

## بررسی پروموتور ژن S-Like RNase در برنج تراریخت

رودابه راوش<sup>۱\*</sup>، بهروز شیران<sup>۲</sup>، اسماعیل ابراهیمی<sup>۳</sup>، سعد الله هوشمند<sup>۴</sup>، رودی دلفروس<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> استادیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

<sup>۳</sup> دانشیار بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

<sup>۵</sup> استادیار موسسه تحقیقات CSIRO، کنبرا، استرالیا.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۳

### چکیده

گروه ژن‌های RNase در فرایندهای حیاتی سلولی همچون همانندسازی DNA، رونویسی، پیرایش و کنترل ترجمه، شرکت می‌کنند. S-Like ریبونوکلئازها (S-Like RNase)، همولوگ S ریبونوکلئاز (S-RNase)ها هستند، ولی آنها در ناسازگاری گیاه مشارکتی ندارند. در گیاهان دو لپه‌ای S-Like RNaseها نقش مهمی در انتقال مجدد فسفات طی فرایند پیری دارند، همچنین آنها در فرایندهای کمبود فسفات معدنی، دفاع سلولی و زخم‌های فیزیکی القا می‌شوند. اثرات RNaseها در پاسخ به خشکی می‌تواند به دلیل اثرات متقابل بین چندین فعالیت مختلف آنها باشد. در این تحقیق پروموتور ژن S-Like RNase در بالادست ژن بتا گلوکرونیداز (GUS) قرار داده شد سپس سازه مورد نظر توسط الکتروپوریشن به آگروباکتریوم تومفاسینس، سویه LBA 4404، انتقال داده شد و سپس به کمک هم کشتی، گیاه تراریخت ایجاد شد. با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی فعالیت پروموتور ژن S-Like RNase در بافت ریشه، برگ و بساک برنج بررسی گردید. نتایج نشان داد که پروموتور این ژن دارای فعالیت بالایی در بساک برنج می‌باشد درحالیکه میزان فعالیت آن در برگ کم و در ریشه نیز ناچیز بوده است. بررسی بروز پروموتور این ژن در بافت‌های مختلف، نتایج بیان بالای ژن S-Like RNase در بساک در مقایسه با بافت‌های دیگر که با استفاده از آنالیز q-PCR در مطالعات قبلی مشخص شده بود را تکمیل و تأیید می‌کند.

**کلمات کلیدی:** بساک، رنگ‌آمیزی GUS، فعالیت پروموتور، S-Like RNase، برنج تراریخته.

دارند، در تنظیمات تنش، دفاع در برابر میکروارگانیسم‌ها، انتقال مجدد فسفات و در ذخیره کردن نیتروژن دخالت دارند (MacIntosh, 2011). بر اساس مطالعات بیشتر روی بیان ژن در گیاهان، پیشنهاد شده‌است که دسته اول S-Like RNaseها در چرخه مجدد فسفات طی فرآیند پیری، مشارکت دارند (Kock *et al.*, 1998). مشخص شده‌است که ژن S-Like RNase1 از آرابدوپسیس، در طی دوره‌های کمبود فسفات، افزایش بیان داشته‌اند (Bariola *et al.*, 1994). در گیاهان دو لپه‌ای S-Like RNaseها نقش مهمی در انتقال مجدد فسفات طی فرآیند پیری داشته‌اند، همچنین آنها در فرایندهای دفاع سلولی و زخم-های فیزیکی القا شده‌اند (Zheng *et al.*, 2014). این ژن در واکنش به برخی از تنش‌ها و بیماری‌ها نیز گزارش شده‌است (Deshpande & Shankar, 2010; MacIntosh *et al.*, 2002). در دسته دوم S-Like RNaseها، بر خلاف دسته اول، خصوصیات اجدادی بیشتر حفظ شده‌اند و این گروه به صورت حفاظت شده در میان یوکاریوت‌ها وجود دارند و با تبدیل به RNA ریپوزومی برای نگهداری هموستازی سلولی و به عنوان ژن خانه‌دار (HouseKeeping) عمل می‌کنند (Luhtala & Parker, 2010; MacIntosh *et al.*, 2011). اثرات بالقوه یافت شده برای RNaseها در القای مقاومت به خشکی، می‌تواند ناشی از برهمکنش چندین خاصیت متمایز آنها باشد (MacIntosh *et al.*, 2010)، با این حال

از آنجایی که پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی شامل عوامل بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و نموی می‌باشد، بروز تنش باعث تغییر در محل بروز ژن‌ها در بافت‌های گیاه می‌گردد (Caliskan, 2009). ژن کد کننده  $\beta$ -glucuronidase (GUS) در *E. coli* یکی از مهمترین ژن‌های گزارشگر است که در تراریزش گیاهان، برای بررسی فعالیت پروموتور بکار برده می‌شود (Jefferson, 1987). ژن GUS بعد از بروز، آنزیم بتاگلوکلورونیداز را تولید می‌کند که این آنزیم وقتی در مقابل پیش‌ماده‌های بی‌رنگ یا غیر فلورسنت قرار گیرد، قادر است آنها را به محصولات رنگی یا فلورسنت، تبدیل کند. رایج ترین پیش ماده GUS، برای رنگ آمیزی هیستوشیمیایی، 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) می‌باشد. محصول واکنش در این روش، به رنگ آبی شفاف، قابل مشاهده است (Blanco *et al.*, 1982).

خانواده RNase T<sub>2</sub> در گیاهان، به دو زیر خانواده S-RNase و S-Like RNase طبقه‌بندی می‌شوند. S-RNaseها به عنوان عامل ناسازگاری عمل می‌کنند، ولی S-Like RNaseها که همولوگ S-RNaseها هستند، در ناسازگاری مشارکتی ندارند. S-Like RNaseها خود به دو دسته تقسیم می‌شوند، دسته اول S-Like RNaseها فقط در گیاهان گزارش شده‌اند که به نظر می‌رسد که بعد از نسخه‌برداری ژنی، دارای تنوع می‌باشند. بسیاری از ژن‌هایی که در این دسته قرار

GUS، به بررسی فعالیت پروموتور این ژن در بافت‌های مختلف برنج تراریخت پرداخته شد.

#### مواد و روش‌ها

بذور برنج IR64 (واريته هندی) و Nipponbare (رقم ژاپنی) پس از ضد عفونی با محلول الكل ۶۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر، روی محیط کشت MS قرار گرفتند تا کالوس تازه برای فرآیند تراریختی آماده شود.

توالی کانینگ ژن S-Like RNase که در بررسی کتابخانه‌های EST در طی تنش خشکی افزایش بیان نشان داده بود (Ravash *et al.*, 2012)، در پایگاه اطلاعاتی ژنوم برنج (Rice Genome Annotation Project) با آدرس اینترنتی (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) بلاست شد. توالی کل ژن (LOC\_Os09g36700.1)، توالی CDs و توالی پروتئین مربوطه بدست آمد. در قسمت Genome browser محل ژن بر روی کروموزوم برنج مشخص شد. به منظور دست‌یابی به توالی ناحیه پروموتری، حدود ۲ کیلو باز قبل از ناحیه ژنی انتخاب شد و توالی مربوطه از این ناحیه بدست آمد. بر اساس توالی بدست آمده برای پروموتور، آغازگر مناسب برای تکثیر آن با استفاده از نرم افزار 11.5.1 Vector NTI advance طراحی گردید. ناحیه پروموتری بوسیله PCR با آغازگر اختصاصی (جدول ۱)، تکثیر شد. واکنش PCR

تاکنون اطلاعات اندکی در مورد عملکرد ژن S-Like RNase در تک لپه‌ای‌ها گزارش شده است. با جداسازی و توالی‌یابی ناحیه پروموتور ژن در گیاه، می‌توان کارکرد دقیق‌تر آن را مشخص کرد. به واسطه جداسازی ناحیه پروموتری و قرار دادن ناحیه ژن GUS بعد از آن و انتقال این سازه به گیاه مدل مانند برنج تراریخت، تشخیص فعالیت پروموتور این ژن در بافت‌های مختلف گیاه، بواسطه بررسی میزان رنگ تولید شده از بروز ژن GUS، ممکن می‌گردد. بسیاری از ژن‌های اختصاصی بساک و پروموتور آنها، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و منجر به شناسایی عناصر سیس ضروری برای بیان اختصاصی شده‌اند (Kuriakose *et al.*, 2009). این پروموتورهای اختصاصی بساک می‌توانند برای ایجاد نر عقیمی در گیاهان، به واسطه مهندسی ژنی و قرار دادن ژن سمی بعد از این پروموتورها مورد استفاده قرار گیرند (Mariani *et al.*, 1990)، همچنین از این پروموتورهای اختصاصی بساک می‌توان برای بازیابی باروری گیاه در نسل F1 گیاهان هیبرید سود جست (Mariani *et al.*, 1992). ژن S-Like RNase در مطالعات بیان ژن تحت تنش خشکی به صورت متفاوتی در بافت‌های گندم بروز کرده است و در اثر تنش خشکی دارای افزایش بیان معنی‌دار در بساک ارقام مختلف بوده است (Ravash *et al.*, 2012)، در این تحقیق با استفاده از روش رنگ‌آمیزی

میکرولیتر و آب مقطر استریل ۷/۶ میکرولیتر) انجام شد. برنامه واکنش شامل: ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه و سپس، طی ۳۵ چرخه با ۹۴°C و زمان ۳۰ ثانیه، ۵۲°C به طول ۳۰ ثانیه و ۶۸°C به مدت ۱ دقیقه، بود.

به وسیله دستگاه Rotor-Gene Q از شرکت کیاژن، با حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر (DNA ۱ میکرولیتر، بافر 10x ۱/۲۵ میکرولیتر، mgcl<sub>2</sub> ۰/۲۷ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت هرکدام ۰/۲۵ میکرولیتر، dNTP ۰/۵ میکرولیتر، DNA پلیمرز ۰/۱۳ میکرولیتر، DMSO<sub>50%</sub> ۱/۲۵

جدول ۱- مشخصات جفت آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

**Table 1- Names and Sequences of primers have used in this study.**

ناحیه تکثیر	نام	توالی آغازگر (5'-3')	دمای اتصال	طول قطعه تکثیر شده
شونده	آغازگر	Primer sequence (5'-3')	(°C)	(bp)
Amplification region	Primer name		Annealing temperature (°C)	Size of products (bp)
S like RNase Promoter	Pro-F	GTGACATCTTGAGCTTGTGTTTG	52	1466
	Pro-R	CTGTGGTCTGTGGAGAACTCA		
	Hph-F	GACGATTGCGTCGCATCGACC	62	831
hygromycin	Hph-R	AGCGTCTCCGACCTGCTGCA		

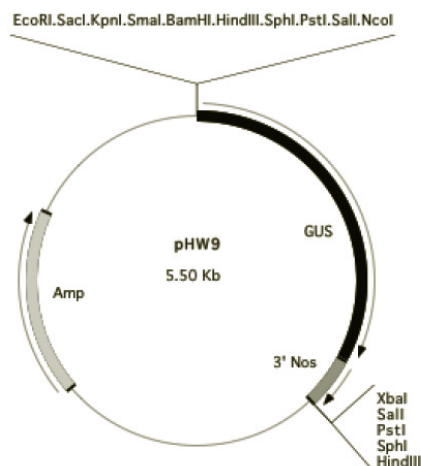
پروموتری به وسیله هضم مضاعف با آنزیم‌های محدود کننده *NcoI* و *EcoRI* برش داده شد و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و جداسازی و خالص سازی قطعه از ژل، برای انتقال به ناقل PHW9 آماده شد (شکل ۱). این ناقل حاوی ناحیه *GUS* در پایین دست ناحیه *Dolferus et al.* (1994) طراحی و ساخته شده است. بدین منظور این ناقل با آنزیم‌های برشی *NcoI* و *EcoRI* برش داده شد. سپس ترانسفورماسیون ناقل PHW9 به

ناحیه پروموتری تکثیر شده، با استفاده از کیت شرکت Promega (Cat No. A1360) در ناقل *pGEM easy* درج و در باکتری همسانه سازی گردید. در این مرحله ۹۶ کلون انتخاب شد و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت *Jetstar* (Cat No. 210050) صورت گرفت. سپس همه پلاسمیدهای استخراج شده برای توالی یابی (به آزمایشگاه توالی یابی *CSIRO*) ارسال گردیدند تا صحت قطعه پروموتری تکثیر شده تأیید گردد. در ادامه ناقل حاوی ناحیه

کالوس‌های برنج رقم IR6، درون مخلوط حاوی آگروباکتریوم، برای مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه، غوطه ور شدند و با استفاده از صافی استریل و سپس فیلتر استریل، خشک شدند و طبق روش Lin & Zhang (2005) روی محیط کشت جامد در دمای ۲۵°C به مدت ۲ تا ۳ روز در تاریکی قرار گرفتند و پس از چند بار، بازکشت کالوس‌های سالم روی محیط کشت‌های مختلف، کالوس‌هایی که در مرحله قبل دارای شاخساره شده بودند به محیط کشت MS 1/2 منتقل شدند و در نور کامل (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز نگه داری شدند. کالوس‌هایی که هم دارای ریشه و هم شاخساره شده بودند انتخاب شدند و به داخل گلدان‌های مقوایی کوچک انتقال داده شدند و در اطاق مه پاشی در فایتوترون (با دمای ۲۵°C) قرار گرفتند. در نهایت پس از ۷ تا ۱۰ روز که گیاهچه‌ها به خوبی در خاک مستقر شدند، به گلدان‌های معمولی انتقال داده شدند و در گلخانه نگهداری شدند، این روش توسط (horsch et al., 1985) به طور مفصل‌تری شرح داده شده است.

باکتری به‌روش شوک حرارتی انجام شد (Dolferus et al., 1994). مجدداً استخراج پلاسمید و توالی‌یابی به منظور یافتن کلون‌هایی که پروموتور در جهت صحیح در آنها درج شده بود، صورت گرفت و کلون‌هایی که در آنها انتهای ناحیه پروموتوری در ابتدای توالی کد کننده GUS قرار گرفته بود، انتخاب شدند.

به منظور درج قطعه حاوی پروموتور ژن S-Like RNase و ژن GUS در ناقل pCAMBIA 1300، هردو ناقل pHW9 و pCAMBIA 1300 به وسیله آنزیم‌های محدود کننده EcoRI و HindIII برش داده شدند. پس از انجام واکنش اتصال، ترانسفورماسیون آگروباکتریوم (سویه LBA4404) صورت گرفت. سلول‌های آگروباکتریوم درون محلول SOB (باکتوتریپتون ۲۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر، NaCl ۰/۵۸۴ گرم در لیتر و KCl ۰/۱۸۶ گرم در لیتر به همراه آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و کرینسیلین به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با غلظت OD<sup>600</sup> برابر با ۰/۸ و میزان ۰/۵ تا ۱ میکروگرم از پلاسمید حاوی سازه، به درون کوت‌های الکتروپوریشن انتقال داده شدند. سپس کوت‌ها در دستگاه الکتروپوریشن قرار گرفتند (طول پالس: ۴- میلی ثانیه، مقاومت: ۴ KOhm) و در نهایت کلون‌های آگروباکتریوم حاوی سازه بر روی سطح پلیت در دمای ۲۸°C در شرایط تاریکی قرار داده شدند.



شکل ۱- ناقل pHW9 حاوی ناحیه GUS در پایین دست ناحیه درج قطعه مورد نظر (Dolferus *et al.*, 1994).

Figure 1- pHW9 vector include GUS gene at downstream of insertion site (Dolferus *et al.*, 1994)

در مرحله رشد زایشی گیاهان تراریخت، نمونه برداری از بافت برگ، ریشه و خوشه برنج انجام گرفت. برای بررسی میزان فعالیت پروموتور در بافت‌های مورد نظر، نمونه‌ها در میکروتیوب قرار داده شدند و حدود ۵۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی GUS (De Block & Debrouwer, 1992) درون میکروتیوب‌ها ریخته شد به طوری که روی سطح نمونه‌ها را بپوشاند، سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه تغلیظ کننده با پمپ خلاء قرار داده شدند و پس از گذشت چند ثانیه از ایجاد خلاء، پمپ خلاء خاموش شد و این عمل ۳ بار تکرار گردید تا محلول رنگ آمیزی GUS به خوبی در بافت‌ها نفوذ کند. نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷°C برای مدت یک شب، قرار داده شدند و سپس با آب مقطر چندین بار

برای تأیید حضور سازه حاوی پروموتور در برنج تراریخت، استخراج DNA از بافت برگ گیاهچه‌ها با روش Dellaporta *et al.*, (1983) انجام گرفت و نمونه‌ها با آغازگر اختصاصی هایگرومایسین (جدول ۱) تکثیر شدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه واکنش شامل: ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه و سپس طی ۳۵ چرخه با ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۶۲°C برای ۳۰ ثانیه و ۶۸°C به مدت ۱ دقیقه، بود. گیاهچه‌های تراریخت به گلدان‌های حاوی شن و ورمی‌کولایت که به نسبت مساوی مخلوط شده بودند، انتقال یافتند و تا مرحله بذر دهی رشد داده شدند و نمونه گیری از بافت ریشه، برگ و بساک در مرحله میکروسپور جوان انجام شد.

(LOC\_Os09g36700.1). سپس پروموتور در ناقل pHW9 درج شد و سپس توالی یابی و مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از صحت قطعه تکثیری، پروموتور به ناقل pCAMBIA 1300 وارد شد، و در نهایت ترانسفورماسیون آگروباکتریوم سویه LBA 4404 صورت گرفت.

سازه حاوی پروموتور و ناحیه ژن GUS در ناحیه جایگاه برشی چندگانه (MCS) به ناقل pCAMBIA 1300 وارد شد. این ناقل قابلیت ترانسفورماسیون به داخل سلول گیاهی را دارد و امکان بررسی رفتار پروموتور را در گیاهان تراریخت شده، مهیا می‌کند (شکل ۲).

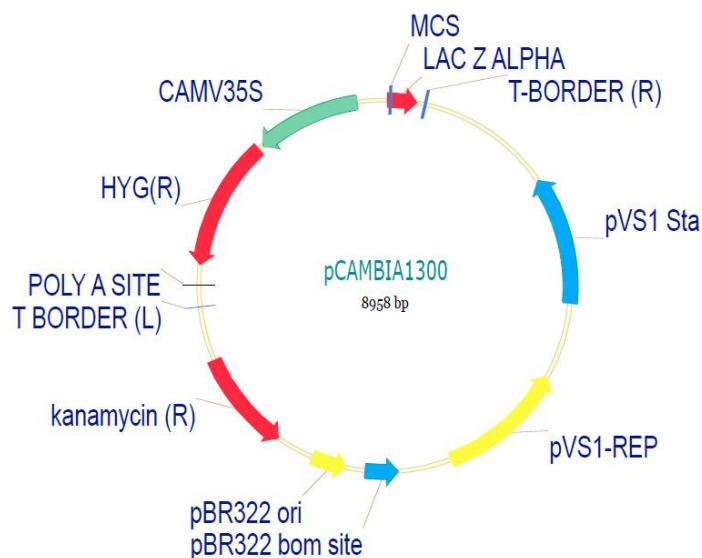
برای یافتن ناقل‌هایی که سازه به طور کامل وارد آنها شده‌بود، نمونه‌ی ناقل pCAMBIA1300 با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* که جایگاه برشی آنها در دو سوی محل قرار گیری سازه حاوی پروموتور قرار داشت، مورد هضم مضاعف قرار گرفتند. نمونه‌ها روی ژل برده شدند و نمونه‌هایی که دارای باند ۱۵۰۰ جفت بازی بودند، انتخاب شدند و برای توالی یابی ارسال شدند.

شستشو شدند. در نهایت در محلول ۷۰٪ اتانول و سپس در محلول ۱۰۰٪ اتانول نگهداری شدند. عکس برداری از نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های متفاوت صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج مطالعات گذشته نشان داده‌است که بیان ژن S-Like RNase در بساک رقم‌ها و گونه‌های مختلف گندم و خویشاوندان وحشی آن، بسیار بالاتر از بقیه بافت‌ها بوده‌است (Ravash *et al.*, 2012). بر همین اساس در این مطالعه پروموتور این ژن برای برآورد فعالیت آن در بافت‌های مختلف، شناسایی و جداسازی شد. ناحیه پروموتوری در بالادست توالی کانتیگ S-Like RNase بر روی کروموزوم شماره ۹ برنج، شناسایی شد (AP014965.1).

قطعه تکثیری پروموتور در ناقل pGEM-T easy درج گردید و همسانه‌ها برای توالی یابی ارسال شدند. این توالی در پایگاه اطلاعاتی برنج بلاست شد و با توالی ژن S like RNase روی کروموزوم شماره ۹ برنج جفت گردید.



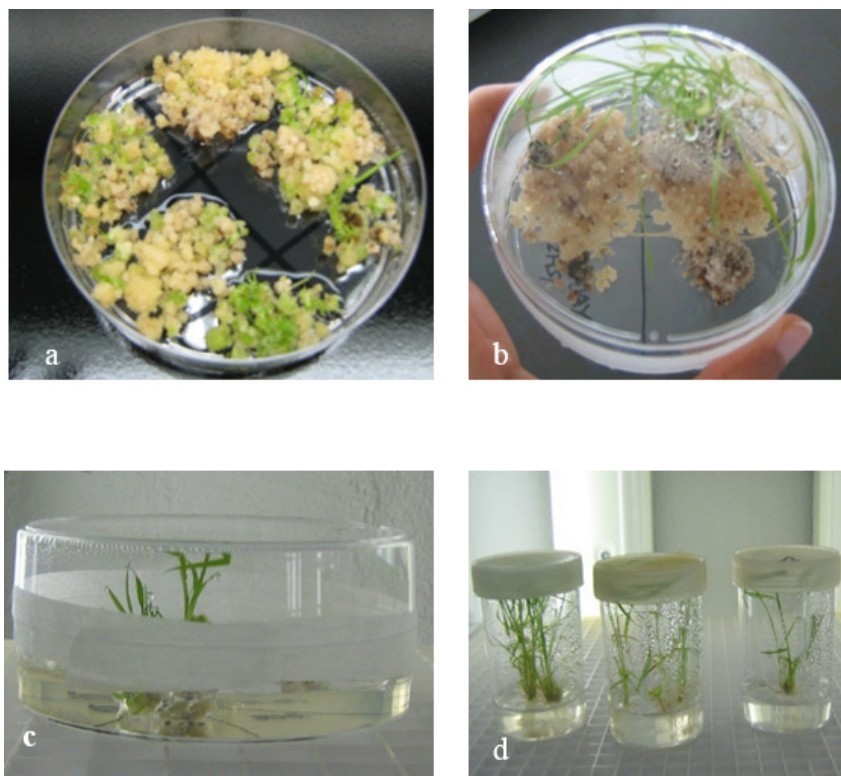
شکل ۲- نقشه ناقل pCAMBIA1300، سازه در ناحیه جایگاه برشی چندگانه (MCS) به ناقل وارد شد (<http://www.cambia.org>).

Figure 2- pCAMBIA1300 map, construct was inserted in MCS site (<http://www.cambia.org>).

همچنین نوار میکروپور برای درزگیری درب پلیت‌ها استفاده شد تا امکان عبور هوا فراهم باشد. استفاده از نوارهای میکروپور نسبت به پارافilm، کارایی تولید گیاه تراریخت را افزایش می‌دهد. شکل ۳ d، رشد گیاهچه‌ها در محیط کشت MS 1/2، را نشان می‌دهد که آماده برای انتقال به گلدانهای مقوایی حاوی خاکبرگ و خاک ماسه‌ای و قرار گرفتن در اتاقک مه‌پاشی می‌باشد. در نهایت، گیاهان کوچک تراریخت به گلخانه برنج با شرایط دمایی ۳۳°C و رطوبت بالای ۷۰ درصد، انتقال داده شده‌اند.

هم کشتی باکتری با کالوس رقم هندی IR6 انجام شد و روی محیط کشت، گیاهچه‌ها تولید برگ و ریشه نمودند و در نهایت گیاه تراریخت ایجاد شد. شکل ۳ مراحل مختلف رشد کالوس و ایجاد گیاه تراریخت را نشان می‌دهد. در شکل ۳ a، تغییر رنگ و سبز شدن کالوس‌ها و نمایان شدن برگ در برخی از آنها، در شرایط نیمه تاریک نشان داده شده‌است. به‌منظور ایجاد گیاهچه از کالوس‌های سبز و یا دارای برگ کوچک، کالوس‌ها به محیط کشت بعدی و شرایط نوری کامل انتقال داده شدند (شکل ۳ b و c). در این مرحله از پلیت‌های بلندتر استفاده شد تا فضای رشد کافی برای رشد برگ‌ها وجود داشته باشد،





شکل ۳- مراحل مختلف کشت بافت کالوس برنج تراریخت: a- سبز شدن کالوس ها b- ایجاد گیاهچه از کالوس ها، c- انتقال گیاهچه به پلیت با ارتفاع بیشتر همراه با نوارهای درزبندی انتقال دهنده هوا، d- گیاهان تراریخت درون محیط کشت  $1/2$  MS.

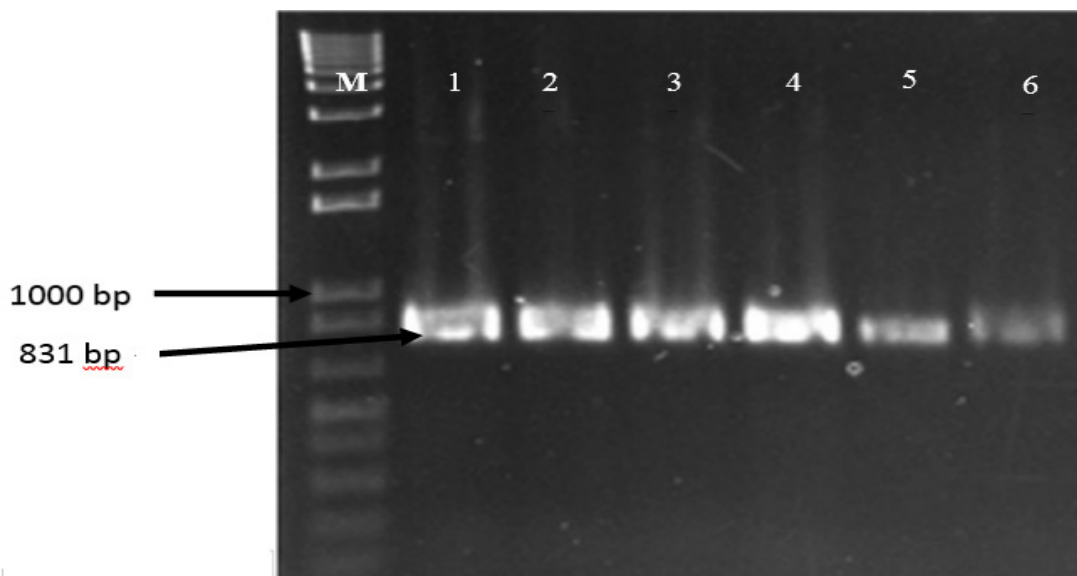
**Figure 3- Transformed rice tissue culture stages: a- callus getting green, b- produce seedling from callus, c- transform callus to plate with micropore tape, d- transformed plants at  $1/2$  MS media.**

باند ۸۳۱ جفت بازی بودند، گیاه تراریخت مثبت ارزیابی شدند و برای ادامه مراحل بررسی بیان ناحیه پروموتری، در نظر گرفته شدند عکس ژل های تایید کننده حضور ژن در نمونه های مختلف برنج تراریخت در شرایط یکسان رنگ آمیزی شدند (شکل ۴). نتایج نشان داد که

برای تایید گیاهچه های تراریخت حاوی قطعه T-DNA، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن هایگرومیسین صورت گرفت. ناقل pCAMBIA1300 دارای ناحیه ژن هایگرومیسین در قسمتی از توالی خود هست (جدول ۱). نمونه هایی که بر روی ژل، دارای یک

گیاهچه‌های تراریخت بود.

هیچیک از کالوس‌های رقم ژاپنی تراریخت نشدند، ولی رقم هندی، رقم مناسبی برای ایجاد



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز به منظور تشخیص گیاهچه‌های برنج تراریخت با استفاده از آغازگر هایگرومایسین. چاهک (M): نشانگر 100 bp plus؛ چاهک (۱-۶): محصولات PCR نمونه های مختلف برگی.

**Figure 4- Agarose electrophoresis gel of PCR products for detecting transformed rice seedling using hygromycin primer. Lane (M): 100 bp plus size marker; lane (1-6): PCR products from various leaf samples**

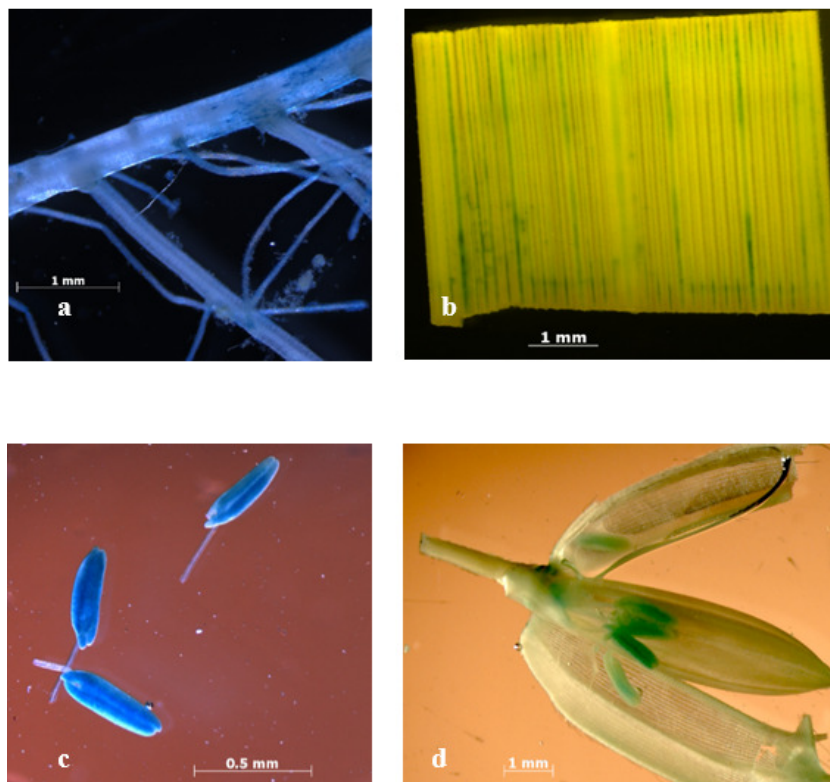
و در ریشه نیز ناچیز بوده است. نتایج در تعداد زیادی نمونه از بافت‌های مختلف و در گیاهچه‌های تراریخت متعدد تکرار شد و در تمامی موارد شدت رنگ آبی در بساک بسیار زیاد بود که نشان‌دهنده فعالیت بالای پروموتور قبل از ناحیه GUS در این بافت می‌باشد، در صورتی که فعالیت پروموتور S-Like RNase در برگ زیاد نبوده است، در نتیجه میزان رنگ آبی مشاهده شده پس از رنگ‌آمیزی برگ، مختصر بوده است. در ریشه

آزمون تشخیص GUS در واقع بسیار حساس و اختصاصی عمل کرده و دارای قابلیت‌های بررسی کمی (اندازه‌گیری میزان بیان ژن GUS) و نیز کیفی (بررسی الگوی بیان ژن GUS در بافت‌ها و اندام‌های مختلف) می‌باشد. بررسی میزان بیان ژن GUS که در واقع میزان فعالیت پروموتور ژن S-Like RNase را مشخص می‌کند، نشان داد که این ژن دارای بیان بسیار بالایی در بساک می‌باشد و بیان آن در برگ کمتر

اختصاصی در بافت گلبرگ و ساقه گیاه میخک نشان داده‌است (Kim *et al.*, 2004). همچنین پروموتر ژن *YY2* دارای فعالیت اختصاصی در بساک برنج و آراییدوپسیس می‌باشد که یک ژن کلیدی در چرخه تولید فلاوانوئید می‌باشد (Kuriakose *et al.*, 2009).

*RNase T2*ها که زیر فامیل خانواده *RNase* هستند، در ژنوم تمام گیاهانی که تا کنون مطالعه شده‌اند، یافت می‌شوند، اما تا کنون اطلاعات دقیقی در مورد نحوه عملکرد پروموتر آنها در بافت‌های مختلف در دست نبوده‌است. اگر چه مطالعات بروز ژن مشخص کرده‌بود که این ژن در فرایند تنش در برنج پاسخ می‌دهد ولی مطالعه‌ای روی پروموتر این ژن صورت نگرفته بود (Zheng *et al.*, 2014; Salekdeh *et al.*, 2002). در این تحقیق به بررسی محل بروز پروموتر این ژن در بافت‌های مختلف برنج تراویخت پرداخته شده است.

فعالیت بسیار ناچیزی از این پروموتر دیده می‌شود که در نتیجه آن، ریشه‌ها کاملاً سفید رنگ با رگه‌های مختصر آبی پراکنده، مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۵). از آنجایی‌که بررسی میزان بیان ژن *S-Like RNase* نشان داده‌بود که بیان این ژن در بساک رقم‌ها و گونه‌های مختلف گندم و خویشاوندان وحشی آن، بسیار بالاتر از بقیه بافت‌ها بوده‌است (Ravash *et al.*, 2012)، و در این مطالعه نیز بیشترین فعالیت پروموتر ژن *S-Like RNase* در فعال کردن ژن *GUS* در بافت بساک بوده‌است، می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل اساسی تفاوت در میزان بیان این ژن در بافت‌های مختلف به دلیل تفاوت در فعالیت پروموتر این ژن در بافت‌های مختلف بوده‌است (شکل ۵). محققان دیگری نیز فعالیت متفاوت ژن‌ها و پروموترها را در بافت‌های مختلف را گزارش نموده‌اند، به عنوان مثال ژن *CSDC9* که به ژن *GUS* ملحق شده‌بود، بیان



شکل ۵- بررسی میزان فعالیت اختصاصی پروموتور ژن S-Like RNase در بافت‌های مختلف برنج تراریخت با استفاده از آزمون تشخیص GUS -a ریشه، b- برگ، c- بساک، d- گلچه.

**Figure 5- GUS Reporter gene expression assay for Analysis of S-Like RNase promoter tissue-specific expression patterns in transformed plants tissues: a- root, b- leaf, c- anther, d- floret.**

توجه به نتایج قبلی، نقش بافت اختصاصی پروموتور این ژن، تخمین زده می‌شد که در این تحقیق با اثبات فعالیت بالای این پروموتور در بساک برنج، علت بروز بالای ژن s-like RNase در این بافت و بیان کم این ژن در بافت‌های دیگر، مشخص شد. با توجه به نتایج این آزمایش، وجود بیان اختصاصی پروموتور ژن S-Like RNase در بساک برنج برای اولین بار گزارش شد و پروموتور از برنج جداسازی و توالی‌یابی شد و

بروز متفاوت ژن S-Like RNase در بافت‌های مختلف گندم و خویشاوندان وحشی آن، در مطالعات گذشته انجام شده بود که بر اساس آن این ژن در بین بافت‌های مختلف گندم، بیشترین بیان را در بساک دارا بوده است و تحت تنش خشکی بیان این ژن افزایش یافته است، همچنین در بساک خویشاوند وحشی گندم (*Aegilops tauschii*)، افزایش بیان تحت تنش خشکی، بسیار بالا بوده است (Ravash et al., 2012). با

GUS در بافت های مختلف نشان داده است فعالیت پروموتور در بافت های مختلف و تحت تاثیر شرایط مختلف تنش متفاوت بوده است (Hashemi *et al.*, 2012). نتایج این تحقیق در شناسایی پروموتور با بیان اختصاصی در بافت مشخص، می تواند در مطالعات بررسی اثر یک ژن خاص در یک بافت بخصوص بسیار مفید و کاربردی باشد. پروموتور بافت اختصاصی می تواند برای بررسی تشدید بیان یک ژن در فعالیت های متابولیکی و ساختاری بافت، طی شرایط تنش مورد استفاده قرار گیرد. در مراحل بعدی تحقیق پیشنهاد می شود، روی لاین های جهش یافته فاقد این ژن و مورفولوژی این گیاهان جهش یافته، تحت شرایط تنش خشکی و نرمال مقایسه انجام شود تا نقش این ژن و پروموتور اختصاصی آن در شرایط تنش، روشن تر گردد.

#### سپاسگزاری

با سپاس از همکاری موسسه CSIRO در استرالیا که منابع مالی این پژوهش را تامین نمودند و موافقت نمودند که انجام این تحقیق در آزمایشگاه بخش plant industry و در فایتوترون این موسسه صورت گیرد.

محل دقیق بروز آن در بساک، به وسیله تکنیک تشخیص GUS مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق مراحل هم کشتی باکتری با کالوس دو رقم برنج (IR64 و Nipponbare) پی گیری شد. کالوس های ایجاد شده از هر دو رقم هندی و ژاپنی تا مرحله القای گیاهچه پیش رفتند، اما رقم ژاپنی پاسخ مناسبی نداشت و فقط کالوس های رقم هندی، تولید برگ و ریشه نمودند و در نهایت گیاه تراریخت به طور موفق، ایجاد شد. نکته حائز اهمیت در این کار این بود که با توجه به برهمکنش عوامل مختلف در تراریزش و باززایی گیاهان تراریخت، کار با ارقام ژاپنی و هندی برنج دنبال گردید و به این ترتیب علی رغم عدم ایجاد ارقام ژاپنی تراریخت، روند انتقال پروموتور به گیاه و باززایی برنج هندی، کاملاً موفقیت آمیز و با کارایی بالا، ارزیابی شد. در تحقیقات گذشته ثابت شده است که تراریزش با اگروباکتریوم به نوع ژنوتیپ ها و واریته های مورد آزمایش بستگی دارد و فقط تعداد محدودی از واریته ها تراریخته می شوند، که اساساً به علت تفاوت های زیاد در توانایی تولید کالوس و باززایی در میان واریته های مختلف پس از آلوده سازی با اگروباکتریوم اتفاق می افتد (Machii *et al.*, 1998). مطالعات دیگری نیز بر روی بروز ژن

#### منابع

Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant Journal* 6: 673–685.

- Blanco C, Ritzenthaler P, Mata-Gilsinger M (1982). Cloning and endonuclease restriction analysis of *uidA* and *uidR* genes in *Escherichia coli* K-12: determination of transcription direction for the *uidA* gene. *Journal of Bacteriol* 149: 587–594.
- Caliskan M (2009). Salt stress causes a shift in the localization pattern of germin gene expression. *Genetic Molecular Research* 8: 1250-1256.
- De Block M, Debrouwer D (1992). In-situ enzyme histochemistry on plastic-embedded plant material. The development of an artefact-free  $\beta$ -glucuronidase assay. *The Plant Journal* 2: 261-266.
- Deshpande RA, Shankar V (2002). Ribonucleases from T2 family. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 79–122.
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES (1994). Differential Interactions of Promoter Elements in Stress Responses of the Arabidopsis *Adh* Gene. *Plant Physiology* 105(4):1075-1087.
- Hashemi F, Shobbar ZS, Majidi MM (2012). Functional Analysis of *OsVPI* Using Rice Mutant Lines. *Journal of agricultural Biotechnology* 4(2): 89-102. (In Farsi)
- Horsch R, Fry J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S, Fraley R (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231.
- Jefferson R (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Kim YJ, Sun HL, Park KY (2004). A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco. *FEBS letters* 578(3): 229-235.
- Kock M, Theierl K, Stenzel I (1998). Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* 204: 404–407.
- Kuriakose B, Arun V, Gnanamanickam SS, Thomas G (2009). Tissue-specific expression in transgenic rice and Arabidopsis thaliana plants of GUS gene driven by the 50 regulatory sequences of an anther specific rice gene *YY2*. *Plant Science* 177: 390–397.
- Lin YJ, and Qifa Zhang (2005). Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant cell reports* 23(8): 540-547.
- Luhtala N, Parker R (2010). T2 family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles, *Trends in Biochemical Sciences* 35: 253–259.
- Machii H, Mi zunno H, Hi rabayashi T, Li H, Hagio T (1998). Screening wheat genotypes for high callus inducti on and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 67-74.
- MacIntosh G, Hillwig M, Meyer A, Flagel L (2010). RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 381–396.
- MacIntosh GC (2011). RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases. in: Nicholson AW (Ed.), *Ribonucleases*, Springer, Berlin, Heidelberg 89–114.
- Mariani C, DeBeuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737–741.
- Mariani C, Gossele V, DeBeuckeleer M, De Block M, Goldberg RB, DeGreef W, Leemans J (1992). A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384–387.
- Ravash R, Shiran B, Ebrahimie E, Houshmand SA (2012). Study of S-Like RNase expression in wheat and its wild relatives under drought stress. *Journal of agricultural Biotechnology* 5(1): 27-38. (In Farsi)

- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145.
- Zheng J, Wang Y, He Y, Zhou J, Li Y, Liu Q, Xie X (2014). Overexpression of an S-like ribonuclease gene, *OsRNS4*, confers enhanced tolerance to high salinity and hyposensitivity to phytochrome-mediated light signals in rice. *Plant Science* 214: 99-105.

## Promoter Analysis of S-Like RNase gene in Transgenic Rice

Ravash R.<sup>1\*</sup>, Shiran B.<sup>2</sup>, Ebrahimie E.<sup>3</sup>, Houshmand S.<sup>4</sup>, Dolferus R.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

<sup>2,4</sup>Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

<sup>5</sup> Professor, CSIRO Plant Industry, Canberra-Australia.

### Abstract

RNases participate in vital cellular functions such as DNA replication, transcription, splicing, and control of translation. S-like ribonucleases (S-like RNases) are homologous to S-ribonucleases (S-RNases), but are not involved in self-incompatibility in plants. In dicotyledonous plants, S-like RNases play an important role in phosphate recycling during senescence and are induced by inorganic phosphate-starvation and in response to defense and mechanical wounding. Potential effects of RNases in drought response might refer to interaction of several different functions. In this study, the promoter of S-Like RNase gene was inserted upstream of  $\beta$ -glucuronidase gene (GUS), *Agrobacterium tumefaciens*, transformed by electroporation with these constructs were used for co-culture for plant transformation. Histochemical staining method on root, Leaf and anther tissue of rice were done for measuring promoter activity. Based on these results, we report tissue specific activity of S-Like RNase promoter in the anther of rice. Results indicate the high activity of S-Like RNase promoter in the anther tissue of rice however Expression level in the leaf was low and in the root was negligible. These results is confirmed by previous studies using q-PCR that indicated high expression of S-Like RNase gene at the anther in comparison with other tissues.

**Keywords:** *Anther, GUS staining, Promoter activity, S-Like RNase, Transformed Rice.*

\* Corresponding Author: Ravash R.

Tel: 03833224401

Email: R.Ravash@gmail.com