طراحی سازه‌های اگروباکتریومی به منظور تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری، خشکی و سرما فاقد نشانگر آنتی‌بیوتیکی

مطهره محسن‌پور*[1]، مسعود توحیدفر[2]، محدثه محسن‌پور[3]

۱و۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، صندوق پستی: ۱۸۹۷-۳۱۵۳۵

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

(*عهده‌دار مکاتبات- mthrhm@yahoo.com)

چکیده

در بیشتر مطالعات مرتبط با انتقال ژن به گیاهان، از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای بازیابی گیاهان تراریخته استفاده می‌شود، اما معرفی چنین محصولاتی به درون زنجیره غذایی ممکن است نگرانی‌هایی را از لحاظ ایمنی‌زیستی منجر گردد. در این تحقیق ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز (BADH) به عنوان یک نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی ایمن و با ارزش، در ساخت وکتورهای اگروباکتریومی مناسب برای تراریزش گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. توالی ژن مذکور از منشأ اسفناج از ۶۱۱۱ جفت باز با دربرداشتن چهارده اینترون، به ۱۴۹۴ جفت‌باز پس از حذف اینترون‌ها کاهش یافت و با تغییر توالی نوکلئوتیدی بدون تغییر در اسیدآمینه، هشت جایگاه‌های آنزیمی داخلی ناحیهٔ کدکنندهٔ این ژن حذف گردید. توالی قسمت کُد کننده ژن BADH که با ناحیهٔ بدون ترجمهٔ '۵ مربوط به *T7*gene10 فاژی همجوش شده و در وکتور پلاستیدی pB کلون‌سازی گردیده بود، طی مراحلی پس از هضم آنزیمی دوگانه، صاف نمودن انتهای چسبنده قطعه، ایجاد کدون آغازین ATG و افزودن تک نوکلئوتید آدنین، ابتدا در ناقل اولیه pTZ57T/A کلون‌سازی شده و سپس در ناحیهٔ T-DNAی دو حامل دوگانه اگروباکتریومی کلون‌سازی مجدد گردید. دو حامل نوترکیب نهایی pBI-BADH و pBI(-k)BADH در این تحقیق حاصل شدند که ژن بتائین‌آلدهید دِهیدروژناز را تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos دربر دارند. حامل pBI(-k)BADH فاقد هر گونه نشانگر آنتی‌بیوتیکی بوده و می‌تواند به تنهایی برای تراریزش گیاهان با هدف ایجاد مقاومت بالا به شوری، خشکی و سرما، مورد استفاده قرار گیرد. امکان کلون‌سازی کاست‌های ژنی دیگر ایجادکننده صفات با ارزش در این ناقل درنظر گرفته شده است که استفاده از آن‌ها می‌تواند به تولید گیاهان تراریخته چندمنظورهٔ عاری از نشانگر و فاقد نگرانی‌های ایمنی زیستی منجر گردد.

کلمات کلیدی: بتائین آلدهید دهیدروژناز، حامل اگروباکتریومی، ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در انتقال ژن، برای تشخیص سلول‌های تراریخته در مراحل اولیه باززایی، لازم است ژن مورد نظر را با یک ژن گزینشگر همراه نمود که عمده‌ترین نشانگرهای انتخابی مورد استفاده در انتقال ژن، ژن‌های ایجادکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند که استفاده از آن‌ها نگرانی‌هایی را دربردارد. غیرفعال و بی‌اثر نمودن دزهای موثر آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان انسان، در اثر احتمال انتقال ژن‌های مقاومت به میکروب‌های بیماری‌زای دستگاه گوارشی و یا باکتری‌های خاک و مقاوم کردن آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله این نگرانی‌ها می‌باشد. اولین مهندسی ژنتیک گیاه با استفاده از ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) به عنوان یک نشانگر انتخابی توسط Daniell و همکاران (۳) گزارش شد. مراحل انتخاب شامل تبدیل بتائین آلدهید (BA) سمی، توسط آنزیم BADH به گلایسین بتائین غیرسمی بود که به عنوان یک تنظیم کننده اسمزی نیز عمل می‌کند. گیاهان تراریخته می‌توانند در محیطی با مقدار موثر فیتوتوکسین رشد کنند زیرا این گیاهان با کُدکردن آدنیل دهیدروژناز از فیتوتوکسین سمی رفع سمیّت می‌کنند و بدین ترتیب می‌توان آن‌ها را انتخاب کرد. در انتخاب کشنده، گیاهان تراریخته زنده می‌مانند و انتخاب می‌شوند. تکثیر سریع گیاهان حاصل از تراریزش، تحت انتخاب BA و کارایی بالای ترانسفورماسیون نسبت به استفاده از سایر نشانگرها، از جمله مزایای استفاده از BADH به عنوان ژن نشانگرگزینشگر مطرح می‌باشد. به موارد بالا این مزیت مهم را نیز باید اضافه نمود که ژن مذکور گیاهان را در برابر شوری و خشکی متحمل می‌کند (۲، ۵ و ۸).

نزدیک به ۴۰ درصد زمین‌های قابل کشت را به علت مسائل شوری نمی‌توان استفاده نمود. بنابراین توسعه گیاهان تراریخته متحمل در برابر نمک زیاد، برای افزایش تولید غذای جهان ضروری است. تعدادی از گیاهان به طور طبیعی، ترکیبات آلی دارای وزن مولکولی پایین را که compatible solutes نامیده می‌شوند، تولید می‌کنند که متاسفانه این مواد در محصولات مهم گیاهی تولید نشده و تجمع نمی‌یابد. بتائین از جمله این مواد می‌باشد که به گیاه برای غلبه بر شوری محیط توسط تنظیم فشار اسمزی در سیتوپلاسم سلولی و حفاظت پرتئین‌ها از تجزیه و انحطاط کمک می‌کند (۹). بیوسنتز این ماده در یک واکنش دو مرحله‌ای انجام می‌گیرد. گلایسین بتائین یک حفاظت کننده اسمزی در موجودات زیادی از جمله باکتری‌ها و گیاهان عالی می‌باشد. باکتری *E. coli*، گلایسین بتائین را توسط یک واکنش دو مرحله‌ای تولید می‌کند. ابتدا کولین دهیدروژناز (CDH) که توسط ژن *betA* کد می‌شود، کولین را به بتائین آلدهید، اکسید کرده و سپس این ماده توسط آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) که توسط ژن *betB* کد می‌شود به گلایسین بتائین تبدیل می‌شود (۷). Holmstrom (۷) ژن‌های *betA* و *betB* از *E. coli* را به گیاه توتون منتقل کرد. گیاهان توتون تراریخته‌ای که هر دو ژن را دریافت کرده بودند قادر به تحمل غلظت‌های بالای نمک بودند. در تحقیق دیگری انتقال ژن BADH به کلروپلاست، هویج‌های تراریخته‌ای تولید کرد که غلظت‌هایی از نمک را تحمل می‌کردند که تنها هالوفیت‌ها قادر به تحمل آن می‌باشند (۸).

هدف از این تحقیق همسانه‌سازی ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز به عنوان نشانگری غیرآنتی‌بیوتیکی و ایمن

Archive of SID

www.SID.ir

در طراحی ناقل‌های اگروباکتریومی بود که علاوه بر اینکه انتخاب گیاهان تراریخته را امکان‌پذیر خواهند نمود، انتظار می‌رود که در افزایش کارایی انتقال ژن نیز موثر بوده و علاوه بر این قادر باشد تا با تنظیم پتانسیل اسمزی، گیاه را در برابر شوری، خشکی و سرما نیز مقاوم نمایند.

مواد و روش‌ها

کلون‌سازی اولیه ژن *badh*

توالی ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (*badh*) از منشأ اسفناج قبلاً توسط نویسندگان از ۶۱۱۱ جفت باز با دربرداشتن چهارده اینترون، به ۱۴۹۴ جفت‌باز پس از حذف اینترون‌ها کاهش یافته و با تغییر توالی نوکلئوتیدی بدون تغییر در اسیدآمینه، هشت جایگاه‌های آنزیمی داخلی ناحیهٔ کدکنندهٔ این ژن حذف گردیده و با ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ۵' مربوط به *T7*gene10 فاژی همجوش شده و در وکتور پلاستیدی pB کلون‌سازی گردیده بود (۱). در این تحقیق توالی ژن مذکور ابتدا توسط دو آنزیم *Nde*I و *Sac*II از وکتور کلروپلاستی pB، مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و پس از خالص‌سازی از روی ژل آگارز، تحت تیمار با آنزیم بلانت‌کننده قرار گرفت. سپس یک نوکلئوتید آدنین به منظور به کارگیری در کلون‌سازی به روش T/A به انتهای قطعه BADH اضافه گردید و در ناقل pTZ57T/A (Fermentas) کلون‌سازی شد. کلونی‌های نوترکیب *E. coli* سویه XLI-Blue حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین رشد کرده و پس از انتخاب کلونی‌های حاوی ژن موردنظر با جهت ورود مناسب، به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی، قطعه مربوط به ژن *badh* توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I هضم و خالص‌سازی گردید. کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های Sambrook و Russel (۱۰) انجام گردید.

حذف ژن نشانگر انتخابی از پلاسمید دوگانه اگروباکتریومی

به منظور حذف ژن نشانگر انتخابی *nptII*، ایجادکنندهٔ مقاومت به کانامایسین از پلاسمید دوگانه[1] pBI121، این پلاسمید توسط آنزیم‌های *Cla*I و *Nhe*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. پس از خروج قطعه مربوط به *nptII* با طول ۱۸۲۲bp، قطعهٔ مربوط به وکتور با طول ۱۲۹۳۸bp از روی ژل آگارز جداسازی و خالص‌سازی شد. به منظور اتصال مجدد دو انتهای حامل، ابتدا پایانه‌های چسبنده موجود در دو انتهای آن توسط تیمار با آنزیم کلنو[2] به پایانه‌های صاف تبدیل شدند و سپس وکتور خطی‌شده در واکنش اتصال توسط آنزیم T4 DNA Ligase مجدداً حلقوی شد و تراریزش مخلوط اتصال به پلاسمیدهای مستعد تهیه شده از *E. coli* سویهٔ XLI-Blue انجام گرفت. پلاسمیدهای حاصل از کلونی‌های نوترکیب، توسط هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Xba*I و *Nhe*I مورد بررسی قرار گرفتند. انتظار بر این بود که جایگاه آنزیمی *Nhe*I پس از حلقوی‌کردن وکتور، مجدداً ایجاد گردد که در این صورت هضم آنزیمی با آنزیم‌های مذکور قطعه‌ای با طول ۱۲۸۲bp در صورت حذف *nptII* ظاهر خواهد نمود و اگر *nptII* حذف نشده باشد باند مورد انتظار ۳۱۰۰bp می‌باشد. بدین

[1] Binary
[2] Klenow

Archive of SID

www.SID.ir

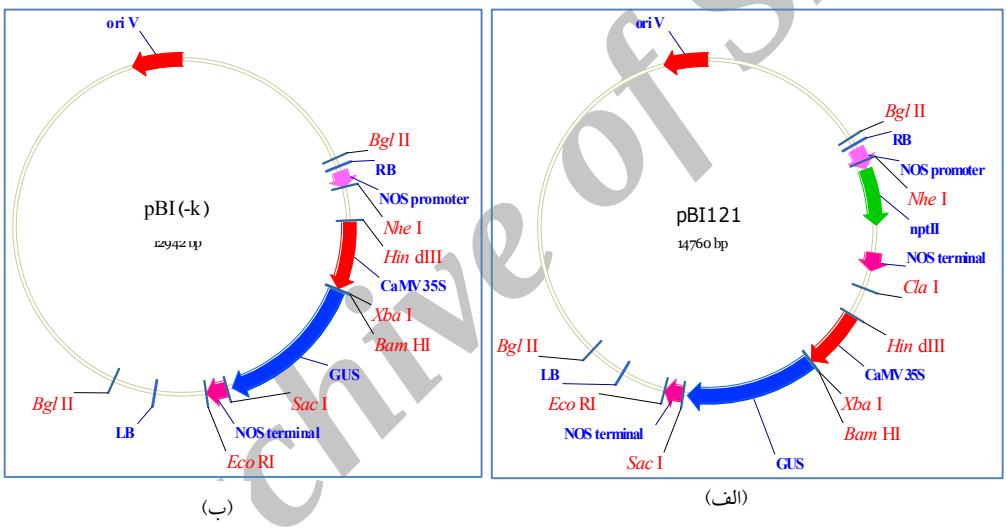
ترتیب پلاسمید نوترکیب آگروباکتریومی بدون نشانگر انتخابی موسوم به pBI(-k) به دست آمد.

کلون‌سازی ژن *badh* در وکتور آگروباکتریومی فاقد ژن نشانگر

قطعه مربوط به ژن کدکننده BADH توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I از پلاسمید نوترکیب pTZ-BADH جدا و در ناحیهٔ T-DNAی دو حامل دوگانه اگروباکتریومی pBI121 و pBI(-k) کلون‌سازی مجدد گردید. در نهایت حامل‌های نوترکیب حاصل به اگروباکتریوم منتقل شد.

نتایج

ظهور باند ۱۸۲۲bp در اثر هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBI (-k) با آنزیم‌های *Xba*I و *Nhe*I، صحت حذف کاست *nptII* را از pBI121 به اثبات رسانید و مشاهده باند ۳۰۳۲bp در اثر هضم آنزیمی پلاسمید pBI(-k) با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI حضور کاست ژن *gus* را نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).



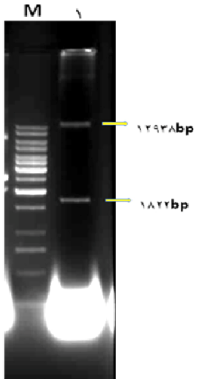
(ب) (الف)

شکل ۱: نمای شماتیک پلاسمید اولیهٔ pBI121 قبل و بعد از حذف ژن نشانگر انتخابی *nptII* طراحی شده در نرم‌افزار Vector NTI.
(الف) pBI121؛ (ب) pBI (*-k*)

صحت جداسازی ناحیه کدکننده ژن BADH با ظهور باند ۱۴۹۹bp به اثبات رسید. قطعه حاصل دارای دو انتهای چسبنده بوده و از سویی دیگر هضم آنزیمی با *Nde*I منجر به ناقص شدن کدون آغاز این ژن شده بود. از آنجایی که آنزیم مذکور ۵'-آورهنگ ایجاد می‌نماید، لذا استفاده از آنزیم Klenow مشکل کدون آغاز را با پُر نمودن دنباله آزاد برطرف نمود. پس از خالص‌سازی با استفاده از خاصیت ترمینال‌ترانسفرازی آنزیم Taq پلیمراز، یک تک نوکلئوتید آدنین به ژن مذکور اضافه شد.

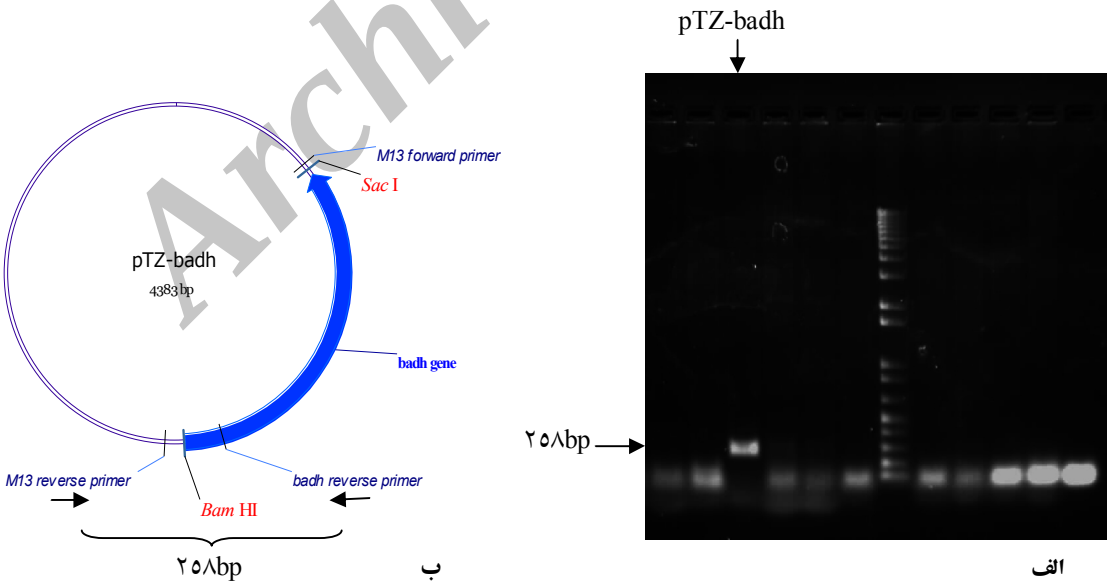
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Cla*I و *Nhe*I به منظور حذف ژن نشانگر *nptII*
M. نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb DNA Ladder) شرکت (Fermentas)
۱. هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Cla*I و *Nhe*I

هدف قرار دادن ژن *badh* تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos در پلاسمید بایزی pBI121 و پلاسمید نوترکیب pBI(-k) بود، لذا نیاز بود جایگاه *Bam*HI به فرادست ژن و جایگاه *Sac*I به فرودست آن اضافه گردد که این امر با کلونسازی اولیه در ناقل pTZ57 میسر گردید. جهت صحیح ورود قطعه از اهمیت بالایی برخوردار بود که صحت پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pTZ-BADH و جهت ورود قطعه به داخل آن توسط واکنش PCR با استفاده از پرایمر داخلی اختصاصی *badh* و پرایمر M13 reverse مورد بررسی قرار گرفت. کلونی‌هایی که باند ۲۵۸bp را در کلونی PCR نشان داده بودند، انتخاب و پس از استخراج پلاسمید توسط هضم آنزیمی تأیید گردیدند (شکل ۳).

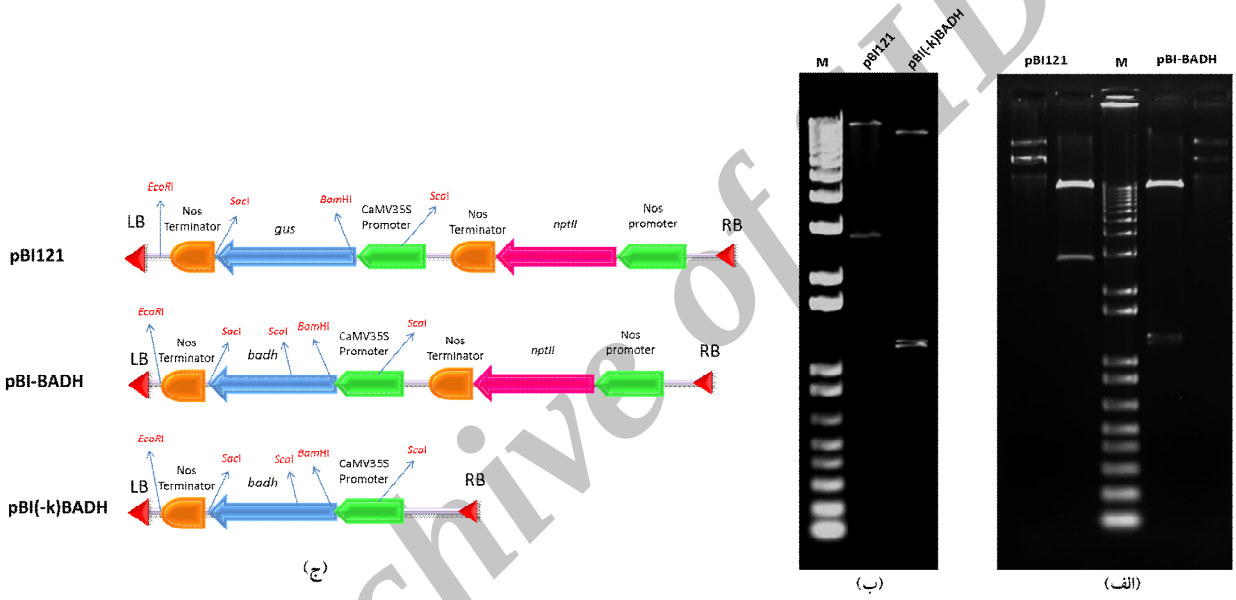


شکل ۳: تأیید صحت پلاسمید نوترکیب pTZ-badh و جهت ورود قطعه به داخل آن توسط واکنش PCR با استفاده از پرایمر داخلی اختصاصی *badh* و پرایمر M13 reverse. ظهور باند ۲۵۸bp را در کلونی PCR منجر به ردیابی کلونی نوترکیب pTZ-badh گردید. الف) کلونی PCR و ب) نمای شماتیک وکتور نوترکیب pTZ-badh را در نرم افزار Vector NTI نشان می‌دهد

Archive of SID

www.SID.ir

صحت کلون‌سازی نهایی در حامل اگروباکتریومی نیز پس از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I و ظهور قطعه ۱۵۲۶bp تأیید گردید. هضم آنزیمی با دو آنزیم *Sca*I و *Eco*RI که باعث ایجاد دو باند ۱۲۵۳bp و ۱۱۹۷bp در صورت حضور BADH و ۲۸۰۳bp در صورت حضور ژن *gus* می‌گردد، حضور ژن *badh* را در پلاسمیدهای نهایی به وضوح نشان داد (شکل ۴). در نهایت دو حامل نوترکیب نهایی pBI-BADH و pBI(-k)BADH در این تحقیق حاصل شدند که ژن بتائین آلدهید دِهیدروژناز را تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos دربردارند. این دو حامل نوترکیب به اگروباکتریوم ترانسفورم گردیدند.



شکل ۴: ساخت ناقل‌های اگروباکتریومی حاوی ژن *badh*

(الف) هضم آنزیمی توسط *Sca*I و *Eco*RI برای تأیید پلاسمید نوترکیب pBI-BADH در کنار pBI121 به عنوان شاهد (چاهک‌های کناری پلاسمیدهای هضم نشده را نشان می‌دهند).

(ب) هضم آنزیمی توسط *Sca*I و *Eco*RI برای تأیید پلاسمید نوترکیب pBI(-k)BADH در کنار pBI121 به عنوان شاهد.

(ج) نمای شماتیک ناحیه T-DNA‌ی پلاسمید pBI121 و پلاسمیدهای نوترکیب pBI-BADH و pBI(-k)BADH.

M. نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb DNA Ladder-Invitrogen)

بحث

گرایش به توسعه سیستم‌های حذف نشانگر در تولید گیاهان تراریخته از اهمیت اجتناب از رهاسازی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در محصولات تراریخته و بار متابولیکی تحمیل شده در اثر بیان ژن‌های نشانگر ناشی می‌شود. در بیشتر مطالعات مرتبط با انتقال ژن به گیاهان، از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای بازیابی گیاهان ترانسفورم شده استفاده می‌شود، اما معرفی چنین محصولاتی به درون زنجیره غذایی ممکن است نگرانی‌هایی را منجر گردد. استراتژی هایی برای حذف ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک پس از ترانسفورماسیون توسط محققین

Archive of SID

www.SID.ir

محتلف مورد استفاده قرار گرفته است که حذف بر اساس همولوژی از طریق توالی‌های تکرار شده مستقیم، حذف توسط ریکامبینازهای اختصاصی به مکان فاژها، الحاق مشترک موقت ژن نشانگر و تفرق ترانسفورماسیون مشترک از جمله آن راهکارها می‌باشد. ولی استفاده از روش‌هایی مانند سیستم CRE/*lox* برای حذف نشانگر که توسط Verma و Daniell (۱۱) تشریح شده است. نیاز به انتقال ژن مجدد به گیاه و بررسی گیاهان حاصل در نسل‌های تفرق داشته و کار وقت‌گیری محسوب می‌گردد. استفاده از نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی BADH توسط Daniell و همکاران (۴) در طراحی وکتورهای مورد استفاده در تراریزش پلاستید گزارش شده بود، ولی استفاده از آن در وکتورهای اگروباکتریومی به عنوان جایگزین ژن نشانگر گزارش نشده است. وکتورهای اگروباکتریومی که ژن BADH به عنوان ژن ایجادکننده مقاومت به شوری، خشکی و سرما در آن‌ها کلون‌سازی شده است در تمامی تحقیقات قبلی، خود دارای نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک جداگانه‌ای بوده‌اند. لذا به دلیل نگرانی‌هایی که در ارتباط با مسائل ایمنی زیستی نشانگرهای انتخابی وجود دارد، در این تحقیق از یک ژن نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی در ساخت حامل اگروباکتریومی استفاده گردید. حامل Pbi(-k)BADH فاقد هر گونه نشانگر آنتی‌بیوتیکی بوده و می‌تواند به تنهایی برای تراریزش گیاهان با هدف ایجاد مقاومت بالا به شوری، خشکی و سرما، مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱. محسن پور، م.، بابائیان، ن.ع.، توحیدفر، م.، محسن‌پور، م.، (۱۳۹۰). استفاده از ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز به عنوان نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی و ایمن در طراحی حامل پلاستیدی. فصلنامه علمی پژوهشی علوم زیستی. در دست چاپ.

2. Chen, S., Yang, Y., Shi, W., Ji, Q., He, F., Zhang, Z., Cheng, Z., Liu, X. and Xua, M., (2008). Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell*. 20: 1850–1861.
3. Daniell, H., Muthukumar, B. and Lee, S. B., (2001). Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet*. 39: 109–116.
4. Daniell, H., Wiebe, P. and Fernandez-San Millan, A., (2001). Antibiotic-free chloroplast genetic engineering_an environmentally friendly approach. *Trends in Plant Sci.* 6: 237–239.
5. Fitzgerald, T. L., Waters, D. L. and Henry, R. J., (2009). Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol (Stuttg)*. 11(2):119-30.
6. Holmstrom, K. O., Welin, B., Mandal, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T. H., Lamark, T., Strøm, A. R. and Palva, E. T., (1994). Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. *The Plant Journal* 6, 749–758.

Archive of SID

www.SID.ir

7. Holmstrom, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E. and Welin, B., (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. Journal of Experimental Botany. 51, 343:177-185.
8. Kumar, S., Dhingra, A. and Daniell, H., (2004). Plastid expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*. 136(1): 2843–2854.
9. Robinson, S. P. and Jones, G. P., (1986). Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 659–668.
10. Sambrook, J. and Russel, D.W., (2000). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
11. Verma, D. and Daniell, H., (2007). Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. Plant Physiol. 145: 1129-1143.

Archive of SID

www.SID.ir