفی)، ۱۶-۱: گیاهچه‌های تراریخته توتون، C-: واکنش PCR بدون DNA الگو (کنترل منفی).

نتایج تحقیقات نشان داد که سیستم گزینش بر اساس مانوز یک سیستم دوستدار محیط زیست و سیستم جایگزین موثر در گزینش سلول‌های تراریخته به جای استفاده از ترکیبات مضر و سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش‌ها در محیط کشت می‌باشد. استفاده از این ژن کارایی تراریختی را در چغندر و سیب‌زمینی تا ۱۰ برابر بیش از ژن نشانگر کانامایسین افزایش داده است. بنابراین از آنجائیکه فراوانی باززایی گیاهان تراریخته افزایش می‌یابد، استفاده از این ژن برای تراریخته کردن گیاهان ایده‌آل به نظر می‌رسد.

سپاس‌گذاری

از پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی لازم برای انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Bahariah, B., Parveez, G.K.A., Masani, M.Y.A., Khalid, N. 2012. Construction of phosphomannose isomerase (PMI) transformation vectors and evaluation of the effectiveness of vectors in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Bioinformation. 8(3):151–157.

2. Barb, A.W., Mason Pharr, D., Williamson, J.D., 2003. A *Nicotiana tabacum* cell culture selected for accelerated growth on mannose has increased expression of phosphomannose isomerase. Plant Science. 165:639_648.

3. Ballester, A., Cervera, M., 2008. Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus. Plant Cell Rep. 27:1005–1015

4. Briza, J., Ruzickova, N., Niedermeierova, H., Dusbabkova, J., Vlasak, J. 2010. Phosphomannose isomerase gene for selection in lettuce (*Lactuca sativa* L.) transformation. Acta Biochimica Polonica. 57:63–67.

5. Ganapathi, T.R., Suprasunna, P., Rao, P.S., Bapat, V.A. 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)_ A model system for tissue culture interventions and genetic engeenering. Indian jurnal of biotechnology. 3:171-184.

6. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–476.

7. Privalle, L.S., Wright, M., Reed, J., Hansen, G., Dawson, J., Dunder, E.M., Chang, Y.F., Luann Powell, M., Meghi, M. 1999. Phosphomannose isomerase, a novel selectable plant selection system: mode of action and safety assessment. In: Fairbain G, Scoles A (eds) Int Symp Biosafety Genet Modified Organ. University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon. 171–178.

8. Sigareva, M., Spivey, R., Willits, M., Kramer, C., Chang, Y.F. 2004. An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. Plant Cell Rep. 23:236–245.

9. Sundar, I.K., Sakthivel, N., 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. Journal of Plant Physiology. 165:1698–1716

10. Thiruvengadam, M., Hsu, W.H., Yang, C.H., 2011. Phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic orchid plants (*Oncidium* Gower Ramsey). Plant Cell Tissue Organ Culture. 104:239–246.

Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for *Agrobacterium-mediated* transformation of tobacco

Ehsasatvatan M.[1], Jafari M.[1,2]

[1]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2] Department of Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, University of Urmia, Urmia, Iran

Abstract

A positive selection system using the phosphomannose isomerase (*pmi*) gene was employed for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Nicotiana tabacum*. In the present study, various concentrations of mannose (0, 10, 20, 30 g/l) in combination with sucrose (0, 5 g/l) were test to determine the efficiency of mannose based selection system for the screen of putative transformants of tobacco plant. Results showed that the optimal concentration of mannose for the selecting of the transformed cells were 20 g/l without sucrose, because at this concentration the least plant growth was observed for the non-transformed cells in compared with cells transformed with the *pmi* gene. Transgenic status of selected plantlets was confirmed using PCR. Our results indicated that mannose based selection in tobacco was more efficient, as a selection efficiency of 94.56% and rate of transformation of 21.75% were achieved.

Keywords: tobacco, phosphomannose isomerase, *pmi*, transformation efficiency

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)