دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

انتقال ژن *fld* سیانوباکتریایی به گیاه برنج به روش اگرو باکتریوم

ابراهیم قریشی[۱]، مسعود توحیدفر[۲] و مطهره محسن‌پور[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲- دانشیار، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده فن‌آوری نوین گروه بیوتکنولوژی، (نویسنده مسوول: m_Tohidfar@sbu.ac.ir)
۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی
تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱

چکیده

تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری، دمای بالا، سمیّت شیمیایی و تنش اکسیداتیو تهدیدات جدی برای کشاورزی محسوب شده و اثرات نامطلوبی بر رشد و باروری گیاهان برجا می‌گذارند. در این تحقیق به منظور انتقال ژن *fld* سیانوباکتریایی به گیاه برنج به روش اگروباکتریوم از سویه EHA105 و حامل پلاسمید p6-ubi استفاده شد. این ناقل حاوی ژن نشانگر باکتریایی مقاومت به استروپتومایسین، نشانگر گیاهی مقاومت به هیگرومایسین و ژن فلاودکسین (*fld*) است. فلاودکسین نقشی مشابه فرودکسین (fd) در گیاه ایفا کرده و هنگام وقوع تنش‌های غیرزیستی با جلوگیری از وقوع اغتشاشات و بی‌نظمی‌های موجود در چرخه انتقال الکترون و ایجاد فرم‌های فعال اکسیژن به صورت آنتی‌اکسیدان عمل کرده و تحمل گیاه را افزایش می‌دهد. در این تحقیق کالوس‌های جنین‌زای برنج رقم هاشمی که بافت هدف به‌شمارمی‌روند، در انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام مراحل تراریختی، کالوس‌های تراریخت احتمالی به محیط باززایی حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید نفتالین استیک، ۲ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین منتقل شدند. برای ریشه‌زایی نیز از محیط ریشه‌زایی حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید نفتالین استیک استفاده شد. گیاهان باززایی شده به لوله‌های حاوی محلول یوشیدا منتقل شدند. آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از پرایمرهای *fld* نشان داد که این گیاهان حداقل یک نسخه از ژن را دارا هستند. آنالیز PCR برای ژن virG نشان داد که تعدادی از گیاهان تراریخت، فاقد آلودگی اگروباکتریومی هستند. در حال حاضر گیاهان تراریخت حاصل در گلخانه برای تولید بذر نگهداری می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اگروباکتریوم، برنج تراریخت، تنش‌های غیرزنده، فلاودکسین

مقدمه

در کشاورزی مهم‌ترین عامل کاهش عملکرد، تنش‌های غیرزنده (دمای بالا، سرما، یخ‌زدگی، کمبود آب ناشی از خشکی یا شوری، شدت تابش نور خورشید، غرقاب شدن، نور ماورای بنفش و فلزات سنگین) معرفی شده است. اکثر این تنش‌های محیطی به طور مستقیم یا غیرمستقیم موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش‌پذیر شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شوند (۱۶). این‌گونه تنش‌ها دلیل اصلی و عمده کاهش محصولات زراعی در سراسر دنیا بوده و به کاهش عملکرد اکثر گیاهان مهم زراعی تا بیش از ۵۰ درصد منجر می‌شود (۴،۳). یکی از ژن‌هایی که نقش کلیدی در پاسخ به چنین تنش‌های محیطی دارد، ژن *fld* است. سیانوباکترها برای جلوگیری از نتایج نامطلوب کاهش فرودکسین، بیان انتقال‌دهنده‌های الکترونی همانند فلاودکسین (Fld) را القاء می‌کند که با عملکرد مشابه فرودکسین(Fd) در گیاه عمل می‌کنند (۸). Fldها پروتئین‌های کوچک (تقریباً ۱۹ kDa) حاوی فلاوین مونو نوکلئوتید مل‌کننده الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتز هستند که باعث رد و بدل شدن الکترون‌ها در بین مجموعه‌ای از گیرنده‌ها و پذیرنده‌ها می‌شوند. Fdها در همه موجودات زنده (از میکروارگانسیم‌ها تا حیوانات) وجود دارند، در حالی‌که Fld فقط در باکتری‌های هوازی، سیانوباکترها و جلبک‌های دریایی که از لحاظ شرایط محیطی و تغذیه‌ای در محیط‌های حاد[۱] زیست می‌کنند، یافت می‌شوند (۲۷). این پروتئین در طول تکامل جلبک‌ها به گیاهان آوندی، از ژنوم گیاه حذف شده است (۲۷). Fd که انتقال‌دهندهٔ الکترون در زنجیره انتقال فتوسنتزی در کلروپلاست گیاهان تحت کاتالیز به وسیله آنزیم FNR[۲] به شمارمی رود، باعث آزاد شدن NADPH برای تثبیت CO_2 و دیگر مسیرهای بیوسنتتیک می‌شود و نیز نقش کلیدی دیگر آن، کاهش و کنترل وضعیت احیاکنندگی شدید تحت شرایط فیزیولوژیکی و محیطی در استروما[۳] است. این پروتئین تحت تنش‌های محیطی و کمبود آهن در گیاه کاهش می‌یابد (۱۳).

برنج[۴] پس از گندم مهم‌ترین منبع غذایی انسان‌ها بوده و برای بیش از نیمی از مردم جهان غذای اصلی به شمارمی‌رود. اخیراً استفاده از شیوه پاسخ میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده مانند سیانوباکترها به تنش‌های نامطلوب محیطی در گیاه مدل توتون به موفقیت‌های جالبی در جهت بهبود تحمل تنش‌ها منجرشده است، به طوری که گیاهان تراریخت حاصل به انواع تنش‌های محیطی مانند تنش آب (کمبود یا غرق آبی)، دماهای مفرط (خیلی گرم یا سرد)، تابش UV و علف‌کش‌های چرخه ردوکس[۵] مقاومت نشان داده‌اند (۲۷). این راهکار که Fld با منشأ سیانوباکتریایی جایگزین Fd در گیاهان زراعی شود، چشم‌انداز جدیدی در بهبود گیاهان زراعی به خصوص برای مقاومت به تنش‌ها خواهد بود، زیرا یک محصول سیانوباکتریایی که وابسته به تنظیمات درونی گیاهان عالی نیست، برای بررسی نیازمندی‌های فتوسنتزی آن‌ها و هم‌چنین ایجاد گیاهان متحمل به تنش‌های مختلف[۶]

1- Extreme environment
2- Ferredoxin-NADP$^+$ reductase
3- Stroma
4- Rice. *Oriza sativa* L.
5- Redox-cycling
6- Multi-stress tolerance

موثر خواهد بود. طبق گزارش توگنتی و همکاران (۲۳) بیان Fld در کلروپلاست گیاه توتون، موجب افزایش تحمل لاین‌های تراریخت نسبت به تنش‌های غیرزیستی شد (۲۳). با توجه به این که برنج دومین مادهٔ غذایی مصرفی در ایران است، از نظر تغذیه از اهمیت بالایی برخوردار است. با این وجود، افزایش سطح آب دریای خزر و نفوذ آب دریا در اراضی ساحلی همواره این نگرانی را به وجود می‌آورد که زراعت‌های برنج در دو استان شمالی کشور یعنی مازندران و گیلان که در مجموع در حدود ۶۴٪ برنج کشور را تولید می‌کنند، تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش تولید در آن‌ها را موجب شود (۱۲). با در نظر گرفتن مسائل ذکر شده به نظر می‌رسد که به‌نژادی این گیاه برای مقاومت به شوری در این شرایط اجتناب‌ناپذیر است. هدف از این تحقیق انتقال ژن *fld* به گیاه برنج رقم هاشمی با استفاده از اگروباکتریوم است که انتظار می‌رود استفاده از این ژن کلیدی در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی نقش به‌سزایی را ایفا کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) انجام شد، از برنج رقم هاشمی، به صورت ماده گیاهی برای انتقال ژن استفاده شد. رقم هاشمی یک رقم برنج معطر است که ضمن داشتن عملکرد مناسب، کیفیت مطلوب و بازارپسندی بسیار زیاد، در محیط‌های این‌ویترو، کالوس‌زایی و باززایی بسیار خوبی دارد. بذور مورد نیاز از مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت تأمین شد.

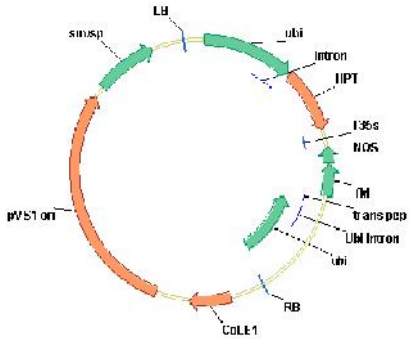
کشت بافت و به دست آوردن کالوس جنین‌زا

در این تحقیق به منظور انجام بررسی روی وضعیت کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا در رقم مورد مطالعه، بذرهای بالغ در محیط کشت N6 کشت شدند و محیط برای القای کالوس‌دهی رقم هاشمی بهینه‌سازی شد و در نهایت محیط N6 تغییریافته (۰/۲ گرم در لیتر تو، فور دی (2,4-D)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، pH ۵/۸ و ۳ گرم در لیتر فیتاژل)، برای محیط کشت بهینه انتخاب شد. بذور در یک فرایند دو مرحله‌ای به صورت سطحی ضدعفونی شدند. در مرحلهٔ اول از اتانول ۹۶٪ برای حذف آلودگی‌های قارچی به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. به دنبال آن ۳ تا ۴ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از این مرحله، برای حذف باقی‌ماندهٔ احتمالی آلودگی‌های دارای منشاء قارچی و به خصوص حذف آلودگی‌های باکتریایی، بذور در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ (محلول ۵۰٪ از مایع سفیدکنندهٔ تجارتی) ضدعفونی شدند. به منظور از بین بردن کشش سطحی آب، به ازاء هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول، یک قطره توئین ۸۰ افزوده شد و به مدت ۴۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد. پس از آن بذور بر روی کاغذ صافی خشک شدند.

بذور استریل درون پتری‌های حاوی محیط کشت N6 به صورتی کشت شدند که بذور به صورت مورب و درحالی‌که جنین آن رو به بالا باشد، قرارگیرند. پتری‌هایی که بدین ترتیب کشت شدند، تا زمان ظهور کالوس‌های جنین‌زا، در محیط کاملاً تاریک و در دمای ۱±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۵ هفته نگهداری شدند.

سازه ژنی و سویه باکتری مورد استفاده

در این پژوهش از سویه اگروباکتریوم EHA105 که حاوی پلاسمید p6-ubi بود، به منظور تلقیح ریز نمونه‌ها استفاده شد. این ناقل حاوی ژن نشانگر باکتریایی مقاومت به استروپتومایسین و نشانگر گیاهی مقاومت به هیگرومایسین و ژن فلاودکسین (*fld*) تحت پیشبر ubiquitin است (شکل ۱).



شکل ۱- سازه انتقال ژن.
Figure 1. Physical map of recombinant pBI121 containing target genes

انتقال پلاسمید به اگروباکتریوم و انجام کلونی PCR

برای انتقال پلاسمید به اگروباکتریوم از روش انجماد و ذوب استفاده شد (۱). برای اطمینان از تراریخت‌شدن کلونی‌های اگروباکتریومی که روی محیط LB انتخابی رشد کرده بودند، واکنش کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *fld* انجام شد.

رشد آگروباکتریوم

ابتدا یک کلونی از اگروباکتریوم در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استروپتومایسین واسپکتینوماسین و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین کشت شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در دستگاه شیکرانکوباتور با دور rpm ۱۸۰ قرار داده شد. پس از طی مدت زمان ۲۲–۱۸ ساعت، به منظور افزایش کارایی انتقال ژن، یک میلی‌لیتر از محلول باکتری رشد یافته، در ۵۰ میلی‌لیتر محیط انتخابی LB تازه رقیق شد و در دستگاه شیکرانکوباتور به مدت ۵–۴ ساعت قرار گرفت تا OD_{600nm} آن به ۰/۶ برسد. پس از رسیدن به OD مناسب، باکتری‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm ۳۰۰۰ رسوب داده شدند. سپس ۵۰ میلی‌لیتر محیط N6 حاوی استوسرینگون ۱۰۰ میکرومولار به آن اضافه شد تا سوسپانسیون باکتریایی برای تلقیح آماده شود.

تلقیح ریز نمونه‌ها و هم‌کشتی

کالوس‌های جنین‌زا ریزنمونه ای هستند که برای انتقال ژن با اگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفتند. کالوس‌های جنین‌زایی که ۳ روز قبل جداسازی شده و در محیط کالوس‌زایی واکشت شده بودند، پس از انتقال به ارلن و افزودن سوسپانسیون تلقیح به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکری با دور آرام قرار داده شدند. سپس کالوس‌ها به کاغذ صافی استریل انتقال داده شده و پس از خشک شدن به محیط هم‌کشتی N6A (حاوی ۰/۲ گرم بر لیتر 2,4-D، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۳ میلی‌گرم بر لیتر فیتاژل، pH ۵/۸ همراه با ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) منتقل و به مدت ۳ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند.

انتخاب و باززایی

پس از هم‌کشتی، کالوس‌ها با آب استریل حاوی سفوتاکسیم (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) چندین بار شستشو داده شدند و پس از خشک‌شدن روی کاغذ صافی به محیط N6B (حاوی ۰/۲ گرم بر لیتر 2,4-D، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۴۰۰ میلی‌گرم سفوتاکسیم، ۳ میلی‌گرم بر لیتر فیتاژل و pH ۵/۸) انتقال داده شدند و به مدت یک هفته در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. پس از یک هفته ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی N6C (حاوی ۰/۲ گرم بر لیتر 2,4-D، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲۵۰ میلی‌گرم سفوتاکسیم، ۳ میلی‌گرم بر لیتر فیتاژل، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگروماسین با pH ۵/۸) منتقل شدند. به دنبال آن پتری‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸–۶ هفته در تاریکی قرار داده شدند و هر ۲ هفته یک‌بار واکشت شدند. سپس کالوس‌هاس مقاوم به هیگرومایسین، به محیط باززایی MSA (حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط موراشیگ و اسکوگ، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، ۳ میلی‌گرم بر لیتر فیتاژل، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگروماسین، ۲ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید نفتالین استیک و pH ۵/۸) با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به روشنایی انتقال داده شد. پس از گذشت ۳ هفته و باززا شدن کالوس‌ها، گیاهچه‌های تراریخت احتمالی به محیط ریشه‌زایی MSB (حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط موراشیگ واسکوگ، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲۵۰ میلی‌گرم سفوتاکسیم، ۲ میلی‌گرم بر لیتر فیتاژل، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگروماسین، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید نفتالین استیک و pH ۵/۸) انتقال یافتند. سپس گیاهان باززا شده به لوله‌های آزمایش ۲۰ سانتی‌متری حاوی محلول یوشیدا منتقل شدند.

استخراج DNA ژنومی و آنالیز مولکولی

استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های برنج به روش دلاپورتا انجام گرفت (۷). به منظور اثبات حضور ژن، واکنش PCR[1] در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۲۵ نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ میلی‌مولار)، ۲ میکرولیتر MgCl2 (۲۵ میلی‌مولار) و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X و ۴۰ نانوگرم از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. برای اثبات حضور ژن *fld* از آغازگرهای اختصاصی طبق جدول ۱ استفاده شد. هم‌چنین جهت تست آلودگی باکتریایی از آغازگرهای اختصاصی *virG* اسفاده شد. برای هر دو ژن، واکنش در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۵۸ درجه برای ژن‌های *fld* و *virG* و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۷ دقیقه) انجام شد. در تمام مراحل PCR از ژن RG100 به عنوان کنترل داخلی و صحت واکنش PCR استفاده شد. در هر سه واکنش از نمونه آب (فاقد هر گونه DNA) و DNA گیاه شاهد، به صورت کنترل منفی و از نمونه پلاسمید که کنترل مثبت، برای تائید تراریختی گیاه استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید.

نتایج و بحث

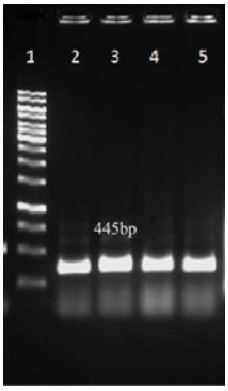
تائید انتقال ژن

به منظور تایید انتقال ژن *fld*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، برای اثبات وجود ژن *fld* در کلونی‌های تراریخت احتمالی سویه EHA105 که روی محیط کشت LB جامد انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و ریف‌آمپی‌سین رشد یافته بودند، انجام شد. در این واکنش از آغازگرهای روبه جلو و رو به عقب ژن *fld* (جدول ۱) استفاده شد. کلونی‌هایی از اگروباکتریوم که تراریختی آن‌ها از طریق حضور قطعه تکثیری ۴۴۵ جفت بازی ژن *fld* به اثبات رسید (شکل ۲)، برای استفاده در انتقال ژن به گیاه برنج، مورد استفاده قرار گرفتند.

1- Polymerase Chain Reaction

جدول ۱– آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز PCR گیاهان تراریخت احتمالی
Table 1. Used primers for PCR of putative transgenic plant

ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگر
fld	آغازگر رو به جلو	5’-CTACGGTACTCAAACTGG-3’
	آغازگر رو به عقب	5’-GCGATCGTCTGTTAAGTC-3
RG100	آغازگر رو به جلو	5’-GCTGGACGTGCCAAAGAGAG-3’
	آغازگر رو به عقب	5’-CGAACCACAGCCACAGCATG-3’
virg	آغازگر رو به جلو	5’-ATGATTGTACATCCTTCACG-3’
	آغازگر رو به عقب	5’-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG-3’

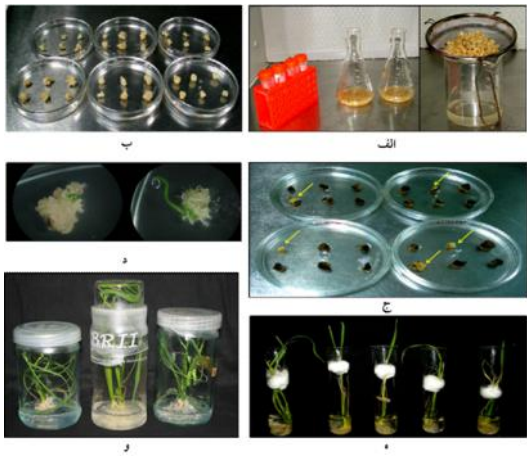


شکل ۲– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای کلونی‌های حاصل از انتقال پلاسمید p6-ubi به اگروباکتریوم سویه EHA105.
(۱) نشان‌گر اندازهٔ وزن ملکولی DNA، (۲ تا ۵) کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *fld* به منظور تایید صحت تراریختی اگروباکتریوم.
Figure 2. Polymerase change reaction for recombinant EHA105 containing p6-ubi. 1) Molecular Size Marker, 2) 2-5 Colony PCR for *fld* gene using specific primer

تولید گیاهان تراریخت و آنالیز آن‌ها

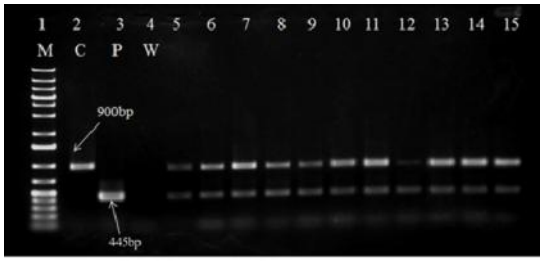
پس از آلوده‌سازی کالوس‌های جنین‌زای برنج با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید p6-ubi، در کلیه آزمایشات، نمونه‌های شاهد در محیط کشت انتخابی از بین رفتند (شکل ۳). در این تحقیق گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین پس از استخراج DNA و تایید کیفیت DNAی استخراجی با پرایمرهای اختصاصی ژن *fld* مورد آنالیز PCR قرار گرفتند.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن *fld* در شکل ۴ نشان داده شده است. در این بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای یازده گیاه تراریخت احتمالی که برای وجود داشتن یا نداشتن ژن انتقالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند به همراه گیاه غیرتراریخت، پلاسمید اولیه p6-Ubi و نیز کنترل منفی شامل آب (دارای کلیهٔ مواد مورد نیاز به جز DNA الگو) روی ژل آگارز بارگذاری شدند. هم‌زمان برای تایید شرایط PCR از آغازگر RG100 نیز استفاده شد. آغازگر RG100 نشان‌گری است که به طور اختصاصی قطعه‌ای از ژنوم برنج را تکثیر می‌کند. این آغازگر در پلاسمید، فاقد ناحیهٔ مکمل است و بنابراین باندی تولید نمی‌کند (شکل ۴) ولی در گیاه تراریخت و غیرتراریخت دارای ناحیهٔ مکمل بوده و باند ۹۰۰ جفت بازی را تولید می‌کند. از آن‌جا که دمای اتصال پرایمر به الگو برای این دو جفت پرایمر تفاوت نداشت، دمای اتصال، ۵۸ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. پرایمر *fld* قطعه‌ای به طول ۴۴۵ جفت‌باز و پرایمر RG100 قطعه‌ای به طول ۹۰۰ جفت‌باز را تکثیر نمودند. وجود باند ۴۴۵ جفت‌بازی نشان‌دهندهٔ وجود حداقل یک نسخه ژن *fld* در این گیاهان بود (شکل ۴).



شکل ۳- مراحل انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخت احتمالی.
(الف) تلقیح ریز نمونه‌ها با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید p6-Ubi، (ب) انتقال به محیط هم‌کشتی، (ج) غربال کالوس‌ها در محیط انتخابی حاوی هایگرومایسین (کالوس‌های سفید: تراریخت احتمالی و کالوس‌های سیاه: غیر تراریخت)، (د) باززایی گیاه از کالوس‌های تراریخت احتمالی، (ه) انتقال به محیط مایع یوشیدا، (و) انتقال به محیط ریشه‌زایی.

Figure 3. Stpes of gene transformation and regeneration of putative transgenic plants.a) Inoculation of explants using *Agrobacterium* containing p6u-Ubi.b) Transfer to co-culture medium, c) Screening of calli in selective medium (White callus: putative transgenic and Black callus: Non-transgenic), d) Regeneration of putative transgenic calli, e) Transfer to yoshida medium, f) Rooting medium



شکل ۴- آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *fld* و RG100 .
(۱) نشان‌گر اندازه وزن مولکولی (1Kb ladder, Fermentase)، (۲)گیاه غیرتراریخت، (۳) کنترل مثبت، پلاسمید p6-Ubi، (۴) کنترل منفی، واکنش PCR بدون DNA الگو، (۵ تا ۱۵) گیاهان تراریخت احتمالی.

Figure 4. Polymerase change reaction for RG100 and *fld* genes using specific primers. 1) Molecular Size marker, 2) Non-transgenic plant,3) Positive control, 4) Negative control, 5-15) Putative transgenic plants.

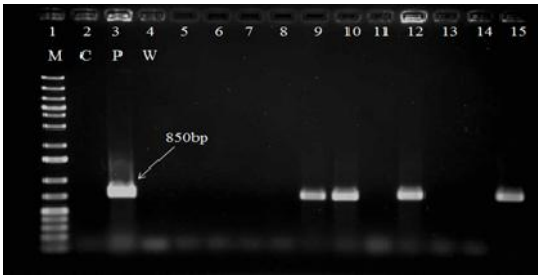
مطابق شکل ۴ نبودن باند در کنترل منفی یا واکنش PCR بدون DNA الگو، نشان‌دهنده این است که واکنش PCR عاری از آلودگی بوده است. وجود باند در نمونهٔ پلاسمید کنترل مثبت نشان‌دهندهٔ صحت مواد و آزمایش PCR است. فقدان ژن مذکور در گیاه شاهد با ظاهر نشدن باند در این نمونه تأیید شد. نمونه شاهد تنها باند ۹۰۰ جفت بازی RG100 را نشان داد، ولی باند ۴۴۵ جفت‌بازی ژن *fld* در آن مشاهده نشد. وجود باند با اندازه پلاسمید در گیاهان تراریخت، نشان‌دهندهٔ وجود حداقل یک نسخه از ژن هدف در ژنوم گیاه بود.

آنالیز گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از پرایمرهای ژن *virG* به منظور ردیابی آلودگی با اگروباکتریوم

برای اثبات نبود حضور اگروباکتریوم در ۱۱ گیاه تراریخت احتمالی که حضور ژن *fld* را با استفاده از آزمون PCR نشان داده بودند، حضور ژن *virG* نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب اختصاصی این ژن بررسی شد. شکل ۵ نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای virG را نشان می‌دهد. در این بررسی

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای یازده گیاه تراریخت احتمالی که برای تست آلودگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند، به همراه گیاه غیرتراریخت، پلاسمید استخراج شده از اگروباکتریوم EHA105 که کنترل مثبت و نیز کنترل منفی شامل آب (دارای کلیهٔ مواد مورد نیاز به جز DNA الگو) به‌شمار می‌روند، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. باند ۸۵۰ جفت بازی مربوط به *virG* در نمونه اگروباکتریوم و چهار نمونه از گیاهان مشاهده شد (شکل ۵).

ژن *virG* در پلاسمید داخلی موجود در اگروباکتریوم که فاقد ناحیهٔ T-DNA است قرار دارد و بنابراین حضور آن نشان‌دهندهٔ حضور اگروباکتریوم در نمونه‌ها بوده و در نمونه‌هایی که PCR ژن *virG* در آن‌ها مثبت می‌شود، باید مثبت‌شدن PCR برای ژن *fld* را نیز به حضور باکتری در گیاهچه‌ها نسبت داد و فرضیهٔ الحاق ناحیهٔ T-DNA حاوی ژن *fld* در مراحل انتقال ژن به ژنوم این گیاهچه‌های تراریخت احتمالی رد می‌شود. هرچند تراریختی این گیاهچه‌ها در این مرحله به طور اولیه رد می‌شود، ولی بهتر است برای از دست ندادن گیاهانی که احتمال تراریختی آن‌ها هنوز وجود دارد آن‌ها را در نسل بعدی و با آنالیزهای ملکولی پیشرفته‌تر نیز مجدداً مورد آنالیز قرار داد.



شکل ۵– آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *virG*.
(۱) نشان‌گر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb ladder ,Fermentase)، (۲) گیاه غیرتراریخت، (۳) کنترل مثبت، پلاسمید استخراج شده از اگروباکتریوم EHA105، (۴) کنترل منفی، واکنش PCR بدون DNA الگو، (۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵) گیاهان آلوده به اگروباکتریوم، (۵، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۳ و ۱۴) گیاهان تراریخت احتمالی و فاقد آلودگی به اگروباکتریوم.

Figure 5. Polymerase change reaction for *virG* gene using specific primers. 1) Molecular Size marker, 2) Non-transgenic plant,3) Positive control, 4) Negative control, 9,10,12 and 15) Putative transgenic plants which were contaminated with *Agrobacterium*, 5,6,7,8,11,13 and 14) Putative transgenic plants without *Agrobacterium* contamination.

پیشبر 35S یک پیشبر دائمی بسیار قوی است و به طور وسیعی، در ناقل‌های بیانی به منظور انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. سطح بالایی از بیان ژن در گیاهان دولپه با به کارگیری این پیشبر ایجاد می‌شود. این در حالی است که تأثیر کمتری در گیاهان تک‌لپه‌ای بـه ویژه غلات داشته است. تفاوت در رفتار آن‌ها احتمالاً به علت تفاوت در کیفیت و یا مشخصات فاکتورهای تنظیمی است (۶). در سلول‌های گیاهان تک لپه‌ای سطوح بیان با پیشبر 35S، ۱۰ تا ۱۰۰ بار کمتر از سطوح بیان در دو لپه‌ای‌ها است (۶). پیشبرها و روش‌های مختلف دیگری به منظور افزایش سطح بیان ژن‌های منتقل شده به سلول‌های تک‌لپه‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند. استفاده از پیشبرهای ژن‌های داخلی با بیان بالا در گیاهان تک‌لپه یکی از راهکارهای دست یابی به سطح بالاتری از بیان ژن در تک‌لپه‌ای‌هاست. یوبی‌کوئیتین[1] پروتئینی است که در سلول‌های یوکاریوتی یافت شده و توالی آن به میزان زیادی در موجودات مختلف حفاظت شده است. این پروتئین در فرآیندهایی چون تغییر پروتئین، کنترل چرخهٔ سلول، ترمیم DNA، پاسخ به شوک حرارتی و سایر استرس‌ها و نیز ساختار کروماتین شرکت دارد. ناحیه تنظیمی که بیان ژن Ubi-1 را در ذرت کنترل می‌کند، از نوکلئوتید ۸۹۹– نقطه شروع رونویسی در انتهای ′۵ تا نوکلئوتید ۱۰۹۲ در انتهای ′۳ نقطه شروع رونویسی ادامه دارد. طول این قطعه تقریباً ۲۰۰۰ جفت بـاز مـــی‌باشد و پیشبر مناسبی در انتقال ژن به تک‌لپه‌ای‌ها مطرح شده است (۶). در این تحقیق برای اولین بار ژن *fld* تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین به گیاه برنج رقم ایرانی منتقل شد. محصول ژن *fld* باید به کلروپلاست منتقل شود تا اثر مقاومت خود را اعمال نماید (۲۳). بنابراین ژن *fld* که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به یک سیگنال پپتیدی کلروپلاستی نیز متصل شده است تا پس از الحاق ژن در هسته، محصول پروتئینی آن را به کلروپلاست هدایت کند (شکل ۱).

در این تحقیق نمونه‌های تراریختی که ژن مقاومت را دریافت کرده بودند، در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین شاخه‌زایی و ریشه‌زایی طبیعی از خود نشان دادند، در حالی‌که گیاه شاهد در این محیط از بین رفت. کشت بافت غلات، انواع مختلفی از کالوس را تولید می‌کند که ممکن است از نظر پتانسیل باززایی با هم متفاوت باشند و پاسخ کالوس و باززایی گیاه بستگی به نوع ژنوتیپ دارد (۲). در این تحقیق رقم هاشمی کالوس‌دهی و باززایی مناسبی را در محیط‌های به کار رفته، از خود نشان داد.

سویهٔ EHA105 یک سویه اگروباکتریومی غیرتومورزا است که از سویه A281 اشتقاق یافته است و ناقلی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان معرفی شده است (۵) و راندمان بالای انتقال ژن آن به ناحیه ژن‌های *vir* پلاسمید

1- Ubiquitin

Ti (pTiBo542) در آن مربوط می‌شود (۱۵،۹). گیاهانی که در نتیجه تلقیح با اگروباکتریوم دارای پلاسمید حاوی ژن *fld* در محیط کشت انتخابی رشد کرده بودند و واکنش PCR در مرحله اول نیز حضور ژن *fld* را در یازده مورد از آن‌ها تایید کرده بود، برای اطمینان بیشتر برای ارزیابی حضور اگروباکتریوم از طریق آغازگرهای اختصاصی ژن *vir*G نیز مورد سنجش قرار گرفتند و آلودگی ناشی از اگروباکتریوم در چهار نمونه DNAی استخراجی مشاهده گردید. این امر بیان‌گر آن است که با وجود آن‌که ریزنمونه‌ها بعد از هم‌کشتی به محیط کشت باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، برای جلوگیری از رشد بیش از اندازه باکتری، منتقل شدند، اگروباکتریوم به طور کامل حذف نشده است و دلیل آن را می‌توان به این موضوع نسبت داد که آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بیشتر از رشد باکتری جلوگیری می‌کند تا این‌که باکتری را از بین ببرد (۱۹).

با وجود آن‌که انتقال ژن به روش بمباران ذره‌ای روشی موفق برای انتقال ژن به تک‌لپه‌ای‌ها بوده و بدون وجود هرگونه محدودیت بیولوژیکی یا محدودیت میزبانی، به طور رایج، برای تولید مفید ژرم پلاسم تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰،۱۴)، اما به علت ورود چندین نسخه از ژن خارجی و گرایش بالا برای خاموشی ژن، کارایی کم انتقال ژن را به همراه دارد (۱۸). در مقابل، استفاده از روش انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم مزایای متعددی از جمله، توانایی انتقال و الحاق قطعه DNA با بازآرایی کمتر درون ژنوم میزبان، ورود تعداد نسخه‌های کمتر و پایدار ژن خارجی، نبود حضور توالی‌های بدنه ناقل و نیز هزینه کمتر آزمایشات را در پی خواهد داشت. تاکنون اگروباکتریوم با موفقیت برای تراریختی ارقام مختلف برنج مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱،۱۱،۱۰). در این تحقیق نیز به دلیل مزایای فوق از روش اگروباکتریوم برای تراریختی رقم هاشمی با ژن *fld* استفاده شد. به هر حال فاکتورهایی مانند ژنوتیپ، سویه اگروباکتریوم، ریزنمونه، ناقل دوگانه، نشان‌گر انتخابی، پیش‌بر، شرایط و محیط‌های تلقیح و هم‌کشتی، تیمارهای اسمزی، غلظت اگروباکتریوم، کشت بافت و محیط باززایی ممکن است بر سودمندی انتقال ژن و بهبود پایداری سلول‌های گیاهی، پس از آلوده‌سازی با اگروباکتریوم تاثیر بگذارند (۲۴).

ایجاد صفت تحمل به شوری و خشکی در گیاهان همیشه مورد توجه محققین بوده است. یو و همکاران (۲۰۱۳) با انتقال ژن EDT1/HDG11 به گیاه برنج تحمل به خشکی و عملکرد دانه را افزایش دادند (۲۶). شرکت مونسانتو با انتقال ژن تولیدکننده پروئین شوک سرمایی B (CSPB) به گیاه ذرت، گیاه تراریخت MON 87460 را تولید نمودند که متحمل به خشکی است (۲۵،۲۲،۱۷). این گیاه اولین گیاه تراریخت دارای تحمل به استرس‌های غیرزنده است که تجاری سازی شده است.

در این تحقیق ۷ گیاه پس از مراحل انتقال ژن حاصل شد که حضور ژن *fld* و حضور نداشتن باکتری را نشان می‌دادند. آنالیزهای بیشتری برای اثبات حضور، تعداد کپی و بیان ژن وارد شده به این گیاهان تراریخت احتمالی برنج و نیز آزمایشات زیست‌سنجی برای اثبات مقاومت به تنش‌های زیستی و در نهایت آنالیز نسل‌های تراریخت برای اثبات پایداری ژن در آینده مورد نیاز خواهد بود. مقایسه مورفولوژی گیاهان تراریخت با گیاهان نرمال و نیز آزمایشات ایمنی‌زیستی از جمله مطالعات حساسیت‌زایی، سمیّت‌زایی، مقایسات پروتئوم و متابولوم گیاهان دستورزی شده با گیاهان شاهد و برهم‌کنش پروتئین حاصل از انتقال ژن *fld* با سایر پروتئین‌ها به منظور بررسی نبود ایجاد ترکیبات ناخواسته و مضر نیاز به بررسی دارد. آزمون فرار دانهٔ گرده از آزمایشات مهم در ایمنی‌زیستی محسوب شده که با وجود خودگشن بودن گیاه برنج، فرار دانهٔ گرده از جمله نگرانی‌های ایمنی‌زیستی این گیاه نخواهد بود. بررسی اثرات روی محیط زیست، ناحیهٔ ریزوسفر و حشرات مفید نیز ایمنی محصول تراریخت جدید را برای محیط زیست به همراه خواهد داشت. امید است تحقیق حاضر مقدمه‌ای باشد برای دستیابی به یک برنج ایرانی محلی نسبتاً پرطرفدار (رقم هاشمی) به طوری که صفت مقاومت به شوری، خشکی و دیگر تنش‌های محیطی را نیز به همراه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. An, G., B.D. Wastson and C.C. Chiang 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. Plant Physiology, 81: 301-305.
2. Baskaran, P., B.R. Rajeswari and N. Jayabalan. 2005. A simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench for crop improvement. Journal of Agricultural Technology, 1: 179-192.
3. Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. Science, 218: 443-448.
4. Bray, E.A., J. Bailey-serres and E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA 1158-1249.
5. Cervera, M., M. Lopez, M. Navarro and L. Pena 1998b. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. Physiological and Molecular Plant Pathology, 52: 67-78.
6. Christensen, A.H. and P.H. Quail. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. Transgenic Research, 5: 213-218.
7. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks 1983. A plant DNA mini preparation, version II. Plant Molcular Biology Report, 1: 19-21.
8. Falk, S., G. Samson, D. Bruce, N.P.A. Huner and D.E. Laudenbach. 1995. Functional analysis of the iron-stress induced CP 43' polypeptide of PS II in the *Cyanobacterium synechococcus sp.* PCC 7942. Photosynthesis Research, 45: 51-60.
9. Ghorbel, R., C. Lopez, C. Fagoaga, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Pena. 2001. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus *p*23 protein exhibit viral like symptoms. Molecular Plant Pathology, 2: 27-36.
10. Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal, 6: 271-282.
11. Ishizaki, T. and T. Kumashiro. 2008. Genetic transformation of NERICA, interspecific hybrid rice between Oryza glaberrima and O, sativa, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Report, 27: 319-327.
12. Kavusi, M. 1994. Determine the appropriate model for predicting the performance of different rice varieties under salt Sepeedrud, Hassansaraii and khazar. Dissertation, University of Tbriz, Iran (In Persian).
13. Kramer, D.M., G. Johnson, O. Kiirats and G.E. Edwards. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. Photosynth Research, 79: 209-218.
14. Li, D., J. Gao, C. Shen, Z. Fang, Y. Xia, L. Yuan and M. Cao. 2013. Production of Green Fluorescent Protein in Transgenic Rice Seeds. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 13: 2045-2050.
15. Li, Z., S. Jayasankar and D.J. Gray. 2004. Bi-directional duplex promoters with duplicated enhancers significantly increase transgene expression in grape and tobacco. Transgenic Research, 13: 143-154.
16. Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Science, 9: 490-498.
17. Monsanto Company. 2009. Petition for the determination of non-regulated status for MON 87460. www.aphis.usda.gov/biotechnology/not_reg.html (accessed 23 May 2013).
18. Montemurro, C., W. Sabatta, H.H. Stinbiss, A. Soltesz, A. Blanco and C. Crosatti. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation in durum wheat. Poster Abstract-E.09.
19. Pena, L., M. Cervera, C. Fagoaga, J. Romero, A. Ballester, N. Soler, E. Pons, A. Rodrguez, J. Peris, J. Juarez and L. Navarro. 2010. Compendium of Transgenic Crop Plants, Volume 5: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts: Citrus fruit.
20. Rakszegi, M., S. Tamas, P. Szucs, L. Tamas and Z. Bedo. 2001. Current status of wheat transformation. Plant Biotechnology, 3: 67-81.
21. Saika1, S., S. Nonaka, K. Osakabe and S. Toki1. 2012. Sequential Monitoring of Transgene Expression Following Agrobacterium-Mediated Transformation of Rice. Plant and Cell Physiology, 53: 1974-1983.
22. Sammons, B., J. Whitsel, L.G. Stork, W. Reeves and M. Horak. 2014. Characterization of drought-tolerant maize MON 87460 for use in environmental risk assessment. Crop Science, 54: 719-729.
23. Tognetti, V.B., J.F. Palatnik, M.F. Fillat, M. Melzer, M.R. Hajirezaei, E.M. Valle and N. Carrillo. 2006. Functional replacement of ferredoxin by a *Cyanobacterial flavodoxin* in tobacco confers Broad-Range stress Tolerance. The plant cell, 18: 2035-2050.
24. Tohidfar, M. and M. Mohsenpour. 2010. Effective factors in Cotton (*Gossipium spp*) Transformation Using *Agrobacterium*. Journal of Agricultural biotechnology, 2: 1-24 (In Persian).
25. USDA-APHIS. 2011. Final environmental assessment for MON 87460 corn. USDA-APHIS-Animal and Plant Health Inspection Service. www.aphis.usda.gov/biotechnology/not_ reg.html (accessed 23 May 2013).
26. Yu, L., X. Chen , Z. Wang, S. Wang, Y. Wang, Q. Zhu, S. Li and C. Xiang. 2013. Arabidopsis enhanced drought tolerance1/homeodomain glabrous11 confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty. Plant Physiology, 162: 1378-1391.
27. Zurbriggen, M., V.B. Tognetti, E.M. Valle and N. Carrillo. 2007. Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms: The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. IUBMB Life, 59: 355-360.

Agrobacterium-Mediated Transformation of Rice using Cyanobacteria *fld* Gene

Ebrahim Ghoreyshi[1], Masoud Tohidfar[2] and Motahhareh Mohsenpour[3]

1- Graduated M.Sc., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran
2- Associate Professor, Shahid Beheshti University, New Technology Faculty of Biotechnology Department
(Corresponding author: m_Tohidfar@sbu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, the Research, Agricultural Extension and Education
Received: April 23, 2014 Accepted: July 23, 2014

Abstract

Abiotic stresses such as drought, salt, high temperature, chemical toxicity and oxidative stress are considered serious to agriculture and adversely affect the growth and reproduction of crops. Production of transgenic rice was studied utilizing *Agrobacterium*-mediated strain EHA105 and p6-ubi vector. This vector contains spectinomycin resistance gene as bacterial selectable marker, hygromycin resistance gene as plant selectable marker and flavodoxin (*fld*) gene. Flavodoxin has similar role to ferredoxin function and during abiotic stress acts as an antioxidant by preventing conflicts in the electron transport chain and forms reactive oxygen species. In this study embryogenic calli of rice Hashemi cultivar were used for gene transformation. Putative transgenic calli were transferred to regeneration medium containing 0.2 mgl^{-1} NAA, 2 mgl^{-1} kinitin and 50 mgl^{-1} hygromycin. For rooting 0.2 mgl^{-1} NAA was used in rooting medium. Regenerated plants were placed in yoshida solution. PCR analysis using *fld* specific primers showed at least one copy of *fld* gene in putative transgenic plants genome. The results of PCR related to *virG* gene confirmed lack of bacterial contamination. Transgenic plants developed during the course of this study are currently being grown in greenhouse for seed production.

Keywords: Abiotic stress, *Agrobacterium*, Flavodoxin, Transgenic rice