Archive of SID

همسانه سازی و تعیین خصوصیات ژن مسئول بیوسنتز اسید اروسیک در گیاه کلزا

علی‌رضا زبرجدی*[۱،۲]، مختار جلالی جواران[۳]، علی هاتف سلمانیان[٤] و قاسم کریم زاده[۳]

[۱] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کرمانشاه، دانشگاه رازی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی تنشهای محیطی

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[٤] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری گیاهی

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲٦

چکیده

جنس براسیکا بر حسب میزان اسید اروسیک، به دو گروه عمده تقسیم می‌شود: گروه اوّل دارای مقادیر زیاد اسید اروسیک و دسته دوّم دارای مقادیر کم اسید اروسیک هستند. روغنهای دارای مقادیر بالای اسید اروسیک برای مصارف مختلف صنعتی و واریته‌هایی با قدرت تولید مقادیر کم اسید اروسیک برای مصارف خوراکی مطلوب می‌باشند. در این تحقیق جداسازی ژن و راه-انداز اختصاصی مسئول بیوسنتز آنزیم β -ketoacyl-CoA synthase (KCS) و تأثیر آن بر میزان اسید اروسیک در بذر گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور دو جفت آغازگر طراحی و با استفاده از تکنیک PCR از منبع DNA ژنومی اقدام به جداسازی ژن و راه‌انداز گردید. ژن و راه‌انداز ابتدا در ناقل عمومی pSK^+ همسانه‌سازی و پس از تعیین توالی و تأیید نهایی، در پلاسمید بیانی گیاهی (pBI121) همسانه‌سازی شدند. پلاسمید حاوی ساختار دست ورزی شده به واسطه *Agrobacterium* به گیاه کلزا منتقل گردید. به منظور اثبات انتقال ژن به گیاه آنالیزهای مولکولی PCR، Dot blot و Southern blot روی گیاهان انجام شد. در نهایت عملکرد ژن و تأثیر سازه منتقل شده از طریق ارزیابی میزان تغییرات اسید اروسیک روغن گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه شاهد توسط روش کروماتوگرافی گازی (GC) مشخص گردید. نتایج نشان داد که در ٤ گیاه تراریخت میزان اسید اروسیک افزایش چشمگیر نشان داد. بیشترین بیان سازه منتقل شده در نمونه شماره ٤ مشاهده گردید که در آن میزان اسید چرب C22:1 به حدود ۱۳ درصد نسبت به ۱/۱ درصد در گیاه شاهد رسید.

واژه های کلیدی: کلزا، همسانه‌سازی ژن *fae*، انتقال ژن، اسید اروسیک، آنزیم KCS

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۸۱۳۲۱۸۰۹، پست الکترونیکی: Zebarjadiali@yahoo.com

مقدمه

یکی از مهمترین گیاهان تامین کننده روغن در دنیا کلزا با نام علمی *Brassica napus L.* می‌باشد (۳). کلزا با تأمین ۱٤/۷ درصد روغن مورد نیاز جهان پس از نخل روغنی و سویا در مقام سوم قرار دارد. در سالهای اخیر گیاه کلزا در سطح جهانی به عنوان یکی از مهمترین نباتات روغنی مورد توجه قرار گرفته است. تولید روغن از جنس براسیکا که عموماً با نام کلزا شناخته می‌شوند از سه دهه قبل در دنیا افزایش یافت و به یکی از مهم ترین منابع روغن نباتی تبدیل شده است (۹). از جمله روشهای بهبود کیفیت روغن کلزا، تغییر در ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده آن می‌باشد. ساخته شدن زنجیره‌های طویل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع دارای مراحل مختلفی می‌باشد که هر یک از این مراحل توسط آنزیمهای متعدد کنترل می‌شود (۱). بیوسنتز اسید چرب یک مسیر متابولیکی اولیه

www.SID.ir

Archive of SID

است که برای رشد و توسعه بذر ضروری می‌باشد. این مسیر تا مرحله ساخته‌شدن اسیدهای چرب C18 در پلاستیدها و توسط یک مجموعه چند آنزیمی انجام می‌شود (۱٦، ۱۷ و ۳۷). اسیدهای چرب C16 و C18 اجزاء عمده آسیل گلیسرول‌های ذخیره‌ای بذر را تشکیل می‌دهند (۲۸ و ۳۲). در بسیاری از گیاهان عالی مانند گونه‌های براسیکا اسیدهای چرب دارای زنجیره‌های بسیار بلند (Very Long Chain Fatty Acids) و تعداد اتم‌های کربن بیشتر از ۱۸، مانند ایکوسانوئیک اسید (C20:1) و اسید اروسیک (C22:1) تولید می‌شود. این ترکیبات به عنوان پیش نیاز لایه‌های سطحی کوتینها و واکسها هستند (٤۰ و ٤۲). روغنهای دارای میزان بالای اسید اروسیک کاربردهای گسترده صنعتی دارند (۲۹ و ۳۲). بررسیهای زیادی برای تغییر مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب به منظور رسیدن به ترکیبات مناسب اسیدهای چرب روغن انجام شده است (۱۲ و ٤۱).

تغییراتی که در کیفیت روغن و کنجاله کلزا ایجاد شده منجر به شناسایی روغن این نبات به عنوان روغن برتر در مصارف خوراکی و کنجاله آن به عنوان یک منبع مهم پروتئین برای تغذیه دام گردیده است. سطح پایین اسیدهای چرب اشباع و سطح نسبتاً بالای اسیدهای چرب با یک باند غیر اشباع، بدون شک از عوامل اصلی مؤثر بودن روغن کلزا در کاهش کلسترول به شمار می‌رود (٤). در خصوص دانه‌های روغنی، بهبود کیفیت روغن به عنوان یک صفت مهم مد نظر است. کیفیت روغن در کلزا بر اساس نسبت اسیدهای چرب تشکیل دهنده آن تعیین می‌گردد. از جمله اسیدهای چرب تأثیر گذار بر کیفیت روغن در کلزا اسید اروسیک می‌باشد. محققین برای تغییر در ترکیب روغن، دو استراتژی را مورد استفاده قرار می‌دهند (۲۲) در استراتژی افزایش میزان بیان ژن با وارد کردن ژن یا ژنهای مورد نظر به درون گیاه می‌توان باعث بیان ژنهایی شد که قبلاً در گیاه وجود ندارند و یا باعث افزایش بیان ژنهای موجود در گیاه می شود. در این حالت انتظار می‌رود که محصول ژن مورد نظر نیز افزایش یابد. استراتژی دیگر که به خاموش کردن ژن معروف است، مبتنی بر بیان توالی غیر همسوی ژن می‌باشد. در این روش با وارد کردن یک ژن در جهت مخالف می‌توان یک مولکول anti- mRAN به دست آورد که به دلیل همولوژی با زنجیر mRNA که به طور طبیعی توسط کلزا تولید می‌شود تشکیل RNA دو رشته‌ای داده و این امر باعث تجزیه‌شدن mRNA و anti-RNA می‌شود (۱۳، ۲۰ و ۳۸). نتیجه این استراتژی کاهش در رونوشت و درنهایت محصول ژن مورد نظر می‌باشد.

علاوه بر روش‌های کلاسیک و متداول که به منظور تغییر در مقدار اسیدهای چرب در کلزا وجود دارد، امروزه می‌توان با استفاده از تکنیک های نوین، همچون مهندسی ژنتیک نیز به این امر نائل شد. آنزیم β -ketoacyl- (KCS) CoA synthase که آنزیم کلیدی در ساخته–شدن اسید اروسیک می‌باشد، توسط ژن Fatty Acid Elongase (*FAE*) کد می‌شود (۲۱). بیان ژن *FAE* در مرحله توسعه جنینی گیاه صورت می‌گیرد. لذا جداسازی راه‌انداز (Promoter) اختصاصی این ژن که می‌تواند کنترل طبیعی آن را فراهم آورد نیز ضروری می‌باشد. طراحی آغازگر، جداسازی و همسانه‌سازی ژن و راه‌انداز اختصاصی *FAE* از گیاه کلزا و تهیه ساختار همسو از این قطعات، انتقال به گیاه کلزا و ارزیابی اثرات آن از مهمترین اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روشها

مواد آزمایشی: از رقم Maplus کلزا با محتوای اسید اروسیک زیاد (High Erucic Acid Rapeseed) تهیه شده از کشور آلمان به عنوان منبع DNA ژنومی استفاده شد و رقم PF (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) که یک رقم بهاره می‌باشد جهت تراریختی مورد استفاده قرار گرفت. از باکتری *E. coli* سویه DH5α برای مراحل مختلف همسانه‌سازی و از *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) برای تراریختی گیاه و ناقلهای

www.SID.ir

Archive of SID

pSK+ و pBI121 نیز به ترتیب برای همسانه‌سازی های عمومی و انتقال ژن به گیاه استفاده گردید. باکتریها و پلاسمیدهای فوق از پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شدند. بذور رقم Maplus داخل گلدانهای معمولی کشت و در شرایط کنترل شده (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. پس از حدود یک ماه از گیاهان ٦-٤ برگی برای استخراج DNA با روش استاندارد استفاده شد (۱۰).

طراحی آغازگر : آغازگرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) به منظور جداسازی راه‌انداز (P1, P2) و ژن *FAE* (P3, P4) به شرح زیر براساس شماره دسترسی آنها (با شماره دسترسی AF275254 برای راه‌انداز و AF274750 برای ژن) با جایگاههای آنزیمی (در بالادست آغازگرها)، متناسب با پلاسمیدهای مورد استفاده، توالی ژن و راه‌انداز طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند.

P1(forward):5'-CCCAAGCTTTACAACGATACACAAAACTT
(29mer) *Hind*III
P2 (reverse):5'-GGACCCGGGTGCTCAGTGTGTGTGT
(25 mer) *Cfr9*I
P3 (forward):5'-CACCCCGGG ATGACGTCCGTTAACGT
(26 mer) *Cfr9*I رمز شروع
P4(reverse):5'-CATGAGCTC TTAGGACCGACCGTTTTGGA
(29 mer) *Sac*I

جداسازی و تعیین توالی راه‌انداز و ژن *FAE* : به منظور جداسازی راه‌انداز و ژن از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای P1 و P2 (برای تکثیر راه-انداز) و P3 و P4 (برای تکثیر ژن) استفاده شد. بهینه‌سازی شرایط تکثیر با انجام تغییرات در غلظتهای DNA (۳۰) ، غلظت یون Mg^{2+} و دمای اتصال آغازگر با رشته الگو صورت گرفت. در مرحله اول آزمایش از آنزیم تگ پلیمراز (*Taq* DNA polymerase) و پس از بهینه‌سازی سیستم از آنزیم پی اف یو پلیمراز (*pfu* polymerase) که دارای قدرت اصلاح اشتباه است برای جداسازی و تکثیر ژن و راه‌انداز استفاده شد.

همسانه سازی راه‌انداز و ژن در پلاسمید pSK+ : پس از تکثیر و تأیید اولیه راه انداز و ژن تکثیر شده (از طریق اندازه باند حاصل از PCR و هضم آنزیمی با آنزیمهای برشی)، محصولات PCR در پلاسمید pBluescript II SK+ همسانه‌سازی شدند. برای این منظور راه‌انداز با آنزیمهای *Hind*III و *Cfr9*I و ژن با آنزیمهای *Sac*I و *Cfr9*I برش داده شد و در دو واکنش جداگانه در ناقل pSK+ که با همین آنزیمها بریده شده بود، همسانه‌سازی گردید. پلاسمیدهای نوترکیب به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* (DH5α) منتقل شد. جهت انتخاب اولیه، باکتریهای حاوی پلاسمید نوترکیب روی محیط مک کانکی آگار (Mac-Conkey) حاوی آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت گردیدند (۳۱).

از کلونیهای سفید رنگ رشد یافته روی محیط فوق، کشت شبانه در محیط مایع LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین تهیه و استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام شد (۳۵). حضور قطعات در پلاسمید با هضم آنزیمی و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی تأیید گردید.

تهیه ساختار همسو (Sense) با استفاده از ژن و راه‌انداز اختصاصی *FAE* جداسازی شده : با توجه به اینکه از باکتری اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) جهت تراریزش گیاه کلزا استفاده شد، لذا ساختار همسو در ناقل بیانی pBI121 همسانه‌سازی شد. در این سازه ژنی، ژن *FAE* در جهت مستقیم در جلوی راه‌انداز اختصاصی خود همسانه‌سازی گردید. با توجه به نقشه‌های برشی که از ژن، راه‌انداز و پلاسمید pBI121 در دسترس است، ساختار مورد نظر طی دو مرحله جداگانه تهیه گردید. در مرحله اول راه‌انداز *FAE* به جای راه‌انداز CaMV 35S در pBI121 همسانه‌سازی شد. برای این منظور هضم دوگانه

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمید pSK^+ حاوی قطعه راه انداز (۱٤۳۲ جفت بازی) توسط آنزیمهای برشی *Hin*dIII و *Cfr*9I انجام شد. این قطعه توسط کیت (PCR clean-up Gel extraction) شرکت MN از ژل خالص‌سازی گردید. هم زمان هضم آنزیمی پلاسمید بیانی pBI121 که حاوی ژن *gus* و راه انداز CaMV 35S می‌باشد توسط آنزیمهای مشابه (*Hin*dIII - *Cfr*9I) صورت گرفت که نتیجه آن جداسازی راه انداز CaMV 35S از پلاسمید است. در نهایت اتصال بین قطعه ۱٤۳۲ جفت بازی و باقیمانده پلاسمید pBI121 انجام شد و محصول نهایی به باکتری *E. coli* مستعد منتقل گردید. جهت تأیید و اثبات همسانه‌سازی راه‌انداز در پلاسمید از روش PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. در نهایت همسانه‌های مثبت که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند انتخاب و پس از اطمینان از همسانه‌سازی راه‌انداز در پلاسمید pBI121، مرحله دوم همسانه‌سازی یعنی جایگزین کردن ژن *FAE* به جای ژن *gus* در این پلاسمید نوترکیب انجام شد. برای این منظور ژن تکثیر شده و پلاسمید نوترکیب به طور جداگانه تحت تأثیر آنزیمهای *Cfr*9I و *Sac*I قرار گرفتند. این هضم در پلاسمید باعث جداسازی ژن *GUS* گردید که در نهایت با اتصال بین ژن *FAE* هضم شده و پلاسمید فاقد ژن *gus*، سازه همسو حاصل گردید. پلاسمید نوترکیب پس از تأیید به روش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از روش انجماد و ذوب کردن به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل گردید.

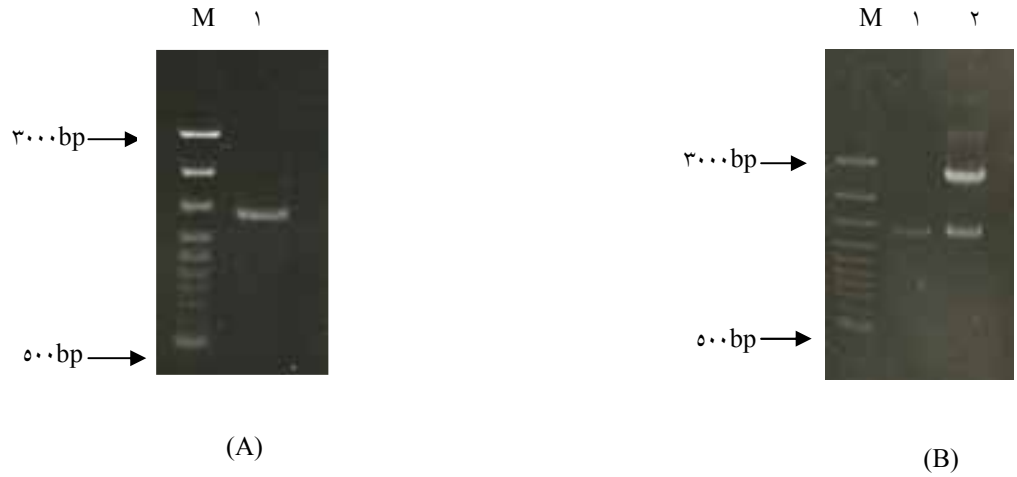
انتقال سازه تهیه شده به گیاه کلزا: آماده سازی بذور و تراریختی گیاه کلزا به روش تغییر یافته مولونی و همکاران (۲٦) انجام شد. بر این اساس بذور رقم کلزای PF پس از سترونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به محیط جوانه‌زنی (محیط کشت MS با۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار) با pH برابر ۵/۸ منتقل و در شرایط کنترل شده ۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برگهای لپه‌ای از گیاهچه‌های ۵ روزه جدا و پس از حذف مریستم انتهایی روی محیط کشت MS حاوی ٤/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون ٦- بنزیل آمینوپورین (BAP) قرار گرفتند و به مدت ۲٤ ساعت (به عنوان پیش‌کشت) در شرایط کنترل شده فوق نگهداری شدند. به منظور تراریخت نمودن ریزنمونه‌ها، از اگروباکتریوم حاوی ساختار مورد نظر استفاده شد. برای این منظور کشت شبانه باکتریهای مورد نظر (حامل پلاسمید نوترکیب) در ۲۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب باکتریهای در محیط آلوده‌سازی (Infection medium) به حالت سوسپانسیون در آمدند ودمبرگهای کوتیلدونهای پیش تیمار شده به مدت ۱۰ ثانیه در محیط فوق قرار داده شد. سپس کوتیلدونها به محیط هم‌کشتی (Co-cultivation) که فاقد آنتی بیوتیک می باشد منتقل و به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. آنگاه به محیط القای شاخساره (Shoot induction medium) (محیط MS حاوی ٤/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل و هر دو هفته یک بار بر روی همان محیط واکشت شدند. پس از ٦ هفته نوشاخه‌های سبز تولید شده روی محیط انتخاب‌گر جدا و به محیط طویل شدن ساقه (محیط القای شاخساره حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین) که فاقد هورمون بود منتقل و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. سپس شاخه‌های طویل‌شده به محیط القای ریشه (محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون ایندول بوتیریک اسید) منتقل شدند. گیاهچه‌های جوان تراریخت پس از ریشه‌دار شدن به گلدانهای کوچک حاوی ماسه، ورمیکولیت و پرلیت (به نسبت ۲ : ۱ : ۱) منتقل و در شرایط کنترل‌شده از نظر میزان رطوبت و درجه حرارت نگهداری شدند.

تجزیه و بررسی گیاهان تراریخت با استفاده از PCR : در اولین مرحله، گیاهان تراریخت توسط PCR با آغازگرهای اختصاصی ارزیابی شدند. آغازگر رفتی

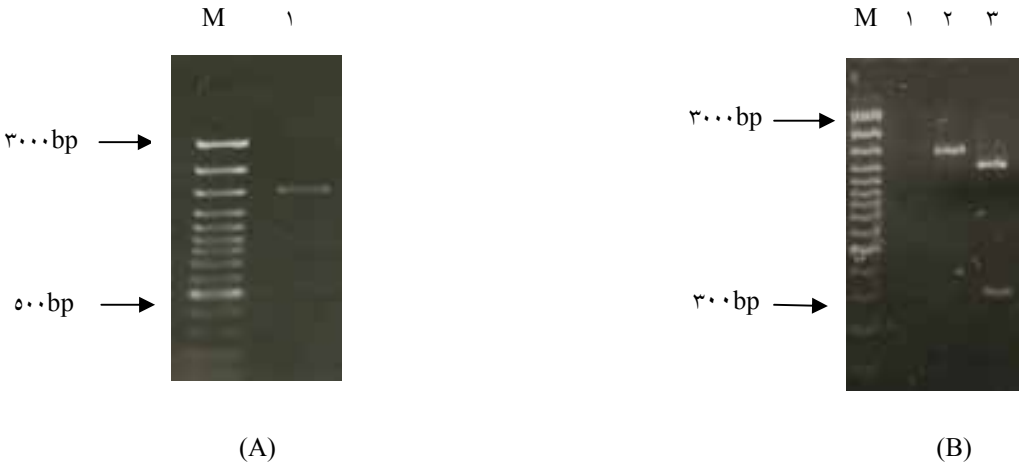
www.SID.ir

Archive of SID

S1:5'-ATTTACGCTGGTGATAATAGGTC که از داخل ژن مورد نظر طراحی شده است وآغازگر برگشتی با ترادف N2:5'-GCGATAATTTATCCTAGTTTGC) که از روی بخشی از خاتمه دهنده Nos (Nos terminator) طراحی شده‌اند، برای این منظور مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱ – تایید پلاسمید نوترکیب pSK+ حاوی راه انداز به کمک PCR و هضم آنزیمی پلاسمید حاوی راه‌انداز *FAE*. (A) قطعه تکثیر شده ۱٤۳۲ جفت بازی مربوط به راه انداز ژن *FAE* (ستون ۱)، (B) واکنش PCR بر روی پلاسمید نوترکیب pSK+ حاوی قطعه ۱٤۳۲ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای P1 و P2 (ستون ۱) و هضم اختصاصی آن توسط آنزیمهای *Cfr*9I و *Hind*III (ستون ۲) و M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



شکل ۲– تکثیر و هضم آنزیمی ژن *FAE*. A : ژن ۱۵۲۱ جفت بازی تکثیر شده با PCR (ستون۱)، B : کنترل منفی واکنش (فاقد الگو) (ستون ۱)، کلونی PCR بر روی پلاسمید حاوی قطعه ۱۵۲۱ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای P3 و P4 (ستون ۲)، الگوی هضم آنزیمی ژن با آنزیم *Eco*RV (ستون۳) آنزیم *Eco*RV ژن را در یک محل بریده و تولید قطعاتی به طول ۱۱۹۰ و ۳۳۱ جفت باز می‌کند، M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه لکه گذاری نقطه‌ای (Dot Blotting) : بـه منظـور حصول اطمینان از حضور ساختار منتقـل شـده بـه گیاهـان تراریخـت، پـس از اسـتخراج DNAی ژنـومی از گیاهـان تراریخت احتمالی، مبادرت به انجـام لکـه‌گـذاری نقطـه‌ای DNA شد (۳۵). برای این منظور ابتدا کاوشگر مناسـب بـه روش PCR بـا اسـتفاده از کیـت PCR DIG Probe Synthesis Kit مربوط به شرکت Roche آلمان تهیه شـد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر همان آغازگرهـای S1 و N2 بود. کاوشگر تولید شده قطعه‌ای به طول ۹۹٦ جفـت باز است که حدود ۷۵۸ جفت باز ازداخل ژن و ۲۳۸ جفت باز از بخش خاتمه دهنده Nos را شامل می‌شود.

هیبریداسـیون سـادرن (Southern Blotting): روش سادرن به منظور اثبات انتقال ژن و همچنـین تعـیین تعـداد نسخه‌های ژن منتقل شده مورد استفاده قرار گرفـت. مقـدار ۱۵ میکروگـرم از DNA ژنـومی گیاهـان تراریخـت توسـط آنزیم برشی *Eco*RV به طور کامل هضم و سـپس قطعـات حاصله روی ژل آگارز ۰/۸ درصد از هـم تفکیـک شـدند. سپس DNA، واسرشت شده و از ژل به غشـاء نـایلونی بـا شارژ مثبت شده منتقل شد. DNA منتقل شده، ابتدا بر روی غشاء ثابت و سپس با کاوشگر تهیه شده، مجـاور گردیـد و در نهایت باندهای پیوند شده با نشانگر بـه وسـیله سیسـتم رنگ زا آشکار گردید (۳۵). شرایط دورگه‌سازی سادرن نیز با تغییر در غلظت بافرهای شستشـو و دمـای هیبریداسـیون بهینه گردید.

اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب در بذور گیاهان تراریخت: به منظور بررسی میزان تغییر در اسیدهای چرب گیاهان تراریخت اقدام به اندازه‌گیری درصد اسیدهای چرب موجود در روغن دانه به روش کروماتوگرافی گازی شد. برای این منظور ابتدا از بذور، چربی استخراج و سپس عمل مشتق سازی و متیله کردن اسیدهای چرب در نمونه‌های روغن به روش متکالف و همکاران، 1996 انجام شد (۲٤). مقدار ۰/۲ میکرولیتر از هر نمونه به دستگاه تزریق گردید. با مشاهده پیک مربوط به هر اسیدچرب و با استفاده از زمان خروج هر پیک ، اسیدهای چرب موجود در نمونه‌ها شناسایی و درصد آنها تعیین گردید.

نتایج و بحث

جداسازی راه‌انداز و ژن *fae* با استفاده از روشPCR : پس از بهینه‌سازی شـرایط PCR، قطعـه DNA تکثیـر شـده مربوط به راه‌انداز (۱٤۳۲ جفت باز) (شـکل ۱–A) و قطعـه مربوط به ژ *fae* (۱۵۲۱ جفت بـاز) (شـکل ۲– A) تکثیـر گردید.

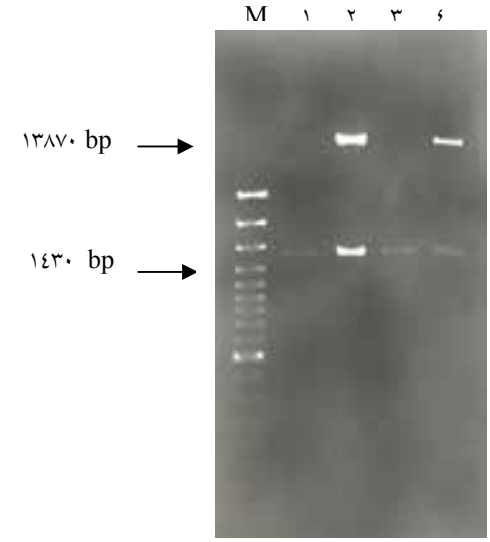
تجزیـه و تحلیـل راه‌انـداز و ژن جداسـازی شـده بـا آنزیمهای برشی: تجزیه آنزیمـی توسـط آنزیمهـای برشـی *Xba*I و *Eco*RI برای راه‌انداز انجام شد. با توجـه بـه نقشـه برشـی بـه دسـت آمـده از راه‌انـداز توسـط نـرم افـزار Webcutter2 از آنزیمهای فوق برای هضم آنزیمی استفاده شد. الکتروفورز محصولات به دست آمده از هضم آنزیمـی توسط هر دو آنزیم برشی تکثیر صحیح قطعه را تأیید نمود. بـرای هضـم ژن *fae* از آنزیمهـای *Eco*RV و *Hin*dIII استفاده شد. کنترل قطعات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد دلیلی برصحت تکثیر قطعه تولید شده دارد (شکل ۲– B). همسانه‌سازی قطعات در ناقل pSK^+ توسـط هضـم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تأیید شد (شـکل ۱– B و ۲– B) . همسانه‌های حاوی قطعات مناسب جهت تعیـین توالی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج تعیـین تـوالی و انجـام تجزیـه آن (BLAST) صـحت قطعات تکثیرشده را اثبات نمود (۲).

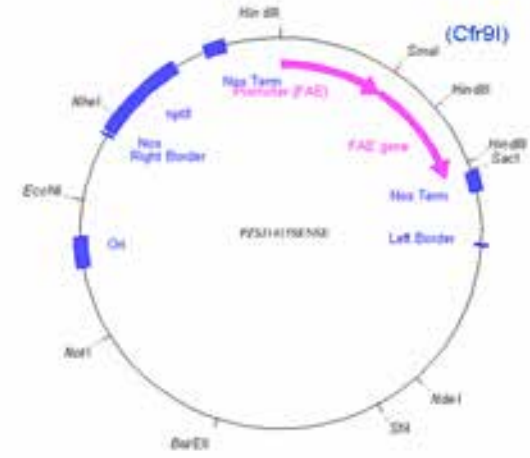
تهیه و بررسی ساختار راه انداز و ژن در ناقل بیانی pBI121 : چون این سازه ژنی طی دو مرحله تهیه گردید، در مرحله اول همسانه‌سازی راه‌انداز در ناقل انجام شده و صحیح بودن آن اثبات گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ – نتایج حاصل از PCR کلنی باکتریهای حاوی پلاسمید pBI121 نوترکیب و هضم آنزیمی آن.
خط M : مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. خط ۱ و ۳: تائید کلونی ها توسط روش PCR و تولید قطعه ۱٤۳۰ جفت بازی. خط ۲ و ٤: هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 نوترکیب حاوی قطعه پیشبرنده توسط *Hin*dIII و *Cfr*9I (قطعات ۱٤۳۲ و ۱۳۸۷۰ جفت بازی ایجاد شده).



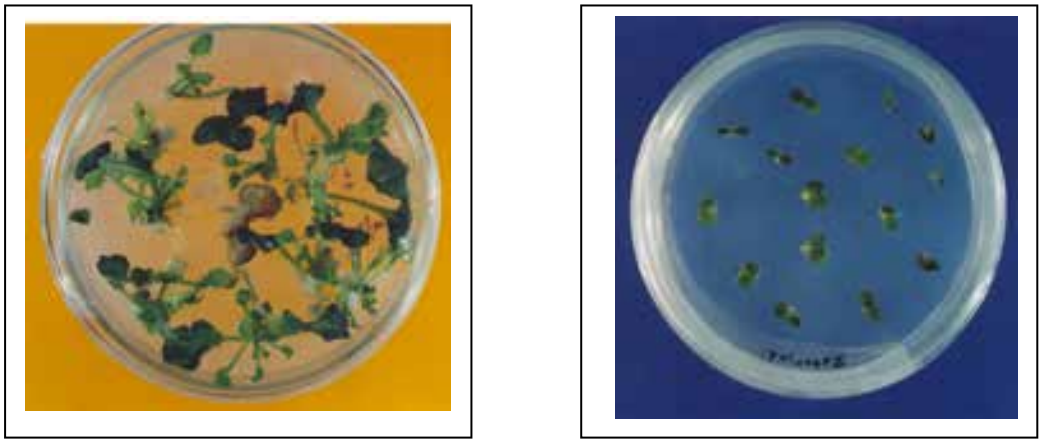
شکل ٤- شمایی از راه‌انداز و ژن همسانه سازی شده در پلاسمید pBI121. راه انداز ژن *fae* به جای راه‌انداز CaMV35S و به جای ژن *gus* ژن *fae* در جهت مستقیم و به خای ژن *gus* همسانه‌سازی شده‌است.

برای این منظور بر روی همسانه های رشد یافته در محیط کشت جامد، حاوی آنتی بیو تیک کانامایسین، واکنش PCR انجام شد. نتیجه این آزمایش وجود قطعه ۱٤۳۲ جفت بازی را تأیید نمود. همچنین با استفاده از هضم اختصاصی پلاسمید هاید نوترکیب توسط آنزیمهای *Hin*dIII و *Cfr*9I این ساختار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نتایج به دست آمده دال بر صحت همسانه‌سازی راه‌انداز در ناقل pBI121 می‌باشد (شکل-۳). پس از اطمینان از صحت مرحله اول همسانه‌سازی، شکل نهایی پلاسمید پیش بینی گردید تا آنالیز های بعدی با سهولت انجام پذیرد. شکل شماتیک ساختار همسو تهیه شده تحت کنترل راه انداز *fae* در شکل ٤ ارائه شده است. برای این منظور، PCR بر روی همسانه‌های مشکوک توسط آغازگرهای اختصاصی P1 و P4 انجام شد. وجود قطعه حدود ۳۰۰۰ جفت بازی دال بر همسانه‌سازی راه انداز و ژن *fae* در جهت مستقیم در این همسانه‌ها می‌باشد. از طرف دیگر پس از استخراج پلاسمید از همسانه‌های انتخاب شده در مرحله قبل اقدام به هضم آنها با آنزیم *Hin*dIII شد. در صورتی که سه قطعه با طولهای تقریبی ۱۲۱۰۰، ۲۱۰۰و ۸۱۰ جفت بازی ایجاد شود، همسانه سازی با موفقیت انجام گرفته است.(داده ها به نمایش در نیامده است).

به منظور بررسی اثر ساختار همسو بر تولید اسید اروسیک در بذور توسعه یافته گیاهان کلزای تراریخت، ساختار تهیه شده که در ناحیه T-DNA ناقل بیانیpBI121 همسانه‌سازی شده بود توسط باکتری اگروباکتریوم (به روش گزارش شده توسط مولونی و همکاران، ۱۹۸۹) به گیاه کلزا منتقل شد (۲٦). گیاهان باززایی شده از کوتیلدون‌های کشت شده که روی محیط حاوی ۲۵ میلی-گرم در لیتر کانامایسین زنده مانده و رشد کردند (شکلهای ۵ و٦). پس از سازگاری تدریجی، این گیاهان به گلخانه منتقل شدند. با وجود رشد گیاهان حاصله بر روی محیط حاوی کانامایسین که می‌تواند دلیلی بر تراریختی آنها باشد، بررسیهای مولکولی بیشتر برای اثبات تراریخت بودن گیاهان لازم است.

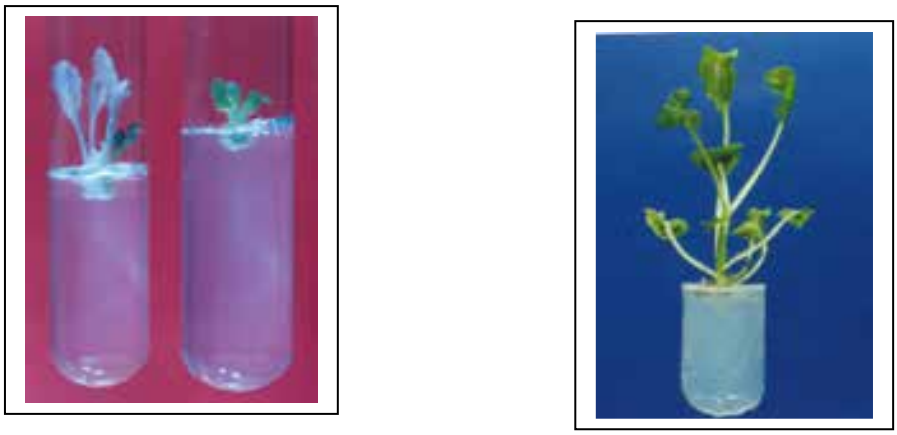
www.SID.ir

Archive of SID



(الف) (ب)

شکل ۵- کشت برگ‌های لپه‌ای ۵ روزه کلزا پس از تراریختی بر روی محیط گزینش‌گر القاء نوساقه (الف) و تولید نوساقه سبز در بعضی از کوتیلدون‌ها (ب).



(الف) (ب)

شکل ٦- نوساقه تراریخت کلزا در محیط طویل‌شدن. شرایط محیط انتخابی ا ست. (الف): نمونه‌ای از نوساقه طویل‌شده تراریخت در محیط حاوی کانامایسین (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و (ب): مقایسه نوساقه تراریخت، سبز، و غیرتراریخت، سفید، روی محیط کشت حاوی کانامایسین .

PCR حاصل از DNA ژنومی این گیاهان با آغازگرهایی که از داخل ژن *fae* (آغازگر S1) و بخشی از خاتمه دهنده Nos (آغازگر N2) طراحی شده بود باعث تکثیر قطعه ۹۹٦ جفت بازی گردد که در گیاهان تراریخت قابل تشخیص بود. اگرچه گیاهان شاهد دارای ژن *FAE* هستند ولی چون فاقد توالی خاتمه دهنده Nos می‌باشند امکان تکثیر قطعه مذکور در آنها وجود نخواهد داشت (شکل ۷). جهت تأیید محصول PCR، قطعه حاصله توسط آنزیم *Sac*I هضم شد. با توجه به وجود جایگاه برشی این آنزیم در محصول تکثیر شده همان گونه که انتظار می‌رفت پس از هضم آنزیمی دو قطعه به طول ۲۳۸ و ۷۵۸ جفت بازی تولید شد (داده ها ی مربوط به هضم آنزیمی به نمایش در نیامده است).

نتایج لکه گذاری نقطه‌ای با توجه به اتصال کاوشگر به نسخه یا نسخه‌های ژن منتقل شده به گیاه بیانگر انتقال موفق سازه به گیاهان مورد بررسی می‌باشد (شکل ۸). با

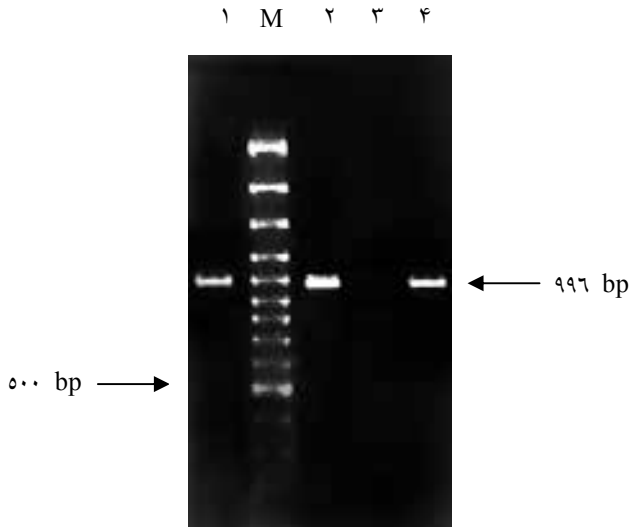
www.SID.ir

Archive of SID

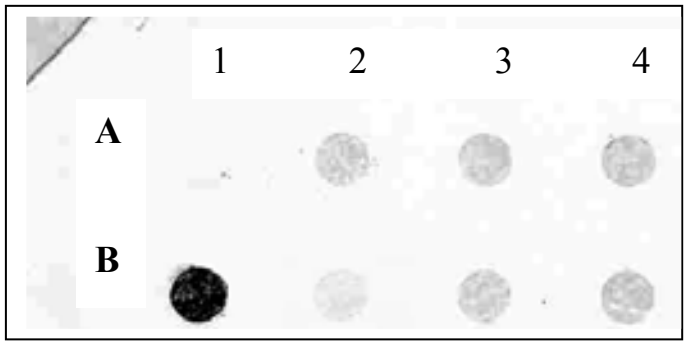
توجه به اینکه کاوشگر تهیه شده حدود ۷۵۸ جفت باز با ژن *fae* شباهت دارد لذا کاملاً طبیعی است که در گیاهان معمولی نیز لکه‌هایی (کمرنگ تر) مشاهده گردد. در شرایط اولیه انجام لکه‌گذاری نقطه‌ای، دمای هیبریداسیون ٦٤ درجه سانتی گراد و غلظت بافرهای شتسشو بالا بود (2X SSC و 0.1% SDS).

در این شرایط در آزمون بلات، زمینه غشاء به صورت تیره مشاهده گردید که با اعمال شرایط سخت (High stringency) نظیر کاهش در غلظت بافرهای شستشو (0.5X SSC و 0.1% SDS) و بالا بردن دمای هیبریداسیون تا ٦۹ درجه سانتی گراد، زمینه حذف گردید.

نتایج هیبریداسیون سادرن با دقت بیشتری نشان داد که سازه مورد نظر، با موفقیت منتقل شده است و در برخی از گیاهان تعداد کپی ژن منتقل شده بیش از یک نسخه می‌باشد. وجود باندهای حدود ۲۰۰۰ و ۳۵۰۰ جفت بازی که در کلیه نمونه‌ها دیده می‌شود به دلیل اتصال کاوشگر با ژنهای درونی *fae* می‌باشد (شکل ۹). این یافته نشان میدهد که از ژن مورد مطالعه حداقل ۲ نسخه در گیاه وجود دارد. بارت و همکاران، ۱۹۹۸ نشان دادند زمانی که از آنزیم *Eco*RV و کاوشگر ساخته شده از روی ژن *fae* جهت لکه گذاری سادرن در ارقام کلزا استفاده می‌شود(۵)، دو باند با اندازه‌های فوق قابل تشخیص است که بیانگر وجود دو کپی از ژن در ژنوم می‌باشد. از طرفی زمانی که از آنزیم *Xba*I برای هضم آنزیمی DNA کروموزومال استفاده شد یک باند به اندازه تقریبی ۹۰۰۰ جفت بازی مشخص گردید.



شکل ۷ - اثبات حضور ژن *fae* در حالت همسو از طریق آزمون PCR با آغازگرهای S1 و N2. خطوط ۱، ۲ و ٤ : گیاهان تراریخت (باند ۹۹٦ جفت بازی). خط ۳ کنترل منفی (DNA گیاه غیر تراریخت). خط M : مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.



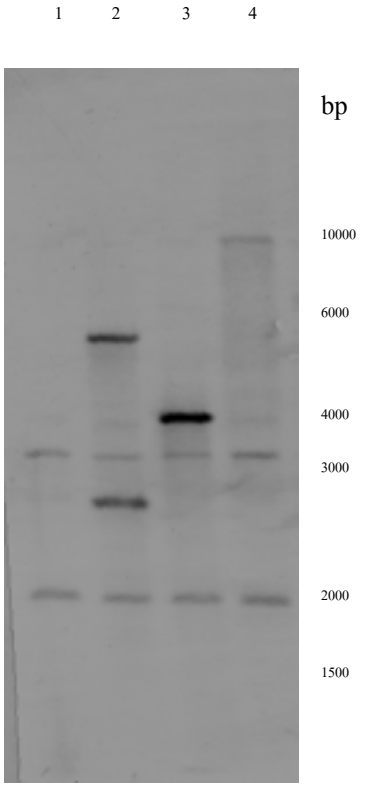
شکل ۸- لکه‌گذاری نقطه‌ای سازه همسو ژن *fae* با کاوشگر ۹٦٦ جفت بازی. نقطه B_1 : کنترل مثبت، پلاسمید pBI121 حاوی سازه، نقطه B_2 کنترل منفی، گیاه شاهد غیرتراریخت. بقیه نقاط مربوط به DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

نظیر آزمون لکه گذاری نقطه ای هنگامی که دمای هیبریداسیون ٦٥ درجه سانتی گراد و غلظت بافرهای شستشو بالا بود (2X SSC و 0.1% SDS) در غشای سادرن، زمینه و باندهای غیراختصاصی مشاهده می گردید که جهت حذف این موارد آزمایش با شرایط سخت (دمای هیبریداسیون ٦٩ درجه سانتی گراد و غلظت پایین بافر شستشو) انجام شد. در این مورد نیز وجود دو باند مشترک در همه نمونه‌ها به علت بالا بودن میزان همولوژی بین کاوشگر و ژنهای داخلی *fae* کلزا است، این همولوژی حدود ٧٦ درصد (٧٥٨ جفت باز از ٩٩٦ باز) می‌باشد (٥). از تفاوتهای بین سایر باندها، می‌توان به انتقال سازه و تعداد کپی منتقل شده پی‌برد (شکل ٩).

نتایج اندازه گیری اسیدهای چرب : پس از اثبات حضور ژن وتعیین تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده، به منظور ارزیابی اثر ساختار همسو بر میزان اسید اروسیک، گیاهان تراریخت از طریق اندازه‌گیری درصد اسیدهای‌چرب روغن دانه توسط کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که سازه منتقل شده به گیاهان توانسته است میزان این اسیدچرب را تغییر دهد. از ١٥ گیاه تراریخت که حاوی ساختار همسو بودند تعداد ٤ گیاه افزایش در میزان اسید اروسیک را نشان دادند به عبارتی حدود ٢٦ درصد از گیاهان ژن *fae* منتقل شده را بیان کرده‌اند. میزان اسید اروسیک در نمونه‌های شاهد حدود ١/١ درصد بود در صورتی که در ٤ گیاه تراریخت افزایش چشمگیری به شرح جدول ١ مشاهده گردید.



شکل ٩- الگوی هیبریداسیون سادرن گیاهان تراریخت با سازه همسو ژن *fae*. چاهک ١ : گیاه شاهد (باندهای ٢٠٠٠ و ٣٥٠٠ جفت بازی) چاهکهای ٢، ٣ و ٤ گیاهان تراریخت شده با ساختار همسو.

از طرف دیگر دو گیاه تراریخت با ساختار همسو (نمونه‌های شماره ٥ و ٦ در جدول ١) به جای افزایش در میزان اسید اروسیک، کاهش نشان دادند. این امر را می‌توان به خاموش شدن ژن *fae* در اثر تشابه با سازه منتقل شده دانست (هم‌فرونشانی). گزارشات متعدد توسط محققین در خصوص هم‌فرونشانی سایر ژنهای مؤثر در بیوسنتز اسیدهای‌چرب وجود دارد (١٤، ١٩، ٢٣ و ٣٩).

جدول٢ - تست t برای رقم PF حاوی ساختار همسو ژن *fae*

اسید چرب	میانگین دارای ساختار	میانگین شاهد	آماره محاسبه شده t
C22:1	٥/٨٥	١/١	٢/٣٧**
C18:2	١٨/١٤	٢٠/١٣	٥/٣**
C18:0	١/٦٨	١/٦٧	١٩/٢**

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ – آنالیز ترکیب اسیدهای چرب بذور کلزای تراریخت با ساختار همسو ژن *fae* تحت کنترل راه‌انداز اختصاصی

نمونه	درصد اسیدچرب *						
	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C22:1
شاهد	٤/٨	١/٦	٥٨/٨	٢٠/١	١١/٥	١/٤	١/١
١	٤/١	١/٦	٤٩/٣	١٨/١	١٠/٧	٢/٣	١٠/٠
٢	٤/٣	١/٦	٥٠/٠	١٨/٦	١٠/٥	٣/٠	٩/٣
٣	٤/٧	١/٨	٥٢/١	١٧/٦	٩/٢	٢/٥	٧/٠
٤	٤/٦	١/٨	٥١/١	١٧/٢	٩/٧	٢/٧	١٣/١
٥	٤/٣	٢/٠	٦٢/٩	١٧/٧	٦/٩	١/٢	٠/٢٤
٦	٤/٩	١/٢	٦٥/١	١٧/٦	٨/٥	١/١	٠/٢٠

*: C16:1 (پالمیتولئیک اسید) ;C18:0 (استئاریک اسید) ; C18:1 (اولئیک اسید) ; C18:2 (لینولئیک اسید) ;
C18:3 (α- لینولنیک اسید) ; C20:1 (گوندوئیک اسید) ; C22:1 (اروسیک اسید)

بحث

بررسیهای انجام شده توسط برخی محققین نشان داده است که ژن *fae* فاقد توالیهای اینترونی می‌باشد (۸، ۱۵، ۱۸ و٤٤)، با استناد به نتایج این محققین ژن مورد با روش PCR و طراحی آغازگر اختصاصی از منبع ژنومی جداسازی گردید. در صورت وجود اینترون در ژن لازم بود ابتدا کتابخانه cDNA تهیه و سپس اقدام به جدا سازی ژن مذکور از کتابخانه گردد. ژن *fae* توسط داس و همکاران از گونه‌های *B. oleracea* و *B. campesrris* شناسایی و همسانه‌سازی شده است. محصول این ژن آنزیمی به نام KCS می‌باشد (۸). همچنین توالی این ژن در گیاه آرابیدوپسیس (۱۸) و جوجوبا (۲۱) نیز گزارش شده است. بارت و همکاران، ۱۹۹۸ نیز دو توالی همولوگ برای ژن *fae* از جنینهای نارس کلزا جداسازی نمودند (۵). علاوه بر آن هان و همکاران (۲۰۰۱) توالی ژن *fae* و راه-انداز آن را (به ترتیب با شماره دسترسی AF274750 و AF275254) گزارش نمودند که از کامل ترین ترادف های ارائه شده است (۱۵). فورمن و همکاران نیز ترادف ناقص این ژن را در گونه *B. rapa* گزارش نمودند (۱۱). در مطالعه فوق تعداد ٥٠٤ نوکلوتید از ژن شناسایی و گزارش شده بود. مقایسه این ترادفها نشان داد که میزان حفاظت شدگی در آنها بسیار زیاد است و می توان با طراحی پرایمر عمومی تر اقدام به جداسازی این ترادف از منابع مختلف نمود.

با توجه به اینکه عملکرد این ژن در داخل بذر و در مرحله توسعه جنین است، لذا باید به گونه ای عمل کرد که ژن هدف به طور اختصاصی در بافت مورد نظر (بذر) بیان شود. به همین منظور همسانه‌سازی راه‌انداز اختصاصی *fae* صورت گرفت تا با استفاده از این توالی، بیان ساختار مورد نظر تنها در بذور کلزا صورت گیرد. علاوه بر آن چنانچه بتوان با استفاده از این راه‌انداز اختصاصی ژن را در بافت مورد نظر بیان و یا غیرفعال (خاموش) نمود در این صورت انتظار می‌رود بدون اثر بر بیان آن در سایر بافتهای گیاه، شاهد بیان بیشتر یا خاموش شدن ژن *fae* فقط در بذور بود. گزارشات مختلفی در رابطه با عملکرد اختصاصی راه-انداز *fae* در بذر وجود دارد (۵، ۱۵ و ۳۳). هان و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی گیاهان تراریخت که حامل ژن گزارشگر *gus* تحت کنترل راه‌انداز *fae* بود، نشان دادند که فعالیت این ژن فقط در بذور درحال توسعه گیاهان کلزای تراریخت قابل تشخیص است (۱۵).

در خصوص مصرف کانامایسین در محیط انتخاب برای کلزا تراریخت گزارشات متعددی وجود دارد که در بسیاری از این گزارشات مقدار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر توصیه شده است (۲٦، ۳٤ و ٤٥). در سال ۱۹۹۲، موکوپادیا و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و زانگ و همکاران (۱۹۹۹) مقدار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را برای انتخاب تراریختها استفاده نمودند. در این گزارشات تعداد زیادی از نوساقه‌های سبز نیز روی محیط انتخابی مشاهده شد که تراریخت نبودند. برای رفع این مشکل نوساقه‌های باززایی شده به محیط حاوی کانامایسین بیشتر(۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و کربوهیدرات کمتر منتقل نمودند که در نتیجه بعد از ۲ هفته نوساقه‌های غیرتراریخت، سفید و نکروزه شدند (۲۷ و ٤۵). در این تحقیق از استراتژی چندمرحله‌ای برای افزودن ماده انتخاب کننده استفاده شد. در مرحله اول غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده گردید. در مرحله بعد گیاهچه‌های کوچک به محیطی با میزان بالاتر آنتی بیوتیک کانامایسین (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردیدند. در این حالت فشار محیطی (غلظت کانامایسین) به قدری است که قادر است سلولهای غیرتراریخت نامطلوب را به راحتی از بین ببرد (شکل ٦ ب).

تجزیه لکه گذاری سادرن علاوه بر اثبات حضور ژن، تعداد نسخه‌های منتقل شده را نیزنشان داد. در تحقیق حاضر بین ۱ الی ۲ نسخه از ساختار به گیاهان تراریخت منتقل شده-است. تعداد نسخه‌های ژن وارد شده، ارتباط نزدیکی با روش انتقال ژن دارد. در روش استفاده از اگروباکتریوم، گزارش‌های متنوعی در ارتباط با تعداد نسخه‌های ژن وارد شده به گیاه وجود دارد. بعضی از محققین تعداد ژن وارد شده را وابسته به گونه اگروباکتریوم (*tumefaciens* یا *rhizogenes*) و حتی سوش مورد استفاده در یک گونه می‌دانند (۷). محققین مختلف تعداد نسخه‌های ژن انتقال یافته را بین ۱ تا ۲۰ مورد نیز گزارش نموده‌اند (٦، ۲۵، ۳٦ و ٤۳). در تحقیق حاضر نیز تعداد نسخه‌های ساختار منتقل شده بین ۱ تا ۲ نسخه می باشد که با نتایج به دست آمده توسط سایر محققان مطابقت دارد.

نتایج کروماتوگرافی گازی روغن دانه گیاهان تراریخت نسل T_0، تغییر در میزان اسیدهای‌چرب آنها را نشان داد (جدول ۱). با استفاده از آزمون t مشخص گردید (جدول ۲) که مقدار تغییر در اسیدهای‌چرب C22:1، C18:2 و C18:0 نسبت به شاهد معنی دار بوده و ساختار انتقال یافته با موفقیت توانسته باعث تغییر معنی‌دار در این اسیدهای-چرب گردد. نتایج نشان داد که دستورزی مسیرهای بیوسنتز اسیدهای چرب در گیاه کلزا امکان پذیر بوده و می توان با تغییر در ترکیب این مواد در دانه های روغنی، کاربرد های متنوعی را برای آنها در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از مساعدتهای فکری و مالی کلیه عزیزان در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و سپاسگزاری به عمل می آید.

منابع

۱. ابراهیم‌زاده، ح. (۱۳۷۷). فیزیولوژی گیاهی ٦ (بیوشیمی ترکیبات اولیه). مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ص ٦۵۳.

۲. زبرجدی، ع.، جلالی جواران، م.، سلمانیان، ع. ه.، کریم‌زاده، ق. و موسوی، ا. (۱۳۸۵). جداسازی و تهیه ساختار Antisense ژن *fae* و انتقال آن به گیاه کلزا (*Brassica napus*). مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۱-۳۷، شماره ۲. ص: ۲۵۷-۲۷۱.

۳. شریعتی، ش و قاضی شهنی زاده، پ. (۱۳۷۹). کلزا. وزارت جهاد کشاورزی، نشر آموزش کشاورزی. ص ۸۰.

4. Auld, D. L., Heikkinem, M. K., Erickson, D. A., Sernyk, J. L. and Romero, J. E. (1992). Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. Crop Science, 32: 657-662.

5. Barret, P., Delourme, R., Rendar, M., Domergue, F., Lessire, L., Delsenoy, M. and Roscoe, T. G. (1998). A rapeseed FAD1 gene linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid. Theor. Appl. Gen. 96: 177-186.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Berthomieu, P., Beilin, C., Charlot, F., Dore, C. and Jouranin, L. (1994). Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*)-molecular evidence for regeneration of chimeras. Plant Sci. 96: 223-235.
7. Bhalla, P. L. and Smith, N. (1998). *Agrobactrium* tumefaciens-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. botrytis. Molecular breeding. 4: 531-541.
8. Das, S., Roacoe, T.J., Delseny, M., Srivastava, P.S. and Lakscmikumaran, M. (2002). Cloning and molecular characterization of the Fatty Acid Elongase 1 (FAE1) gene from high and low erucic acid lines of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*. Plant Sci. 162: 245-250.
9. Doweny, R.K., and Robbelie, G. (1989). Brassica species. In: Robbelen, G., Doweny, R.K., and Ashri, A. (eds) Oil Crops of the World. McGraw-Hill, New York. Pp: 339-362.
10. Dolye, J. J. and Dolye, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
11. Fourmann, M., Barret, P., Rendar, M., Pelletier, G., Delourme, R. and Brunel, D. (1998). The two genes homologous to *Arabidopsis* FAE1 co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. Theor. Appl. Gen. 96: 852-858.
12. Gopalan, G. D., Krisnamurthy, D., Shenolikar, I. S. and Krisnamuethy, K. A. V. R. (1974). Myocardial changes in monkeys fed on mustard oil. Nutr. Metab. 16: 352-365.
13. Gura, T. (2000). A silence that speaks volumes. Nature, 404: 804-808.
14. Hamilton, A. J., Fray, R. G., and Grierson, D. (1995). Sense and antisense inactivation of fruit ripening in tomato. Curr Top Immuno Microbiol Immunol., 197: 77-89.
15. Han, J., Lush, W., Sonntag, K., Zahringer, U., Borchardt, S. D., Wolter, F. P., Heinz, E. and Frentzen, M. (2001). Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. Plant Mol. Biol. 46: 229-239.
16. Harwood, J. L. (1988). Fatty acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biol. 39: 101-188.
17. Harwood, J. L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. Biochemica et Biophysica Acta. 1301: 7-56.
18. James, D. W., Keller, L. E., Plooy, I. and Donner, H. K. (1995). Directed tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation 1 (FAE1) gene with the maize transposon activator. Plant Cell. 7: 309-319.
19. Kinney, A. J. (1998). Plants as industrial chemical factories-new oils from genetically engineered soybeans. Fett/Lipid, 100: 173-176.
20. Kooter, J. M., Matzke, M. A. and Meyer, P. (2000). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogene control. Trends Plant Science, 4: 340-347.
21. Lassner, M. W., Lardizabel, K. and Metz, J.G. (1996). A Jojoba β-ketoacyl – CoA synthase cDNA complements the Canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. Plant Cell. 8: 281-292.
22. Lopez Alonso, D. and Garcia Maroto, F. (2000). Plant as " chemical factories " for the production of polyunsaturated fatty acids. Biotechnology Advances, 18: 481-497.
23. Matzke, M. A. and Matzke, A. J. K. (1995). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? Plant Physiology, 107: 679-685.
24. Metcalf, L. C., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. (1966). Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. Analytical Chemistry. 38: 514-515.
25. Metz, T. D., Dixit, R. and Earle, E. D. (1995). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) and cabbage (*B. oleracea* var. capatita). Plant Cell Rep. 15: 287-292.
26. Moloney, M.M., Walker, J. and Sharma, K. (1989). High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports, 8: 238-242.
27. Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan, A. K., Gupta, V. and Pental, D. (1992). Agrobacterium-mediated genetic transformation of oilseed Brassica campestris: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. Plant Cell Rep, 11: 506-513.
28. Murphy, D. J. (1995). The use of conventional and molecular genetics to produce new diversity in seed oil composition for the use of plant breeders – progress, problems and future prospects. Euphytica. 85: 433-440.
29. Murphy, I. S. and Sonntag, J. G. (1991). Erucic, behenic: feedstocks of the 21st century. Inform. 2: 449-463.
30. O'Brien, P. (1994). Lecture Notes, Laboratory manual. Molecular Biology 1 N305, Section2, 17-20.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Parks, L. C. (1993). " Hand Book of Microbiological Media ". 2nd edition, Ch.2: 120-122.

32. Princen, L. H. and Rothfus, J. A. (1984). Development of new crops for industrial raw materials. Journal of American Oil Chemistry Society. 61: 281-289.

33. Puyaubert, J., Garbay, B., Costaglioli, P., Dieryck, W., Roscoe, T. J., Rendard, M., Cassagne, C. and Lessire, R. (2001). Acyl-CoA elongase expression during seed development in *Brassica napus*. Biochemica et Biophysica Acta (BBA). 1533: 141-152.

34. Radke, S. E., Turner, J. C. and Faccitti, C. (1992). Transformation and regeneration of Brassica rapa using Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell Rep, 11: 499-505.

35. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory manual. 3 rd Edition. Cold Spring Harhor Press. New York.

36. Schroder, M., Dixelius, C., Rahlen, I. and Glimilus, K. (1994). Transformation of *Brassica napus* dy using the add A gene as selectable marker and inheritance studies of the marker gene. Physiologyia Plantarum, 92: 37-46.

37. Somerville, C. and Browse, J. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants and memberanes. Science. 252: 80-87.

38. Stam, M., and De Bruin, R., Van Blokland, R., Vander Hoorn, R. A. L., Mol, J. N. M. and Kooter, J. M. (2000). Distinct features of post-transcriptional gene silencing by antisense transgenes in single copy and inverted T-DNA repeat loci. Plant Journal, 21: 27-42.

39. Stoutjesdijk, P. A., Hurlestone, C., Singh, S. P. and Green, A. G. (2000). High – oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenousΔ 12 – desaturases. Biochemical Society Transactions, 28: 938-940.

40. Todd, J., Post-Beittenmiller, D. and Jarowski, J. G. (1999). KCS encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, Plant Journal. 17: 119-130.

41. Tofer, R., Martini, N. and Schell, J. (1995). Modification of plant lipid synthesis. Science. 268: 681-686.

42. Von Wettstein-Knowles, P. M. (1993). Waxes, cutin and suberin, in: T.S. Moore Jr (Ed.), Lipid metabolism in plants, CRC Press, Boca Raton. pp. 127-166.

43. Wang, H. Y., Li, Y. F., Xie, L. X and Xu, P. (2003). Expression of bactrial aroA mutant, aroA-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimste 3-phoshpate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. Journal of Plant Research. 116: 455-460.

44. Zebarjadi, A. R. , Jalali Javaran, M., Karimzadeh, Gh., Moeini,A., Mousavi,A., and Salmanian, A.H., (2006). Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 4, No. 2, April .

45. Zhang, Y., Singh, M. B. and Bhalla, P. L. (1999). Genetic transformation of Australian cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). New Horizos for an old crop. Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

www.SID.ir

Archive of SID

Cloning and Characterization of Responsible Gene for Erucic Acid Biosynthesis in *Brassica napus*

Zebarjadi A.R[1, 2], Jalali Javaran M.[3], Salmanian A.H.[4] and Karimzadeh G.[3]

[1] **Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Razi Univ., Kermanshah, I.R. of IRAN**

[2] **Research Institute of Biotechnology for Environmental Stress, Razi Univ., Kermanshah, I.R. of IRAN**

[3] **Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares Univ., Tehran, I.R. of IRAN**

[4] **National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

The *Brassica* genus classified into two basic groups: High erucic acid rapeseed (HEAR) and Low erucic acid rapeseed (LEAR). Oils having high levels of erucic acid have found widespread applications for non-edible purposes and oils with low levels of erucic acid have used for edible purposes. In this study, the gene and its promoter of β - ketoacyl-CoA synthase (KCS) enzyme that responsible for erucic acid biosynthesis were isolated and their effect was investigated on rate of erucic acid content of transgenic canola. Specific primers were used to amplify *fae* gene and its specific promoter from genomic DNA by PCR technique. The putative gene and promoter from *B. napus* were cloned into pSK^+ vector and sequenced in both directions. Sense construct from *fae* gene and its promoter cloned into a plant expression vector, pBI121. Recombinant vector transferred to rapeseed plant via *Agrobacterium*-mediated transformation method. Presence of gene construct in transgenic plants was confirmed with PCR, dot blot and Southern blotting analyses. Finally the transgene function and its effect on erucic acid content were measured with gas chromatography in transgenic and control plants. Four putative transgenic plants were shown an increase in erucic acid level. Maximum of increasing was observed in one sample (No. 4) with 13% C22:1 in comparison with 1.1% in control plant.

Keywords: *Brassica; fae* Gene cloning; Canola transformation; Erucic acid; KCS enzyme

www.SID.ir