مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۳۵۱-۳۴۳)

ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به شوری با استفاده از ژن دست‌ورزی شده اسموتین

اشرف الدین سخن‌سنج، حکمت علیخانی و مسعود میرمعصومی
گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران
(دریافت: ۸۱/۵/۲۰ ؛ پذیرش: ۸۱/۲/۲۰)

چکیده

یکی از راههای اساسی مقابله گیاهان با تنشهای محیطی، تولید و انباشتن پروتئینهای ویژه درون سلولها است. نشان داده شده پروتئین اسموتین که توسط ژن اسموتین رمز می‌شود در گروههای مختلف گیاهی باعث مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماریزا و همچنین تنشهای محیطی نظیر شوری می‌گردد. تنش اخیر عامل ایجاد تنش اسمزی می‌باشد. ژن دست ورزی شده اسموتین موجود در یک ساختار حامل دوگانه، از طریق همکشتی قطعات جداکشت برگ توتون با اگروباکتریوم حاوی ژن، به گیاه توتون انتقال داده شد. مراحل غربالگری گیاهان تراریخت در محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک و مقادیر مشخص نمک صورت گرفت. قطعات جداکشت لاین تراریخت از نظر توانایی تولید کالوس، نوساقه و ریشه در محیط دارای مقادیر متفاوت نمک مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که قطعات جداکشت توانایی تولید بخش هوایی بیشتری نسبت به سایر اندامها در شرایط تنش شوری دارند. جهت تایید انتقال ژن اسموتین از واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR) استفاده گردید.

واژه‌های کلیدی: *اسموتین، مقاومت اسمزی، مقاومت به شوری، تنش اسمزی، تنش شوری، تراریختی*

مقدمه

یکی از مهمترین راههای مقابله گیاهان با تنش‌های محیطی تجمع ترکیبات پروتئینی درون سلولهای آنها می‌باشد. یکی از این عوامل که بخوبی مورد مطالعه قرارگرفته پروتئینهایی هستند که نخستین بار در ارتباط با ویژگی مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا شناخته شده‌اند. این پروتئینها تحت عنوان کلی(Pathogenic Related Proteins (PRS درگروهی ازگیاهان مورد بررسی قرارگرفته‌اند. این پروتئینها شامل گروههای متنوع پروتئینها هستند مثل خانواده کیتینازها (PR-3, -4, 8,11)، بتا –۱و۳ گلوکاناز (PR-2)، بازدارنده پروتئیناز (PR-6)، پراکسید از ویژه(PR-9) و همچنین PR-5, PR-1 که اصطلاحاً شبه توماتین (Thaumatin-like) گفته می‌شود (Van Loon *et al.,* 1994).

پروتئینهای خانواده PR-5 تنها در پاسخ به پاتوژن بوجود نمی‌آیند بلکه درجریان تنش اسمزی نیز درسلولهای گیاهان انباشته می‌شوند. بدین ترتیب اسموتین (PR-5C) توتون و همولوگ آن (NP24(PR-Sa هر دو بطور مستقل توسط تنش شوری آفات القاء می گردند، (Van Loon, 1997). با توجه به روشهای گوناگون جداسازی و خالص سازی اسموتین دو نوع از این پروتئینها شناخته شده اند: انواع I و II که دلیل این نامگذاری ویژگی حل شدن آنها در بافرهای گوناگون می‌باشد.

بیان ژن رمزکننده اسموتین با بیش از یک مکانیسم صورت می‌گیرد. ارتباط تجمع اسموتین با میزان ابسیزیک اسید (ABA) درون سلولی بخوبی نشان داده شده است. پس از اینکه سلولها در شرایط کاهش پتانسیل آبی محیط قرار گرفتند ترجمه mRNA اسموتین صورت می‌گیرد (Singh *et al.,* 1987).

تجمع اسموتین درحقیقت یک صفت پایدار است و پس از حذف NaCl از محیط، تجمع اسموتین در بیش از۴۰ نسل سلولها ادامه خواهد داشت (La Rosa *et al.,* 1989).

مطالعات انجام شده توسط La Rosa و همکاران (۱۹۸۹) نشان داد که NaCl و ABA از طریق مسیرهای مستقل از یکدیگر روی تجمع اسموتین تاثیر می‌گذارند. تنظیم بیان ژن اسموتین پس از رونویسی صورت می‌گیرد. ABA تجمع mRNA اسموتین را در سلولهای برگ گیاهان کشت شده القاء می‌کند ولی پاسخ به تیمار ABA با سن برگ کاهش می‌یابد، با اینحال میزان mRNA اسموتین درساقه‌ها و برگهای گیاهان تیمار شده با نمک پس از سازگاری افزایش می‌یابد. از طرفی مشاهده شده که اتیلن باعث تجمع اسموتین در ریشه و بافتهای برگ جوان می‌گردد. اینکه اتیلن در سلولهای کشت شده mRNA و پروتئین اسموتین را القاء

نمی‌کند و ABA این عمل را انجام می‌دهد می‌رساند که این دو هورمون ژنها را بطـور مسـتقل تنظیم می‌کنند. همچنین لازم به ذکر است که وجود زخم و ویروس موزائیـک توتـون (TMV) روی تجمع mRNA اسموتین تاثیر می‌گذارند ولی درارتباط با پروتئین اسموتین بی اثر هستند (La Rosa *et al.,* 1989).

Kononowicz و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از ژن گزارشگر GUS مطالعه‌ای درمورد نحـوه فعالیت پروموتر ژن اسموتین انجام دادند. دراین آزمون ژن GUS درکنار پرومـوتر اسـموتین در ساختار حامل گردونه‌ای(Shuttle vector) قرار می‌گیرد و عمـل پروموتـور بـا اسـتفاده از آنـالیز هیستوشیمیایی درگیاهان توتون تراریخت (transgen) قابل بررسی می‌باشد.

درگیاهانی که قادر به سازگاری با شرایط شوری و خشکی نیستند میـزان فعالیـت GUS در بافتهای ریشه، ساقه و برگها و همچنین اندامهای تولید مثلی بسیار کم است. سازگاری درگیـاه نسبت به نمک، با افزایش فعالیت پروموتوراسموتین درمیانگره‌های ساقه درتمـامی مراحـل نمـو همراه می‌باشد. درطول دوره خشکی در بافتهای مادری میـوه افـزایش فعالیـت GUS مشـاهده می‌گردد ولی چنین اثری در دانه‌ها دیده نمی‌شود. به همین ترتیب قبل از لقاح، بافت تخمـدان تنها بافتی در قسمت تحتانی اندام زایشی است که فعالیت GUS را نشان می‌دهد. در دانه‌هـای گرده بالغ بعد از شکوفایی بساک نیز افزایش فعالیت GUS مشاهده می‌گردد.

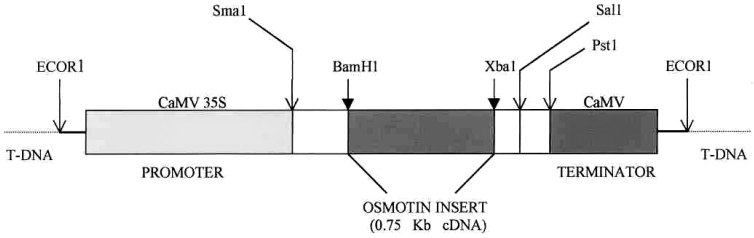
درزمان سازش گیاه نسبت به نمک (NaCl) قویترین فعالیت GUS در نوک برگهـا مشـاهده می‌گردد. درحالیکه در مریستم جوانه انتهایی یا طرح اولیه برگی اثری مشاهده نمی‌شود.

نتایج این مطالعات و همچنین آزمایشاتی که توسـط(Wolf, 1991) از طریـق تشـابه الگـوی فعالیت پروموتور اسموتین و توزیع درگیاه صورت گرفت، همگی این نظر را حمایت می‌کنند که بیان ژن اسموتین یک پاسخ سازشی گیاهان به تنش اسمزی است و احتمالا نقش دفاعی آن در مقابل عوامل بیماریزا ممکن است در ارتباط با اثراتی باشد که این عوامل در گیاه ایجاد می‌کنند و این اثرات تشابه زیادی با وضعیت تنش اسمزی دارند.

از این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ژن دست‌ورزی شده اسـموتین مـی‌توانـد منجربه ایجاد مقاومت به شوری درگیاهان شود.

مواد و روشها

ژن اسموتین بشکل یک cDNA در ساختار حامل دوگانه (Binary vector) ازPusa University هند اخذ شد (شکل۱) در این تحقیق از گونـه توتـون *Nicotiana glutinosa* جهـت انتقـال ژن استفاده گردید.



شکل ۱- ساختارهای حامل دوگانه (Binary vector) واجد ژن اسموتین.

جهت رشد اگرو باکتریوم حاوی حامل گردونه‌ای، محیط کشت Yeast mannitol browt (YMB) انتخاب گردید (Gartland & Davery, 1995). برای مراحل مختلف باززایی محیط‌های کشت گیاهی متفاوتی از نظر نوع هورمون و آنتی‌بیوتیکها مورد نیاز می‌باشد. محیط کشت پایه گیاهی محیط (MS) (Murashige and Skoog, 1962) بود که برای تولید کالوس ۱ میلی‌گرم درلیتر هورمون بنزیل آمینوپورین(سیتوکینین) و ۰/۱ میلی‌گرم درلیتر اندول استیک اسید (اکسین) به آن اضافه شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰-۷۰ میلی‌گرم درلیتر) و سفاتوکسیم (۵۰۰ میلی‌گرم درلیتر) استفاده شد. استخراج پلاسمید با روش قلیایی درحجم کم (Bironobium & Doly, 1979) انجام گردید.

استخراج DNA از گیاه توتون با استفاده از روش ذکر شده توسط Edwards و همکاران (۱۹۹۱) صورت گرفت. بموجب این روش DNA مناسب توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reation=PCR) بدست می‌آید. ابتدا برگهای گیاه توتون آسیاب شده و با استفاده از یک بافر مخصوص همگن می‌شود. بافر تشکیل شده از CTAB 10% 20 ml، NaCl 20.5% ml، EDTA 0.5M, pH=8, 5ml، Tris-HCl 1M , pH=8 , 5ml، 0.25g محلول PVP (پلی وینیل پرولیدین)، ،۳ml درحجم نهایی ۵۰ml . پس از سانتریفوژ روشناور شستشو داده شده و DNA رسوب داده می‌شود.

تراریختی قطعات جدا کشت برگ با استفاده از روش ذکرشده توسط (Mazo, 1992) انجام شد. در این روش قطعات برگهای نسبتاً جوان توسط پانچر به قطر ۵ میلی‌متر جدا شده روی محیط کشت قرار داده شد و سپس عمل همکشتی درمحیط مایع با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید مورد نظر که از شب قبل درمحیط کشت قرار داده شده بود صورت گرفت. پس از

همکشتی، قطعات جدا کشت جهت تولید کالوس و مراحل بعدی یعنی تولید بخش هوایی و ریشه به محیط‌های مناسب دارای هورمونهای لازم و آنتی‌بیوتیکها انتقال داده شد.

جهت بررسی گیاهان تراریخت علاوه بر اینکه درمحیط انتخابی آنتی‌بیوتیک کانامایسین که ژن مقاومت به آن روی ساختار حامل قرار دارد (و از این جهت تا حدودی می‌توان گیاهان تراریخت را شناسایی کرد) از PCR نیز استفاده شد. برای اطمینان از اینکه آلودگی با اگروباکتریوم وجود ندارد، برگ‌های گیاهان تراریخت درمحیط فاقد سفاتوکسیم رشد داده شدند، اگر درآنها حتی مقادیر کم اگروباکتریوم وجود داشته باشد بعد از ۲ روز در اطراف برگها هاله‌ای بوجود می‌آید. با توجه به عدم وجود چنین نشانه‌ای نتیجه گرفتیم آلودگی وجود ندارد.
برای انجام PCR با توجه به اینکه ژن اسموتین در گیاه بطور طبیعی وجود دارد از پرایمرهای مربوط به پروموتور S-CMV ۳۵موجود در برساخته (Construct) استفاده گردید که قبل از ژن اسموتین قرار داشت. برای انجام PCR مراحل کلی بر اساس اصول ذکر شده توسط Foster و Twell بهینه‌سازی گردید (Foster & Twell, 1996).

غربالگری گیاهان تراریخت با استفاده از محیط‌های کشت گیاهی همراه با مقادیر مورد نظر شوری (NaCl) صورت گرفت.

نتایج

پس از همکشتی قطعات برگی با اگروباکتریوم کلیه مراحل تشکیل کالوس، نوساقه (Shoot)و ریشه‌زا درمحیط‌های انتخابی دنبال شد. مجموعا ۴۸ لاین گیاه تراریخت با توجه به محیط‌های انتخابی بدست آمد.

درمرحله بعد جهت غربالگری کلیه نمونه‌ها در محیط‌های دارای درجات مختلف شوری ۱۵۰،۲۵۰،۳۲۰،۳۷۰) میلی‌مولار) جهت ریشه‌زایی قرار داده شدند و از بین تمامی نمونه‌ها چهار لاین جهت ادامه آزمایشها انتخاب گردیدند.

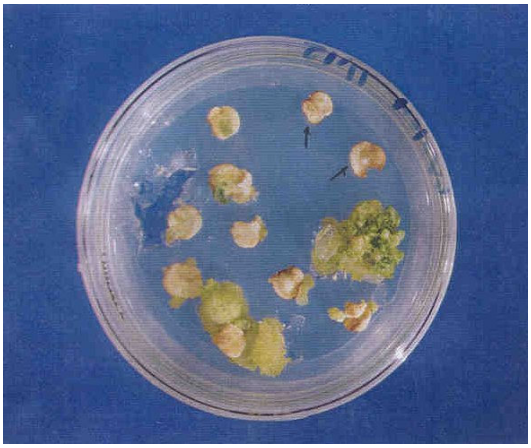
گیاهان انتخاب شده در درجات مختلف شوری جهت تولید کالوس، نوساقه و ریشه در مقایسه با گیاه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت یک لاین انتخاب شد.
با تکرار آزمایشها روی این لاین و در ۱۵ تکرار صورت گرفت که نتایج در جدول شماره ۱ آمده است.

بطوریکه از این جدول بر می آید، تولید نوساقه در شوری بیش از ۳۵۰ میلی‌مولار نیز با موفقیت همراه بود و در شوری ۳۷۰ میلی‌مولار گیاه تا حدود نسبتاً زیادی سبز باقی ماند. در

حال حاضر لاین فوق درمحیط دارای ۳۲۰ میلی‌مولار نمک بخوبی قادر به رشد می‌باشد و به گلدان منتقل شده است.

ریشه‌زایی با اشکالات بیشتر همراه بود. درحالیکه گیاه شاهد درشوری ۱۵۰ میلی‌مولار قادر به تولید ریشه نبود و درنتیجه سبزینه خود را از دست می‌داد، گیاه تراریخت قادر به تولید ریشه بود و درنتیجه سبز باقی می‌ماند. در مورد تولید کالوس نتیجه مناسبی بدست نیامد (اشکال ۲، ۳، ۴).

شکل۲- قرار دادن دیسکهای برگی (قطعات جداکشت) درمحیط MS حاوی ۳۷۰ میلی‌مولار NaCl



شکل۳- تولید نوساقه از قطعات برگها درگیاهان تراریخت و عدم تولید آن درگیاه شاهد درمحیط دارای ۳۷۰ میلی‌مولار NaCl- گیاهان شاهد با فلش مشخص شده‌اند.

شکل۴- تولید نوساقه کامل از گیاهان توتون تراریخت در محیط دارای ۳۷۰ میلی‌مولار NaCl

برای اثبات اینکه ژن اسموتین درگیاه وارد شده، از پرایمرهای مربوط به ژن اسموتین و پروموتورS۳۵ استفاده گردید. باند بدست آمده از DNA گیاه تراریخت همراه با باند مربوط به اگروباکتریوم که بعنوان شاهد استفاده شد. درشکل شماره ۵ آمده است.

شکل۵- نتیجه حاصل از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) به منظور اثبات وجود ژن (باند سمت چپ) مربوط به نمونه پلاسمیدی و دو باند موجود در سمت راست مربوط به لاین‌های ترانس ژن می‌باشند.

بحث

با بررسی گیاهان درمحیط دارای نمک بعنوان محیطی که ایجاد کننده تنش اسمزی می‌باشد مشاهده می‌شود که گیاه دارای ژن دست‌ورزی شده اسموتین (ژن در کنار پروموتور قوی‌S۳۵) قادر به تولید نوساقه می‌باشد ولی در محیط تشکیل ریشه تا حدودی مقاوم به نمک بوده و در محیط تولید کالوس مقاومت می‌نماید.

برای پاسخ به این تفاوتها دو فرضیه وجود دارد یکی اینکه هنگامی که برگ در شرایط تشکیل کالوس قرارمی‌گیردخود یک تنش محسوب می‌شود و اگر تنش شوری اضافه شود تشکیل کالوس بسیار مشکل می‌گردد.

دوم اینکه تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها پیچیده است. عوامل Trans-acting تحت اثر عوامل القاء کننده محیط که می‌توانند سیگنال‌های مربوط به شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زا باشند، فعال می‌شوند و با عوامل cis تنظیمی ژن ارتباط برقرار می‌کنند.

با توجه به اینکه محیط های تولید کالوس از نظر نسبت‌های هورمونی محیط‌های ویژه‌ای هستند وهر دو گروه هورمونی اصلی اکسین و سیتوکینین درآنها وجود دارنداحتمالاً نسبت هورمونی دراین محیط قادر به فعال سازی عوامل Trans-acting نمی‌باشد و به این ترتیب عوامل فوق قادر نیستند تا با توالی های DNA اتصال برقرار می‌نمایند.از این گذشته ناحیه بسیار کوچکی در ناحیه تنظیمی اسموتین در تنظیم بیان ژن نقش دارد و این موضوع در آزمایشهای مربوط به فعال‌سازی ژن گزارشگرتایید شده است (La Rosa *et al.,* 1992). بدین ترتیب نقش این ناحیه در ارتباط با عوامل فعال کننده حائز اهمیت زیادی است.

به هر صورت شناخت بیشتر رابطه اکسین / سیتوکینین در ارتباط با عوامل موثر بر بیان ژن برای فهم بهتر فعالیت ژن اسموتین و به دنبال آن مقاومت به شوری حائز اهمیت است.

قرار است بزودی گیاه ترانس ژن مورد نظر که واحد ژن دست ورزی شده اسموتین در درجات مختلف شوری قرار داده شده و ترکیبات محافظ اسمزی(Osmoprotectors) آن مانند آمینو اسیدهای پرولین، گلسین و گلیسین بتائین و ترکیبات دیگری نظیر پینتول، مانیتول و آنزیمهایی نظیر متیل ترانسفراز که در مقاومت اسمزی نقش دارند و همچنین پروتئینهای اسموپروتکتوری آن در مقایسه با حالت معمولی و گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گیرند.

انتقال ژن اسموتین به گیاهان مفیدی نظیر گندم و برنج از دیگر اهداف مربوط به این پژوهش می‌باشد.

References

Bironobium, H.C., Doly, T. (1979). A rapid allcaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acid Research, **7,** 1513–1523.

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A rapid and simple method for the preparation of plant genome cDNA for PCR analysis. Nucleic Acid Research, **19,** 13–49.

Foster, G., Twell, D. (1996). Plant gene isolation principies and practice, page 331.

Gartland K.M.A.Davery, M.R. (1995). *Agrobacterium protolulus*, Methods in Molecular Biology, **44,**

Kononowicz, A.K., Nelson, D.A., Singh, N.K., Hasegawa P.M., Bressan, R.A. (1992). Regulation of osmotin gene promoter, Plant Cell, **4,** 513.524.

La Rosa, P.C., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1989). Stable NaCl tolerance of tobaceo cells is associated with enhaced accumulation of osmotin, **91,** 855-861.

La Rosa, P.C. (1992). Osmotin gene expression is post transcriptionally regulated, plant Physiology, **100,** 409-415.

Mazo, T. (1992). Factors affecting the rate of T-DNA transfer from *Agrobacterium temefaciens* to *Nicotiana glauca* Plant Cells, Plant Molecular Biology, **19,** 1019-1030.

Murashige, G.L., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant, **15,** 473-497.

Singh, N.K., Hand A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1987). Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance. Plant Cell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **84,** 739-743.

Van Loon, L.C., Yam, G., Bollert, (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis proteins, Plant Molecular Biology Reporter, **12,** 245-264.

Van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogensis-related proteins, Enviromental Journal of Plant Pathology, **103,** 753-765.

Wolf, O. (1991). The role of the stem in partitioning of and in salt treated barely, Z. Exp.Bxp.Bot, **42,** 679-704.