جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره چهارم، مهر ـ آبان ۱۳۸۶
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

طراحی و ساخت پلاسمید نوترکیب pBI121-*Glu* جهت انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به پنبه

*مطهره محسن‌پور[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۳] و علی اکبر حبشی[۲]
[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه مازندران، [۲]استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج،
[۳]استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۴/۵

چکیده

ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز از منشاء جو با کدکردن پروتئینی ضدقارچی و تجزیه گلوکان‌ها که از اجزای اصلی دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشند، منجر به تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها شده و در نتیجه مقاومت گیاهان را در برابر بیماری‌های قارچی افزایش می‌دهد. به‌منظور انتقال این ژن به گیاه پنبه، قدم اول طراحی و ساخت کاست ژنی مناسب و الحاق آن در ناقلی پلاسمیدی برای انتقال توسط سیستم آگروباکتریوم بود. بدین‌منظور ابتدا کاست مزبور با افزودن پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos به چهارچوب خواندنی باز (ORF) ژن گلوکاناز در داخل پلاسمید حدواسط pCaMV تهیه شد و سپس در ناحیه T-DNA پلاسمید باینری pBI121 بین ژن‌های *gus* و *nptII* کلون‌سازی مجدد گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pBI121-*Glu*، برای تراریزش مریستم نوک ساقه پنبه به واسطه آگروباکتریوم به کار رفت. مریستم‌های نوک ساقه پنبه پس از جداسازی و همکشتی با آگروباکتریوم در محیط انتخابی حاوی کانامایسین قرار داده شدند. گیاهان باززا شده در محیط انتخابی که به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت دادند، تراریخته احتمالی محسوب شده و مراقبت از آنان تا رسیدن به رشد کافی جهت انجام بررسی‌های دقیق‌تر اثبات حضور و بیان ژن انجام خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: پنبه، کلون سازی، گلوکاناز، هیستوشیمیایی GUS

مقدمه

پیشرفت و توسعه برنامه‌های اصلاح ژنتیکی به گونه فزاینده‌ای وابسته به نتایج چگونگی استفاده از ابزارهای دستورزی ژنتیکی است. انتقال DNA خارجی به گیاهان با چندین روش صورت می‌گیرد. مؤثرترین روش انتقال که گیاهان مستعد آن هستند، استفاده از آگروباکتریوم[۱] است. ناقل‌های مورد نیاز برای انتقال ژن با جایگزینی بخش T-DNA با قطعاتی از DNA که باید به گیاه وارد شود، به‌دست می‌آیند. بیان موفقیت‌آمیز ژن‌های خارجی پس از انتقال به گیاه نیازمند آماده کردن ساختار مناسب ژن قبل از انتقال به گیاه است. علاوه‌بر توجه به توالی ژن بایستی پیشبر[۲] و پایانبر[۳] مناسبی به پایانه‌های ۵′ و ۳′ اضافه گردد تا بیان مؤثر و دلخواه ژن را تضمین نماید (هنری، ۱۹۹۷). یکی از پیشبرهای گیاهی که به بهترین وجه مطالعه شده، پیشبر CaMV35S می‌باشد که این پیشبر ویروسی، RNA ژنومی 35S ویروس

*- مسئول مکاتبه: mthrhm@yahoo.com

1- Agrobacterium tumefaciens
2- Promoter
3- Terminator

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

موزائیک گل کلم را تولید می‌کند و بیان خودسرشت[1] ژن‌های تحت کنترل خود را به‌خصوص در گونه‌های دولپه منجر خواهد شد (رانجان، ۲۰۰۲).

ردیابی و آشکارسازی سیستم‌های ترانسفورماسیون گیاه، به‌منظور اطلاع از این که آیا DNA موردنظر با موفقیت به درون سلول‌های میزبان منتقل شده است یا خیر، به کمک مجموعه‌ای از ژن‌ها، موسوم به ژن‌های نشانگر صورت می‌گیرد که همراه با ژن هدف در پلاسمید ناقل جای داده می‌شوند. ژن‌های نشانگر را می‌توان به دو دسته ژن‌های گزارش‌گر و ژن‌های گزینشگر تقسیم نمود. مزیت استفاده از این ژن‌ها بررسی آسان آنهاست، زیرا برای تشخیص آنها به استخراج DNA، الکتروفورز و یا اتورادیوگرافی نیازی نیست. ژن باکتریایی *uidA*، که آنزیم بتاگلوکورونیداز (*gus*) را کد می‌نماید، به‌عنوان یکی از پرکاربردترین ژن‌های گزارشگر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن در گیاهان مطرح شده است. ژن *uidA*، آنزیم بتاگلوکورونیداز را که یک هموتترامر با وزن ملکولی ۶۸ کیلودالتون است و به pH مطلوب ۸-۷ نیاز دارد، کد می‌نماید. بتاگلوکورونیداز، گلوکورونید را می‌شکند و منجر به یک واکنش رنگی می‌شود. *nptII* یا آمینوگلیکوزید-۳′- فسفوترانسفراز II (APH (۳′) -II) یکی از پرکاربردترین نشانگرهای گزینشگر می‌باشد. این آنزیم را ژن *nptII* که از ترانسپوزون Tn5[2] منشاء گرفته است، کد می‌نماید. این آنزیم تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نظیر کانامایسین[3]، نئومایسین[4]، جنتامایسین[5] و پاراموماسین[6] را غیر فعال می‌سازد (چاولا، ۲۰۰۰). اغلب برای غربال گیاهان تراریخته حاوی ژن *nptII* در محیط‌کشت گیاهان از آنتی‌بیوتیک کانامایسین استفاده می‌گردد.

1- Constitutive
2- Transposon Tn5
3- Kanamycin
4- Neomycin
5- Geneticin
6- Paramomycin

بیماری‌های قارچی هر ساله خسارات زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌نمایند. طولانی بودن روش‌های سنتی اصلاحی برای ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری‌های قارچی از یک سو و مشکلات مصرف سموم شیمیایی که پرهزینه بوده، باعث آلودگی محیط‌زیست شده و به‌دلیل تکامل عوامل بیماری‌زا کم اثر می‌گردند، از سویی دیگر، بیانگر نیاز و اهمیت استفاده از ژن‌های مقاومت و فن‌آوری‌های جدید و کارآمد برای مقاوم نمودن گیاهان به پاتوژن‌های قارچی است. در حال حاضر بیماری قارچی ورتیسیلیوم[7]، از مشکلات اصلی زراعت پنبه در مناطق تحت آبیاری اقلیم‌های نسبتاً خشک می‌باشد. کاهش محصول ناشی از تیپ برگ‌ریز ۲۰ تا ۳۰ درصد و در تیپ غیربرگ ریز ۱۰ تا ۵۰ درصد برآورد شده است. میزان خسارت تیپ SS4 در ایران ۱۵ تا ۲۰ درصد تخمین زده شده است (حمدا...زاده، ۱۹۹۳). ضدعفونی خاک با گاز متیل‌بروماید یا مخلوط‌کردن متیل‌بروماید و کلروپیکرین با دز قوی (میزان مصرف متیل بروماید بستگی به نوع خاک دارد و بین ۴۰۰-۲۰۰ کیلو در هکتار متغیر است) و در عمق زیاد و کشیدن ورقه پلاستیکی پلی‌اتیلن در روی خاک می‌تواند موجب از بین‌رفتن بیماری شود ولی هزینه این روش بسیار زیاد بوده و اثرات زیانباری نیز روی ارگانیسم‌های خاک در ناحیه ریزوسفر[8] داشته و آلودگی محیط را نیز به همراه دارد. بنابراین بهترین روش در کنترل پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه کشت رقم مقاوم است (توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۳). تاکنون تعدادی از ژن‌های پاسخ دفاعی گیاهان که پروتئین‌های ضد قارچی راکد می‌نمایند، شناسایی گردیده‌اند که از جمله آنها، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی یا PR می‌باشند، که گروه PR-2 یکی از گروه‌های اصلی این پروتئین‌ها بوده و بیان آن در گیاهان مقاومت آنها را به پاتوژن‌های قارچی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم افزایش داده است. خانواده

7- *Verticillium dahlae*
8- Rhizosphere

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پروتئین‌های PR-2 از جمله بتا- ۱ و ۳- گلوکانازها (گلوکان- اندو- ۱ و ۳- بتا گلوکاناز E.C.3.2.1.39)، پیوندهای بتا- دی - گلیکوزیدی را در بتاگلوکان‌ها که یکی از اجزای اصلی دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها می‌باشند، هیدرولیز می‌کنند. گلیکوهیدرولازها به دو روش متفاوت عمل می‌کنند: مستقیم، یعنی از طریق تخریب دیواره سلولی عامل بیماری‌زا و غیرمستقیم با آزادسازی مواد مشتق از دیواره سلولی قارچ که می‌توانند به‌عنوان تحریک‌کننده‌های واکنش‌های دفاعی عمل کنند (لبنر و مینز، ۱۹۹۹). در حال حاضر اکثر استراتژی‌های تولید گیاهان تراریخته[1] مقاوم به بیماری‌های قارچی، روی معرفی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های PR[2] نظیر کیتیناز[3] و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز[4] یا سایر پروتئین‌های ضدقارچی متمرکز شده است. گیاهان دارای ژن‌های خارجی PR، به‌طور ساختاری یک یا چند ژن کدکننده پروتئین‌های PR را بیان کرده که ممکن است به این طریق در مقابل بعضی عوامل بیماری‌زا محافظت شوند.

اگرچه میزان انتقال ژن به پنبه به‌طور معنی‌داری نسبت به گزارش‌های اولیه (یولین و همکاران، ۱۹۸۸؛ فیروزآبادی و دبر، ۱۹۹۳؛ توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۳)، افزایش یافته است ولی باز هم درصد انتقال ژن بیشتری موردنیاز است. چندین عامل بر کارآیی انتقال ژن اثر می‌گذارند، از جمله این عوامل می‌توان نژاد باکتری، اضافه‌کردن مواد فنولی در محیط‌کشت (به‌عنوان مثال استوسرینگون[5]) (گودوین و همکاران، ۱۹۹۱)، ایجاد زخم در بافت هدف پیش از آلوده‌سازی با آگروباکتریوم (نورلی و همکاران، ۱۹۹۶) و به‌کار بردن روش مناسب انتخاب سلول‌های تراریخته از بافت غیرتراریخته را نام برد. تا به حال در انتقال ژن با آگروباکتریوم به پنبه از ریزنمونه‌هایی مثل هیپوکوتیل‌ها[6]، کوتیلدون‌ها[7] و سوسپانسیون سلولی[8] استفاده شده است (یولین و همکاران، ۱۹۸۸؛ فیروزآبادی و دبر، ۱۹۹۳؛ راجیسکاران و همکاران، ۱۹۹۶). محدودیت این ریزنمونه‌ها میزان باززایی کم و وابسته بودن آنها به ژنوتیپ است به‌طوریکه باززایی فقط در تعداد محدودی از ارقام ممکن بوده است. با به وجود آمدن سیستم باززایی از مریستم نوک ساقه پنبه این امکان به وجود آمد تا انتقال ژن به هر ژنوتیپ در زمان کوتاهی انجام‌پذیر شود (زاپاتا و همکاران، ۱۹۹۹).

این تحقیق با هدف تهیه پلاسمید حامل ژن گلوکاناز برای استفاده در تراریزش پنبه انجام شد. تلاش بر این بود که پلاسمید مزبور طوری طراحی و ساخته شود که:

الف) کاست ژنی مناسبی برای ژن گلوکاناز با دریافت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos تهیه گردد تا بیان خودسرشت ژن موردنظر را در گیاه تأمین نماید.

ب) کاست ژنی گلوکاناز در ناحیه T-DNA یک ناقل[9] مناسب پلاسمیدی برای تراریزش گیاهان با سیستم آگروباکتریوم کلون‌سازی گردد.

ج) ناقل ساخته شده برای ژن گلوکاناز بتواند ردیابی این ژن را در گیاهان تراریخته، تنها با استفاده از ژن‌های گزارش‌گر و گزینش‌گر و بدون نیاز به آنالیزهای ملکولی نظیر PCR[10]، لکه‌گذاری سادرن[11] و وسترن[12]، در مراحل ابتدایی باززایی، تسهیل نماید.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه XLI-blue (Cinna Gen B76-50c) و آگروباکتریوم سویه LBA 4404 استفاده شد.

پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمیدهای، pCAMBIA 1390 حامل ژن گلوکاناز جو، با نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین، پلاسمید

1- Transgenic plant
2 - Pathogenesis Related Protein
3- Chitinase
4- Beta 1,3- glucanase
5- Acetosyringone
6- Hypocotyls
7- Cotyledons
8- Cell suspension
9- Vector
10- Polymerase Chain Reaction
11- Southern blot
12- Western blot

pCaMV (اهدایی مرکز ملی مهندس ژنتیک) با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین، پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos و پلاسمید باینری pBI121 حاوی ژن *gus* تحت پیشبر 35S و ژن *nptII* با پیشبر Nos به‌عنوان نشانگر انتخابی[1] مقاومت به کانامایسین بود. آنزیم‌های به‌کار رفته در این تحقیق از شرکت Roche تهیه گردیدند.

ساخت پلاسمید نوترکیب *pBI121-Glu*. چارچوب خواندنی باز[2] ژن گلوکاناز در پلاسمید pCAMBIA1390 بین جایگاه شناسایی آنزیم‌های *Bam*HI در ابتدای ژن و *Bgl*II، در انتهای ژن قرار داشت (شکل ۱- الف). به‌منظور اضافه‌کردن پیشبر 35S به انتهای ′۵ از ORF ژن و همچنین افزودن پایانبر Nos به انتهای ′۳ آن، از پلاسمید حدواسط pCaMV استفاده گردید. ویژگی اصلی ناقل پلاسمیدی pCaMV که آن را به‌عنوان پلاسمید حدواسط برای هدف ما مناسب می‌کرد، وجود تک محل آنزیم محدودکننده *Bam*HI، بین پیشبر و ترمیناتور این ناقل و مهمتر از آن وجود دو محل برشی برای آنزیم محدودکننده *Hind*III یکی قبل از پیشبر و دیگری بعد از پایانبر آن بود، این بدان معنی است که اگر بتوان ORF موردنظر را در محل *Bam*HI این پلاسمید وارد کرد، امکان خارج کردن کاست کامل ژن با دریافت پیشبر و پایانبر، توسط آنزیم *Hind*III فراهم خواهد شد (شکل ۱- ب). بنابراین با توجه به این که آنزیم‌های *Bam*HI و *Bgl*II انتها سازگار هستند، جداسازی گلوکاناز با این دو آنزیم از ناقل پلاسمیدی pCAMBIA1390 منجر به ایجاد پایانه‌های سازگار در دو انتهای ژن خواهد شد که توانایی ورود به جایگاه *Bam*HI از پلاسمید pCaMV را به‌دست می‌آورد.

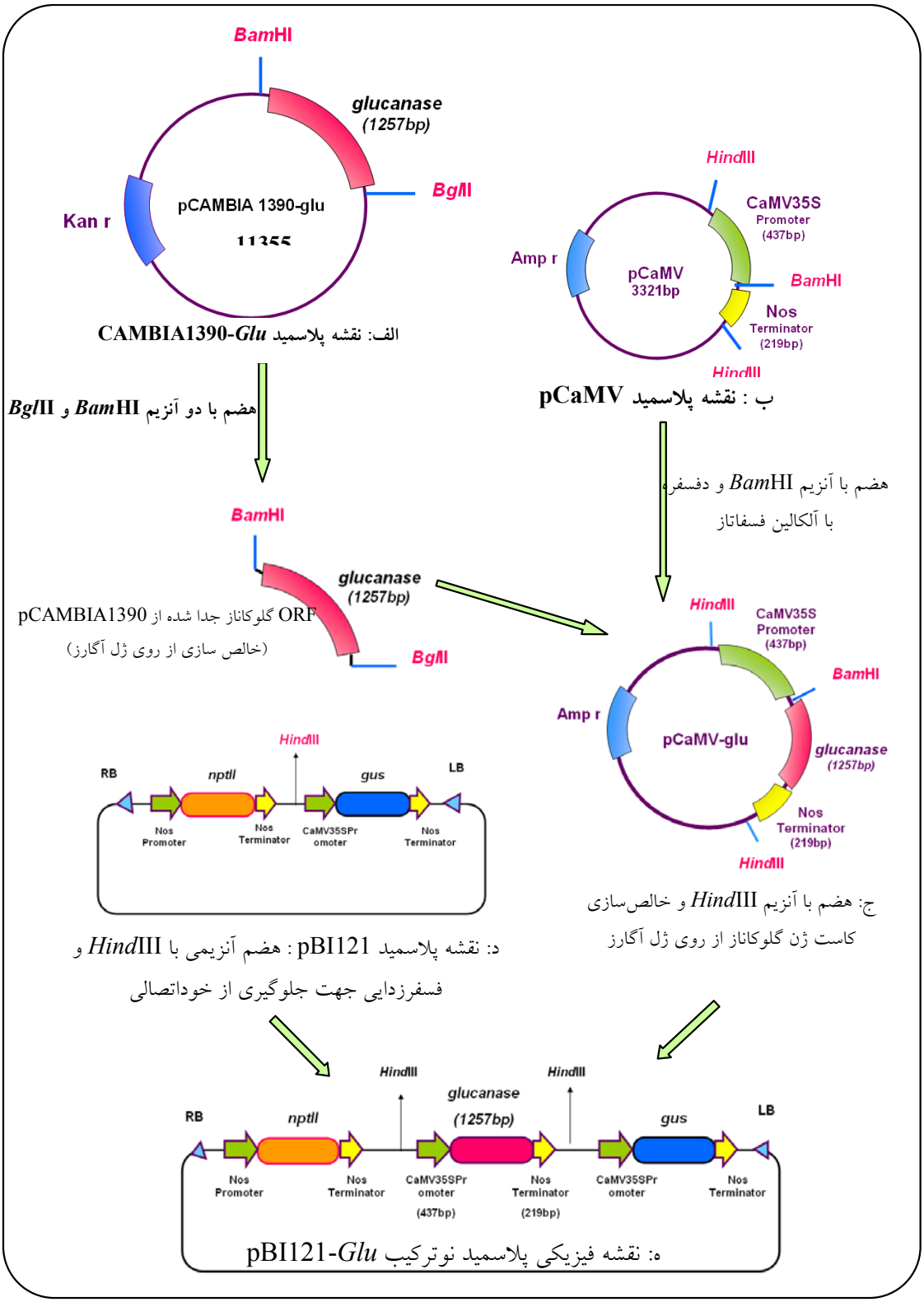
بنابراین، جهت کلون‌سازی ژن گلوکاناز در ناقل pCaMV، ابتدا پلاسمید pCAMBIA1390 با دو آنزیم *Bam*HI و *Bgl*II هضم شد (شکل ۲). قطعه مربوط به ORF که bp ۱۲۵۷ بود، از روی ژل آگارز، خالص‌سازی شد. ناقل pCaMV نیز توسط *Bam*HI هضم شده و جهت جلوگیری از خود اتصالی پلاسمیدی با استفاده از آلکالین فسفاتاز دفسفره شد. پس از انجام واکنش اتصال، مخلوط حاصل به داخل باکتری‌های مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی[3]، تراریزش[4] شد. باکتری‌های تراریخته روی محیط انتخابی LB[5] حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر آمپی‌سیلین تشکیل کلنی دادند. کلنی‌های حاصل، پس از استخراج پلاسمید به‌منظور تأیید حضور و نیز صحت جهت ژن بررسی شدند. بدین منظور از آنزیم‌های *Hind*III و *Bam*HI استفاده گردید (شکل ۳).

ژن نوترکیب گلوکاناز که در جهت صحیح در پلاسمید pCaMV ساب‌کلون شده بود، توسط آنزیم *Hind*III جدا و از روی ژل آگارز خالص‌سازی شد. ناقل پلاسمیدی pBI121 (شکل ۱- د) نیز با *Hind*III هضم آنزیمی شد و جهت جلوگیری از خوداتصالی پلاسمیدی مراحل فسفرزدایی با آنزیم آلکالین فسفاتاز روی آن انجام گرفت. پس از واکنش اتصال و تراریخته کردن باکتری *E. coli*، کلنی‌های حاصل، پس از استخراج پلاسمید از نظر حضور ژن گلوکاناز بررسی شدند (شکل ٤) و پلاسمید نوترکیب *pBI121-Glu* ساخته شد (شکل ۱- ۵).

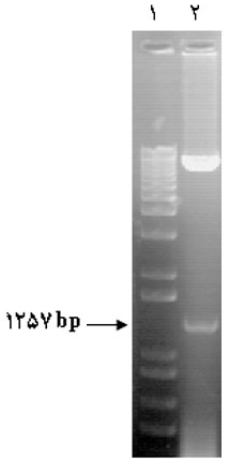
استخراج پلاسمید، واکنش هضم با آنزیم‌های اندونوکلئاز نوع II، تهیه باکتری‌های مستعد[6]، تراریخته کردن باکتری‌ها با استفاده از روش شوک حرارتی، واکنش اتصال[7] و فسفرزدایی، طبق دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (۲۰۰۰) انجام شد.

1- Selectable marker
2- Open Reading Frame (ORF)

3- Heat shock
4- Transform
5- Luria-Bertani
6- Competent
7- Ligation



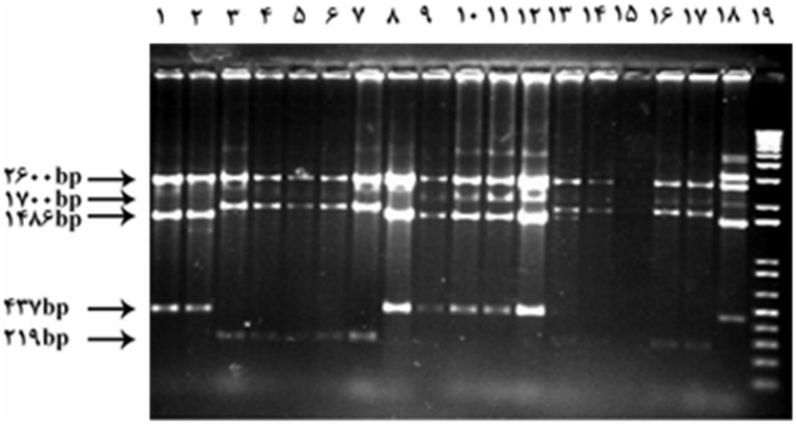
شکل ۱- نمای شماتیک ساخت پلاسمید pBI121-*Glu*.



شکل ۲- هضم آنزیمی پلاسمید pCAMBIA1390-*Glu* حامل ژن گلوکاناز با آنزیم‌های *Bgl* II و *Bam* HI.

۱- نشانگر ملکولی تعیین اندازه DNA (1Kb Plus DNA Ladder)

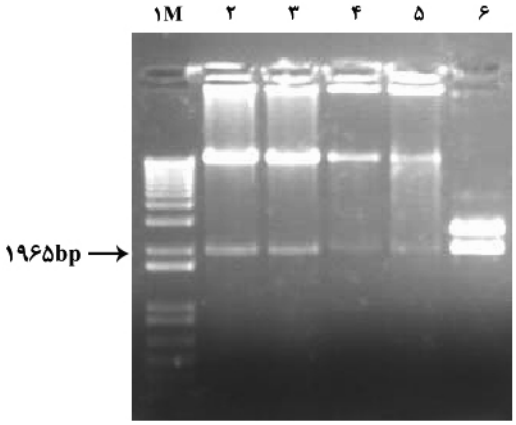
۲- هضم آنزیمی پلاسمید pCAMBIA1390-*Glu* با آنزیم‌های *Bgl* II و *Bam*HI.



شکل ۳- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pCaMV به‌منظور بررسی ورود و جهت ژن با *Hind* III و *Bam*HI.

هضم آنزیمی به‌منظور بررسی ورود و جهت ژن در کلنی‌هایی که ژن را دریافت کرده بودند با آنزیم‌های *Hind*III و *Bam*HI

1Kb Plus DNA Ladder

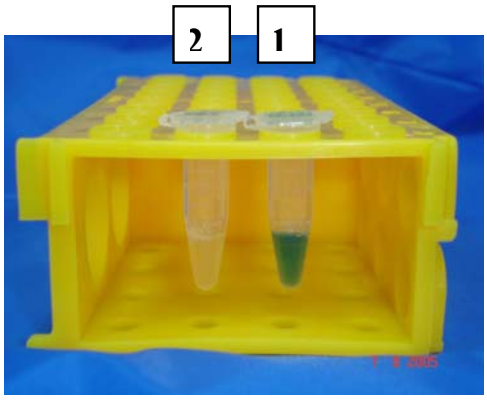


شکل ٤- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBI121-*Glu* حاوی ژن گلوکاناز به‌منظور بررسی حضور ژن

نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder)

هضم آنزیمی ٤ پلاسمیدهای نوترکیب، با آنزیم *Hind*III به‌منظور بررسی حضور ژن

هضم آنزیمی پلاسمید pCaMV-*Glu* با آنزیم *Hind*III به‌عنوان شاهد اندازه ژن گلوکاناز



شکل ۵- باکتری آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121-*Glu* (تظاهر ژن *gus* نمونه را به رنگ آبی درآورده است)
باکتری آگروباکتریوم فاقد پلاسمید به عنوان شاهد در محلول X-gluc (به‌دلیل عدم تظاهر ژن *gus* تغییر رنگ در نمونه مشاهده نمی‌شود).

مواد گیاهی: در این تحقیق از بذور پنبه ارقام ساحل و ورامین دریافتی از مرکز تحقیقات گرگان استفاده گردید. بذرها به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در آب استریل حاوی ۲۰ درصد هیپرکلریت‌سدیم (وایتکس) قرار داده شدند. به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، یک قطره توئین ۲۰ نیز به مایع ضدعفونی اضافه شد و هر چند دقیقه تکان داده شدند. پس از سه بار آبشویی با آب استریل، بذرها روی کاغذ صافی خشک شده و به لوله‌های حاوی محیط جوانه‌زنی (نمک‌های MS [1] غلظت کامل بدون ویتامین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۸) و سپس به تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

جداسازی مریستم‌ها: جداسازی مریستم پس از ۷ تا ۱۱ روز به کمک میکروسکوپ به روش جیانگ (۲۰۰٤)، از نوک ساقه‌های جوانه‌زده انجام گرفت. چون باززایی مریستم‌های کوچکتر از یک میلی‌متر مشکل‌تر از باززایی مریستم‌های بزرگ‌تر می‌باشد، سعی شد که مریستم‌ها به‌صورت کامل و درشت جدا شوند. مریستم‌ها روی محیط شاخه‌دهی (نمک‌های MS، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مایو- اینوزیتول، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیرودوکسین، ۳ درصد سوکروز، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل با pH= ۵/۸) به‌مدت دو روز پرورش داده شدند.

همکشتی با آگروباکتریوم و باززایی گیاهان تراریخته: یک کلنی از باکتری در ۵ میلی‌لیتر از LB مایع همراه با آنتی‌بیوتیک‌های لازم ($۵۰\ mgl^{-1}$ کانامایسین و $۷۵\ mgl^{-1}$ ریف آمپی‌سین) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۲۰ rpm قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از کشت باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر، LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک رقیق‌سازی شد و پس از ۳ ساعت قرار دادن در دور و دمای مذکور، استوسرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار به همراه ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع، دوباره به کشت اولیه باکتری‌ها اضافه گردید و تا رسیدن OD_{600nm} به ۰/٦، باکتری‌ها دوباره در دور و دمای مذکور قرار گرفتند. مریستم هایی که دو روز پیش جداسازی شده و در محیط MS همراه با کینیتین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شده بودند، پس از زخم زنی به محیط MS همراه با ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون، منتقل شده و با ۲ میکرولیتر آگروباکتریوم با OD_{600nm}= ۰/٦، آلوده‌سازی شدند. سپس به مدت ۲ روز، در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پرورش داده شدند. بعد از همکشتی، مریستم‌ها به محیط انتخابی، حاوی MS به‌علاوه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم منتقل شدند. مریستم‌هایی که با باکتری تلقیح نشده بودند به‌عنوان شاهد منفی در محیط MS انتخابی قرار گرفتند. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۸ ساعت پرورش داده شدند. واکشت هر ۳

1- Murashige and Skoog

هفته یک بار، انجام گرفت. این کار تا زمانی‌که نمونه شاهد از بین برود، ادامه یافت. سپس نمونه‌هایی که سبز باقی مانده بودند تحت آزمایش هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند.

بررسی‌های قبلی (گودوین همکاران، ۱۹۹۱؛ سونیکومار و همکاران، ۱۹۹۹ و ۲۰۰۱؛ یاو، ۲۰۰۲) نشان داده بود که استفاده از استوسرینگون به‌عنوان یک ماده فنلی که در القاء عمل ژن‌های *vir* مؤثر می‌باشد، در افزایش کارآیی انتقال ژن مؤثر است. این ماده در غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌مولار علاوه‌بر استفاده در کشت رقیق‌شده باکتری‌ها، در محیط همکشتی مریستم‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفت. از دیگر عوامل مؤثر در کارایی انتقال ژن پیش‌تیمار زخم‌زنی مریستم‌ها عنوان شده است (راجیسکاران و همکاران، ۱۹۹٦؛ نورلی و همکاران، ۱۹۹٦). مریستم‌ها قبل از مرحله آلوده‌سازی با باکتری ابتدا توسط سوزن استریل و تیز، زخم‌زنی شده و روی محیط همکشتی حاوی استوسرینگون قرار داده می‌شدند. زخم‌زنی دسترسی باکتری را به لایه‌های پایین‌تر مریستم (رگه زایشی) که قسمت اعظم بافت جدید را تشکیل می‌دهد، افزایش خواهد داشت (سوسکس، ۱۹۸۹). مریستم‌های جداشده از گیاهانی که ۹ تا ۱۱ روز در محیط جوانه‌زنی بذر قرار داشتند، دارای باززایی بهتری نسبت به مریستم‌هایی بودند که زودتر جدا می‌شدند. استفاده از باکتری با OD_{600nm}=۰/٦ نیز در افزایش کارایی انتقال ژن مؤثر می‌باشد (جیانگ، ۲۰۰٤).

رنگ‌آمیزی برای ارزیابی تظاهر ژن بتا گلوکورونیداز: آزمایش هیستوشیمیایی GUS برای نمونه‌های تراریخته احتمالی با استفاده از سوبسترای X-gluc به روش جفرسون (۱۹۸۷) انجام گرفت. آنزیم GUS روی سوبسترای X-gluc اثر گذاشته و فرآورده واکنش به رنگ آبی در نمونه‌های تراریخته تظاهر می‌نماید. اجزای تشکیل‌دهنده محلول رنگ‌آمیزی برای بررسی تظاهر ژن *gus* شامل X-gluc، ۸۸۹ میلی‌گرم در لیتر؛ کلرامفنیکل، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر؛ NaH2PO4 (یک مولار)، ۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ترایتون ایکس-۱۰۰[1]، ۱ میلی‌گرم در لیتر و متانول[2]، ۲۰ میلی‌لیتر با pH برابر ۷ تا ۸ بود. در این روش ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول X-gluc به قطعه کوچکی از برگ نمونه‌های باززا شده اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

نتایج و بحث

ساخت پلاسمید نوترکیب *pBI121-Glu*. استخراج پلاسمید pCaMV از باکتری‌های *E. coli* سویه XLI-blue که در محیط حاوی آمپی‌سیلین تشکیل کلنی داده بودند، انجام شد تاحضور ORF گلوکاناز بررسی گردد. به‌منظور بررسی ورود ژن گلوکاناز به پلاسمید pCaMV، نمی‌توان از برش با آنزیم *Bam*HI و *Bgl*II استفاده کرد زیرا محل شناسایی آنزیم *Bam*HI در انتهای ژن، در اثر اتصال با انتهای آزاد ایجاد شده توسط آنزیم *Bgl*II، قابل شناسایی توسط هیچ کدام از این دو آنزیم نمی‌باشد. بنابراین برای تأیید ورود ژن و نیز بررسی جهت آن از آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III استفاده گردید.

کلنی‌هایی که ORF را با جهت صحیح دریافت کرده بودند پس از برش با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III باندهای ۲٦۰۰ bp، ۱٤۸٦bp و ٤۳۷bp مورد انتظار را ظاهر کردند و کلنی‌هایی که ORF با جهت عکس وارد آنها شده بود باندهای ۲٦۰۰ bp، ۱۷۰۰ bpو ۲۱۹ bp را نشان دادند. (شکل ۳).

کلنی‌هایی که دارای پلاسمیدهای pCaMV با جهت صحیح ORF گلوکاناز بودند (شکل ۳: چاهک‌های شکاره ۱، ۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۸) موسوم به پلاسمید نوترکیب pCaMV-*Glu* (شکل ۱- ج)، با آنزیم *Hind*III هضم و کاست کامل ژن گلوکاناز (پیشبر 35S + ORF گلوکاناز + پایانبر Nos)، از روی ژل آگارز خالص‌سازی گردید. pBI121 نیز با *Hind*III هضم

1- Triton X-100
2- Methanol

آنزیمی شد. پس از واکنش اتصال و تراریخته کردن باکتری‌ها، کلنی‌های نوترکیب روی محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین تشکیل شدند که پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌های حاصل و بررسی ورود ژن توسط هضم با آنزیم *Hind*III، کلنی‌های دارای پلاسمید نوترکیب pBI121-*Glu* غربال گردیدند (شکل ٤).

انتقال ژن به پنبه با استفاده از آگروباکتریوم و مریستم نوک ساقه: ابتدا پس از تراریخته کردن اگروباکتریوم سویه LBA4404 با پلاسمید نوترکیب pBI121-*Glu* به روش ذوب و انجماد (آن و همکاران، ۱۹۸۸)، این پلاسمید از لحاظ بیان ژن *gus* بررسی شد. حضور پلاسمید با قرار دادن باکتری حاوی پلاسمید pBI121-*Glu* و باکتری‌های فاقد پلاسمید به‌عنوان شاهد، در محلول X-gluc و آبی رنگ شدن سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز که در اثر بیان ژن *gus* ایجاد شده است، تأیید گردید (شکل ۵).

ریزنمونه‌های مریستم که تحت همکشتی با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید مزبور قرار گرفته بودند در محیط انتخابی حاوی کانامایسین قرار داده شدند و هر سه هفته یک بار واکشت گردیدند. ریزنمونه‌های باززا شده روی محیط حاوی کانامایسین (شکل ٦)، در مراحل ابتدایی رویش تحت آزمون هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند که از میان آنها یک نمونه باززا شده از رقم ورامین، بیان ژن *gus* تحت کنترل پیشبر 35S را در محیط X-gluc در برگ نشان داد (شکل ۷). ثبات رنگ آبی پس از قرار دادن نمونه در الکل به‌مدت طولانی حفظ شد.

شکل ٦- مریستم‌های باززا شده رقم ورامین.

شکل ۷- برگ گیاه باززا شده روی محیط حاوی کانامایسین پس از آزمون GUS سنجی

۱- گیاه تراریخته (تظاهر ژن *gus* نمونه را به رنگ آبی درآورده است)

۲- گیاه شاهد (به دلیل عدم تظاهر ژن *gus* تغییر رنگ در نمونه مشاهده نمی‌شود)

به‌منظور تراریزش پنبه، یک سیستم باززایی مطمئن و مستقل از ژنوتیپ موردنیاز است. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی دارای مشکلاتی است، زیرا تنها تعداد کمی از ارقام قادرند از این طریق باززا شوند چون بیشتر واریته‌های گروه کوکر هستند که امروزه به‌صورت تجاری کاشته نمی‌شوند (فنگ و همکاران، ۱۹۹۸). علاوه‌بر محدودیت ژنوتیپی، بسیاری از گیاهانی که از کالوس‌های جنین‌زای سوماتیکی باززا می‌شوند، نرمال نیستند (راجاسکاران و همکاران، ۱۹۹۶). این مشکلات و وقت‌گیر بودن این روش کاربرد این روش را در بیوتکنولوژی پنبه و اصلاح آن محدود می‌کند. ایجاد سیستم انتقال ژن مریستم به واسطه اگروباکتریوم، امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ فراهم کرده است (زاپاتا و همکاران، ۱۹۹۹). از آنجایی که اغلب ژنوتیپ‌های زراعی پنبه، پتانسیل باززایی پایینی دارند و دستکاری ژنتیکی در آنها مشکل می‌باشد، بهینه‌سازی باززایی از طریق کشت مریستم که چندان به ژنوتیپ وابسته نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد، مناسب به‌نظر می‌رسد (توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۳). زاپاتا و همکاران (۱۹۹۹) استفاده از مریستم نوک ساقه برای انتقال ژن توسط آگروباکتریوم را برای انتقال ژن‌های *nptII* و *gus* تحت پیشبر CaMV35S، گزارش کرده بودند. در این تحقیق، با به‌کار بردن ترکیبی از شرایطی که در بهینه‌سازی انتقال ژن توسط محققین مختلف به اثبات رسیده بود (در بخش مواد و روش‌ها به آنها اشاره شد)، توانستیم در مدت کوتاهی به گیاه تراریخته موردنظر دست یابیم.

از سویی دیگر، طراحی و ساخت پلاسمید حامل ژن گلوکاناز، امکان ردیابی آسان و سریع گیاهان تراریخته احتمالی را در مراحل اولیه باززایی فراهم آورد. از آنجایی‌که ژن گلوکاناز به‌همراه نواحی تنظیمی خود (پیشبر CaMV35S و ترمیناتور Nos)، بین ژن گزینشگر *nptII* در مرز راست و ژن گزارشگر *gus* در مرز چپ ناحیه T-DNA کلون‌سازی گردید، گیاهان باززا شده‌ای که در محیط حاوی کانامایسین رشد کرده و به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت می‌دهند، به احتمال، ژن مورد نظر (گلوکاناز) را که در فاصله ژن‌های *gus* و *nptII* کلون‌سازی شده، نیز دریافت کرده‌اند. با توجه به این که گیاهان باززا شده از مریستم نوک ساقه پنبه، بسیار کند رشد بوده و به سختی ریشه‌دار می‌شوند، تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی در ماه‌های اولیه رشد برای محقق بسیار مهم خواهد بود و می‌تواند وقت و دقت و کار بیشتری را صرف رسیدگی و پرورش این گیاهان ارزشمند نموده تا به رشد کافی دست یابند و دارای سیستم ریشه‌ای مناسبی برای انتقال به گلدان شده و به مراحل بلوغ و بذردهی برسند. به‌علت این که گیاهان حاصل از مریستم نوک ساقه پنبه حتی تا چندین ماه پس از باززایی بسیار ظریف و کوچک باقی می‌مانند (شکل ٦، نمونه باززا شده رقم ورامین را در ماه سوم نشان می‌دهد)، جداسازی این برگ‌های کوچک جهت آنالیزهای ملکولی، موجب ضعیف و ناتوان شدن بیشتر گیاه شده و چون ممکن است گیاهان تراریخته از دست بروند، جداسازی برگ برای بررسی رویداد انتقال ژن، تا زمان رسیدن گیاه به رشد کافی توصیه نمی‌گردد. از طرفی PCR مستقیم روی قطعه کوچکی از برگ پنبه و بدون انجام مراحل استخراج DNA به‌دلیل وجود سطوح بالایی از پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها در گونه‌هایی نظیر پنبه، مناسب نمی‌باشد. این ترکیبات یک ماتریکس ژلاتینی قهوه‌ای رنگ در طی آماده‌سازی به وجود می‌آورند که در هضم DNA و مراحل PCR تداخل ایجاد می‌کند، ولی برای انجام آزمون هیستوشیمیایی GUS حتی قطعه کوچکی از یک برگ نیز بدون نیاز به انجام مراحل استخراج DNA، کفایت می‌کند. بنابراین نیاز به نمونه گیاهی کمتر در ردیابی ژن‌های گزارشگر، نسبت به آنالیزهای ملکولی، یکی از مزایای این سیستم ردیابی می‌باشد. از سویی دیگر از بین رفتن تعداد زیادی از گیاهان غیرتراریخته نیز در محیط حاوی کانامایسین تا چندین ماه به طول می‌انجامد. این گیاهان به تدریج ضعیف می‌شوند. ضعف حاصل از

مقاوم نبودن با ضعف باززایی روی محیط حاوی کانامایسین که گیاهان تراریخته را نیز شامل می‌شود، قابل تشخیص نبوده و از آنجایی که حضور کانامایسین در محیط‌کشت به‌طور معنی‌داری طویل شدن ساقه و رشد گیاه را با کندی مواجه کرده (جیانگ، ۲۰۰٤) و برای القای ریشه نیز باید کانامایسین از محیط‌کشت گیاه حذف گردد، با تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی توسط آزمون GUS سنجی در مراحل اولیه باززایی می‌توان آنها را روی محیط‌کشت بدون کانامایسین قرار داده تا دچار کندی و متوقف شدن رشد نگردند. این روش غربالگری، امکان تشخیص و حذف گیاهان تراریخته‌ای را که در اثر عدم‌الحاق کامل ناحیه T-DNA ممکن است تنها ژن *nptII* را دریافت کرده و بنابراین روی محیط حاوی کانامایسین به رشد خود ادامه داده ولی فاقد ژن موردنظر می باشند نیز با منفی بودن آزمون هیستوشیمیایی GUS، فراهم می‌کند. با تشخیص زود هنگام گیاهان تراریخته احتمالی دارای ژن موردنظر، می‌توان دیگر گیاهان غیرتراریخته را در مراحل اولیه باززایی حذف نمود و حجم کار، وقت و هزینه‌ای که صرف نگهداری آنها شده تا به میزان رشد کافی جهت بررسی‌های ملکولی برسند و هزینه اضافه آنالیزهای ملکولی روی گیاهان غیرتراریخته را کاهش داد. مسلماً بررسی‌های ثانویه و دقیق‌تر اثبات حضور، الحاق و بیان ژن در ژنوم گیاه نظیر PCR، آنالیزهای لکه‌گذاری سادرن، وسترن و زیست‌سنجی در مراحل پیشرفته‌تر رشد و نسل‌های بعدی این گیاهان تراریخته مثبت اولیه، نیاز خواهد بود.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به‌خاطر در اختیار نهادن امکانات و بودجه این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1.An, G., Wastson, B.D., and Chiang, C.C. 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. Plant Physiology. 81:301-305.
2.Chawla, H.S. 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. Enfield, NH, USA. 378p.
3.Feng, R., Zhang, B.H., Zhang, W.S., and Wang, Q.L. 1998. Genotype analysis in cotton tissue culture and plant regeneration. P161-163, In: Larkin, P.J. (ed.), Proceedings of the 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Darwin 13-16 July 1998. UTC Publishing, Canberra.
4.Firoozabady, E., and DeBoer, D.L. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. 29:66–173.
5.Godwin, I., Todd, G., Ford, L., and Newbury, H.J. 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation varies according to plant species. Plant Cell Reports. 9:671-675.
6.Hamdollahzadeh, A. 1993. Characterizations of deciduous and nondeciduous race of the *Verticillium* pathogen for cotton of the North of Iran. Plant Diseases of Iran. 2:125-131.
7.Henry, R.J. 1997. Practical Applications of Plant Molecular Biology, Chapman and Hall, London. 258p.
8.Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plant: the *gus* gene fusion system. Plant Molecular report. 5:387-405.
9.Jiang, B. 2004. Optimization of *Agrobacterium* mediated cotton transformation using shoot apices and explants quantitive trait loci analysis of yield and yield component traits in upland cotton. Ph.D. thesis, Louisiana State University. 106p.
10.Leubner, G., and Meins, F. 1999. Functions and regulation of plant ß-1, 3-glucanases (PR-2). Review in: Pathogenesis-related proteins in plants. P49-76, In: Datta, SK., S. Muthukrishnan (eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
11.Norelli, J., Mills, J., and Aldwinckle, H. 1996. Leaf wounding increases efficiency of *agrobacterium*-mediated transformation of apple. Hort. Science. 36:1026-1027.

12. Rajasekaran, K., Grula, J.W., Hudspeth, R.L., Pofelis, S., and Anderson, D.M. 1996. Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. Molecular Breeding. 2:307-319.
13. Ranjan, R. 2002. Transgenic plants. Agrobios. 108p.
14. Sambrook, J., and Russel, D.W. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork, USA.
15. Sunikumar, G., and Rathore, K.S. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Molecular breeding. 8:37-52.
16. Sunikumar, G., Vijayachandra, K., and Veluthambi, K. 1999. Pre-incubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. Plant Science. 141:51-58.
17. Sussex, I.M., 1989. Developmental programming of the shoot meristem. Cell. 56: 223-230.
18. Tohidfar, M., Ghareyazie, B., and Mohammadi, M. 2003. Agrobacterium-mediated transformation of cotton using a heterologous bean chitinase gene, Journal of Science of the Universitry of Theran. 30:2.367-380.
19. Ulian, E.C., Smith, R.H., Gould, J.H., and McKnight, T.D. 1988. Transformation of plants via the shoot apex. In Vitro Cellular and Developmental Biology. 24:951-954.
20. Yao, S., 2002. Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of soybean using glufosinate as a selection agent. Ph.D. thesis, Louisiana State University. 118p.
21. Zapata, C., Park, S.H., El-Zik, K.M., and Smith, R.M. 1999. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. Theoretical Applied Genetics. 98:252-256.

J.Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(4), Oct -Nov 2007
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Design and construction of a recombinant plasmid pBI121-*Glu* in order to *Agrobacterium* mediated transformation of cotton

M. Mohsenpour[1], M. Tohidfar[2], N.A. Babaeian[3] and A.A. Habashi[2]
[1]Former M.Sc. student of Dept. of Agronomy and Plant Breeding, mazandaran University, Iran,
[2]Assistant Prof. of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran,
[3]Prof. of Dept. of Agronomy and Plant Breeding mazanaran Univ. Iran

Abstract

Beta 1, 3-glucanase gene derived from barley encodes an antifungal protein and hydrolyzes glucans which are major components of cell walls of many pathogenic fungi. This gene increases plants resistance against fungus infection. In order to transform *beta 1, 3-glucanase* gene into the cotton, at first a suitable gene cassette was designed by addition of the CaMV35S promoter and the Nos terminator to open reading frame of the *glucanase* gene in pCaMV vector. Subsequently the complete cassette of *glucanase* gene was subcloned into T_DNA region of binary vector pBI121 between *nptII* as a selective marker and *Gus* as a reporter gene. The pBI121-*Glu* recombinant plasmid was used for gene transformation via *Agrobacterium* into the cotton shoot apices. After isolation the cotton shoot apices and inoculation them by *Agrobacterium* solution, explants were transferred to selective medium containing kanamycin. The surviving and regenerated shoot apices in selective medium that were positive in histochemical assay for *Gus* gene expression were considered as putative transgenic plants. They should be cared to grow enough for carrying out further molecular analysis to confirm the integration and expression of the interest gene and transformation event.

Keyword: Cloning; Cotton; *Glucanase*; Histochemical GUS assay