ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۷۰- ۳۶۳

تشدید بیان ژن *AtEXPA18* در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

Overexpression of *AtEXPA18* in *Arabidopsis thaliana*

سارا شاه‌نجات بوشهری [۱]، علیرضا عباسی*[۲]، هوشنگ علیزاده[۳]

۱،۲و۳- کارشناس ارشد و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Shahnejat bushehri S[1], Abassi AR[2*], Alizade H[3]

1,2,3. Graduate Student, Assistant Professors, Department of Agronomy and Plant breeding, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:rezabbasi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۸- تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

ریشه‌های موئین، نقش مهمی در جذب آب و مواد غذایی از خاک بازی می‌کنند و به عنوان جایگاهی برای اثر متقابل با میکروارگانیسم‌های خاک محسوب می‌شوند. فرایند شکل‌گیری ریشه‌های موئین در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا شناخته شده می‌باشد. ژنهای متعددی در توسعه سلول های گیاهی نقش دارند که در این تحقیق یک ژن اختصاصی ریشه به نام *AtEXPA18* که به طور مستقیم در شکل‌گیری ریشه‌های موئین مؤثر است، جداسازی و تحت کنترل پیشبرنده *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* درون ناقل بیان گیاهی pBI121 کلون و در نهایت به باکتری آگروباکتریوم منتقل گردید. باکتری آگروباکتریوموم حاوی ناقل بیانی گیاهی pBI:EXPA18 طی روش غوطه‌وری گل‌آذین به آرابیدوپسیس منتقل شد. بذور حاصل از غوطه‌وری گل‌آذین جهت ارزیابی اولیه تراریخته بودن روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند و به منظور تأیید تراریخته بودن گیاهان، آنالیز مولکولی گیاهان رشد کرده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به روش RT-PCR انجام شد. بدین صورت که با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و *AtEXPA18* و همچنین cDNA گیاهان تراریخته واکنش PCR انجام و تراریختگی گیاهان در سطح رونویسی تأیید شد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا ، آلفا اکسپنسین، توسعه سلول، ژنهای خانواده اکسپنسین، سست‌کنندگی دیواره سلولی، غوطه‌وری گل‌آذین.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]

مقدمه

ریشه یک اندام گیاهی است که برای به‌دست آوردن آب و مواد غذایی از محیط سازگار شده است (Schiefelbein et al. 1997). منطقه تقسیم سلولی ریشه شامل مریستم نوک ریشه است که تقسیمات سلولی جدید را انجام می‌دهد. سلول‌های نشأت گرفته از منطقه تقسیم سلولی اغلب در منطقه افزایش طول[1]، بسط می‌یابند. بعد از اینکه این سلول‌ها طویل شدند، در منطقه بلوغ متمایز می‌شوند و ریشه‌های موئین یا ثانویه را به وجود می‌آورند. پیشنهاد شده است که وقایع طویل شدن و تمایز که در ریشه اتفاق می‌افتد، توسط قابلیت بسط دیواره سلولی و اتساع غشاء پروتوپلاسم گیاهی درون سلولی کنترل می‌شود (Cosgrove 1996). حد طویل شدن سلول گیاهی محدود به دیواره سلولی است. دیواره سلولی نقش اساسی در تعیین اندازه و شکل سلول گیاهی دارد. سلول گیاهی برای طویل شدن یا بلوغ، نیاز به تغییر انتخابی دیواره سلولی دارد عواملی که در تغییر دیواره سلول‌های گیاهی نقش دارند شامل اجزاء مختلف دیواره سلولی مانند اکسپنسینها، اندوگلوکانازها، زایلوگلوکان اندوترانس گلیکوزیلاز و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد (Cosgrove 1999, 2000a, 2000b) . اکسپنسین ها اساساً به عنوان عوامل اصلی برای طویل شدن سلول محسوب می‌شوند (Vissenberg et al. 2000). اکثر شواهد نشان می‌دهد که اکسپنسین ها از طریق سست کردن پیوندهای هیدروژنی بین میکروفیبریل‌های سلولز و پلیمر ماتریکس باعث تغییر شکل تدریجی دیواره می‌شوند (Cosgrove 2000b). ژن‌های اکسپنسین در ۴ زیرخانواده آلفا اکسپنسین، بتا اکسپنسین، شبه اکسپنسین A و شبه اکسپنسینB قرار دارند. پروتئین‌های آلفا اکسپنسین و بتا اکسپنسین دارای فعالیت سست‌کنندگی دیواره سلولی می‌باشند که در بسط سلولی و دیگر وقایع نموی که در طی آن‌ها دیواره سلولی تغییر می‌کند، شرکت دارند (Choi et al. 2006). اکسپنسین ها اولین بار در مطالعات رشد سلولی القا شده در اثر pH اسیدی به عنوان پروتئین‌های بسط دهنده دیواره شناخته شدند. برای سال‌ها شناخته شده بود که pH خارج سلولی کمتر از ۵/۵ باعث بسط دیواره در گیاهان خاکی می‌شود. این فرایند در pH اسیدی مناسب توسط بخش بزرگی از اکسپنسینهای موجود در دیواره انجام می‌شود. رشد القا شده در pH اسیدی و عکس العمل اکسپنسین ها، در پاسخ رشدی گیاهان به هورمون‌ها، محرک‌های خارجی مانند نور، خشکی، شوری، شرایط غرقاب و فرایندهای مورفوژنتیک مانند تشکیل ریشه‌های موئین نقش دارد (Sampedro and Cosgrove 2005). عوامل محیطی و هورمونی روی رشد ریشه‌های موئین (در یک مسیر متمایز از مسیر مرتبط با رشد) موثرند. جوانه زدن ریشه های موئین با سست شدن دیواره سلولی در محل تشکیل ریشه موئین همراه است. Bibikova et al. (1998) اسیدی شدن دیواره سلولی در محل تشکیل ریشه‌های موئین ثابت کردند. که این اسیدی شدن می‌تواند اکسپنسین ها را فعال کند. بدین ترتیب اکسپنسین ها دسته‌ای از ژن‌ها هستند که نقش پیشنهادی در توسعه سیستم ریشه برای آنان ارائه شده است. افزایش طول و حجم ریشه از طریق ظهور ریشه‌های مویین می‌تواند به عنوان مکانیسمی برای جذب آب بیشتر در نظر گرفته شود زیرا ریشه‌ها غالبا در شرایط کم آبی که طویل شدن برگ و ساقه به طور کل محدود می‌گردد، به رشد خود ادامه می‌دهند که این خصوصیت به عنوان یک مکانیسم مهم سازگاری گیاه به شرایط محدودیت آبی در نظر گرفته می‌شود.

با توجه به اینکه نقش بعضی از ژن‌های اکسپنسین در توسعه سیستم ریشه تایید شده است می‌توان با انتقال این ژن‌ها به گیاهان زراعی مورد نظر، گیاهان تراریخته‌ای تولید کرد که سیستم ریشه توسعه یافته‌تری داشته و توانایی جذب آب بیشتر و بالتبع تحمل بیشتری به تنش خشکی داشته باشند. در راستای گسترش اندام ریشه در گیاه آرابیدوپسیس و افزایش توانایی گیاه برای جذب آب بیشتر، در این پژوهش تشدید بیان ژن *AtEXPA18* مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه ژنی pBI:*EXPA18*

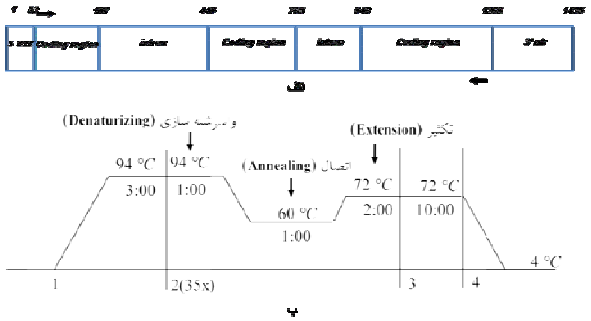
در این تحقیق از بذور آرابیدوپسیس تالیانا رقم کلمبیا استفاده شد. به منظور جداسازی و کلون کردن ژن *EXPA18*، DNA ژنومی گیاه آرابیدوپسیس به روش CTAB استخراج گردید (Doyle and

[1] Elongation

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]

Doyle 1990). به منظور طراحی آغازگر، توالی ژن *EXPA18* توسط نرم‌افزار DNA Star از نظر مکان برش با آنزیم‌های برش-دهنده اختصاصی بررسی شد و سپس آغازگرهای مناسب برای تکثیر ژن *EXPA18* بر اساس ابتدا و انتهای CDS این ژن طراحی شد (شکل ۱- الف). به طوری که به آغازگر پیشرو توالی شناسایی آنزیم برشی *Bam*HI (3′ 5′GGATCCCAGAGTAAAAATGGATCAAAATTT) و به آغازگر پسرو توالی مربوط به آنزیم برشی *Sac*I (3′ 5′GAGCTCTTAGTTAAAATTAGCCTTGCTCTG) اضافه گردید. دلیل انتخاب این دو سایت برشی در دو طرف ژن این بود که این دو آنزیم دارای جایگاه برشی درون ژن *EXPA18* نبودند. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix و DNA ژنومی گیاه آرابیدوپسیس مطابق با نمودار نشان داده شده در شکل ۱- ب انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز و باند مربوطه از روی ژل بریده و DNA آن با کیت کیاژن از ژل استخراج شد. به منظور وارد نمودن قطعه به درون ناقل pGEM-T، طبق دستور شرکت پرومگا یک نوکلئوتید A به دو انتهای ژن اضافه شد. به این صورت که طبق دستور شرکت پرومگا بعد از مخلوط نمودن مواد مورد نیاز واکنش به مدت 30 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از این مرحله به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور T/A- cloning حذف نوکلئوتیدهای اضافی موجود در واکنش با استفاده از کیت QIAquick Nucleotide removal شرکت کیاژن انجام شد سپس از کیت T/A-cloning، محصول شرکت پرومگا، به‌منظور بهره‌گیری از سیستم یک‌مرحله‌ای برای کلون کردن قطعات DNA تکثیر شده با PCR، استفاده شد و این قطعات با آنزیم T4 DNA لیگاز به درون ناقل pGEM-T وارد شدند. محصول این الحاق به باکتری *E. Coli* $DH5_{\alpha}$ مستعد شده منتقل شد. از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط LB (Merck) جامد حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام شد. به منظور جداسازی قطعه از ناقل pGEM-T هضم دوگانه با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I طبق پیشنهاد شرکت فرمنتاز انجام شد. محصول برش آنزیمی با استفاده از کیت کیاژن از روی ژل خالص‌سازی شد. هضم دوگانه ناقل pBI121 با آنزیم‌های مذکور نیز، طبق پیشنهاد شرکت فرمنتاز انجام شد. سپس ژن *EXPA18* توسط آنزیم T4 DNA لیگاز به درون ناقل pBI121 کلون شد. از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط LB (Merck) جامد حاوی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کاناماسین استخراج پلاسمید انجام شد و با واکنش هضم دوگانه با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I صحت سازه ژنی pBI:*EXPA18* بررسی شد (شکل ۲). پس از ساخت سازه ژنی و تأیید آن، این سازه به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل شد و سپس این سلول‌ها بر روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک-های ریفامپیسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) و کانامایسین (۲۵ میلی گرم بر لیتر) کشت شدند. رشد بر روی این محیط انتخابی تأیید وجود آگروباکتریوم (به واسطه رشد در حضور ریفامپسین و استرپتومایسین) حاوی pBI121 (به واسطه رشد در حضور کانامایسین) بود. برای تأیید نهایی حضور سازه ژنی در آگروباکتریوم از این کلونی‌ها استخراج پلاسمید به عمل آمد و صحت سازه ژنی موجود در آگروباکتریوم با واکنش هضم آنزیمی دوگانه تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۱- الف شمای ژن *EXPA18* و محل اتصال آغازگرها بر روی این ژن و (ب) برنامه پی سی آر مورد استفاده جهت تکثیر قطعه *EXPA18*

انتقال سازه ژنی pBI:*EXPA18* به آرابیدوپسیس

بذور گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) در خاک حاوی ورمی‌کولایت و پیت ماس به نسبت ۱:۱ که مرطوب شده بود کشت شدند به منظور شکست خواب بذر به مدت دو روز در دمای ۴°C نگهداری شدند. سپس گیاهان به فیتوترون منتقل شدند. به مدت ۳ تا ۴ هفته گیاهان در شرایط روز کوتاه (۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی) نگه داشته شدند و سپس به منظور

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]

القای گلدهی به فیتوترون با شرایط طول روز بلند (۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) منتقل شدند در هر دو حالت میانگین درجه حرارت ۲۱°C و میزان رطوبت معادل ۵۰ درصد بود. بعد از ظهور شاخه‌های گل‌دهنده اولیه، این شاخه‌ها از نزدیک محل روزت قطع شدند تا جوانه‌های گل ثانویه با تعداد بیشتر تولید گردد. تلقیح زمانی انجام گرفت که هر گلدان دارای ۲۰ تا ۳۰ گل آذین و تعداد بسیار کمی غلاف بود.

برای انتقال ژن به گیاهان آرابیدوپسیس از روش غوطه‌وری گل آذین استفاده شد. در این روش سوسپانسیون باکتری‌ها که حاوی ۵ درصد سوکروز، ۰/۰۵ سورفکتانت Silwet-L77 و دارای OD حدود ۲-۱/۸ بود آماده شد و سپس گلدان‌ها به مدت ۴۰ ثانیه به طور وارونه در این سوسپانسیون قرار گرفتند، به طوری‌که تمام گل‌آذین گیاه در داخل سوسپانسیون غوطه‌ور شد (Zhang et al. 2006). سپس گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در زیر پوشش نایلونی و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت گیاهان به فیتوترون منتقل شدند. بذور حاصل از این گیاهان به منظور گزینش جهت دستیابی به گیاهان تراریخت، با الکل ۷۵ درصد و هیپوکلریت ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند. این بذور بر روی محیط MS نیم برابر حاوی ۵۰ mg/l کانامایسین کشت شدند و از گیاهان گزینش شده بر روی این محیط استخراج RNA به روش RNX™ انجام شد و متعاقباً ساخت cDNA صورت گرفت. در نهایت با استفاده از این cDNA و آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و *EXPA18* واکنش RT-PCR انجام شد.

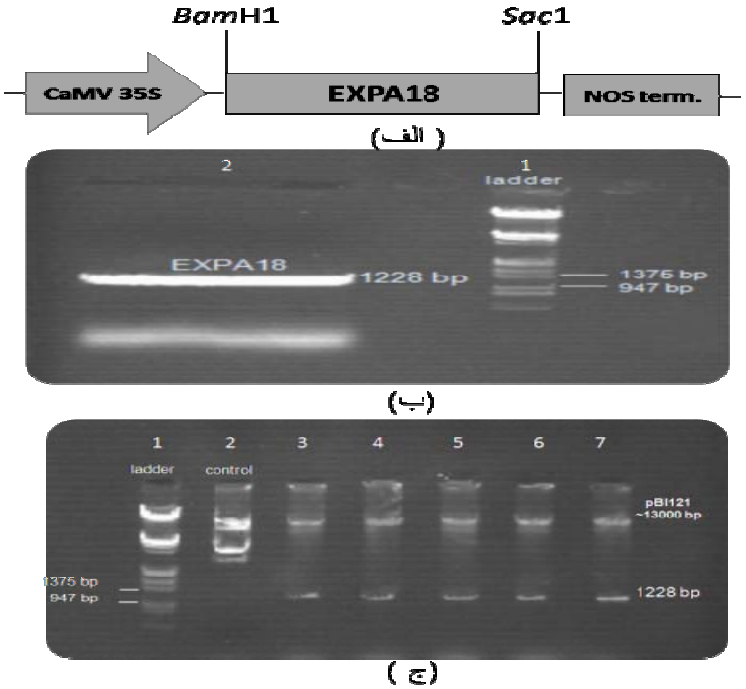
نتایج و بحث

ژن *EXPA18* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix و با تکنیک PCR تکثیر گردید. برای کاهش احتمال خطا در فرآیند تکثیر از این آنزیم استفاده شد که خاصیت غلط‌گیری دارد و تخمین زده می‌شود که نرخ اشتباه آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix ، یک در هر ۵/۲ میلیون نوکلئوتید در هر چرخه باشد. از انجا که کارایی آنزیم های دارای خاصیت ترمیمی پایین است شرایط انجام PCR ابتدا با آنزیم *Taq* پلیمراز بهینه شد و سپس تکثیر قطعه با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲- ب نشان داده شده است نتیجه این تکثیر منجر به تولید قطعه ۱۲۲۸ bp شد که اندازه آن مطابق با اندازه مورد نظر بود. قطعه حاصل در ناقل های حدواسط کلون شد از انجا که ناقل حد واسط pGEM-T بود به منظور وارد نمودن ژن به درون ناقل pGEM-T و به علت این که این ناقل دارای یک انتهای آزاد T میباشد، یک نوکلئوتید به دو انتهای ژن اضافه گردید پس از این مرحله به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور T/A- cloning حذف نوکلئوتیدهای اضافی موجود در واکنش با استفاده از کیت QIAquick Nucleotide removal شرکت کیاژن انجام شد که بدست آوردن کلونی های در حال رشد روی محیط کشت انتخابی موید صحت کار می باشد. در نهایت سازه تهیه شده پس از برش و خالص سازی به pBI منتقل گردید که نتیجه هضم آنزیمی کلون‌های pBI:EXPA18 رشد کرده در محیط آنتی بیوتیک‌دار با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I در شکل ۲- ج نشان دهنده صحت کلون‌های ساخته شده می‌باشد. در طی این تحقیق سازه آماده شده برای تشدید بیان ژن *EXPA18* به اگروباکتریوم که به عنوان یک ناقل طبیعی در تراریختگی گیاهان روشی مرسوم و کارآمداست و در مورد بسیاری از گیاهان کاربرد دارد منتقل گردید. در این تحقیق نیز به منظور انتقال ناقل pBI121 نوترکیب به گیاه آرابیدوپسیس بدلیل در دسترس بودن و کارایی بهتر برای روش انتقال بواسطه غوطه وری گل آذین از سویه LBA4404 این باکتری استفاده شد.

سازه ژنی pBI:EXPA18 از طریق غوطه‌وری گل‌آذین به آرابیدوپسیس تالیانا منتقل شد. دلیل استفاده از این روش این بود که اکثر روش‌های استفاده شده برای انتقال ژن به گیاهان مستلزم مراحل کشت بافتی هستند که این مراحل می توانند منجر به تغییرات ژنتیکی ناخواسته‌ای مثل تغییر در متیلاسیون سیتوزین، القا جهش و همچنین انحرافات کروموزومی شوند. بنابراین روش انتقال ژنی که فاقد این مراحل باشد، قطعاً مطلوب‌تر خواهد بود. از مزایای روش غوطه‌وری گل‌آذین این است که با حذف مراحل کشت بافت و باززایی، زمان کمتری صرف خواهد شد و همچنین به نیروی ماهر و متخصص کمتری نیاز است. طی بررسی‌هایی که روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شده است، مشخص شده که با این

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

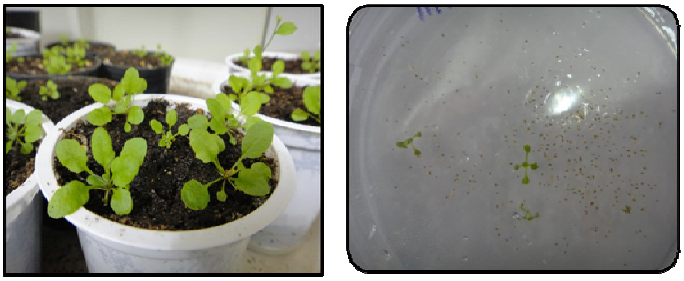
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]



شکل ۲- ساخت و تایید سازه pBI:EXPA18 . الف) سازه ژنی pBI:*EXPA18*، ب)- محصول تکثیر ژن *EXPA18* بر روی ژل آگارز یک درصد، ۱) مارکر وزن مولکولی λ/*Eco*RI+*Hin*dIII، ۲) ژن EXPA18 تکثیر شده با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix، ج)- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب آگروباکتریوموم پس از انتقال به *E. coli* ۱) مارکر وزن مولکولی λ/*Eco*RI+*Hin*dIII، ۲) پلاسمید نوترکیب برش نخورده ۳-۷) حضور قطعه EXPA18 در ۵ کلونی مختلف.

روش می‌توان به نرخ انتقال ژنی حدود ۰/۵-۳ درصد دست پیدا کرد (Zhang et al. 2006). علاوه بر این مزیت از آنجایی‌که در گیاه آرابیدوپسیس میزان بذر زیادی تولید می‌شود و با توجه به کارایی انتقال ژن ۰/۵ تا ۳ درصد در این تحقیق، گیاهان تراریخته زیادی تولید شد که اگر این روش انتقال ژن در مورد کلزا هم بهینه سازی شود، می‌توان بدون نیاز به مراحل کشت بافت گیاهان تراریخته کلزای بسیاری به دست آورد. زمان تلقیح با اگروباکتریوم در این روش بسیار مهم است و گیاهان تراریخته زمانی که اگروباکتریوم پنج روز یا بیشتر بعد از گرده افشانی به کار برده شود بدست می‌آیند. در روش غوطه‌وری گل‌ها هدف انتقال ژن، تخمک ها می باشند و اگروباکتریوم باید قبل از بسته شدن Locule وارد تخمدان شود. استفاده از این روش در گیاهان کلزا (Li et al. 2010)، یونجه (Trieu et al. 2000) و تربچه (Curtis and Nam 2001) نیز گزارش شده است. افزایش تراکم سلولی اگروباکتریوم مورد استفاده(OD_{600}) از ۰/۸ به ۲ باعث افزایش راندمان انتقال ژن به روش غوطه وری گل‌آذین، به میزان ۲-۳ درصد می گردد (Martinez et al. 2004). بنابراین در این پژوه از تراکم سلولی آگروباکتریوم (OD_{600}) ۲ استفاده شد. پس از انتقال سازه pBI:EXPA18 با روش غوطه وری گل‌آذین به گیاهان آرابیدوپسیس بذوری که از این گیاهان حاصل گردید برای گزینش اولیه گیاهان تراریخته بر روی محیط MS نیم برابر انتخابی کشت شدند. بعد از گذشت دو هفته بذوری که جوانه زده بودند در صورتی‌که حاوی ژن بودند در صورتی‌که غیرتراریخت‌ها سفید شده و حذف می‌گردیدند به رشد ادامه داده و سبز می-ماندند لذا همان‌طور که در شکل ۳ الف نشان داده شده است تعدادی از گیاهان توانایی رشد در محیط کانامایسین را دارند که به عنوان گیاهان تراریخته احتمالی انتخاب شده و به گلدان منتقل شدند (شکل۳ ب).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]



(ب) (الف

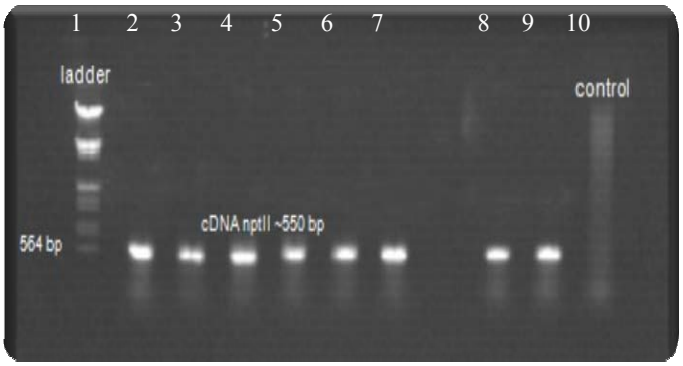
شکل ۳- شناسایی گیاهان تراریخته احتمالی آرابیدوپسیس الف) شناسایی گیاهان تراریخته احتمالی آرابیدوپسیس بر روی محیط انتخابی حاوی ۵۰µg/ml کانامایسین
شکل ب گیاهان تراریخته احتمالی آرابیدوپسیس پس از انتقال به گلدان

استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین بعنوان گزینشگر اولیه گیاهان تراریخته به این دلیل است که کانامایسین قادر است با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌سازی و با اتصال به بخش ۳۰S ریبوزوم، که در اندامک ها وجود دارد، سلول تحت اثر را از بین ببرد. میزان مقاومت یک سلول گیاهی تراریخت شده بستگی کامل به تعداد نسخه های ژن[1] مقاومت به کانامایسین و جایگاه قرارگیری آن درون ژنوم هسته‌ای[2] دارد. در این پژوهش از غلظت کانامایسین ۵۰ میلی گرم بر لیتر به منظور انتخاب گیاهان تراریختهه استفاده شد. در این غلظت کانامایسین گیاهان شاهد از رشد باز ماندند و سفید شدند. در حالیکه با این غلظت کانامایسین، گیاهان تراریخته تولید ریشه های بلند نموده و سبز ماندند. غلظت بیش از این حد (۵۰ میلی گرم بر لیتر) منجر به از بین رفتن گیاهان تراریخته احتمالی می گردد. به منظور تأیید تراریخته بودن گیاهان، بیان ژن *EXPA18* در گیاهان تراریخته احتمالی با کمک روش RT-PCR بررسی گردید. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، با استفاده از آغازگرهای مناسب (الیگوdT) و با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی، واکنش PCR انجام شد. همان‌گونه که نتیجه آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و sscDNA گیاهان تراریخته و شاهد، در شکل۴ الف نشان می‌دهد، در چاهک‌های ۲ تا ۷ حضور ژن *npt*II و در نتیجه سازه ژنی مورد نظر در گیاهان تراریخته، با ظاهر شدن باند حدود ۵۶۰ bp تایید می‌گردد. چاهک ۱۰ در این شکل نمایانگر عدم وجود باند مورد نظر در این مکان می‌باشد که مجموع این دو نشان می‌دهد که گیاهان انتخاب شده حاوی ناقلی هستند که دارای ژن *npt*II می‌باشد. جهت تأیید بیشتر و اثبات این‌که باند به دست آمده در تست قبل آلودگی موجود در محیط نمی‌باشد مجدداً آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *EXPA18* و sscDNA گیاهان تراریخته به عنوان الگو انجام گردید. همانطور که در شکل ۴-ب مشاهده می‌شود، قطعه ۷۸۹ bp حاصل از تکثیر با آغازگرهای *EXPA18* تنها در گیاهان تراریخته وجود دارد و در گیاه شاهد باندی دیده نمی‌شود که این مسئله، تأییدی بر تشدید بیان ژن *EXPA18* در گیاهان تراریخته می‌باشد.

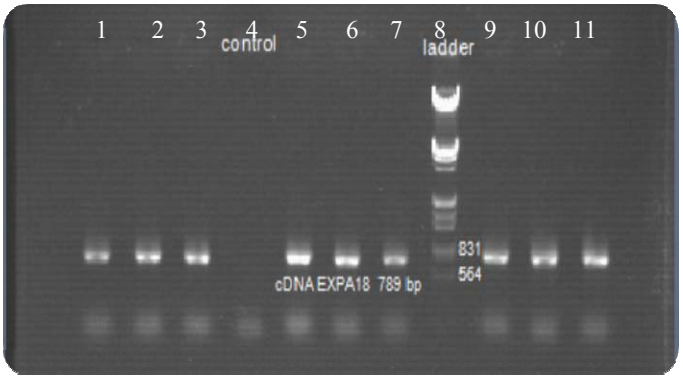
نتایج آزمون RT-PCR بر روی نمونه‌های گیاه تراریخت و مقایسه آن با نمونه خالص شده از گیاه شاهد غیرتراریخت نشان می‌دهد که نسخه برداری موفق از ژن مورد نظر انجام می‌گیرد. قابل ذکر است که رقیق‌سازی cDNA های ساخته شده نقش بسیار موثری در تکثیر باند مورد نظر در واکنش RT-PCR دارد. همانطور که قبلاً ذکر شد، بیان ژن *EXPA18* مختص بافت ریشه می‌باشد. بنابراین همانطور که انتظار می‌رفت چون از بافت‌های برگ و گل آذین استخراج RNA انجام شد، باندی در گیاهان شاهد مشاهده نشد. با توجه به اینکه این ژن در سازه ژنی، تحت پیشبرنده ۳۵S قرار گرفته است، طبق انتظار بیان این ژن در تمام بافت‌های گیاهان تراریخته انجام می‌شود.

[1] Gene copy number
[2] Position effect

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]



(الف)



(ب)

شکل ۴- نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی. الف) نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II بر روی ژل آگارز یک درصد، ۱) مارکر وزن مولکولی λ/*Eco*RI+*Hin*dIII ۹-۲) تکثیر ژن *npt*II در گیاهان تراریخته ۱۰) عدم تکثیر ژن *npt*II با در گیاه شاهد.
ب) نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن EXPA18 بر روی ژل آگارز یک درصد، ۸) مارکر وزن مولکولی λ/*Eco*RI+*Hin*dIII ۳- ۱، ۷- ۵، ۱۱- ۹) تکثیر cDNA ژن *EXPA18* درگیاهان تراریخته، ۴) عدم تکثیر cDNA ژن *EXPA18* در گیاه شاهد

با توجه به نقش اکسپنسین‌ها در بسط دیواره سلولی انتظار می‌رود که با تشدید بیان این ژن ریشه‌های توسعه یافته‌تری ایجاد شود. با توجه به اینکه این ژن تحت پیشبرنده ۳۵S قرار گرفته و بیان این ژن در تمام بافت های گیاهان تراریخته انجام می شود، بنابراین انتظار می رود که علاوه بر توسعه اندام ریشه فنوتیپ جدیدی در دیگر اندام‌ها مشاهده شود که باید مورد بررسی قرار گیرد. ضمن بررسی تاثیر افزایش بیان این ژن در آرابیدوپسیس و تأیید نقش این ژن در توسعه ریشه می‌توان این ژن را به گیاه کلزا که یکی از دانه‌های روغنی خوراکی و صنعتی با اهمیت در جهان به شمار می‌آید، انتقال داد.

منابع

Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S (1998) Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. Development 125:2925-2934.
Choi D, Cho HT, Lee Y (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. Physiol Plant 126:511-518
Cosgrove DJ (1996) Plant cell enlargement and the action of Expansins. BioEssays 18: 533-540
Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 391-417
Cosgrove DJ (2000a) Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiol Biochem 38: 109-124
Cosgrove DJ (2000b) Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321-326

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]

Curtis I S, Nam HG (2001) Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. Transgenic Research 10:363-371.

Doyle JJ, JL Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* Vol. 12.pp. 11-5

Li J. Xiaoli T, Zhu F, Guo J (2010) A Rapid and Simple Method for *Brassica Napus* Floral-Dip Transformation and Selection of Transgenic Plantlets. International Journal of Biology 2, 127-131.

Martinez-Trugillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. Plant Molecular Biology Reporter 22, 63-70.

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

Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. Plant Cell 9:1089-1098.

Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with Agrobacterium. Plant J 22: 531-541.

Vissenberg K, Martinez-Vilchez IM, Verbelen J-P, Miller JG, Fry SC (2000) *In vivo* co-localization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. Plant Cell 12: 1229-1237

Zhang X, Henriques R, Lin S, Niu Q, Chua N (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method Nature Protocols 1:641-646.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.6.7]