

طراحی و ساخت ناقل بیانی گیاهی واجد ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین

علی سعیدپور¹، سدابه جهانبخش^{2*}، ته‌مین لهراسی³، کسری اصفهانی³، علی هاتف سلمانیان⁴، خدیجه رضوی⁵

1. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

2. دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

3. استادیار گروه زیست‌فراورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

4. استاد گروه زیست‌فراورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

5. استادیار گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/8/1 - تاریخ پذیرش: 1398/12/13)

Designing and construction of a plant expression vector containing the hygromycin antibiotic resistance marker gene

Ali Saeedpour¹, Soodabeh Jahanbakhsh^{2*}, Tahmineh Lohrasebi³, Kasra Esfahani³,

Ali Hatf Salmanian⁴, Khadijeh Razavi⁵

1. Ph.D. Student, Faculty of Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Associate Professor, Faculty of Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Plant Bioproducts, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

4. Professor, Department of Plant Bioproducts, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

(Received: 22 Nov. 2019 - Accepted: 8 Mar. 2020)

Abstract

Conventional pBI121-based binary vectors are widely used in transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium* but they are useless in transformation of some monocots because of inefficiency of kanamycin in selection, while, hygromycin resistance gene is an important selectable marker that usually used in transformation of several plants, especially monocots. The aim of this study was to improve the pBI121 vector for transformation of monocot plants. For this purpose, the hygromycin resistance gene with the 35S terminator were isolated from p6-ubi-mai plasmid and cloned into pBlueScript intermediate vector via *SmaI* and *NorI* restriction enzyme digestion. The CaMV 35 promoter was isolated from pBI121 vector by using *SmaI* and *HindIII* enzymes and cloned upstream of the gene. By using *HindIII* and *Eco53KI* enzymes, the complete hygromycin resistance gene cassette was replaced the kanamycin resistance gene cassette (which digested by *HindIII* and *MssI*) of pBI121 vector. Construction of this vector was confirmed by PCR method, digestion pattern analysis, and sequencing. Due to the popularity of pBI121-based vectors than other binary vectors and the researchers' familiarity with their manipulation, the vector which is introduced in this study could be used in gene transfer studies of monocot plants.

Keywords: *Agrobacterium*, Monocots, Hygromycin, pBI121, Binary Vector.

چکیده

ناقلین دوتایی مرسوم مبتنی بر pBI121 که هنوز به طور گسترده‌ای در انتقال ژن به گیاه به‌وسیله آگروباکتریوم استفاده می‌شوند، به‌علت عدم کارایی گزینش‌گر کانامایسین، در برخی از گیاهان تک‌لپه‌ای قابل استفاده نیستند در حالی که مقاومت به هیگرومایسین یک نشانگر گزینشی پرکاربرد و مهم در تراریختی برخی گیاهان به‌ویژه تک‌لپه‌ای‌ها به شمار می‌رود. از این رو در مطالعه حاضر، بهبود ناقل pBI121 برای تراریختی گیاهان تک‌لپه‌ای مورد نظر قرار گرفت. به این منظور، ژن مقاومت به هیگرومایسین به همراه خاتمه‌دهنده 35S از پلاسمید p6-ubi-mai به‌وسیله آنزیم‌های برشی *SmaI* و *NorI* جداسازی و در ناقل حدواسط pBlueScript همسانه‌سازی شد. در ادامه، با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI* پیش‌بر 35S CaMV از بدنه حامل pBI121 جداسازی و در بالادست این ژن در ناقل pBlueScript قرار داده شد. با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *Eco53KI* کاست کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین جایگزین کاست ژن مقاومت به کانامایسین (که با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *MssI* حذف شده بود) در ناقل pBI121 شد. صحت ساخت ناقل جدید توسط روش PCR، بررسی الگوی هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. با توجه به محبوبیت سری ناقلین مبتنی بر pBI121 نسبت به سایر ناقلین موجود و آشنایی محققین با نحوه دست‌ورزی آنها، کارایی ناقل معرفی شده در این مطالعه می‌تواند در پژوهش‌های انتقال ژن به گیاهان تک‌لپه مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، تک‌لپه، هیگرومایسین، pBI121، ناقل دوتایی.

مقدمه

در روش‌های مختلف انتقال ژن، فرایندهای گوناگونی از جمله انتقال ناقل واجد ژن مورد نظر به داخل سلول‌های زنده گیاهی، شناسایی و گزینش سلول‌های تراریخت و باززایی و ایجاد گیاه کامل از سلول‌های تراریخته انجام می‌شود (Miki and McHugh, 2004). در این مسیر، تنها تعداد محدودی از سلول‌ها تراریخته می‌شوند بنابراین جداسازی و باززایی رخدادهای تراریخت به یک سیستم گزینش مناسب نیاز دارد. ژن‌های نشان‌گر گزینش‌گر برای توسعه فناوری تراریختی گیاهان ضروری هستند چون که به محققان امکان شناسایی، جداسازی و ارزیابی سلول‌ها و نتاج تراریخته را از گیاهان غیر تراریخت می‌دهند. از آنجایی که انتقال اکثر ژن‌های خارجی به گیاه بلافاصله باعث ایجاد یک صفت قابل بررسی نمی‌شود از ژن‌های گزینش‌گر برای غربال‌گری سلول‌های تراریخته استفاده می‌شود. رشد سلول‌های عادی به وسیله غلظت‌های پایین ترکیبات سمی، به عنوان عامل گزینش، مختل شده درحالی که این ترکیبات سمی بر روی سلول‌های تراریخت واجد ژن‌های گزینش‌گر مقاومت اثری ندارند (Roa-Rodriguez, 2003). عوامل گزینش‌گر مختلفی تاکنون گزارش شده‌اند اما فقط تعداد محدودی از آن‌ها کاربرد عملی پیدا کرده‌اند که از این بین می‌توان به آمپی‌سیلین، کانامایسین، هیگرومایسین و علف‌کش فسفینوتریسن اشاره کرد. سایر عوامل گزینش‌گر یا دارای محدودیت خاصی هستند یا این که بر روی گونه‌های متنوع گیاهی بررسی نشده‌اند (Breyer et al., 2014). از بین تمامی عوامل گزینش‌گر ذکر شده، 90٪ ناقلین انتقال ژن گیاهی، واجد ژن‌های مقاومت به کانامایسین، هیگرومایسین یا علف‌کش فسفینوتریسن هستند (Miki and McHugh, 2004; Scheid, 2004). نتومایسین

3- فسفوترانسفراز¹ (NPTII) یک نشان‌گر گزینش‌گر است که به طور گسترده برای غربال‌گری گیاهان تراریخت استفاده می‌شود (Low et al., 2018). این آنزیم به وسیله ژن *nptII* (یا *neo*) رمز می‌شود که از ترنسپوزون Tn5 گرفته شده است و تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، مانند کانامایسین و نتومایسین را غیرفعال می‌کند. برای غربال‌گری گیاهان تراریخت، کانامایسین اغلب به عنوان عامل گزینش‌گر در دامنه غلظتی چند ده تا صد میلی‌گرم بر لیتر استفاده می‌شود. اگرچه مقاومت به کانامایسین، یک نشان‌گر بسیار مفید برای دامنه متنوعی از گونه‌های گیاهی است و طی دو دهه گذشته تحقیقات گسترده‌ای بر روی تراریختی غلات با استفاده از این آنتی‌بیوتیک انجام شده است (Rastogi et al., 2018) اما برای برخی گونه‌ها، کانامایسین به عنوان یک عامل گزینش‌گر، غیرموثر است (Shrawat et al., 2018) چون تعدادی از گیاهان تک‌لپه‌ای از جمله گیاه جو به طور طبیعی به غلظت‌های مختلف کانامایسین مقاوم هستند (Glick, 2018). هیگرومایسین B یک آنتی‌بیوتیک است که سنتز پروتئین را مختل می‌کند. ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز از باکتری *اشریشیا کلی* گرفته شده و برای بیان در گیاه بهینه شده است و به عنوان ژن مقاومت خصوصاً در غلات دارای کاربرد گسترده‌ای است. هیگرومایسین بسیار سمی‌تر از کانامایسین بوده و سلول‌های حساس را بسیار سریعتر می‌کشد (Stanišić et al., 2018). در این مطالعه طراحی و ساخت یک ناقل واجد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای تراریختی گیاهان تک‌لپه‌ای صورت گرفت تا پس از معرفی و تأیید کارایی آن، توسط محققان بیوتکنولوژی گیاهی برای مهندسی ژنتیک غلات، خصوصاً جو استفاده شود.

1. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')-II)

و بالادست ژن هیگرومایسین در ناقل pBlueScript همسانه‌سازی شد. براساس توالی ژنی pBI121، پیش‌برش 35S با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI* برش داده شد و پس از الکتروفورز بر روی ژل 1% آگاروز، باند موردنظر (پیش‌بر 35S) از ژل تخلیص شد. همزمان ناقل حدواسط pBlueScript حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین و پایان‌دهنده 35S نیز با دو آنزیم *HindIII* و *SmaI* برش داده شد و پیش‌بر 35S (تخلیص‌شده از ژل) در آن همسانه‌سازی شد (شکل 3).

انتقال کاست کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین به ناقل pBI121

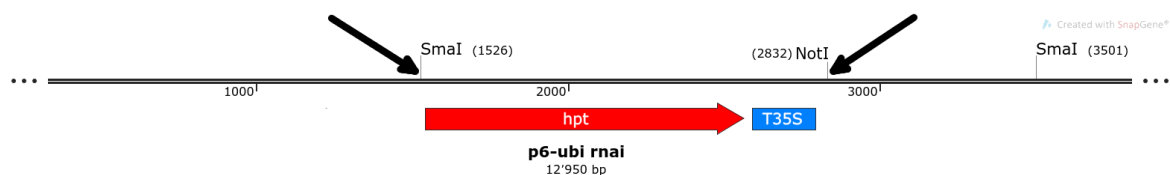
ابتدا ناقل pBlueScript حاوی سازه کامل ژن هیگرومایسین به‌وسیله آنزیم‌های *HindIII* و *Eco53KI* برش داده شد و پس از الکتروفورز محصول هضم، باند موردنظر از روی ژل خالص سازی شد. همزمان ناقل pBI121 نیز با آنزیم‌های *HindIII* و *MssI* برش داده شد و بر روی ژل الکتروفورز شد و قطعه موردنظر (بدنه ناقل) از روی ژل جداسازی شد. در نهایت سازه کامل هیگرومایسین در ناقل pBI121 به‌جای کاست ژن گزینش‌گر کانامایسین همسانه‌سازی شد (شکل 4). صحت ساخت ناقل جدید با استفاده از روش PCR، بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد.

مواد و روش‌ها

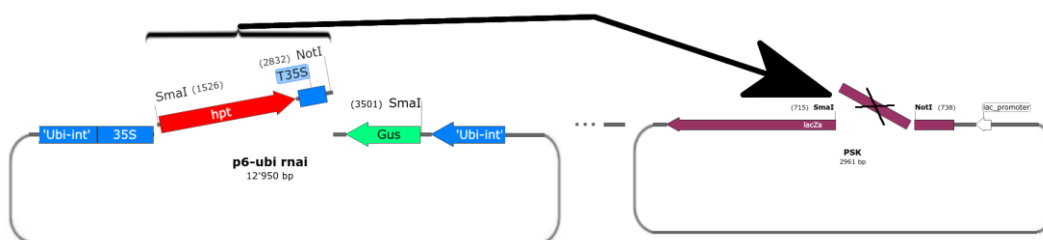
ساخت کاست واجد پیش‌بر، ژن هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده

ناقل p6-ubi-rnai تغییریافته، اهدایی آقای دکتر مسعود توحیدفر (دانشگاه شهید بهشتی، تهران)، برای جداسازی ژن هیگرومایسین استفاده شد. در این ناقل ژن هیگرومایسین به‌همراه پایان‌دهنده 35S بین جایگاه‌های برشی *SmaI* و *NotI* قرار گرفته است (شکل 1). ناقل به‌وسیله آنزیم‌های برش *SmaI* و *NotI* برش داده شد و محصول هضم آنزیمی که شامل قطعات متعددی بود بر روی ژل آگاروز 1% بررسی و مشاهده شد. سپس قطعه موردنظر (1306 جفت‌بازی) به‌وسیله کیت *PCR Product Purification* شرکت Roche تخلیص و برای مراحل بعدی همسانه‌سازی استفاده شد. ناقل حدواسط pBlueScript نیز با آنزیم‌های *SmaI* و *NotI* برش داده شد و سپس قطعه 1306 جفت‌بازی (ژن مقاومت به هیگرومایسین به‌همراه خاتمه‌دهنده 35S) با استفاده از آنزیم لیگاز شرکت *Thermo Fisher Scientific* در این ناقل همسانه‌سازی شد (شکل 2). برای تأیید همسانه‌سازی، ناقل حدواسط pBlueScript حاوی ژن مقاومت هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده 35S با استفاده از آنزیم‌های *SmaI* و *NotI* برش داده شد و بر روی ژل آگاروز 1% مشاهده شد.

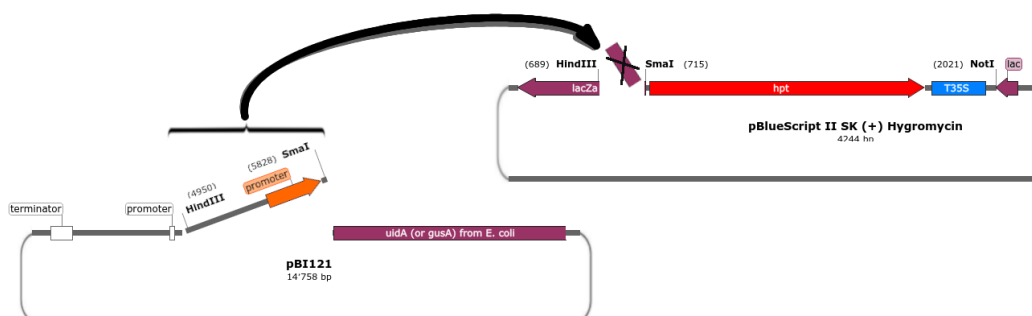
از آنجایی که قطعه همسانه‌شده فاقد پیش‌بر است برای ساخت کاست کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین، پیش‌بر 35S از ناقل pBI121 جداسازی



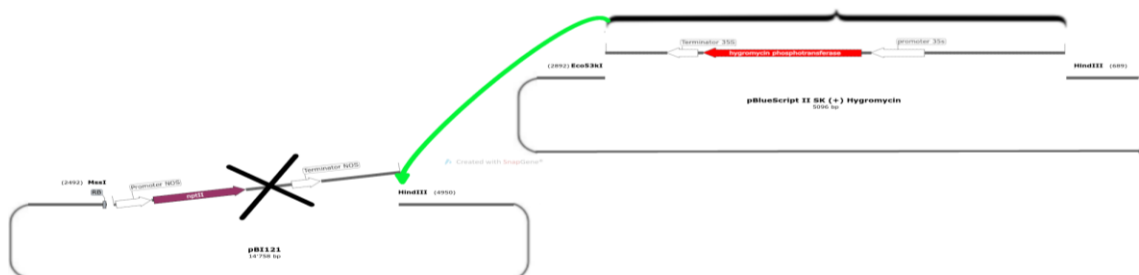
شکل 1. نقشه شماتیک مربوط به ژن هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده 35S در ناقل p6-ubi-rnai



شکل 2. نقشه شماتیک مربوط به انتقال ژن مقاومت به هیگرومایسین به همراه خاتمه‌دهنده 35S به ناقل حدواسط pBlueScript



شکل 3. نقشه شماتیک مربوط به انتقال پیش‌بر 35S به ناقل حدواسط pBlueScript حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین به همراه خاتمه‌دهنده 35S



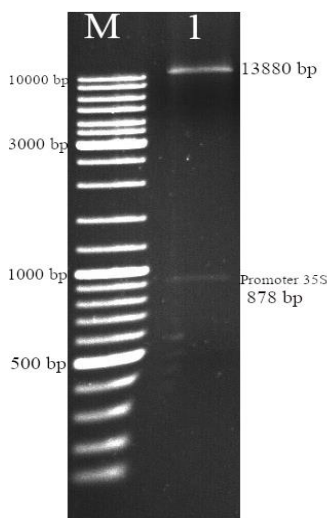
شکل 4. نقشه شماتیک مربوط به انتقال سازه کامل ژن هیگرومایسین به ناقل pBI121 و ساخت ناقل pBI121^{hygR}

قطعه 1306 جفت‌بازی (ژن مقاومت به هیگرومایسین و پایان‌دهنده 35S) در داخل ناقل حدواسط pBlueScript، هضم آنزیمی مجدد این ناقل (با استفاده از آنزیم‌های *SmaI* و *NotI*)، درج قطعه موردنظر را تأیید کردند (شکل 6). برای افزودن پیش‌بر 35S به مجموعه ژن مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده 35S، ناقل pBI121 با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI* برش داده شد و پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز یک درصد باند 878 جفت‌بازی (پیش‌بر 35S) از روی ژل تخلیص شد (شکل 7) و سپس در بالا دست ژن مقاومت به هیگرومایسین در ناقل pBlueScript همسانه‌سازی شد. برای تأیید درج پیش‌بر 35S در بالادست ژن مقاومت به هیگرومایسین در ناقل

نتایج و بحث

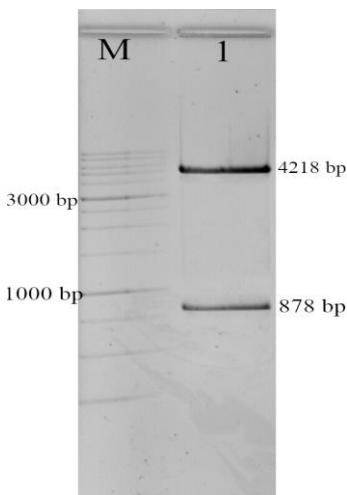
ساخت کاست واجد پیش‌بر، ژن هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده

بر اثر هضم p6-ubi-rnai با آنزیم‌های *SmaI* و *NotI* تعداد شش قطعه ایجاد شد، که قطعات 1306 جفت‌بازی (حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین) و قطعه 1290 بازی در ژل آگاروز در مجاورت هم قرار گرفتند و در هنگام تخلیص این دو قطعه با همدیگر تخلیص شدند (شکل 5). به علت وجود جایگاه‌های حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* در دو انتهای قطعه 1290 جفت‌بازی، امکان همسانه‌سازی آن در داخل ناقل حدواسط pBlueScript برش یافته با *SmaI* و *NotI* وجود نخواهد داشت. پس از همسانه‌سازی



شکل 7. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI*.

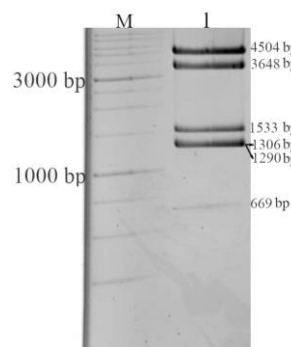
1: هضم آنزیمی ناقل pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI*؛ دو قطعه 878 جفت‌بازی (پیش‌بر 35S) و 13880 جفت‌بازی (بدنه ناقل pBI121) مشاهده شد که قطعه اول به‌عنوان پیش‌بر کاست ژن مقاومت به هیگرومیسین استفاده شد. M: نشان‌گر وزن مولکولی Ladder Mix (شرکت *Thermo Fisher Scientific*).



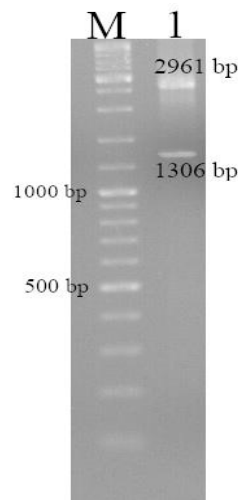
شکل 8. تأیید درج پیش‌بر 35S در بالا دست ژن مقاومت به هیگرومیسین در ناقل pBlueScript

1: هضم ناقل حدواسط pBlueScript حاوی کاست کامل ژن مقاومت به هیگرومیسین به‌وسیله آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI*؛ دو قطعه 4218 جفت‌بازی (بدنه ناقل به‌همراه ژن مقاومت به هیگرومیسین و خاتمه‌دهنده 35S) و 878 جفت‌بازی (پیش‌بر 35S) مشاهده شد. M: نشان‌گر وزن مولکولی 1kb (شرکت *Thermo Fisher Scientific*).

pBlueScript این ناقل به‌وسیله آنزیم‌های *HindIII* و *SmaI* برش داده شد. نتایج هضم درج پیش‌بر 35S در بالادست ژن مقاومت به هیگرومیسین در ناقل pBlueScript را تأیید کرد (شکل 8).



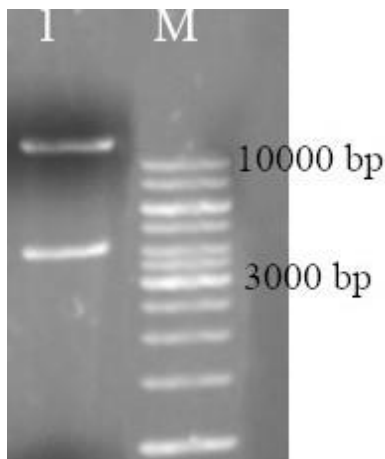
شکل 5. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل p6-ubi-rnai واجد ژن مقاومت به هیگرومیسین با آنزیم‌های *NotI* و *SmaI*: نشان‌گر وزن مولکولی 1kb (شرکت *Thermo Fisher Scientific*). 1: در اثر هضم آنزیمی 6 قطعه 4505 می‌شود که در هنگام الکتروفورز دو قطعه 1290 و 1306 جفت‌بازی ایجاد جفت‌بازی بر روی هم قرار گرفته و به‌صورت یک باند مشاهده می‌شود.



شکل 6. تأیید درج ژن هیگرومیسین به‌همراه خاتمه‌دهنده 35S در ناقل حدواسط pBlueScript

1: هضم ناقل pBlueScript حاوی ژن مقاومت به هیگرومیسین به‌همراه خاتمه‌دهنده با آنزیم‌های *NotI* و *SmaI*؛ دو قطعه 2961 جفت‌بازی (بدنه ناقل pBlueScript) و 1306 جفت‌بازی (ژن مقاومت به هیگرومیسین به‌همراه خاتمه‌دهنده 35S) بر روی ژل مشاهده شد. M: نشان‌گر وزن مولکولی Ladder Mix (شرکت *Thermo Fisher Scientific*)

از آنجایی که در داخل توالی هیگرومایسین و همچنین بر روی بدنه ناقل pBI121 جایگاه برشی آنزیم *EcoRI* وجود دارد برای تأیید درج سازه کامل هیگرومایسین در ناقل pBI121، این ناقل با آنزیم *EcoRI* برش داده شد و محصول هضم بر روی ژل مشاهده شد. در صورتی که سازه کامل در ناقل pBI121 درج شده باشد با این برش باید دو قطعه با اندازه‌های 10330 و 4169 مشاهده شود در حالی که برش ناقل pBI121 تنها یک قطعه ایجاد می‌نماید. بررسی نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی، درج کاست کامل هیگرومایسین در ناقل pBI121 را تأیید کرد (شکل 10). سازه حاصل $pBI121^{hygR}$ نام‌گذاری شد (شکل 11). بخشی از گزینش‌گر مقاومت به هیگرومایسین در ناقل $pBI121^{hygR}$ توالی‌یابی شد و نتیجه توالی‌یابی با توالی هیگرومایسین در ناقل p6- ubi-rnai با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.6.1 هم‌ردیف شد (شکل 12). نتایج هم‌ردیفی درج صحیح سازه کامل هیگرومایسین را تأیید کرد.

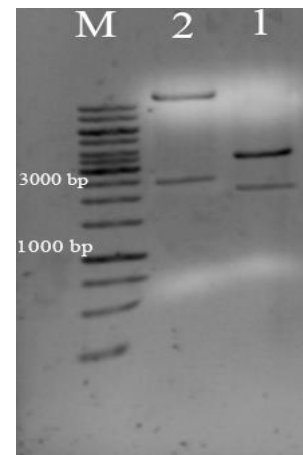


شکل 10. تأیید آنزیمی درج سازه کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین در ناقل pBI121.

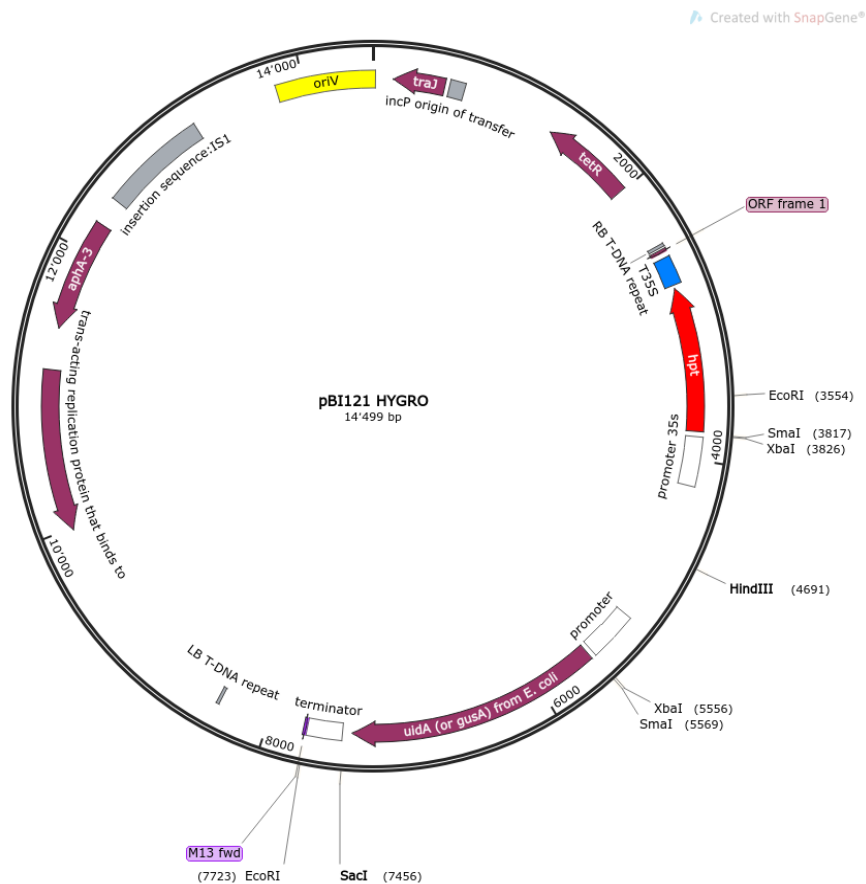
1: هضم آنزیمی ناقل pBI121 حاوه سازه کامل هیگرومایسین به وسیله آنزیم *EcoRI*؛ دو قطعه 10330 (بدنه ناقل pBI121) و 4169 (قسمتی از کاست هیگرومایسین به همراه کاست ژن گزارش‌گر) مشاهده شد. M: نشان‌گر وزن مولکولی 1kb (شرکت Thermo Fisher Scientific).

انتقال کاست کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین به ناقل pBI121

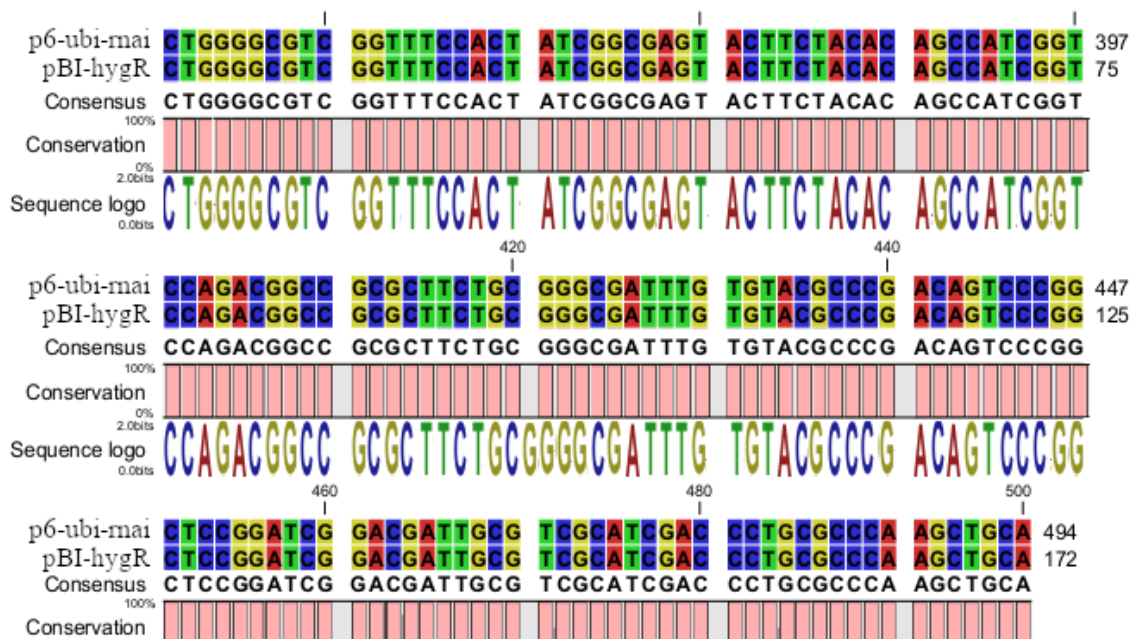
با برش ناقل pBlueScript حاوی سازه کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین به وسیله آنزیم‌های *HindIII* و *Eco53KI* باند 2203 جفت‌بازی (حاوی پیش‌بر 35S، ژن مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده 35S) از روی ژل جداسازی شد (شکل 9-1). ناقل pBI121 نیز با آنزیم‌های *HindIII* و *MssI* برش داده شد و الکتروفورز انجام شد. با برش ناقل pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *MssI*، دو قطعه 12300 جفت‌بازی (بدنه ناقل pBI121) و 2458 جفت‌بازی (حاوی پیش‌بر NOS، ژن گزینش‌گر کانامایسین و خاتمه‌دهنده NOS) ایجاد شد (شکل 9-2) که باند 12300 جفت‌بازی از روی ژل جداسازی و در ادامه سازه کامل ژن هیگرومایسین در این ناقل هم‌سانه‌سازی شد.



شکل 9. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pBlueScript و اجد سازه ژن مقاومت به هیگرومایسین و ناقل pBI121. 1: هضم آنزیمی ناقل pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *MssI*؛ دو قطعه 12300 جفت‌بازی (بدنه ناقل pBI121) و 2458 جفت‌بازی (حاوی پیش‌بر NOS، ژن گزینش‌گر کانامایسین و خاتمه‌دهنده NOS) ایجاد شد. 2: هضم آنزیمی ناقل pBlueScript با آنزیم‌های *HindIII* و *Eco53KI*؛ دو قطعه 2960 جفت‌بازی (بدنه ناقل pBlueScript) و 2203 جفت‌بازی (حاوی پیش‌بر 35S، ژن مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده 35S) ایجاد شد. M: نشان‌گر وزن مولکولی 1kb (شرکت Thermo Fisher Scientific).



شکل 11. نقشه شماتیک ناقل pBI121^{hygR} حاوی سازه کامل ژن مقاومت به هیگرومایسین (پیش بر 35S، ژن مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه دهنده 35S)



شکل 12. همردیفی نتیجه توالی یابی ژن هیگرومایسین همسانه سازی شده با توالی هیگرومایسین در ناقل p6-ubi rnaI با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 5.6.1 و تأیید همسانه سازی ژن مقاومت به هیگرومایسین در ناقل pBI121^{hygR}

معرفی شد که واجد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین است و برای انتقال ژن به غلات خصوصا جو قابل استفاده است. به نظر می‌آید که به دلیل آشنایی محققین کشور با دستوری ناقلین سری pBI121، ناقل $pBI121^{hygR}$ نسبت به سایر ناقلین موجود در بازار مثل pCAMBIA1300، pBht2 و pGH215 با اقبال بیشتری همراه خواهد شد و از آنجایی که دسترسی به سایر ناقلین حاوی نشان‌گر گزینش‌گر مقاومت به هیگرومایسین محدود بوده، معرفی این ناقل می‌تواند انجام پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان تک‌لپه را تسهیل کند. با توجه به ناقلین متعدد معرفی شده توسط این گروه (Behzadmand *et al.*, 2017; Esfahani and Salmanian, 2014)، امکان جایگزینی ژن نشان‌گر مقاومت به هیگرومایسین با ژن مقاومت به کانامایسین یا جایگزینی ژن گزارش‌گر با جایگاه همسانه‌سازی چندگانه بهبود یافته و در نتیجه معرفی سری جدید ناقلین انتقال ژن به گیاهانی که عامل گزینش‌گر مقاومت به کانامایسین در آن‌ها کارایی ندارد، فراهم خواهد شد.

سپاسگزاری

هزینه‌های این پژوهش از طرح شماره 581 پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین اعتبار شده است. همچنین از جناب آقای دکتر مسعود توحیدفر عضو محترم هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی تهران به‌خاطر در اختیار قرار دادن ناقل p6-ubi-rnai تغییر یافته، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Behzadmand M, Esfahani K, Salmanian Ali H, Mousavi A (2017) Designing, Construction and Functional Analysis of Two Plant Expression Vectors ($pBI121^{GUS-9}$ and $pBI121^{3+4}$) with Improved Cloning Sites. *Agric. Biotechnol.* 8: 75-84.

محبوبیت ناقل pBI121 ممکن است به‌خاطر انتشار وسیع این ناقل در آزمایشگاه‌ها در سال‌های اولیه انجام پروژه‌های انتقال ژن به گیاه و در نتیجه آن حجم بالای مقالات منتشر شده با استفاده از این ناقل و در پی آن آشنایی بیشتر و اعتماد محققان به این ناقل باشد. همچنین سادگی ناقل pBI121 و سهولت جایگزینی یک مرحله‌ای ژن مورد نظر با ژن *gus* و پس از آن بیان مناسب ژن منتقل شده تحت کنترل پیش‌بر قدرتمند CaMV 35S می‌تواند از دیگر دلایل محبوبیت این ناقل باشد. اما این ناقل به دلیل وجود نشان‌گر گزینشی مقاومت به کانامایسین، در فرایند تراریختی بسیاری از گیاهان (به‌ویژه گیاهان تک‌لپه‌ای)، کارایی ندارد. اجرای پروژه‌های تحقیقاتی مهندسی ژنتیک گیاهی به میزان بسیار زیادی به ژن نشان‌گر گزینشی بستگی دارد که قادر به غربال‌گری مؤثر نمونه‌های تراریخته باشد (LIU *et al.*, 2016). ژن نشان‌گر علاوه بر قدرت گزینشی بالا باید بر روی رشد و بازایی گیاه‌های تراریخته نیز اثر منفی نداشته باشد یا این اثر بسیار ناچیز باشد. براساس مطالعات متعددی، مشخص شده که ژن گزینش‌گر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، به‌عنوان سیستم گزینشی در غلات نسبت به گیاهان دولپه‌ای بسیار ضعیف عمل می‌کند (Miki & McHugh, 2004; Serrano *et al.*, 2015; Shrawat & Armstrong, 2018). جهت رفع این مشکل، در این تحقیق ژن گزینش‌گر مقاومت به هیگرومایسین جایگزین ژن گزینش‌گر مقاومت به کانامایسین در ناقل pBI121 شد. با این کار یک ناقل جدید مبتنی بر ناقل pBI121

Breyer D, Kopertekh L, Reheul D (2014) Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of genetically modified plants—scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33: 286-330.

- Esfahani K, Salmanian AH (2014) Construction and functional analysis of pBI105, a plant expression vector to facilitate cloning and recombinant protein purification. *Crop Biotech.* 4: 59-69.
- Glick BR (2018) *Methods in plant molecular biology and biotechnology.* CRC Press, Boca Raton.
- Liu W, Stewart CN Jr, Brian M (2016) Promoters and Marker Genes. *Plant Biotechnol. Genet. Princ. Tech. Appl.* 233.
- Low LY, Yang SK, Andrew Kok DX, Ong-Abdullah J, Tan NP, Lai KS (2018) Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method. In: Celik O (ed) *New Visions in Plant Science*, IntechOpen, London, pp 41-61.
- Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 107: 193-232.
- Mohammadhassan R, Esfahani K, Kashefi B (2018) Constructional and Functional Evaluation of Two New Plant Expression Vectors-pBI121^{Gus-6} and pBI121⁵⁺¹. *Banats J. Biotechnol.* 9: 60-68.
- Rastogi J, Bubber P, Singh RK, Singh RB (2018) Determination of minimal inhibitory concentration of kanamycin as selective agents and marker genes for use in *Agrobacterium* mediated transformation in sugarcane. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7: 1861-1864.
- Roa-Rodriguez C (2003) Antibiotic Resistance Genes and Their Uses in Genetic Transformation: Especially in Plants. *CAMBIA Intellectual Property Resource.*
- Scheid OM (2004) Either/or selection markers for plant transformation. *Nat. Biotechnol.* 22: 398-399.
- Serrano M, Kombrink E, Meesters C (2015) Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Front. Plant Sci.* 6: 131.
- Shrawat AK, Armstrong CL (2018) Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Crit. Rev. Plant Sci.* 37: 335-421.
- Stanišić M, Ninković S, Savić J, Čosić T, Mitić N (2018) The effects of β -lactam antibiotics and hygromycin B on de novo shoot organogenesis in apple cv. Golden Delicious. *Arch. Biol. Sci.* 70: 179-190.