

تشدید بیان ژن *AtEXPA18* در گیاه *Arabidopsis thaliana*

Overexpression of *AtEXPA18* in *Arabidopsis thaliana*

سارا شاه‌نجات بوشهری^۱، علیرضا عباسی^{۲*}، هوشنگ علیزاده^۳

۱،۲،۳- کارشناس ارشد و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Shahnejat bushehri S¹, Abassi AR^{2*}, Alizade H³

1,2,3. Graduate Student, Assistant Professors, Department of Agronomy and Plant breeding,
University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rezabbasi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

ریشه‌های موئین، نقش مهمی در جذب آب و مواد غذایی از خاک بازی می‌کنند و به عنوان جایگاهی برای اثر متقابل با میکرواگانیسم‌های خاک محسوب می‌شوند. فرایند شکل‌گیری ریشه‌های موئین در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناخته شده می‌باشد. ژنهای متعددی در توسعه سلول‌های گیاهی نقش دارند که در این تحقیق یک ژن اختصاصی ریشه به نام *AtEXPA18* که به طور مستقیم در شکل‌گیری ریشه‌های موئین مؤثر است، جداسازی و تحت کنترل پیش‌برنده *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* درون ناقل بیان گیاهی *pBI121* کلون و در نهایت به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل گردید. باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حاوی ناقل بیانی گیاهی *pBI:EXPA18* طی روش غوطه‌وری گل‌آذین به *Arabidopsis thaliana* منتقل شد. بذور حاصل از غوطه‌وری گل‌آذین جهت ارزیابی اولیه تراریخته بودن روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند و به منظور تأیید تراریخته بودن گیاهان، آنالیز مولکولی گیاهان رشد کرده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به روش RT-PCR انجام شد. بدین صورت که با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و *AtEXPA18* و همچنین cDNA گیاهان تراریخته واکنش PCR انجام و تراریختگی گیاهان در سطح رونویسی تأیید شد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا،
آلفا اکسپنسنین،
توسعه سلول،
ژنهای خانواده اکسپنسنین،
سست‌کنندگی دیواره سلولی،
غوطه‌وری گل‌آذین.

مقدمه

ریشه یک اندام گیاهی است که برای به دست آوردن آب و مواد غذایی از محیط سازگار شده است (Schiefelbein et al. 1997). منطقه تقسیم سلولی ریشه شامل مریستم نوک ریشه است که تقسیمات سلولی جدید را انجام می دهد. سلول های نشأت گرفته از منطقه تقسیم سلولی اغلب در منطقه افزایش طول¹، بسط می یابند. بعد از اینکه این سلول ها طویل شدند، در منطقه بلوغ متمایز می شوند و ریشه های موئین یا ثانویه را به وجود می آورند. پیشنهاد شده است که وقایع طویل شدن و تمایز که در ریشه اتفاق می افتد، توسط قابلیت بسط دیواره سلولی و اتساع غشاء پروتوپلاسم گیاهی درون سلولی کنترل می شود (Cosgrove 1996). حد طویل شدن سلول گیاهی محدود به دیواره سلولی است. دیواره سلولی نقش اساسی در تعیین اندازه و شکل سلول گیاهی دارد. سلول گیاهی برای طویل شدن یا بلوغ، نیاز به تغییر انتخابی دیواره سلولی دارد عواملی که در تغییر دیواره سلول های گیاهی نقش دارند شامل اجزاء مختلف دیواره سلولی مانند اکسپنسنینها، اندوگلوکانازها، زایلوگلوکان اندوترانس گلیکوزیلاز و رادیکال های هیدروکسیل می باشد (Cosgrove 1999, 2000a, 2000b). اکسپنسنین ها اساساً به عنوان عوامل اصلی برای طویل شدن سلول محسوب می شوند (Vissenberg et al. 2000). اکثر شواهد نشان می دهد که اکسپنسنین ها از طریق سست کردن پیوندهای هیدروژنی بین میکروفیبریل های سلولز و پلیمر ماتریکس باعث تغییر شکل تدریجی دیواره می شوند (Cosgrove 2000b). ژن های اکسپنسنین در ۴ زیرخانواده آلفا اکسپنسنین، بتا اکسپنسنین، شبه اکسپنسنین A و شبه اکسپنسنین B قرار دارند. پروتئین های آلفا اکسپنسنین و بتا اکسپنسنین دارای فعالیت سست کننده دیواره سلولی می باشند که در بسط سلولی و دیگر وقایع نموی که در طی آن ها دیواره سلولی تغییر می کند، شرکت دارند (Choi et al. 2006). اکسپنسنین ها اولین بار در مطالعات رشد سلولی القا شده در اثر pH اسیدی به عنوان پروتئین های بسط دهنده دیواره شناخته شدند. برای سال ها شناخته شده بود که pH خارج سلولی کمتر از ۵/۵ باعث بسط دیواره در گیاهان خاکی

می شود. این فرایند در pH اسیدی مناسب توسط بخش بزرگی از اکسپنسنین های موجود در دیواره انجام می شود. رشد القا شده در pH اسیدی و عکس العمل اکسپنسنین ها، در پاسخ رشدی گیاهان به هورمون ها، محرک های خارجی مانند نور، خشکی، شوری، شرایط غرقاب و فرایندهای مورفونژنیک مانند تشکیل ریشه های موئین نقش دارد (Sampedro and Cosgrove 2005). عوامل محیطی و هورمونی روی رشد ریشه های موئین (در یک مسیر متمایز از مسیر مرتبط با رشد) موثرند. جوانه زدن ریشه های موئین با سست شدن دیواره سلولی در محل تشکیل ریشه موئین همراه است. (Bibikova et al. 1998). Bibikova et al. (1998) اسیدی شدن دیواره سلولی در محل تشکیل ریشه های موئین ثابت کردند. که این اسیدی شدن می تواند اکسپنسنین ها را فعال کند. بدین ترتیب اکسپنسنین ها دسته ای از ژن ها هستند که نقش پیشنهادی در توسعه سیستم ریشه برای آنان ارائه شده است. افزایش طول و حجم ریشه از طریق ظهور ریشه های موئین می تواند به عنوان مکانیسمی برای جذب آب بیشتر در نظر گرفته شود زیرا ریشه ها غالباً در شرایط کم آبی که طویل شدن برگ و ساقه به طور کل محدود می گردد، به رشد خود ادامه می دهند که این خصوصیت به عنوان یک مکانیسم مهم سازگاری گیاه به شرایط محدودیت آبی در نظر گرفته می شود.

با توجه به اینکه نقش بعضی از ژن های اکسپنسنین در توسعه سیستم ریشه تایید شده است می توان با انتقال این ژن ها به گیاهان زراعی مورد نظر، گیاهان تراریخته ای تولید کرد که سیستم ریشه توسعه یافته تری داشته و توانایی جذب آب بیشتر و بالتبع تحمل بیشتری به تنش خشکی داشته باشند. در راستای گسترش اندام ریشه در گیاه آراییدوپسیس و افزایش توانایی گیاه برای جذب آب بیشتر، در این پژوهش تشدید بیان ژن *AtEXPA18* مد نظر قرار گرفت.

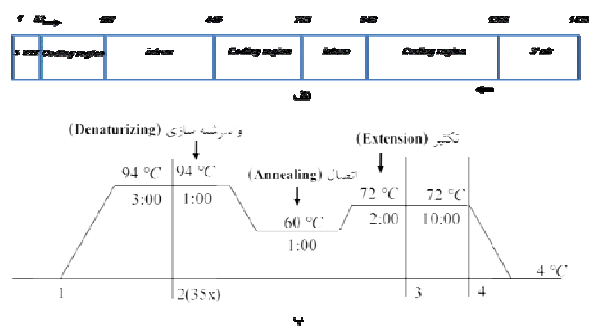
مواد و روش ها

ساخت سازه ژنی *pBI:EXPA18*

در این تحقیق از بذور آراییدوپسیس تالیانا رقم کلمبیا استفاده شد. به منظور جداسازی و کلون کردن ژن *EXPA18*، DNA ژنومی گیاه آراییدوپسیس به روش CTAB استخراج گردید (Doyle and

¹ Elongation

ژل خالص سازی شد. هضم دوگانه ناقل pBI121 با آنزیم های مذکور نیز، طبق پیشنهاد شرکت فرمتاز انجام شد. سپس ژن *EXPA18* توسط آنزیم T4 DNA لیگاز به درون ناقل pBI121 کلون شد. از کلونی های رشد کرده بر روی محیط LB (Merck) جامد حاوی ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کاناماسین استخراج پلاسمید انجام شد و با واکنش هضم دوگانه با آنزیم های *BamHI* و *SacI* صحت سازه ژنی *pBI:EXPA18* بررسی شد (شکل ۲). پس از ساخت سازه ژنی و تأیید آن، این سازه به سلول های مستعد آگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل شد و سپس این سلول ها بر روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک های ریفامپیسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) و کانامایسین (۲۵ میلی گرم بر لیتر) کشت شدند. رشد بر روی این محیط انتخابی تأیید وجود آگروباکتریوم (به واسطه رشد در حضور ریفامپیسین و استرپتومایسین) حاوی pBI121 (به واسطه رشد در حضور کانامایسین) بود. برای تأیید نهایی حضور سازه ژنی در آگروباکتریوم از این کلونی ها استخراج پلاسمید به عمل آمد و صحت سازه ژنی موجود در آگروباکتریوم با واکنش هضم آنزیمی دوگانه تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۱- الف شمای ژن *EXPA18* و محل اتصال آغازگرها بر روی این ژن و (ب) برنامه پی سی آر مورد استفاده جهت تکثیر قطعه *EXPA18*

انتقال سازه ژنی *pBI:EXPA18* به آرابیدوپسیس بذور گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) در خاک حاوی ورمی کولایت و پیت ماس به نسبت ۱:۱ که مرطوب شده بود کشت شدند به منظور شکست خواب بذر به مدت دو روز در دمای ۴°C نگهداری شدند. سپس گیاهان به فیتوترون منتقل شدند. به مدت ۳ تا ۴ هفته گیاهان در شرایط روز کوتاه (۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی) نگه داشته شدند و سپس به منظور

Doyle 1990). به منظور طراحی آغازگر، توالی ژن *EXPA18* توسط نرم افزار DNA Star از نظر مکان برش با آنزیم های برش- دهنده اختصاصی بررسی شد و سپس آغازگرهای مناسب برای تکثیر ژن *EXPA18* بر اساس ابتدا و انتهای CDS این ژن طراحی شد (شکل ۱- الف). به طوری که به آغازگر پیشرو توالی شناسایی آنزیم *BamHI* برشی (3') 5'GGATCCCAGAGTAAAAATGGATCAAAATTT و به آغازگر پسرو توالی مربوط به آنزیم برشی *SacI* (3') 5'GAGCTCTTAGTTAAAAATTAGCCTTGCTCTG اضافه گردید. دلیل انتخاب این دو سایت برشی در دو طرف ژن این بود که این دو آنزیم دارای جایگاه برشی درون ژن *EXPA18* نبودند. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix و DNA ژنومی گیاه آرابیدوپسیس مطابق با نمودار نشان داده شده در شکل ۱- ب انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز و باند مربوطه از روی ژل بریده و DNA آن با کیت کیاژن از ژل استخراج شد. به منظور وارد نمودن قطعه به درون ناقل pGEM-T، طبق دستور شرکت پرومگا یک نوکلئوتید A به دو انتهای ژن اضافه شد. به این صورت که طبق دستور شرکت پرومگا بعد از مخلوط نمودن مواد مورد نیاز واکنش به مدت 30 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از این مرحله به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور T/A-cloning حذف نوکلئوتیدهای اضافی موجود در واکنش با استفاده از کیت QIAquick Nucleotide removal شرکت کیاژن انجام شد سپس از کیت T/A-cloning، محصول شرکت پرومگا، به منظور بهره گیری از سیستم یک مرحله ای برای کلون کردن قطعات DNA تکثیر شده با PCR، استفاده شد و این قطعات با آنزیم T4 DNA لیگاز به درون ناقل pGEM-T وارد شدند. محصول این الحاق به باکتری *E. coli* DH5 α مستعد شده منتقل شد. از کلونی های رشد کرده بر روی محیط LB (Merck) جامد حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام شد. به منظور جداسازی قطعه از ناقل pGEM-T هضم دوگانه با آنزیم های *BamHI* و *SacI* طبق پیشنهاد شرکت فرمتاز انجام شد. محصول برش آنزیمی با استفاده از کیت کیاژن از روی

۲- ب نشان داده شده است نتیجه این تکثیر منجر به تولید قطعه ۱۲۲۸ bp شد که اندازه آن مطابق با اندازه مورد نظر بود. قطعه حاصل در ناقل های حدواسط کلون شد از آنجا که ناقل حد واسط pGEM-T بود به منظور وارد نمودن ژن به درون ناقل pGEM-T و به علت این که این ناقل دارای یک انتهای آزاد T میباشد، یک نوکلئوتید به دو انتهای ژن اضافه گردید پس از این مرحله به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور T/A- cloning حذف نوکلئوتیدهای اضافی موجود در واکنش با استفاده از کیت QIAquick Nucleotide removal شرکت کیاژن انجام شد که بدست آوردن کلونی های در حال رشد روی محیط کشت انتخابی موید صحت کار می باشد. در نهایت سازه تهیه شده پس از برش و خالص سازی به pBI منتقل گردید که نتیجه هضم آنزیمی کلون های pBI:EXPA18 رشد کرده در محیط آنتی بیوتیک دار با آنزیم های *Bam*HI و *Sac*I در شکل ۲- ج نشان دهنده صحت کلون های ساخته شده می باشد. در طی این تحقیق سازه آماده شده برای تشدید بیان ژن *EXPA18* به اگروباکتریوم که به عنوان یک ناقل طبیعی در تراریختگی گیاهان روشی مرسوم و کارآمدست و در مورد بسیاری از گیاهان کاربرد دارد منتقل گردید. در این تحقیق نیز به منظور انتقال ناقل pBI121 نو ترکیب به گیاه آراییدوپسیس بدلیل در دسترس بودن و کارایی بهتر برای روش انتقال بواسطه غوطه وری گل آذین از سویه LBA4404 این باکتری استفاده شد.

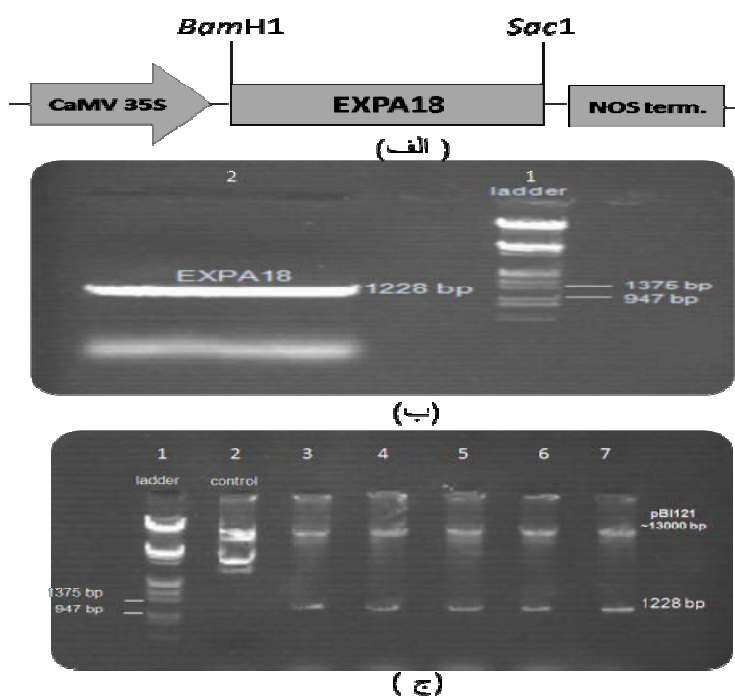
سازه ژنی pBI:EXPA18 از طریق غوطه وری گل آذین به آراییدوپسیس تالیانا منتقل شد. دلیل استفاده از این روش این بود که اکثر روش های استفاده شده برای انتقال ژن به گیاهان مستلزم مراحل کشت بافتی هستند که این مراحل می توانند منجر به تغییرات ژنتیکی ناخواسته ای مثل تغییر در میتلاسیون سیتوزین، القا جهش و همچنین انحرافات کروموزومی شوند. بنابراین روش انتقال ژنی که فاقد این مراحل باشد، قطعاً مطلوب تر خواهد بود. از مزایای روش غوطه وری گل آذین این است که با حذف مراحل کشت بافت و باززایی، زمان کمتری صرف خواهد شد و همچنین به نیروی ماهر و متخصص کمتری نیاز است. طی بررسی هایی که روی گیاه آراییدوپسیس انجام شده است، مشخص شده که با این

القای گلدهی به فیتوترون با شرایط طول روز بلند (۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) منتقل شدند در هر دو حالت میانگین درجه حرارت ۲۱°C و میزان رطوبت معادل ۵۰ درصد بود. بعد از ظهور شاخه های گل دهنده اولیه، این شاخه ها از نزدیک محل روزت قطع شدند تا جوانه های گل ثانویه با تعداد بیشتر تولید گردد. تلقیح زمانی انجام گرفت که هر گلدان دارای ۲۰ تا ۳۰ گل آذین و تعداد بسیار کمی غلاف بود.

برای انتقال ژن به گیاهان آراییدوپسیس از روش غوطه وری گل آذین استفاده شد. در این روش سوسپانسیون باکتری ها که حاوی ۵ درصد سوکروز، ۰/۰۵ سورفکتانت Silwet-L77 و دارای OD حدود ۲-۱/۸ بود آماده شد و سپس گلدان ها به مدت ۴۰ ثانیه به طور وارونه در این سوسپانسیون قرار گرفتند، به طوری که تمام گل آذین گیاه در داخل سوسپانسیون غوطه ور شد (Zhang et al. 2006). سپس گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در زیر پوشش نایلونی و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت گیاهان به فیتوترون منتقل شدند. بذور حاصل از این گیاهان به منظور گزینش جهت دستیابی به گیاهان تراریخت، با الکل ۷۵ درصد و هیپوکلریت ۲/۵ درصد ضد عفونی شدند. این بذور بر روی محیط MS نیم برابر حاوی ۵۰ mg/l کانامایسین کشت شدند و از گیاهان گزینش شده بر روی این محیط استخراج RNA به روش RNXTM انجام شد و متعاقباً ساخت cDNA صورت گرفت. در نهایت با استفاده از این cDNA و آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و *EXPA18* واکنش RT-PCR انجام شد.

نتایج و بحث

ژن *EXPA18* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix و با تکنیک PCR تکثیر گردید. برای کاهش احتمال خطا در فرآیند تکثیر از این آنزیم استفاده شد که خاصیت غلط گیری دارد و تخمین زده می شود که نرخ اشتباه آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix، یک در هر ۵/۲ میلیون نوکلئوتید در هر چرخه باشد. از آنجا که کارایی آنزیم های دارای خاصیت ترمیمی پایین است شرایط انجام PCR ابتدا با آنزیم *Taq* پلیمرز بهینه شد و سپس تکثیر قطعه با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix انجام شد. همان طور که در شکل



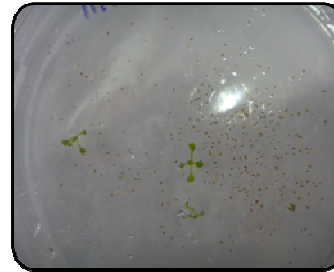
شکل ۲- ساخت و تایید سازه pBI:EXPA18. الف) سازه ژنی pBI:EXPA18. ب)- محصول تکثیر ژن *EXPA18* بر روی ژل آگارز یک درصد، ۱) مارکر وزن مولکولی λ /EcoRI+HindIII، ۲) ژن *EXPA18* تکثیر شده با آنزیم High Fidelity PCR Enzyme Mix، ج)- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب آگروباکتریوم پس از انتقال به *E. coli* ۱) مارکر وزن مولکولی λ /EcoRI+HindIII، ۲) پلاسمید نو ترکیب برش نخورده ۳-۷) حضور قطعه *EXPA18* در ۵ کلونی مختلف.

راندمان انتقال ژن به روش غوطه وری گل آذین، به میزان ۲-۳ درصد می گردد (Martinez et al. 2004). بنابراین در این پژوه از تراکم سلولی آگروباکتریوم (OD_{600}) ۲ استفاده شد. پس از انتقال سازه pBI:EXPA18 با روش غوطه وری گل آذین به گیاهان آرابیدوپسیس بذوری که از این گیاهان حاصل گردید برای گزینش اولیه گیاهان تراریخته بر روی محیط MS نیم برابر انتخابی کشت شدند. بعد از گذشت دو هفته بذوری که جوانه زده بودند در صورتی که حاوی ژن بودند در صورتی که غیرتراریختها سفید شده و حذف می گردیدند به رشد ادامه داده و سبز می ماندند لذا همان طور که در شکل ۳ الف نشان داده شده است تعدادی از گیاهان توانایی رشد در محیط کاناماسین را دارند که به عنوان گیاهان تراریخته احتمالی انتخاب شده و به گلدان منتقل شدند (شکل ۳ ب).

روش می توان به نرخ انتقال ژنی حدود ۰/۵-۳ درصد دست پیدا کرد (Zhang et al. 2006). علاوه بر این مزیت از آنجایی که در گیاه آرابیدوپسیس میزان بذر زیادی تولید می شود و با توجه به کارایی انتقال ژن ۰/۵ تا ۳ درصد در این تحقیق، گیاهان تراریخته زیادی تولید شد که اگر این روش انتقال ژن در مورد کلزا هم بهینه سازی شود، می توان بدون نیاز به مراحل کشت بافت گیاهان تراریخته کلزای بسیاری به دست آورد. زمان تلقیح با آگروباکتریوم در این روش بسیار مهم است و گیاهان تراریخته زمانی که آگروباکتریوم پنج روز یا بیشتر بعد از گرده افشانی به کار برده شود بدست می آیند. در روش غوطه وری گل ها هدف انتقال ژن، تخمک ها می باشند و آگروباکتریوم باید قبل از بسته شدن Locule وارد تخمدان شود. استفاده از این روش در گیاهان کلزا (Li et al. 2010)، یونجه (Trieu et al. 2000) و تربچه (Curtis and Nam 2001) نیز گزارش شده است. افزایش تراکم سلولی آگروباکتریوم مورد استفاده (OD_{600}) از ۰/۸ به ۲ باعث افزایش



(ب)



(الف)

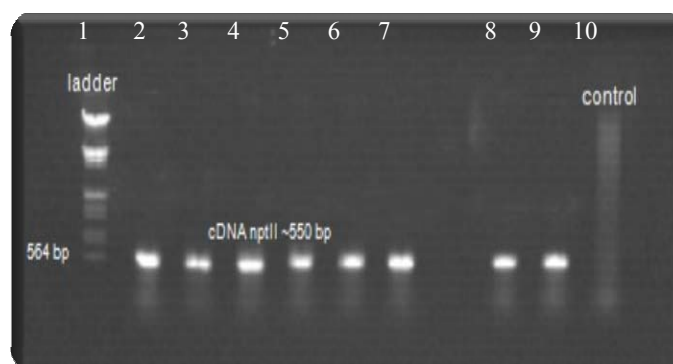
شکل ۳- شناسایی گیاهان تراریخته احتمالی آراییدوپسیس (الف) شناسایی گیاهان تراریخته احتمالی آراییدوپسیس بر روی محیط انتخابی حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین
شکل ب گیاهان تراریخته احتمالی آراییدوپسیس پس از انتقال به گلدان

چاهک ۱۰ در این شکل نمایانگر عدم وجود باند مورد نظر در این مکان می‌باشد که مجموع این دو نشان می‌دهد که گیاهان انتخاب شده حاوی ناقلی هستند که دارای ژن *nptII* می‌باشد. جهت تأیید بیشتر و اثبات این که باند به دست آمده در تست قبل آلودگی موجود در محیط نمی‌باشد مجدداً آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *EXPA18* و *sscDNA* گیاهان تراریخته به عنوان الگو انجام گردید. همانطور که در شکل ۴-ب مشاهده می‌شود، قطعه 789 bp حاصل از تکثیر با آغازگرهای *EXPA18* تنها در گیاهان تراریخته وجود دارد و در گیاه شاهد باندی دیده نمی‌شود که این مسئله، تأییدی بر تشدید بیان ژن *EXPA18* در گیاهان تراریخته می‌باشد.

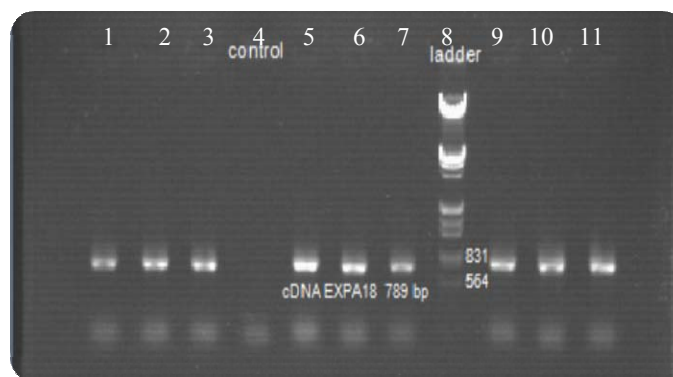
نتایج آزمون RT-PCR بر روی نمونه‌های گیاه تراریخت و مقایسه آن با نمونه خالص شده از گیاه شاهد غیرتراریخت نشان می‌دهد که نسخه برداری موفق از ژن مورد نظر انجام می‌گیرد. قابل ذکر است که رقیق‌سازی cDNA های ساخته شده نقش بسیار موثری در تکثیر باند مورد نظر در واکنش RT-PCR دارد. همانطور که قبلاً ذکر شد، بیان ژن *EXPA18* مختص بافت ریشه می‌باشد. بنابراین همانطور که انتظار می‌رفت چون از بافت‌های برگ و گل آذین استخراج RNA انجام شد، باندی در گیاهان شاهد مشاهده نشد. با توجه به اینکه این ژن در سازه ژنی، تحت پیشبرنده $35S$ قرار گرفته است، طبق انتظار بیان این ژن در تمام بافت‌های گیاهان تراریخته انجام می‌شود.

استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین بعنوان گزینشگر اولیه گیاهان تراریخته به این دلیل است که کانامایسین قادر است با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌سازی و با اتصال به بخش $30S$ ریبوزوم، که در اندامک‌ها وجود دارد، سلول تحت اثر را از بین ببرد. میزان مقاومت یک سلول گیاهی تراریخت شده بستگی کامل به تعداد نسخه‌های ژن^۱ مقاومت به کانامایسین و جایگاه قرارگیری آن درون ژنوم هسته‌ای^۲ دارد. در این پژوهش از غلظت کانامایسین 50 میلی گرم بر لیتر به منظور انتخاب گیاهان تراریخته استفاده شد. در این غلظت کانامایسین گیاهان شاهد از رشد باز ماندند و سفید شدند. در حالیکه با این غلظت کانامایسین، گیاهان تراریخته تولید ریشه‌های بلند نموده و سبز ماندند. غلظت بیش از این حد (50 میلی گرم بر لیتر) منجر به از بین رفتن گیاهان تراریخته احتمالی می‌گردد. به منظور تأیید تراریخته بودن گیاهان، بیان ژن *EXPA18* در گیاهان تراریخته احتمالی با کمک روش RT-PCR بررسی گردید. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، با استفاده از آغازگرهای مناسب (الیگو dT) و با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی، واکنش PCR انجام شد. همان‌گونه که نتیجه آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و *sscDNA* گیاهان تراریخته و شاهد، در شکل ۴ الف نشان می‌دهد، در چاهک‌های ۲ تا ۷ حضور ژن *nptII* و در نتیجه سازه ژنی مورد نظر در گیاهان تراریخته، با ظاهر شدن باند حدود 560 bp تأیید می‌گردد.

¹ Gene copy number² Position effect



(الف)



(ب)

شکل ۴- نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی. الف) نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* بر روی ژل آگارز یک درصد، (۱) مارکر وزن مولکولی λ /EcoRI+HindIII (۲-۹) تکثیر ژن *nptII* در گیاهان تراریخته (۱۰) عدم تکثیر ژن *nptII* با در گیاه شاهد. ب) نتیجه آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *EXPA18* بر روی ژل آگارز یک درصد، (۸) مارکر وزن مولکولی λ /EcoRI+HindIII (۳-۷، ۱۱-۱۰) عدم تکثیر cDNA ژن *EXPA18* در گیاهان تراریخته، (۴) عدم تکثیر cDNA ژن *EXPA18* در گیاه شاهد.

منابع

- Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S (1998) Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. Development 125:2925-2934.
- Choi D, Cho HT, Lee Y (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. Physiol Plant 126:511-518
- Cosgrove DJ (1996) Plant cell enlargement and the action of Expansins. BioEssays 18: 533-540
- Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 391-417
- Cosgrove DJ (2000a) Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiol Biochem 38: 109-124
- Cosgrove DJ (2000b) Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321-326

با توجه به نقش اکسپنسین‌ها در بسط دیواره سلولی انتظار می‌رود که با تشدید بیان این ژن ریشه‌های توسعه یافته‌تری ایجاد شود. با توجه به اینکه این ژن تحت پیش‌برنده ۳۵S قرار گرفته و بیان این ژن در تمام بافت‌های گیاهان تراریخته انجام می‌شود، بنابراین انتظار می‌رود که علاوه بر توسعه اندام ریشه فنوتیپ جدیدی در دیگر اندام‌ها مشاهده شود که باید مورد بررسی قرار گیرد. ضمن بررسی تاثیر افزایش بیان این ژن در آرابیدوپسیس و تأیید نقش این ژن در توسعه ریشه می‌توان این ژن را به گیاه کلزا که یکی از دانه‌های روغنی خوراکی و صنعتی با اهمیت در جهان به شمار می‌آید، انتقال داد.

- Curtis I S, Nam HG (2001) Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research* 10:363-371.
- Doyle JJ, JL Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* Vol. 12, pp. 11-5
- Li J, Xiaoli T, Zhu F, Guo J (2010) A Rapid and Simple Method for *Brassica Napus* Floral-Dip Transformation and Selection of Transgenic Plantlets. *International Journal of Biology* 2, 127-131.
- Martinez-Trugillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* 22, 63-70.
- Sampedro J, Cosgrove DJ (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology* 6: 242.
- Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.
- Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J* 22: 531-541.
- Vissenberg K, Martinez-Vilchez IM, Verbelen J-P, Miller JG, Fry SC (2000) *In vivo* co-localization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 12: 1229-1237
- Zhang X, Henriques R, Lin S, Niu Q, Chua N (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method *Nature Protocols* 1:641-646.