سیستم القا شونده با اتانول در کالوس‌های تراریخت حاصل از کشت پروتوپلاست در گیاه چغندرقند

Characterization of Ethanol Inducible Gene Expression System in Transgenic Sugar Beet Calli Derived From Stomatal Guard Cells

اصغر میرزائی اصل[۱]، احمد معینی[۲*]، علی هاتف سلمانیان[۳]، مختار جلالی جواران[۲] و لیلا خدایی[۴]

چکیده

امکان بیان کنترل شده یک ژن در گیاه تراریخت از اهداف دستکاری ژنتیکی است. به‌طور معمول این کنترل در سطح رونویسی انجام می‌شود و پیشبر القا شونده با اتانول یکی از پیشبرهای با کارایی زیاد، در تنظیم خارجی بیان ژن است. در این پژوهش، ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پیشبر القا شونده با اتانول و خاتمه دهنده OCS تهیه و بیان آن در کالوس‌های حاصل از پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه در برگ چغندرقند بررسی گردید. ابتدا، پروتوپلاست‌های مورد اشاره استخراج شدند و کالوس‌های حاصل از این پروتوپلاست‌ها، با اگروباکتریوم دارای سازه پیشبر القا شونده با اتانول و ژن گزارشگر *GUS* تلقیح شدند. کالوس‌های حاصل از تراریختی با اتانول در شرایط درون شیشه‌ای تیمار شده و بیان ژن گزارشگر *GUS* در آن‌ها قبل و بعد از القا با اتانول بررسی شد. برخی از کالوس‌ها پس از القا با اتانول بیشترین میزان بیان ژن *GUS* را داشتند ولی قبل از القا با اتانول بیان ژن مشاهده نشد. بیان ژن گزارشگر در این کالوس‌ها زیاد و از نظر مقدار نزدیک به بیان ژن *GUS* تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S بود. زیاد بودن بیان ژن *GUS* با القای اتانول و عدم بیان آن در شرایط قبل از القا، کارایی این پیشبر در شرایط القایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، انتقال ژن، پیشبر القا شونده با اتانول، پرتوپلاست، سلول‌های نگهبان روزنه، ژن گزارشگر *GUS*

۱. دانشجوی سابق گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران
۴. دانشجوی گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران
*. نویسنده مسوول

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پس از توالی یابی ژنوم گیاهان مختلف و کشف ژن‌ها، لازم است که اثر ژن بر مورفولوژی، مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی معلوم شود (Ren *et al.*2003). یکی از روش‌های ارزیابی عملکرد یک ژن، بیان آن درگیاه، به صورت تنظیم شده است. انتقال ساختار القایی به همراه ژن مورد مطالعه به گیاه، اطلاعات ارزشمندی از اثرات بیان ژن در شرایط مختلف رشد را نشان می‌دهد. تاکنون پیشبر دایمی (Constitutive promoter) CaMV 35S برای بیان ژن‌های مختلف در گیاهان استفاده شده است، اما استفاده از این پیشبر و بیان دایمی برخی ژن‌ها، باعث خسارت یا مرگ در گیاه می‌شود. هم‌چنین ممکن است بیان یک ژن در یک بافت خاص یا یک مرحله خاص از رشد گیاه مورد نظر باشد. در این مورد می‌توان بیان ژن‌های مقاومت به آفت‌ها یا علف‌کش‌ها، القای گلدهی هم‌زمان گیاهان و ایجاد نرعقیمی را نام‌برد که در کلیه این موارد به کنترل بیان ژن مورد نظر نیاز می‌باشد (Li *et al.* 2005). برای این منظور، تنظیم بیان شیمیایی معرفی شده است که با افزودن یا حذف مواد شیمیایی خاص، می‌توان بیان ژن مورد نظر را خاموش یا روشن نمود. پیشبر القا شونده با اتانول یکی از پیشبرهایی است که در آزمایشگاه و مزرعه قابل استفاده است (Padidam 2003). این پیشبر از قارچ *آسپرژیلوس نیدولانس* (*Aspergillus nidulans*) جداسازی شده است که بیان ژن را در مرحله رونویسی تنظیم می‌کند (Felenbok *et al.*1988). پیشبر القا شونده با اتانول، شامل دو واحد رونویسی است. واحد اول alcR است که تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S همراه با ژن *alcR* از قارچ آسپرژیلوس نیدولانس است و واحد دوم، از ژن هدف به همراه یک پیشبر حداقل از CaMV 35S و یک ناحیه فعال کننده بالادست پیشبر alcA تشکیل یافته است. در غیاب اتانول، پروتئین ALCR از واحد اول بیان می‌شود اما غیر فعال است و نمی‌تواند به پیشبر *alcA* متصل شده و در نتیجه ژن هدف بیان نمی‌شود. هنگامی که اتانول به محیط اضافه شود، پروتئین ALCR با اتانول واکنش داده و ساختار فضایی آن تغییر می‌یابد و به شکل فعال خود تبدیل می‌شود. این عامل رونویسی فعال شده به پیشبر *alcA* متصل می‌شود و در نتیجه ژن هدف در پایین دست رونویسی می‌گردد. وقتی اتانول حذف شود پروتئین ALCR فعالیت خود را از دست داده و از ناحیه پیشبر *alcA* رها می‌شود و بیان ژن نیز پایان می‌پذیرد (Caddick *et al.* 1998).

پیشبر القا شونده با اتانول در تنظیم بیان ژن در گیاهانی نظیر آرابیدوبسیس، توتون، کلزا، سیب زمینی، گوجه فرنگی و برنج مورد استفاده قرار گرفته است (Caddick *et al.* 1998., Deveaux *et al.* 2003., Roslan *et al.* 2001., Salter (*et al.* 1998. and Sweetman *et al.* 2002 اما این پیشبر تاکنون در گیاه چغندرقند بررسی نشده است. در این پیشبر عامل القا کننده ارزان، غیر سمی و قابل تجزیه می‌باشد و قابلیت استفاده در آزمایشگاه و مزرعه را دارد. علاوه بر آن می‌توان اتانول را با روش‌های مختلفی نظیر پاشیدن بر روی قسمت‌های علفی، خیساندن ریشه‌ها در محلول حاوی اتانول و اتانول تبخیر شده نیز استفاده نمود (Caddick *et al.* 1998; Deveaux *et al.* 2003; Roslan *et al.* 2001; Sweetman *et al.* 2002). این پیشبر، القای ناچیزی در برابر تنش‌های مختلفی نظیر زخم، سرما، گرما یا تیمارهای اسید سالسیلیک یا متیل جاسمونات‌ها دارد (Caddick *et al.* 1998; Deveaux *et al.* 2003; Roslan *et al.* 2001; Salter *et al.* 1998; Sweetman *et al.* 2002)

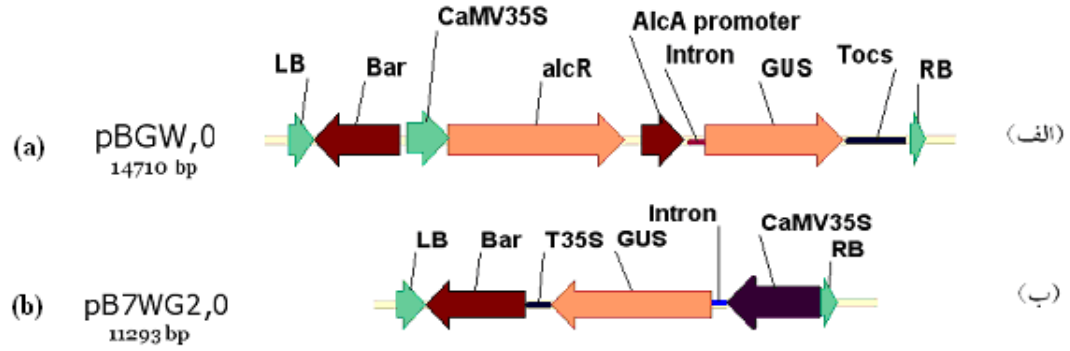
چغندرقند مهم‌ترین گیاه تولید شکر در ایران و نواحی معتدل است. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک امکان انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های مختلف و یا صفات با ارزشی نظیر مقاومت به علف‌کش‌ها برای افزایش عملکرد و کیفیت محصول چغندرقند وجود دارد. کنترل بیان این ژن‌ها در زمان مناسب بسیار با ارزش خواهد بود. بنابراین نیاز است که پیشبر القا شونده با اتانول به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای کنترل بیان ژن در گیاه چغندرقند مورد بررسی قرار گیرد. این مقاله اولین گزارش بررسی پیشبر القا شونده با اتانول در گیاه چغندرقند در جهان است.

مواد و روش‌ها

برای انتقال ژن به گیاه چغندرقند، ابتدا سلول‌های نگهبان روزنه به شرحی که خواهد آمد از برگ جدا و پروتوپلاست تهیه شد. سپس از پرتوپلاست‌ها کالوس تهیه و با استفاده از آگروباکتریوم ژن مورد نظر به کالوس‌ها منتقل شد. سازه‌های (Constructs) مورد نیاز از دانشگاه Wageningen هلند تهیه شد. پلاسمید دوگانه pBGW,O حامل ژن GUS اینترون‌دار است که تحت کنترل پیشبر القا شونده قرار دارد که نقشه ژنتیکی آن در شکل ۱- الف نشان داده شده است. هم‌چنین برای مقایسه از پلاسمید دوگانه pB7WG2,O حاوی ژن GUS اینترون‌دار تحت کنترل پیشبر دایمیCaMV 35S استفاده شد (شکل ۱- ب).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: سازه‌های ژنی مورد استفاده در انتقال ژن به کالوس‌های چغندرقند (a): سازه حاوی ژن *GUS* اینترون‌دار تحت کنترل پیشبر القا شونده با اتانول (b): سازه حاوی ژن *GUS* اینترون‌دار تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S

Figure 1. Constructs used for gene transfer into calli of sugar beet. a. The construct containing gus-intron gene under control of the ethanol induced promoter. b. The construct containing gus-intron gene under control of the CaMV 35S promoter.

تهیه و کشت پروتوپلاست از سلول‌های نگهبان روزنه

در این پژوهش از چغندرقند لاین NF برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد. پس از ضدعفونی بذرهای چغندرقند و جوانه زنی بذور، جوانه انتهایی کشت و پس از چهار هفته، از برگ‌های جوانه‌های انتهایی برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد (Hall *et al.* 1993). حدود ۱/۵ گرم پهنک برگ استریل تهیه و در داخل همزن برقی حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد به مدت دو دقیقه با سرعت کم خرد گردید. مخلوط حاصل با استفاده از غربال نایلونی ۳۰۰ میکرومتری فیلتر شده و با آب مقطر استریل شسته شد و قطعات اپیدرم روی فیلتر، به یک پتری‌دیش نه سانتی‌متری منتقل گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول CPW9MCa (نمک‌های CPW به همراه ۹٪ مانیتول، ۳/۸٪ (w/v) CaCl2, 2H2O) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک دقیقه با دور ۵۵g سانتریفوژ شد و روشناور حذف گردید و سپس رسوب حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر محلول هضم (محلول هضم شامل نمک‌های CPW به همراه ۹٪ مانیتول، mM n-propyl gallate ۰/۲۵، ۰/۵٪ (w/v) سلولاز RS و ۳٪ Macerozyme R10 بود) حل گردید. هر پنج میلی‌لیتر از محلول به یک پتری‌دیش ۶۰ میلی‌متری منتقل شد و به مدت ۱۶ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به آرامی مخلوط شد. محصول هضم از غربال‌های نایلونی ۲۹۷ و ۵۵ میکرومتری عبور داده شد. محلول فیلتر شده با یک حجم محلول فیلتر استریل شده ایزواسمتیک دارای ۷۵ درصد پرکول و ۱۵ درصد ساکارز مخلوط گردید و به ۱۲ لوله آزمایش ۱۲ میلی‌لیتری منتقل شد. در هر لوله ابتدا یک میلی‌لیتر محلول CPW15S (نمک‌های CPW به همراه ۹٪ مانیتول، ۰/۲۵ Mm n-propyl gallate و ۱۵٪ ساکارز) با دقت روی سوسپانسیون پروتوپلاست ریخته شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول9M (۹٪ مانیتول و 1mM $CaCl_2$, 2 H_2O) اضافه شد. با انجام سانتریفوژ با سرعت ۵۵g به مدت ۱۰ دقیقه، سلول‌های نگهبان روزنه در لایه 9M جمع‌آوری شدند. پروتوپلاست‌های جمع‌آوری شده در داخل آلژینات کلسیم قرار داده شدند و در محیط کشت K&P تغییر یافته مطابق روش پیشنهاد شده کشت شدند (Hall *et al.* 1993).

انتقال ژن به کالوس‌های حاصل از کشت پروتوپلاست

پس از ۱۸ روز، صفحه آلژینات کلسیم حاوی پروتوپلاست‌ها به صورت نوارهایی با عرض پنج ۵ میلی‌متر برش داده شده و به محیط کشت جامد PGo حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند (De Greef & Jacobs 1979). پس از یک هفته، نوارهای آلژینات با اگروباکتریوم تلقیح شدند. سلول‌های اگروباکتریوم سویه AGLO حاوی ناقل ژن *GUS* به همراه پیشبر دایمی CaMV 35S و یا پیشبر القا شونده با اتانول، در محیط کشت LB به‌صورت شبانه کشت داده شدند. سپس رسوب باکتری در محیط کشت مایع PGo (جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) حل شد. نوارهای آلژینات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس به محیط کشت توام PGo حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP منتقل شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. به‌منظور حذف آگروباکتریوم، نوارهای آلژینات به

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت جامد PG1B-BC (PGO حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP، ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و یک میلی‌گرم در لیتر علف‌کش بایلوفوس) حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. پس از دو روز بر روی نوارهای آلژینات حاوی کالوس‌های تلقیح شده با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر دایمی CaMV 35S، آزمون هیستوشیمیایی GUS صورت گرفت و بیان موقت این ژن بررسی گردید (Sevenier *et al.* 1998). کالوس‌های کوچک از روی نوارهای آلژینات تلقیح شده با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر القا شونده اتانول به محیط کشت جامد PG1B-BC انتقال یافتند و به مدت ۱۵ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت، کالوس‌های رشد یافته مجددا به محیط کشت جامد PG1B-BC انتقال یافته و پس از ۱۰ روز آزمون هیستوشیمیایی GUS بر روی کالوس‌های رشد یافته انجام گردید و میزان بیان ژن گزارشگر در غیاب القا کننده اتانول مطالعه شد. سپس به میزان یک میلی‌لیتر اتانول یک درصد به محیط کشت اضافه گردید و بعد از ۲۴ ساعت مجدداً، روی همان کالوس‌ها، آزمون هیستوشیمیایی GUS انجام شد.

آزمون هیستوشیمیایی GUS

برای رنگ‌آمیزی با GUS، کالوس‌ها به مدت یک شب در محلول رنگ آمیزی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول رنگ آمیزی شامل Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، $CaCL_2, 2H_2O$ ۱۲۵ میلی مولار، $K_3(Fe(CN)_6)$ نیم مولار، $K_4(Fe(CN)_6)$ نیم میلی مولار، Triton-x-100 به میزان (v/v) ۰/۳٪ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر X-gluc با pH=۷/۰ بود (Hall *et al.* 1997).

نتایج و بحث

در این پژوهش استخراج پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه با موفقیت انجام شد. اغلب پروتوپلاست‌های جدا شده دارای پلاستیدهای مشخص، ذرات نشاسته بوده (Hall *et al.* 1995,1996) و قابلیت تقسیم سلولی داشتند. کشت این پرتوپلاست‌ها منجر به تولید کالوس‌های ترد در داخل آلژینات کلسیم گردید (شکل ۲). پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه برگی چغندرقند قادر به تقسیم سلولی هستند (Hall *et al.* 1995). سلول‌های نگهبان روزنه در اوایل نمو برگ تمایز می‌یابند و جمعیت یکنواخت و متمایز سلولی را تشکیل می‌دهند که در مراحل بعد نیز کمی تغییر می‌کنند (Sack 1987). این سلول‌ها دارای ویژگی خاصی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد در شرایطی که برای سلول‌های دیگر نامساعد است، زنده بمانند. سلول‌های نگهبان فاقد پلاسمودسماتا هستند و نسبت به سایر سلول‌ها موجودیت مستقل دارند. هم‌چنین تنها سلول‌هایی در برگ هستند که به تغییرات منظم پتانسیل اسمزی سازش یافته‌اند که آن‌هم به دلیل نقش اساسی پتانسیل اسمزی در عملکرد سلول‌های روزنه‌ای است (Sack 1987). به همین دلیل است که سلول‌های روزنه‌ای تنش‌های اسمتیک را در طی جداسازی پروتوپلاست بهتر تحمل می‌کنند (Hall *et al.* 1995). کالوس‌های حاصل از سلول‌های نگهبان، توان باززایی نوساقه را به میزان ۲۰ درصد دارند و از آن‌ها گیاهان کاملاً طبیعی حاصل می‌شود (۸). وجود این ویژگی‌ها، مناسب بودن این سلول‌ها را برای دستورزی ژنتیکی فراهم نموده است.

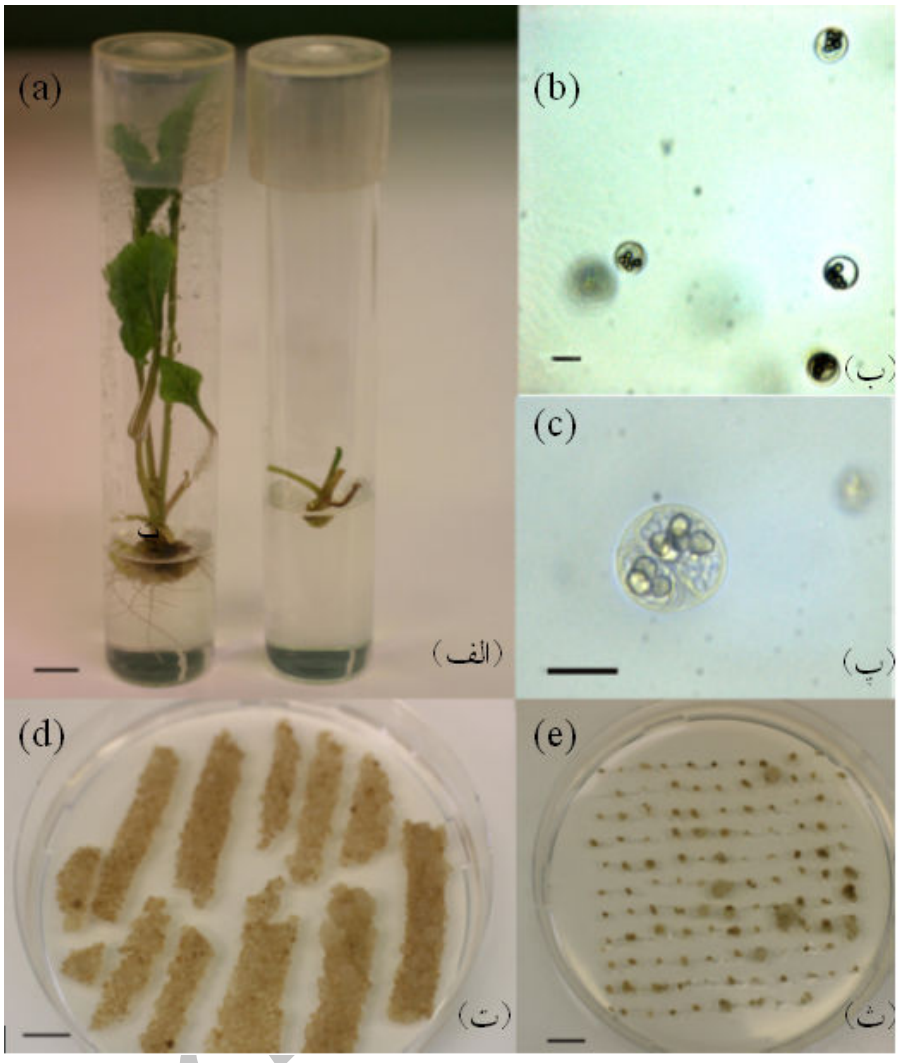
برای اطمینان از انتقال ژن *GUS* و عملکرد مناسب آن در گیاه، سنجش آنزیمی GUS با پیشبر CaMV 35S انجام شد. در سنجش GUS با روش هیستوشیمیایی با سوبسترای x-gluc ، در اثر فعالیت آنزیم بتا-گلوکورونیداز ژن *GUS* ترکیب X-gluc شکسته شده و تولید رسوب آبی رنگ می‌کند. فعالیت ژن گزارشگر *GUS*، انتقال و بیان آن‌را نشان می‌دهد. چون ژن *GUS* مورد استفاده در ناحیه T-DNA پلاسمید دارای اینترون می‌باشد، این ژن در سیستم پروکاریوتی قابل بیان نیست، بنابراین احتمال رنگی شدن بافت در اثر آلودگی با اگروباکتریوم وجود ندارد. کالوس‌های قرار گرفته در داخل آلژینات به‌خوبی رنگ آمیزی شدند و بیان بسیار خوب ژن *GUS* را نشان دادند. نتایج این آزمون بیانگر کارایی بسیار خوب انتقال ژن به کالوس‌ها می‌باشد (شکل ۳).

برای مطالعه بیان ژن گزارشگر *GUS* تحت پیشبر القا شونده با اتانول، تعداد ۴۰ کالوس تلقیح شده با اگروباکتریوم دارای سازه مورد نظر که در محیط انتخابی علف کش بایلوفوس به مدت یک ماه رشد یافته بودند، در شرایط قبل از القا (شکل ۴- a) و بعد از القا (شکل۴- b) با اتانول رنگ آمیزی شدند. پس از القا با اتانول، دو کالوس در چاهک‌های شماره A8 و E1 بیشترین میزان بیان ژن *GUS* را داشتند در حالی‌که قبل از القا با اتانول، بیان ژن مشاهده نشد. بیان ژن گزارشگر در این چاهک‌ها به میزانی نزدیک به بیان ژن *GUS* با پیشبر دایمی CaMV 35S در چاهک‌های شماره E5 و E7 بود. توانایی بیان ژن *GUS* با این پیشبر، به

Archive of SID

www.SID.ir

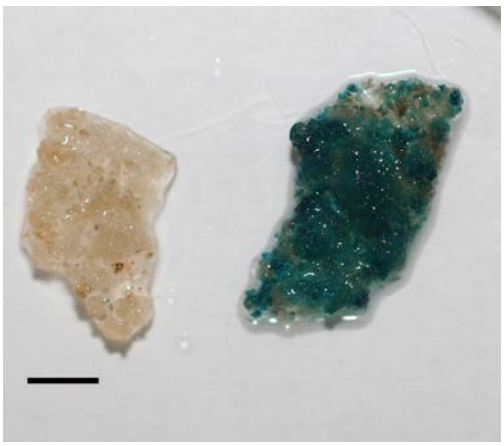
اندازه بیان این ژن با پیشبر دایمی CaMV 35S در گیاه است (Salter *et al.* 1998). بیان زیاد ژن *GUS* با استفاده از اتانول و عدم بیان این ژن در کالوس‌ها در شرایط قبل از استفاده از اتانول، کارایی این پیشبر را نشان می‌دهد.



شکل ۲: مراحل تهیه پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه چغندرقند، کالوس و تراریختی کالوس‌ها (الف): کشت درون شیشه‌ای جوانه انتهایی و رشد برگ‌ها برای استخراج پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه (مقیاس ۱ cm) (ب): پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه (مقیاس ۲۰ µm) (پ): تقسیم سلولی یک پروتوپلاست سلول نگهبان روزنه که در داخل آلژینات کلسیم قرار گرفته است (مقیاس ۲۰ µm). (ت): نوارهای آلژینات حاوی کالوس که با آگروباکتریوم تومه فاسینس تلقیح یافته‌اند. (مقیاس ۱ cm) ث) کالوس‌های کوچک انتقال یافته از نوارهای آلژینات به محیط کشت گزینش حاوی یک میلی گرم در لیتر علف کش بایلوفوس و رشد برخی کالوس‌های تراریخت (مقیاس ۱ cm)

Figure 2. Protoplast isolation and callus production from guard cells of sugar beet and gene transformation method, a. *In vitro* culture of shoot tips and leaves growth for guard cell protoplast isolation (bar = 1 cm) b. Guard cell protoplasts (bar = 20 µm) c. Cell division of a guard cell protoplast after stabilizing in calcium alginate (bar = 20 µm) d. The strips of alginate containing the sugar beet calli infected with *Agrobacterium tumefaciens* (bar = 1 cm) e. Transferring very tiny calli from alginate strips to selection medium containing 1 mg/l bialaphos and the growth of transgenic calli (bar = 1 cm).

www.SID.ir



شکل۳: آزمون هیستوشیمیایی ژن *GUS* نوارهای آلژینات حاوی کالوس‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم تومه فاسینس دارای سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر CaMV 35S همراه با نوار آلژینات تلقیح نشده به عنوان شاهد (مقیاس ۰/۵ cm)

Figure 3. Histochemical GUS assay of alginate strips containing calli infected by A. *tumefaciens* carrying a construct with a GUS-intron gene under control of a CaMV 35S promoter and a fragment of alginate without transformation as control (bar = 0.5 cm).

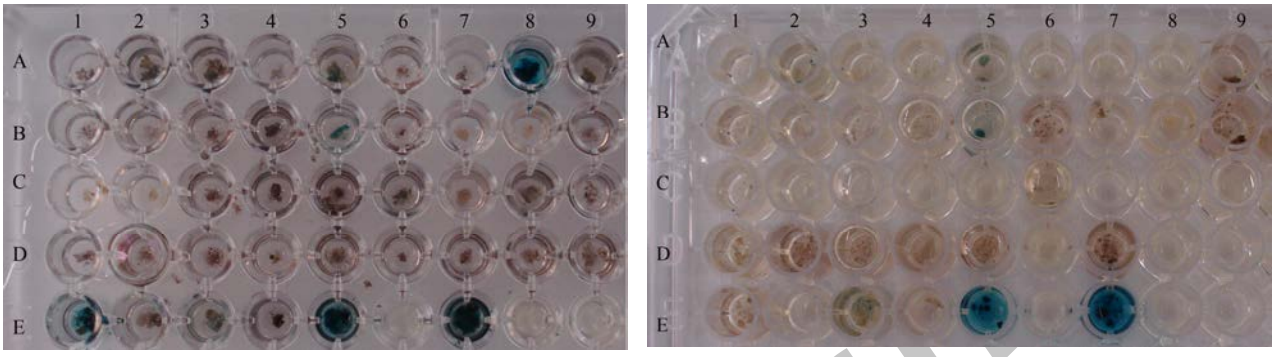
چنان‌چه در واحد بیانی alcR، پیشبر دایمی CaMV 35S با یک پیشبر خاص بافت گیاهی جایگزین گردد، امکان تنظیم بیان ژن در یک بافت خاص فراهم می‌گردد. از اتانول برای تنظیم بیان ژن در طی نمو و در یک بافت یا اندام خاص در گیاه آرابیدوبسیس استفاده شده است (Deveaux *et al.* 2003). در سازه بیانی، ژن *alcR* به‌وسیله پیشبرهای مختص بافت کنترل گردید. این پیشبرها در نواحی ویژه‌ای از جوانه رویشی و گلدهی بیان می‌شدند (Deveaux *et al.* 2003). غلظت کم اتانول تبخیر شده موجب بیان ژن در گیاهان توتون، سیب زمینی و کلزا شده است (Sweetman *et al.* 2002). در آزمایشی، تیمار یک برگ کلزا با اتانول تبخیر شده منجر به بیان ژن *GUS* فقط در همان برگ گردید و در گیاه توتون، با استفاده از اتانول نشان‌دار شده مشخص شد که اتانول به برگ‌های دیگر منتقل نشده است. بنابراین با در معرض قرار دادن قسمت‌های مختلف یک گیاه تراریخت با بخار اتانول ، می‌توان بیان ژن هدف را در یک اندام مشخص کنترل کرد (Sweetman *et al.* 2002).

نتایج این پژوهش مشخص نمود که قبل از القا با اتانول، در برخی از کالوس‌ها، نظیر چاهک‌های شماره A2، A5 وB5 (شکل ۴- a)، بیان ژن *GUS* به مقدار کم مشاهده می‌شود. بیان ژن گزارشگر در کالوس‌ها در شرایط درون شیشه ای در غیاب اتانول خارجی، وجود شرایط القا در این محیط را نشان می‌دهد. در یک مطالعه که ژن *GUS* به همراه پیشبر القا شونده با اتانول به گیاه آرابیدوبسیس منتقل شد و در گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه‌ای رشد یافته بودند، بدون استفاده از اتانول، فعالیت ژن *GUS* مشاهده شد. در مقابل، در گیاهچه‌های گلدانی، بیان این ژن مشاهده نشد (Roslan *et al.* 2001). هم‌چنین، با استفاده از ژن لوسیفراز به‌همراه پیشبر القا شونده با اتانول نشان داده شد که در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بدون استفاده از القاکننده (اتانول) بیان ژن لوسیفراز مشاهده می‌شود ولی در گیاهچه‌های گلدانی بیان این ژن مشاهده نمی‌شود (Roslan *et al.* 2001). باید در نظر داشت که گیاهان آنزیم الکل دهیدروژناز تولید می‌کنند (Dolferus *et al.* 1994). ریشه گیاهان اندام‌هایی هستند که در شرایط بی‌هوازی تنفس تخمیری انجام می‌دهند که محصول نهایی این روش تنفس، الکل است. تجمع اتانول داخلی در ریشه ممکن است این پیشبر را فعال کند. پیشبر اتانول در گیاه توتون در شرایط بی هوازی مصنوعی بسیار سخت فعال می‌شود (Salter *et al.* 1998). در گیاه آرابیدوبسیس رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای که در آن انتشار اکسیژن محدود است، میزان تنفس غیرهوازی در ریشه‌ها افزایش می‌یابد (Chung & ferl 1999). در پژوهش حاضر، در شرایط درون شیشه‌ای و بدون استفاده از اتانول، برخی کالوس‌ها فعالیت ژن *GUS* را نشان دادند که بیانگر حضور اتانول می‌باشد. ممکن است که کالوس‌ها نیز مانند ریشه در شرایط محدود اکسیژن محیط، تنفس بی هوازی انجام داده باشند و با تولید الکل موجب فعال شدن پیشبر و بیان ژن *GUS* در برخی کالوس‌ها شده‌اند، البته اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

مشخص شده است که یک ساعت پس از استفاده از عامل القا کننده (اتانول) نیز بیان ژن *GUS* قابل تشخیص است. در صورت عدم استفاده از اتانول، بیان ژن متوقف می‌گردد اما

www.SID.ir

می‌توان با استفاده مستمر اتانول، سطح بیان ژن را حفظ نمود. پیشبر القا شونده با اتانول، بسیار به اتانول حساس می‌باشد، به نحوی که با استفاده از ۰/۰۱ درصد اتانول نیز عمل القا، مشاهده شده است. لذا، غلظت اتانول مورد استفاده ابزار مناسبی برای کنترل سطح بیان ژن در این پیشبر بوده (Roslan *et al.* 2001) و می‌توان یک ژن را کوتاه مدت یا طولانی مدت بیان نمود (Caddick *et al.* 1998 & Deveaux *et al.* 2003).



(b) (a)

شکل۴: آزمون هیستوشیمیایی GUS کالوس‌های تراریخت احتمالی با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر القا شونده با اتانول بدون تیمار با اتانول (a) و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با اتانول (b). در هر دو شکل الف و ب: چاهک‌های E5 و E7 حاوی کالوس‌های تراریخت با سازه ژن GUS تحت پیشبر دایمی CaMV 35S به عنوان شاهد مثبت و چاهک‌های A، B، C، D و E1-4 حاوی کالوس‌های تلقیح شده با سازه ژن GUS تحت پیشبر القا شونده با اتانول

Figure 4. Histochemical GUS assay of candidate transgenic calli with construct containing a *GUS* reporter gene under control of the ethanol induced promoter before treatment with ethanol (a) and after treatment with ethanol (b). In the both figures a and b: Wells E5 and E7 containing transgenic calli with a *GUS* gene under control of the CaMV 35S promoter as positive controls and wells A, B, C, D and E1- 4 containing the candidate transgenic calli with a *GUS* gene under control of the ethanol induced promoter.

Archive of SID

تشکر و قدردانی

این پژوهش طی یک فرصت مطالعاتی در دانشگاه Wageningen هلند انجام شده است و هزینه آن توسط وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تامین شده است. از آقایان Ruud de Maagd و Jeroen van Arkel و خانم Tjitske Riksen-Bruinsma به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۶۱-۶۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir