

طراحی و ساخت سازه اختصاصی کلروپلاستی گیاه برنج حاوی ژن‌های بتائین آلدئید دهیدروژناز (*badh*) و فلاودکسین (*fld*) جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های غیرزنده

مسعود توحیدفر^{۱*}، ابراهیم قریشی^۲، براتعلی فاخری^۳، مطهره محسن‌پور^۱

۱. دانشیار و استادیار بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج ۲، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشگاه زابل، زابل ۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۳)

Design and Construction of Specific Chloroplast Vectors for Rice Plants Containing Betaine Aldehyde Dehydrogenase (*badh*) and Flavodoxin (*fld*) Genes for Resistance to Abiotic Stress

M. TOHIDFAR^{1*}, E. GHOREYSHI², B. FAKHERI³, M. MOHSENPOUR¹

1. Associate Professor & Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran. 2. M.Sc. student of Department of Agronomy and Plant Breeding, Zabol University, Zabol, Iran.

3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Zabol University, Zabol, Iran

(Received: May. 6, 2014 - Accepted: Sep. 14, 2014)

Abstract

Abiotic stresses such as drought and salinity are the first factor of YIELD decrease in the world. In this study, betaine aldehyde dehydrogenase gene (*badh*) is used as both an abiotic stress marker gene and one of the abiotic stress tolerance candidate genes along with Flavodoxin (*fld*) in construction of chloroplast vector for rice. Thereby, adding the appropriate enzyme role to let gene cassette enter to the center. The first two parts of a specific target area of Plastom rice (FR) the rice genome using PCR that they can be re-attached in cloning. Then, the gene cassettes were designed for *fld* and *badh* genes in regulatory regions of the chloroplast. So that the *fld* genes and with *rbcl* 5'UTR and *badh* genes with T7gene10 5'UTR were cloned the strong chloroplast promoter Prn and the terminator *rbcl* 3'UTR. Finally, The complete two-gene cassettes *fld/badh* with the regulatory regions is separated from targeting chloroplast metabolism of rice in two sides cloned. The two specific chloroplast vector called pFrFB(-) and pFrFB(+) are potential to be attached to gene that are resistant to drought and salinity targeted with two different orientations relative to the inner regions of the chloroplast genome of rice plants and are able to be the goal of creating high resistance to salinity, drought and chill in transferring genes to use the chloroplast of rice plant via gene gun.

Keywords: Abiotic stress, Betaine aldehyde dehydrogenase, Flavodoxin, Cloning, Vector chloroplastid

چکیده

تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و شوری اولین عامل کاهش محصول در دنیا است. در این تحقیق ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز (*badh*) هم به عنوان یک نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی و هم به عنوان یکی از ژن‌های کاندید در تحمل به تنش‌های غیرزیستی به همراه ژن فلاودکسین (*fld*) در ساخت ناقل کلروپلاستی برای گیاه برنج مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ابتدا دو قسمت از یک ناحیه اختصاصی هدف‌گیری کننده به پلاستوم برنج (FR) با افزودن جایگاه آنزیمی مناسب جهت ورود کاست‌های ژنی به مرکز آن، در دو مرحله به گونه‌ای با استفاده از PCR از ژنوم کلروپلاستی برنج جداسازی شد که امکان اتصال مجدد آنها ضمن کلون‌سازی ایجاد گردد. سپس طراحی کاست ژنی برای ژن‌های *fld* و *badh* تحت نواحی تنظیمی کلروپلاستی انجام شد، به طوری که ژن *fld* همراه با *rbcl* 5'UTR و ژن *badh* همراه با T7gene10 5'UTR به صورت پلی‌سیسترونی تحت پیشبر قوی کلروپلاستی Prn و پایانبر *rbcl* 3'UTR کلون‌سازی شدند. سرانجام کاست کامل دو ژنی *fld/badh* به همراه نواحی تنظیمی از ناقل نوترکیب حاصل موسوم به pBF جدا و در مرکز ناحیه هدف‌گیری کننده به کلروپلاست برنج در دو جهت کلون‌سازی گردید. دو ناقل مختص کلروپلاست حاصل موسوم به pFrFB(-) و pFrFB(+) بتانسیل الحاق هدفدار ژن‌های مقاوم به شوری و خشکی را با دو جهت‌گیری مختلف نسبت به نواحی داخلی ژنوم کلروپلاستی گیاه برنج دارا بوده و قادرند با هدف ایجاد مقاومت بالا به شوری، خشکی و سرما در انتقال ژن به کلروپلاست گیاه برنج با استفاده از تفنگ ژنی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بتائین آلدئید دهیدروژناز، تنش‌های غیرزنده،

فلاودکسین، کلون‌سازی، ناقل کلروپلاستی

مقدمه

تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری، دمای بالا، سمیت شیمیایی و تنش اکسیداتیو تهدیدات جدی برای کشاورزی محسوب می‌شود و اثرات نامطلوبی بر رشد و باروری گیاهان زراعی بر جای می‌گذارند. این‌گونه تنش‌ها دلیل اصلی و عمده کاهش محصولات زراعی در سراسر دنیا بوده و منجر به کاهش عملکرد اکثر گیاهان مهم زراعی تا بیش از ۵۰ درصد می‌شود (Bray et al. 2000; Boyer, 1982). تنش‌های غیرزیستی باعث کاهش انتقال الکترون در مسیر فتوسیستم می‌شوند، فرودکسین‌ها (Fd) که در انتقال الکترون دخالت دارند در پاسخ به محرک‌های محیطی کاهش می‌یابند (Sing and Sherman, 2004). سیانوباکترها نسبت به نتایج نامطلوب کاهش فرودکسین، بیان ناقل‌های الکترونی همانند فلاودکسین (Fld) با عملکرد مشابه فرودکسین را القا می‌کنند (Falk et al. 1995). Fldها پروتئین‌های کوچک (تقریباً ۱۹ kDa) حاوی فلاوین مونونوکلوئید حمل‌کننده الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوستنز هستند که باعث رد و بدل شدن الکترون‌ها در بین مجموعه‌ای از گیرنده‌ها و پذیرنده‌ها می‌شوند (Zubriggen et al. 2007). طبق گزارش‌ها بیان Fld در کلروپلاست گیاه توتون، موجب افزایش تحمل لاین‌های تراریخت نسبت به تنش‌های غیر زیستی شد (Tognetti et al. 2006). از جمله راه‌های دیگری که بسیاری از گیاهان و برخی موجودات زنده در صورت مواجه شدن با تنش اسمزی انجام می‌دهند سنتز و تجمع ترکیباتی است که حفاظت‌کننده‌های اسمزی نامیده می‌شوند. گلاسیسین بتائین از جمله این اسمولیت‌های سازگار است که طی یک واکنش دو مرحله‌ای توسط آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH) تولید می‌شود (Chen et al. 2008; Kumar et al. 2004). آزمایش‌های متعددی در محیط *In vitro* نشان داده‌اند که گلاسیسین بتائین از طریق پایدارسازی

ساختمان چهارم پروتئین‌ها و ساختمان بسیار منظم غشا در برابر اثرات مضر شوری و دماهای بسیار کم و زیاد به عنوان حفاظت‌کننده اسمزی عمل می‌کند (Gorham et al. 1997). در تحقیق دیگری انتقال ژن *badh* به کلروپلاست هویج، گیاهانی تولید کرد که غلظت‌هایی از نمک را تحمل می‌کردند که تنها هالوفیت‌ها قادر به تحمل آن بودند (Daniell and Muthukumar. 2001). مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصر به فرد را ارائه می‌دهد که شامل: بیان بالای تراژن (Daniell. 2002)، مهندسی چند ژنی در یک رویداد انتقال ژن (Daniell et al. 2001; De Cosa et al. 2003; Ruiz et al. 2003) محدود نگه‌داشتن تراژن از طریق وراثت مادری (Daniell. 2002) فقدان خاموشی ژن (De Cosa et al. 2001; Lee et al. 2003) فقدان اثرات مکانی و پلیوتروپیک (Daniell, 2002) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد (Grevich and Daniell, 2005).

مهندسی ژنتیک کلروپلاست، نوید بزرگی برای بیوتکنولوژی گیاهی است. پیشرفت‌های اخیر انتقال ژن به پلاستید، فن‌آوری مهندسی پلاستید را به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای تراریخت هسته‌ای مطرح می‌کند، که می‌توان از آن به عنوان زمینه‌ای کارا و سازگار با مسائل زیست‌محیطی، برای ایجاد صفات با ارزش زراعی استفاده نمود. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که همولوژی بالای توالی‌های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی همولوگ و برای هدف‌گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی محسوب می‌شود (Dufourmantel et al. 2004; Kumar et al. 2004a; Kumar et al. 2004b). براساس تحقیقات انجام شده، ورود ژن نشانگر هیچ تداخلی با بیان ژن‌های پلاستییدی مجاور ۱۴ ناحیه بین ژنی در پلاستوم نداشت. قطعات DNA پلاستییدی که

با نشانگر انتخابی مقاومت به استرپتومایسین، پلاسمید pB حامل ژن *badh* با نشانگر انتخابی آمپی سیلین، پلاسمید pTZ57T/A (Fermentase) و پلاسمید pJET(Roche) بود. آنزیم‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت (Roche) و (Fermentase) تهیه شد. استخراج پلاسمید، تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش اتصال، فسفرزایی و استفاده از آنزیم کلنو، طبق دستورالعمل‌های Sambrook and Russl (۲۰۰۰) انجام شد.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها
توالی کامل ژنوم کلرو پلاستی گیاه برنج از سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) دریافت شد. توالی‌های احاطه کننده چپ (FR1) و راست (FR2) هر کدام به طول ۲۲۰۰bp انتخاب گردید و آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo tech طراحی شدند که یک سایت برشی *SphI* در سمتی که این دو قطعه به هم وصل می‌شدند ایجاد شود.

ساخت پلاسمید نو ترکیب pBF حاوی ژن‌های *fld* و *badh*

ابتدا ژن *fld* که درون ناقل p6-ubi قرار داشت با دو آنزیم *SacI* و *SalI* هضم و قطعه ۵۱۰bp از روی ژل آگارز خالص‌سازی شد در ناقل p6-ubi جایگاه آنزیمی *SalI* در انتها و *SacI* در ابتدای ژن *fld* قرار دارد و این در حالی است که به منظور کلون سازی ژن *fld* تحت نواحی تنظیمی کلروپلاستی، نیاز بود جایگاه‌های آنزیمی *SalI* در ابتدا و *SacI* در انتهای ژن اضافه شود (شکل ۱) بنابراین قطعه خالص شده *fld* پس از تیمار با آنزیم کلنو و افزودن یک نوکلئوتید آدنین به انتهای آن در ناقل pTZ57T/A کلون‌سازی شد. چون کلون‌سازی از نوع T/A بوده و امکان ورود قطعه در دو جهت وجود داشت (شکل ۱) انتخاب کلونی‌های حاوی ژن مورد نظر با جهت ورود مناسب به روش کلونی PCR با استفاده از آغازگر رو به جلوی M13 و رو به عقب

حاوی هر یک از این ۱۴ مکان ورود بین ژنی خنثی می‌باشند، این قابلیت را دارند که برای طراحی ناقل‌های انتقال ژن پلاستی از آنها استفاده شوند (Maliga, 2004). توالی بین ژنی 16S/23SrRNA اختصاصی ژنوم کلروپلاستی که در ناحیه تکرار معکوس کلروپلاستی قرار دارد و باعث می‌شود در هر ptDNA دو نسخه از ژن موردنظر الحاق شود در انتقال ژن به کلروپلاست مورد توجه بوده است (Grevich and Daniell, 2005).

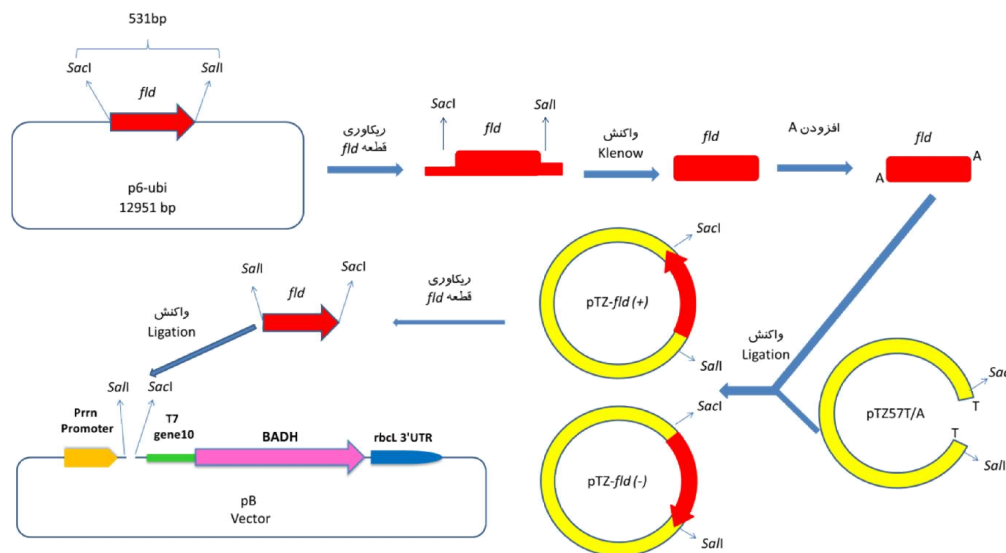
برنج گیاهی نسبتاً حساس به شوری است که در مقایسه با سایر غلات حساسیت بیشتری را نسبت به شوری از خود نشان می‌دهد (Akbar and Ponnampereuma, 1982). با توجه به اینکه برنج دومین ماده غذایی مصرفی در ایران است، از نظر تغذیه از اهمیت بالایی برخوردار است. با این وجود، افزایش سطح آب دریا و نفوذ آب دریا در اراضی ساحلی همواره این نگرانی را به وجود می‌آورد که زراعت رنج در دو استان شمالی کشور یعنی مازندران و گیلان که در مجموع در حدود ۶۴٪ برنج کشور را تولید می‌کنند، تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش تولید در آنها را موجب شود (Kavusi, 1994). با در نظر گرفتن مسائل ذکر شده به نظر می‌رسد که به‌نژادی این گیاه برای مقاومت به شوری در این شرایط اجتناب ناپذیر است. هدف از این تحقیق همسازسازی ژن *badh* و *fld* به طور همزمان در طراحی ناقل‌های کلروپلاستی است که انتظار می‌رود انتقال آن به گیاه در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی نقش بسزایی را ایفا کند.

مواد و روش‌ها

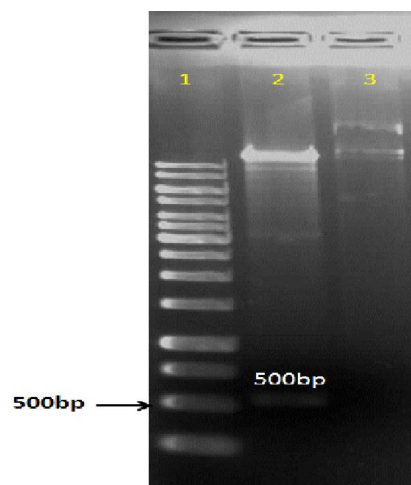
سویه‌های باکتری و پلاسمیدهای بکار رفته
در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه (XLI-) Blue Cinna Gen B76-50c استفاده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمیدهای p6-ubi حامل ژن *fld* سیانوباکتریایی،

استفاده از آنزیم T4-DNA ligase انجام و مخلوط اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E. coli* سویه XLI-Blue به روش شوک حرارتی تراریزش شد. کلونی‌های حاوی ژن مورد نظر با جهت ورود مناسب ابتدا به روش کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی *fld* (جدول ۱) و سپس توسط هضم پلاسمید نوترکیب حاصل توسط دو آنزیم *SacI* و *SalI* بررسی شد.

اختصاصی ژن *fld* و نیز توسط هضم آنزیمی، انجام شد. ژن *fld* که با ورود به پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به *pTZ-fld* دو جایگاه آنزیمی مورد نظر یعنی *SacI* و *SalI* را با جهت صحیح دریافت نموده بود، توسط آنزیم‌های مذکور برش و از روی ژل خالص‌سازی شد (شکل ۲). ناقل *pB* دارای ژن *badh* (Mohsenpour *et al.* 2012b) نیز توسط این دو آنزیم برش داده شد و قطعه ۴۹۱۳ bp از روی ژل خالص‌سازی و واکنش اتصال با



شکل ۱- نمای شماتیک ساخت ناقل نوترکیب pBF



شکل ۲- هضم آنزیمی ناقل *p6-ubi* با آنزیم‌های *SacI* و *SalI* برای جداسازی ژن *fld* (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb DNA ladder, Fermentase). (۲) نمونه هضم شده ناقل *p6-ubi* با آنزیم‌های *SacI* و *SalI*. (۳) نمونه هضم نشده ناقل *p6-ubi*.

پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های نوترکیب حاصل، از هضم آنزیمی *SphI* برای بررسی تشکیل سایت برشی این آنزیم در مرکز ناحیه FR استفاده شد.

وارد کردن قطعه هدف به ناقل pJET-FR
ابتدا ناقل *pB(fld/badh)* با آنزیم *SphI* هضم و قطعه هدف به طول ۲۴۹۲bp از روی ژل خالص‌سازی شد و همچنین ناقل pJET-FR نیز با آنزیم *SphI* برش و بلافاصله با آنزیم آلکالین فسفاتاز دفسفریله شد تا از خود اتصالی (Self-ligation) ناقل جلوگیری گردد. سرانجام قطعه هدف (کاست ژنی *fld/badh*) در وسط توالی‌های هدف‌گیری کننده چپ و راست همسانه‌سازی شد. از آنجایی که قطعه هدف و ناقل pJET-FR هر دو با آنزیم *SphI* برش خورده بودند امکان ورود قطعه به ناقل در دو جهت وجود داشت لذا کلونی‌های نوترکیب پس از استخراج پلاسمید با استفاده از آنزیم‌های *SphI* (برای تایید حضور قطعه) و آنزیم *SacI* و *SalI/NotI* (برای تعیین جهت قطعه) مورد هضم قرار گرفتند.

کلون کردن قطعات هدف‌گیری کننده در ناقل pJET
کل DNA ژنومی از برگ گیاه برنج رقم هاشمی با استفاده از کیت (DNeasy plant Mini) شرکت Qiagene استخراج شد. توالی‌های احاطه‌کننده چپ و راست با استفاده از آنزیم Long PCR Enzyme تکثیر شدند. محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA (Roche) طبق دستورالعمل از روی ژل خالص‌سازی شد. با استفاده از آنزیم لیگاز قطعه اول (FR1) در ناقل pJET کلون شد. ورود FR1 به داخل ناقل کلروپلاستی، با آغازگرهای رو به عقب pJET (جدول ۱) و FR1 مورد بررسی قرار گرفت. سپس ناقل حاصل (pJET-FR1) با آنزیم‌های *SphI* و *PvuII* هضم و قطعه ۴۵۵۲ bp از روی ژل خالص‌سازی شد. محصول PCR قطعه دوم (FR2) پس از هضم با آنزیم *SphI*، از روی ژل آگاروز خالص‌سازی شد و سپس به pJET-FR1 متصل شد (pJET-FR). برای بررسی ورود دو قطعه ابتدا کلونی‌های حاصل با آغازگرهای رو به جلوی FR1 و رو به عقب FR2 تحت کلونی PCR قرار گرفتند و

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	نوع آغازگر	توالی آغازگر
آغازگرهای اختصاصی ژن <i>fld</i>	رو به جلو	5'-CTACGGTACTCAAACCTGG-3'
	رو به عقب	5'-GCGATCGTCTGTAAAGTC-3'
آغازگرهای اختصاصی وکتور pJET	رو به جلو	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
	رو به عقب	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'
M13	رو به جلو	5'-GTA AACGACGGCCAG-3'
	رو به عقب	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

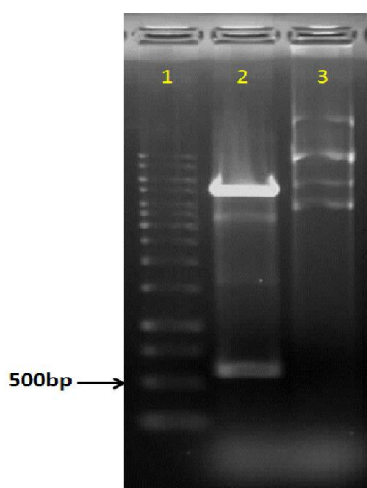
SalI در ابتدا و *SacI* در انتهای ژن اضافه شود. این در حالی بود که این دو جایگاه آنزیمی در ناقل p6-ubi عکس این حالت قرار داشت. بنابراین قطعه *fld* پس از جداسازی، توسط آنزیم کلنو تیمار شد و پس از تشکیل دو انتهای صاف، یک نوکلئوتید A به انتهای 3' قطعه اضافه گردید تا قابلیت کلون‌سازی در ناقل pTZ57 را پیدا کند. جهت صحیح ژن پس از

نتایج

ساخت پلاسمید نوترکیب pBF حاوی ژن‌های *fld* و *badh*

صحت جداسازی ژن *fld* از ناقل p6-ubi با مشاهده باند مورد انتظار ۵۱۰bp مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). به منظور کلون‌سازی ژن *fld* تحت نواحی تنظیمی کلروپلاستی، نیاز بود جایگاه‌های آنزیمی

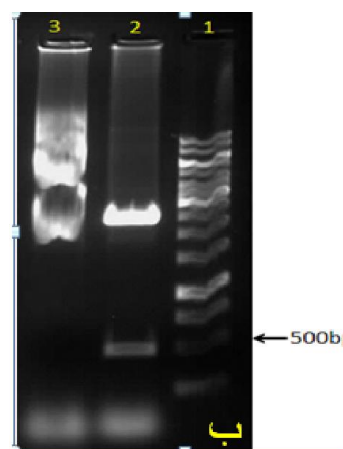
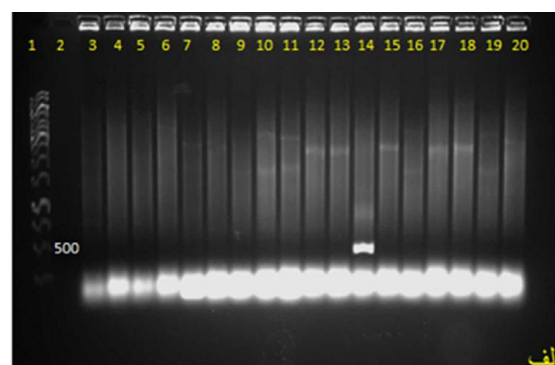
برای همسانه‌سازی ژن *fld* در ناقل pB، این ناقل نیز با آنزیم‌های *SacI* و *SalI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و قطعه هدف در این ناقل کلون و پلاسمید نوترکیب pBF ساخته شد. پلاسمید نوترکیب حاصل به داخل باکتری *E. coli* تراریزش شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب گزینش شدند و پس از استخراج پلاسمید به منظور اطمینان از درج ژن، پلاسمید نوترکیب حاصل با استفاده از آنزیم‌های *SacI* و *SalI* برش داده شد (شکل ۴).



شکل ۴- هضم آنزیمی ناقل pBF با آنزیم‌های *SacI* و *SalI* به منظور تایید پلاسمید نوترکیب حاوی هر دو ژن *badh* و *fld*. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase)، (۲) نمونه هضم‌شده ناقل نوترکیب pBF آنزیم‌های *SacI* و *SalI*، (۳) نمونه هضم‌نشده ناقل pBF.

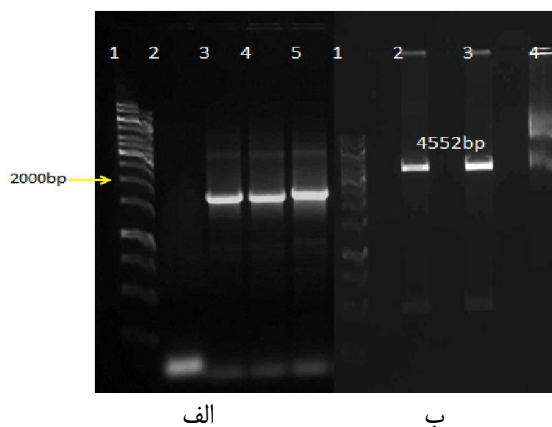
کلون کردن قطعات هدف‌گیری‌کننده در ناقل pJET
کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از کیت (DNeasy plant Mini; Qiagene) مشاهده روی ژل آگاروز مورد تایید قرار گرفت. (شکل ۵-الف) ظهور باند ۲۲۰۰bp تکثیر صحیح قطعات FR1 و FR2 را تایید کرد (شکل ۵-ب) یک جفت آغازگر FRicenter برای اضافه کردن جایگاه آنزیمی *SphI* تنها با تغییر یک نوکلئوتید در مرکز ناحیه هدف‌گیری‌کننده و در تکثیر اولیه قطعات FR1 و FR2 مورد استفاده قرار گرفت. این آغازگرها،

انتقال به ناقل pTZ57 با مشاهده باند ۵۵۳ bp حاصل از تکثیر با آغازگر رو به جلوی M13 و رو به عقب اختصاصی ژن *fld* به اثبات رسید (شکل ۳-الف). همچنین پس از استخراج پلاسمید و هضم آن با آنزیم‌های *SacI* و *SalI* درج قطعه مورد نظر در ناقل تایید شد (شکل ۳-ب). بدین ترتیب پلاسمید نوترکیب pTZ-*fld* ساخته شد.



شکل ۳- بررسی ساخت پلاسمید نوترکیب pTZ-*fld* توسط کلونی PCR و هضم آنزیمی. (الف) واکنش کلونی PCR با آغازگرهای رو به جلوی M13 و رو به عقب *fld* نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase)، (۱) نشانگر ladder، (۲) کنترل منفی، واکنش PCR بدون DNA الگو، (۳) تا ۱۳ و ۱۵ تا ۲۰ کلونی‌هایی که قطعه *fld* را با جهت عکس دریافت کرده اند، (۱۴) کلونی که قطعه *fld* را با جهت صحیح دریافت کرده است. (ب) نمونه هضم‌شده ناقل نوترکیب pTZ-*fld* با آنزیم‌های *SacI* و *SalI*، (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase)، (۲) نمونه هضم شده ناقل نوترکیب pTZ-*fld* با آنزیم‌های *SacI* و *SalI*، (۳) نمونه هضم نشده ناقل pTZ-*fld*.

کلروپلاستی قرار گیرند، به طوری که ژن *fld* همراه با 5'UTR *rbcl* و ژن *badh* همراه با T7gene10 5'UTR به صورت پلی سیسترونی تحت پیشبر قوی کلروپلاستی *Prrn* و پایان بر 3'UTR *rbcl* کلون سازی شدند (Mohsenpour *et al.* 2012a, b). صحت ورود دو قطعه (FR) و اتصال آن‌ها به یکدیگر و تشکیل سایت برشی *SphI* در بین آنها نیز با هضم توسط آنزیم *SphI* و تشکیل باند ۷۲۰۰bp تایید شد (شکل ۷-ب).

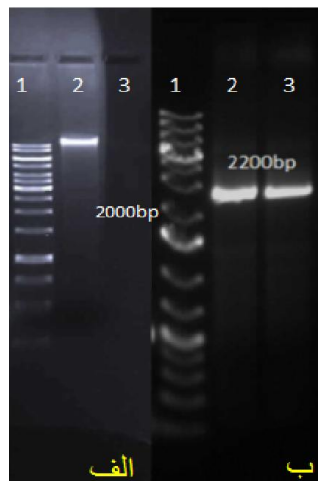


شکل ۶- (الف) واکنش کلونی PCR با آغازگرهای رو به عقب pJET و رو به جلوی FR1. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA ladder (1Kb DNA ladder, Fermentase). (۲) کنترل منفی (واکنش PCR بدون DNA الگو)، (۳ و ۴) کلونی‌هایی که دارای قطعه FR1 هستند. (ب) هضم ناقل pJET-FR با آنزیم‌های *PvuII* و *SphI*، (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA ladder (1Kb DNA ladder, Fermentase). (۲ و ۳) پلاسمیدهای هضم شده با آنزیم‌های *PvuII* و *SphI*.

وارد کردن قطعه هدف به ناقل pJET-FR

سرانجام کاست کامل ژنی *fld/badh* به همراه نواحی تنظیمی از ناقل نو ترکیب حاصل موسوم به pBF جدا و در مرکز ناحیه هدف‌گیری‌کننده به کلروپلاست برنج در دو جهت کلون‌سازی گردید. همسانه‌سازی قطعه هدف (*fld/badh*) در بین نواحی هدف‌گیری‌کننده ناقل کلروپلاستی با مشاهده باندهای ۲۴۹۲bp (قطعه هدف) و باند ۷۲۰۰bp پس از هضم با آنزیم *SphI* تایید شد (شکل ۸).

جایگاه آنزیمی مذکور را به انتهای قطعه FR1 و به ابتدای قطعه FR2 اضافه می‌کنند (شکل ۵).

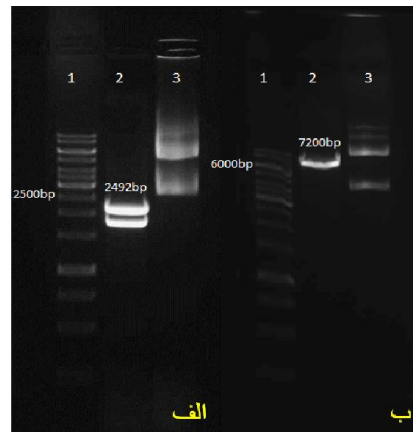


شکل ۵- جداسازی ناحیه هدف‌گیری‌کننده ژنوم کلروپلاستی برنج در دو مرحله. (الف) DNA ژنومی استخراج شده از برنج رقم هاشمی. (ب) تکثیر قطعات FR1 و بطور جداگانه FR2 با آنزیم پلیمرز دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی، (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase, 1Kb DNA ladder)، (۲) قطعه FR1 تکثیر شده با آغازگرهای رو به جلوی FR1 و رو به عقب FRcenter، (۳) قطعه FR2 تکثیر شده با آغازگرهای رو به جلوی FR2 و رو به عقب FRcenter.

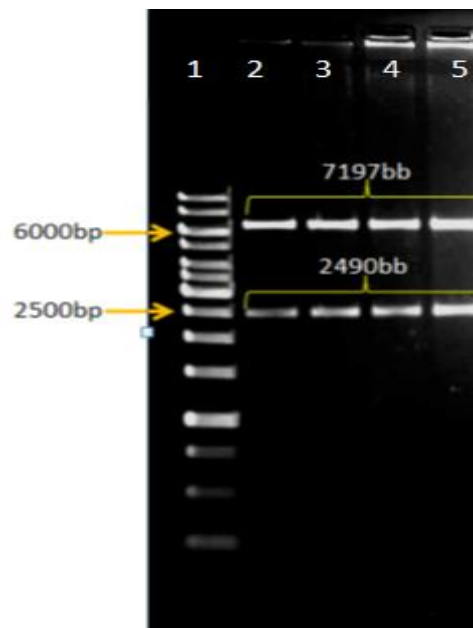
ورود قطعه FR1 به ناقل pJET توسط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای رو به عقب pJET و رو به جلوی FR1 مورد تایید قرار گرفت (شکل ۶-الف). هضم ناقل pJET-FR با آنزیم‌های *PvuII* و *SphI* باندهای مورد انتظار ۴۵۵۲bp و ۵۰۰bp دیده شد (شکل ۶-ب).

ورود قطعه FR2 به ناقل pJET-FR1 و تشکیل ناقل pJET-FR با آغازگرهای رو به جلوی FR1 و رو به عقب FR2 مورد تایید قرار گرفت.

خروج قطعه هدف با طول ۲۴۹۲bp حاوی کاست ژن‌های *fld* و *badh* از ناقل pBF پس از هضم با آنزیم *SphI* مورد تایید قرار گرفت (شکل ۷-الف). کاست ژنی مذکور برای ژن‌های *fld* و *badh* طوری طراحی شد که این ژن‌ها تحت نواحی تنظیمی



شکل ۷- هضم ناقل pBF حاوی کاست‌های ژنی هدف و pJET-FR به عنوان ناقل با آنزیم *SphI* به منظور خالص‌سازی قطعات مورد نیاز از روی ژل آگاروز. (الف) هضم ناقل pBF با آنزیم *SphI* و خروج قطعه هدف. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb DNA ladder, Fermentase)، (۲) نمونه هضم شده و کتور نوترکیب pBF با آنزیم *SphI* (باند ۲۴۹۲ bp از روی ژل جداسازی شد)، (۳) نمونه هضم‌نشده ناقل نوترکیب. (ب) هضم ناقل pJET-FR با آنزیم *SphI*. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb DNA ladder, Fermentase)، (۲) نمونه هضم شده و کتور نوترکیب pJET-FR (باند ۷۲۰۰bp از روی ژل جدا سازی شد)، (۳) نمونه هضم نشده ناقل نوترکیب.



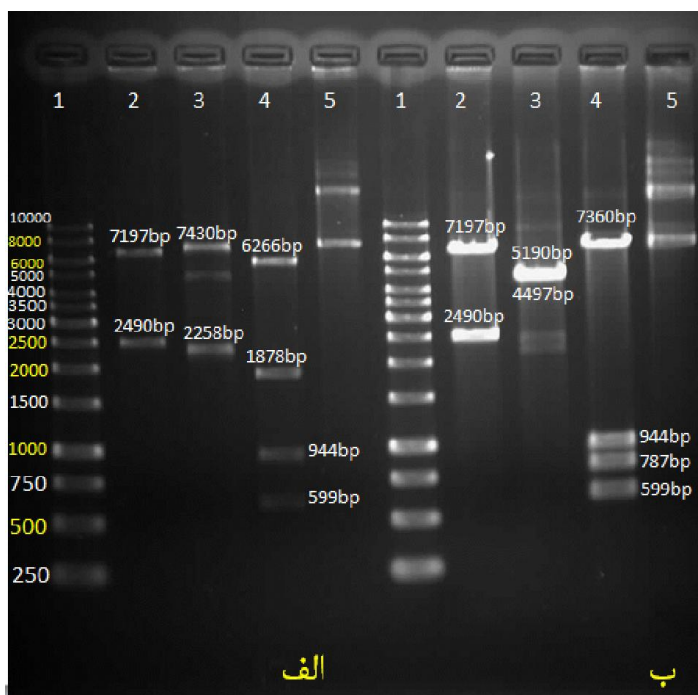
شکل ۸- هضم ناقل نوترکیب pJET FR (*fld/badh*) با آنزیم *SphI*. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb, Fermentase)، DNA ladder، (۲ تا ۵) هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های نوترکیب با آنزیم *SphI*.

pFrFB(-) و باندهای ۷۳۶۰، ۹۴۴، ۷۸۷ و ۵۹۹ جفت باز در هضم با آنزیم *SacI* و باندهای ۵۱۹۰ و ۴۴۹۷ جفت باز در هضم با آنزیم‌های *SacI* و *SalI/NotI* برای ناقل نوترکیب pFrFB(+) تایید شد (شکل ۹).

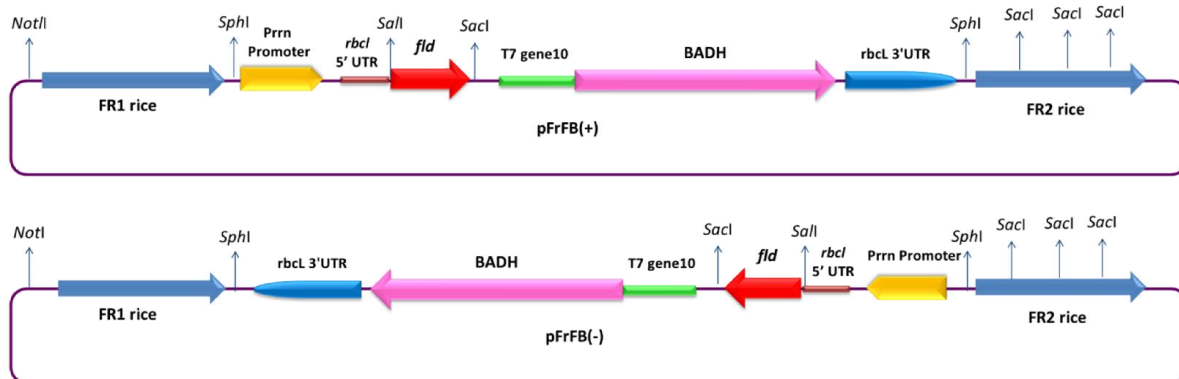
جهت ورود قطعه هدف پس هضم با آنزیم‌های *SacI* و *SalI/NotI* و مشاهده باندهای ۶۲۶۶، ۱۸۷۸، ۹۴۴ و ۵۹۹ جفت باز در هضم با آنزیم *SacI* و باندهای ۷۴۳۰ و ۲۲۵۸ جفت باز در هضم با آنزیم‌های *SalI/NotI* برای ناقل نوترکیب

rbcl و *Prrn* تحت پیش‌بر *fld* و *badh* ساختن 3'UTR (شکل ۱۰).

به این ترتیب وکتوهای کلروپلاستی نو ترکیب *pFrFB(-)* و *pFrFB(+)* در بردارنده ژن‌های



شکل ۹- تایید ساخت ناقلین جدید توسط هضم آنزیمی. (الف). هضم ناقل نو ترکیب مثبت *pFrFB(-)* با آنزیم‌های *SacI*، *SphI* و *SalI/NotI*. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase, 1Kb DNA ladder)، (۲) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SphI*، (۳) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SalI/NotI* (۴) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SacI* (۵) نمونه هضم نشده ناقل نو ترکیب. (ب). هضم ناقل نو ترکیب منفی *pFrFB(+)* با آنزیم‌های *SacI*، *SphI* و *SalI/NotI*. (۱) نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Fermentase, 1Kb DNA ladder)، (۲) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SphI*، (۳) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SalI/NotI* (۴) نمونه هضم شده ناقل نو ترکیب با آنزیم *SacI* (۵) نمونه هضم نشده ناقل نو ترکیب.



شکل ۱۰- نمای شماتیکی ناقل‌های نو ترکیب کلروپلاستی در دو جهت. (الف) ناقل کلروپلاستی با جهت مثبت *pFrFB(+)*. (ب) ناقل کلروپلاستی با جهت منفی *pFrFB(-)*.

بحث

وجود شباهت صد در صدی توالی کلروپلاستی مورد استفاده در حامل، در بالا رفتن کارایی انتقال ژن، تأثیر بسزایی دارد و علت آن نیز بالا رفتن ایجاد نوترکیبی همولوگ برای ورود قطعات به داخل ژنوم کلروپلاستی می‌باشد. انتظار بر این است که استفاده از توالی حفاظت شده بین ژنی 16S rRNA\23S از توالی اختصاصی ژنوم برنج در این تحقیق کارایی الحاق تراژن را به دلیل استفاده از FR اختصاصی بالا ببرد. همچنین استفاده از ناقل‌های ساخته شده در این تحقیق، هدف‌گیری ژن‌های موردنظر (*badh* و *fld*) را در ناحیه تکرار معکوس کلروپلاستی باعث خواهند شد که در نتیجه در هر ptDNA دو نسخه از ژن موردنظر الحاق می‌شود؛ در برداشتن *ori* کلروپلاستی نیز از دیگر مزایای ناقل‌های این تحقیق بوده که سبب خواهد شد پلاسمید حاوی تراژن‌ها در سلول حفظ گردد تا زمانی که نوترکیبی همولوگ بتواند ژن‌های موردنظر را در ژنوم کلروپلاستی الحاق کند.

نکته دیگری که در ساخت سازه‌های این تحقیق حائز اهمیت است، جهت‌گیری ژن‌های *badh* و *fld* نسبت به نواحی وحشی^۱ ژنوم کلروپلاستی است. در پلاسمیدهای نوترکیب pFrFB(+) و pFrFB(-) به ترتیب ژن‌های مذکور به صورت همسو و ناهمسو با نواحی وحشی کلروپلاستی قرار گرفته‌اند. با توجه به احتمال وقوع کراسینگ‌آور در بین قطعات همولوگ و نگرانی‌هایی که در گزارش‌های مختلف در مورد احتمال حذف ژن‌ها در نسل‌های آتی وجود دارد، لازم است اثر استفاده از هر دو سازه در پایداری ژن‌ها پس از انتقال ژن بررسی گردد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که در صورت وجود توالی‌های همولوگ، احتمال حذف یا جابجایی قطعات مذکور بسته به

جهت قرارگیری و اندازه این قطعات وجود دارد (Branzei and Foiani.2010; Kohli *et al.* 2003). بررسی‌ها نشان داده‌اند که در قطعات حاوی توالی‌های همولوگ با جهت‌گیری مخالف تنها جابجایی قطعات صورت می‌گیرد که خطر از دست دادن ژن‌ها را منتفی خواهد کرد و در این تحقیق نیز ناقل pFrFB(-) به همین علت ساخته شد. از طرف دیگر در ناقل pFrFB(+) حاوی کاست‌های ژنی به صورت همسو با اپران *rrn* کلروپلاستی ژن‌های *badh* و *fld* علاوه بر اینکه امکان بیان از نواحی تنظیمی و پیشبر تعبیه شده در ناقل را خواهند داشت بلکه امکان رونویسی سراسری^۲ آنها از اپران *rrn* وحشی کلروپلاستی نیز وجود خواهد داشت که بدین ترتیب امکان بیان ژن را باز هم دو برابر خواهد کرد (Lutz *et al.* 2007; Krech *et al.* 2013).

محصول ژن *fld* باید به کلروپلاست منتقل شود تا اثر مقاومت خود را اعمال نماید. گزارش‌هایی مبنی بر انتقال این ژن به هسته گیاه وجود دارد. که با اضافه کردن سیگنال پپتید کلروپلاستی محصول پروتئینی آن را به کلروپلاست هدایت کرده‌اند (Tognetti *et al.* 2006). در این تحقیق برای اولین بار سازه‌ای حاوی کاست بیانی این ژن برای الحاق مستقیم در ژنوم کلروپلاستی ساخته شده است که نیاز به افزودن سیگنال پپتید کلروپلاستی را منتفی کرده است و از سوی دیگر انتقال آن به همراه ژن *badh* به ژنوم کلروپلاستی امکان استفاده از نواحی تنظیمی مشترک را برای این دو ژن و بیان پلی‌سیترونی آنها فراهم آورده است. هر چند امکان انتقال این ژن‌ها به ژنوم هسته‌ای گیاه و هدایت آنها با استفاده از پپتید نشانه به کلروپلاست وجود دارد ولی اگر این ژن‌ها به هسته منتقل می‌شدند نیاز بود از پیشبر و پایانه‌های جداگانه برای هر یک از این

1. Native

2. Read-through transcription

است که به عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ اسمزی نیز عمل می‌کند. دنیل و همکاران گزارش کرده بودند که تکثیر سریع گیاهان حاصل از کلروپلاست تراریخت، تحت انتخاب BA و کارایی بالای تراریزش که ۲۵ برابر بالاتر از زمانی بود که اسپکتینومایسین به عنوان نشانگر استفاده می‌شد، از جمله مزایای استفاده از BADH به عنوان ژن نشانگر گزینش‌گر می‌باشد (Daniell and Muthukumar, 2001).

از سویی دیگر در این تحقیق با افزودن نواحی تنظیمی مختلف شامل پیش‌برها و پایان‌برهای قوی کلروپلاستی و نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب تلاش شد تا کاست کلروپلاستی مناسبی برای ژن‌ها طراحی شود که بیان بالای ژن‌ها را تأمین کند. ژن *badh* که در این تحقیق برای ساخت ناقل پلاستییدی مورد استفاده قرار گرفت به ناحیه بدون ترجمه ۵' (5'UTR) ژن ۱۰ T7 متصل گردید. از آنجایی که نشانگر انتخابی باید قادر به بیان مناسب در هر نوع ریزنمونه اعم از سبز و غیرسبز باشد، استفاده از UTR مذکور امکان بیان قوی در سطح ترجمه و قدرت انتخاب را در مراحل اولیه رشد برای ریزنمونه‌های تراریخته فراهم خواهد نمود. از ناقل‌های حاصل از این تحقیق می‌توان برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب در کلروپلاست برنج و با جایگزینی ژن‌های مورد نظر به جای ژن *fld* استفاده نمود.

سپاسگزاری

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

ژن‌ها استفاده گردد که علاوه بر افزودن طول سازه که کارایی انتقال ژن را کاهش می‌دهد باعث می‌شد نگرانی‌هایی در مورد وجود توالی‌های تکراری (در صورت استفاده از پیشبر و پایانبر مشابه برای هر دو ژن) و احتمال حذف ژن در نسل‌های بعدی وجود داشته باشد. به دلیل استفاده از نواحی تنظیمی کلروپلاستی در سازه‌های این تحقیق، انتظار بر این است که ژن‌های *fld* و *badh* نتوانند توسط RNA پلیمرزهای موجود در هسته گیاه شناسایی و رونویسی شوند و تنها پس از ورود ژن‌ها به پلاستید قدرت بیان خواهند داشت.

اکثر حامل‌هایی که برای انتقال ژن به کلروپلاست ساخته می‌شوند دارای ژن *aada* ایجادکنندهٔ مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین به عنوان نشانگر انتخابی هستند (Verma and Daniell, 2007)، ولی از آنجایی که rRNAهای پلاستییدی برخی از گیاهان به طور طبیعی جهش‌هایی دارند که از اتصال اسپکتینومایسین جلوگیری می‌کند و از سویی دیگر نگرانی‌هایی در ارتباط با مسائل ایمنی زیستی این نشانگر انتخابی وجود دارد، لذا در این تحقیق از یک ژن نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی در ساخت حامل کلروپلاستی استفاده گردید. استفاده از نشانگر *badh* در حامل کلروپلاستی طراحی شده در این تحقیق قادر است علاوه بر اینکه نگرانی‌های ایمنی زیستی نشانگرهای آنتی‌بیوتیکی را کاهش دهد، در گیاهانی که این ژن را دریافت می‌کنند صفت مقاومت به شوری، خشکی و سرما را نیز ایجاد نماید. مراحل انتخاب شامل تبدیل بتائین‌آلدئید (BA) سمی، توسط آنزیم BADH به گلایسین بتائین غیرسمی

REFERENCES

- Akbar M, Ponnampereuma FN (1982) Saline soils of South and Southeast Asia as potential rice lands. In: Rice Research Strategies for the future IIRI, manila, the Philippines Pp. 256-281.
- Boyer J S (1982) Plant productivity and environment. sci. 218:443-448.

- Branzei D, Foiani M (2010) Leaping forks at inverted repeats. *Genes & Development* 24: 5-5.
- Bray EA, Bailey-serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA 1158-1249.
- Chen S, Yang Y, Shi W, Ji Q, He F, Zhang Z, Cheng Z, Liu X, XU 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.
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology*. 20: 581-586.
- Daniell H, Dhingra A (2002) Multigene engineering: Dawn of an exciting new era in biotechnology. *Current Opinion Biotechnology*. 13(2): 136-141.
- Daniell H, Muthukumar B, Lee S (2001) Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Current Genetics*. 39: 109-116.
- Daniell H, Wiebe P, Millan FS (2001) Antibiotic-free chloroplast genetic engineering an environmentally friendly approach. *Trends in Plant science* 6: 237-239.
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniel H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* 19: 71-74.
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology* 55(4): 479- 89.
- Falk S, Samson G, Bruce D, Huner NPA, Laudenbach DE (1995) Functional analysis of the iron-stress-induced CP 43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Photosynthesis Research* 45: 51-60.
- Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvorak J, Hollington PA, Khan, JA (1997) Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K⁺/Na⁺ discrimination in wheat. *New Phycologist*. 137: 109-116.
- Grevich J, Daniell H (2005). Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 24: 83-107.
- Kavusi M (1994) Determine the appropriate model for predicting the performance of different rice varieties under salt Sepeedrud, Hassansaraii and Khazar. Dissertation, University of Tabriz, Iran. (In Farsi).
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247-258
- Krech K, Fu H, Thiele W, Ruf S, Schottler M, Bock R (2013) Reverse genetics in complex multigene operons by co-transformation of the plastid genome and its application to the open reading frame previously designated psbN. *The Plant Journal*. Accepted manuscript online: 6 JUN 2013.
- Kumar S, Dhingra A, and Daniell H (2004a) Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology* 136(1): 2843-2854.
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004b) Manipulation of gene expression facilitates cotton plastid transformation of cotton by somatic embryogenesis and maternal inheritance of transgenes. *Plant Molecular Biology*. 56(2): 203-216.
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SCH, Jeong SE, H. Daniell (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers

- drought tolerance. *Molecular Breeding*. 11: 1–13.
- Lutz KA, Azhagiri AK., Tungsuchat T, Maliga P (2007) A Guide to Choosing Vectors for Transformation of the Plastid Genome of Higher Plants. *Plant Physiol*. 145:1201-1210.
- Maliga, P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55: 289-313.
- Mohsenpour M, Babaeian Jelodar NA, Tohidfar M, Mohsenpour M (2012b). The Use of Betaine Aldehyde Dehydrogenase as a Non-Antibiotic and Safe Selective Marker in Design of Plastid Vector. *Biotechnological Journal of Environmental Microorganisms* 6 (3): 55-62.
- Mohsenpour M, Tohidfar M, Babaeian Jelodar NA (2012a) Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation. *Iranian Journal of Crop Science*. 14 (3): 218- 234.
- Ruiz O, Hussein HS, Terry N, Daniell H (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiology* 132: 1344–1352.
- Sambrook J, Russel DW (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Singh AK, Li H, Sherman LA (2004) Microarray analysis and redox control of gene expression in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiologia plantarum*. 120: 27-35.
- Tognetti VB, Palatnik JF, Fillat MF, Melzer M, Hajirezaei MR, Valle EM, Carrillo N (2006) Functional replacement of ferredoxin by a *Cyanobacterial flavodoxin* in tobacco confers Broad-Range stress Tolerance. *The Plant Cell*, 18: 2035-2050.
- Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. *Plant Physiology*. 145: 1129-1143.
- Zurbriggen M, Tognetti V B, Valle E M, Carrillo N (2007) Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms: The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *IUBMB Life*. 59: 355-360.