

سیستم القا شونده با اتانول در کالوس‌های تراریخت حاصل از کشت پروتوپلاست در گیاه چغندر قند

Characterization of Ethanol Inducible Gene Expression System in Transgenic Sugar Beet Calli Derived From Stomatal Guard Cells

اصغر میرزائی اصل^۱، احمد معینی^{۲*}، علی هاتف سلمانیان^۳، مختار جلالی جواران^۲ و لیلا خدایی^۴

چکیده

امکان بیان کنترل شده یک ژن در گیاه تراریخت از اهداف دستکاری ژنتیکی است. به طور معمول این کنترل در سطح رونویسی انجام می‌شود و پیشبر القا شونده با اتانول یکی از پیشبرهای با کارایی زیاد، در تنظیم خارجی بیان ژن است. در این پژوهش، ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پیشبر القا شونده با اتانول و خاتمه دهنده OCS تهیه و بیان آن در کالوس‌های حاصل از پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه در برگ چغندر قند بررسی گردید. ابتدا، پروتوپلاست‌های مورد اشاره استخراج شدند و کالوس‌های حاصل از این پروتوپلاست‌ها، با آگروباکتریوم دارای سازه پیشبر القا شونده با اتانول و ژن گزارشگر *GUS* تلقیح شدند. کالوس‌های حاصل از تراریختی با اتانول در شرایط درون شیشه‌ای تیمار شده و بیان ژن گزارشگر *GUS* در آن‌ها قبل و بعد از القا با اتانول بررسی شد. برخی از کالوس‌ها پس از القا با اتانول بیشترین میزان بیان ژن *GUS* را داشتند ولی قبل از القا با اتانول بیان ژن مشاهده نشد. بیان ژن گزارشگر در این کالوس‌ها زیاد و از نظر مقدار نزدیک به بیان ژن *GUS* تحت کنترل پیشبر دائمی CaMV 35S بود. زیاد بودن بیان ژن *GUS* با القای اتانول و عدم بیان آن در شرایط قبل از القا، کارایی این پیشبر در شرایط القایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، انتقال ژن، پیشبر القا شونده با اتانول، پروتوپلاست، سلول‌های نگهبان روزنه، ژن گزارشگر *GUS*

۱. دانشجوی سابق گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران
۴. دانشجوی گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران

* نویسنده مسوول

سیستم القا شونده با اتانول در کالوس‌های تراریخت حاصل از کشت ..

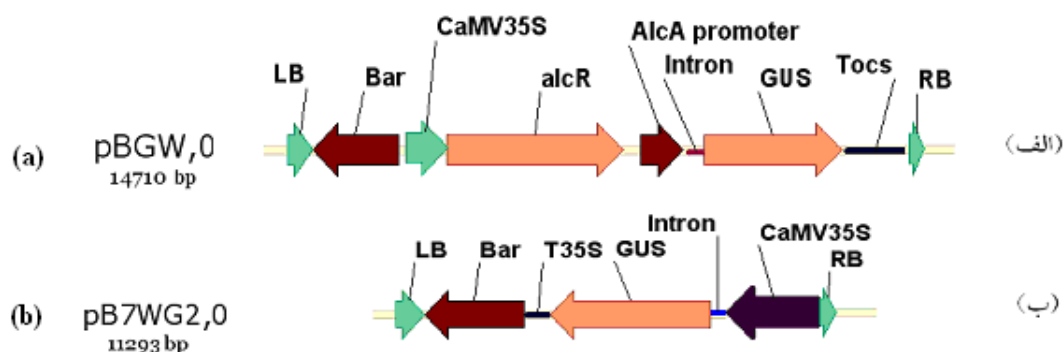
پیشبر القا شونده با اتانول در تنظیم بیان ژن در گیاهانی نظیر آرابیدوبسیس، توتون، کلزا، سیب زمینی، گوجه فرنگی و برنج مورد استفاده قرار گرفته است (Caddick *et al.* 1998., Deveaux *et al.* 2003., Roslan *et al.* 2001., Salter *et al.* 1998. and Sweetman *et al.* 2002). اما این پیشبر تاکنون در گیاه چغندر قند بررسی نشده است. در این پیشبر عامل القا کننده ارزان، غیر سمی و قابل تجزیه می‌باشد و قابلیت استفاده در آزمایشگاه و مزرعه را دارد. علاوه بر آن می‌توان اتانول را با روش‌های مختلفی نظیر پاشیدن بر روی قسمت‌های علفی، خیساندن ریشه‌ها در محلول حاوی اتانول و اتانول تبخیر شده نیز استفاده نمود (Caddick *et al.* 1998; Deveaux *et al.* 2003; Roslan *et al.* 2002; Sweetman *et al.* 2001; *al.* 2001). این پیشبر، القای ناچیزی در برابر تنش‌های مختلفی نظیر زخم، سرما، گرما یا تیمارهای اسید سالسیلیک یا متیل جاسمونات‌ها دارد (Caddick *et al.* 1998; Deveaux *et al.* 2003; Roslan *et al.* 2001; Salter *et al.* 1998; Sweetman *et al.* 2002)

چغندر قند مهم‌ترین گیاه تولید شکر در ایران و نواحی معتدل است. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک امکان انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های مختلف و یا صفات با ارزشی نظیر مقاومت به علف‌کش‌ها برای افزایش عملکرد و کیفیت محصول چغندر قند وجود دارد. کنترل بیان این ژن‌ها در زمان مناسب بسیار با ارزش خواهد بود. بنابراین نیاز است که پیشبر القا شونده با اتانول به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای کنترل بیان ژن در گیاه چغندر قند مورد بررسی قرار گیرد. این مقاله اولین گزارش بررسی پیشبر القا شونده با اتانول در گیاه چغندر قند در جهان است.

مواد و روش‌ها

برای انتقال ژن به گیاه چغندر قند، ابتدا سلول‌های نگهبان روزنه به شرحی که خواهد آمد از برگ جدا و پروتوپلاست تهیه شد. سپس از پروتوپلاست‌ها کالوس تهیه و با استفاده از آگروباکتریوم ژن مورد نظر به کالوس‌ها منتقل شد. سازه‌های (Constructs) مورد نیاز از دانشگاه Wageningen هلند تهیه شد. پلاسمید دوگانه pBGW,O حامل ژن GUS اینترون دار است که تحت کنترل پیشبر القا شونده قرار دارد که نقشه ژنتیکی آن در شکل ۱- الف نشان داده شده است. هم‌چنین برای مقایسه از پلاسمید دوگانه pB7WG2,O حاوی ژن GUS اینترون دار تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S استفاده شد (شکل ۱- ب).

پس از توالی یابی ژنوم گیاهان مختلف و کشف ژن‌ها، لازم است که اثر ژن بر مورفولوژی، مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی معلوم شود (Ren *et al.* 2003). یکی از روش‌های ارزیابی عملکرد یک ژن، بیان آن در گیاه، به صورت تنظیم شده است. انتقال ساختار القایی به همراه ژن مورد مطالعه به گیاه، اطلاعات ارزشمندی از اثرات بیان ژن در شرایط مختلف رشد را نشان می‌دهد. تاکنون پیشبر دایمی (Constitutive promoter) CaMV 35S برای بیان ژن‌های مختلف در گیاهان استفاده شده است، اما استفاده از این پیشبر و بیان دایمی برخی ژن‌ها، باعث خسارت یا مرگ در گیاه می‌شود. هم‌چنین ممکن است بیان یک ژن در یک بافت خاص یا یک مرحله خاص از رشد گیاه مورد نظر باشد. در این مورد می‌توان بیان ژن‌های مقاومت به آفت‌ها یا علف‌کش‌ها، القای گلدهی هم‌زمان گیاهان و ایجاد نرعمیمی را نام برد که در کلیه این موارد به کنترل بیان ژن مورد نظر نیاز می‌باشد (Li *et al.* 2005). برای این منظور، تنظیم بیان شیمیایی معرفی شده است که با افزودن یا حذف مواد شیمیایی خاص، می‌توان بیان ژن مورد نظر را خاموش یا روشن نمود. پیشبر القا شونده با اتانول یکی از پیشبرهایی است که در آزمایشگاه و مزرعه قابل استفاده است (Padidam 2003). این پیشبر از قارچ *آسپرژیلوس نیدولانس* (*Aspergillus nidulans*) جداسازی شده است که بیان ژن را در مرحله رونویسی تنظیم می‌کند (Felenbok *et al.* 1988). پیشبر القا شونده با اتانول، شامل دو واحد رونویسی است. واحد اول alcR است که تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S همراه با ژن *alcR* از قارچ *آسپرژیلوس نیدولانس* است و واحد دوم، از ژن هدف به همراه یک پیشبر حداقل از CaMV 35S و یک ناحیه فعال کننده بالادست پیشبر *alcA* تشکیل یافته است. در غیاب اتانول، پروتئین ALCR از واحد اول بیان می‌شود اما غیر فعال است و نمی‌تواند به پیشبر *alcA* متصل شده و در نتیجه ژن هدف بیان نمی‌شود. هنگامی که اتانول به محیط اضافه شود، پروتئین ALCR با اتانول واکنش داده و ساختار فضایی آن تغییر می‌یابد و به شکل فعال خود تبدیل می‌شود. این عامل رونویسی فعال شده به پیشبر *alcA* متصل می‌شود و در نتیجه ژن هدف در پایین دست رونویسی می‌گردد. وقتی اتانول حذف شود پروتئین ALCR فعالیت خود را از دست داده و از ناحیه پیشبر *alcA* رها می‌شود و بیان ژن نیز پایان می‌پذیرد (Caddick *et al.* 1998).



شکل ۱: سازه‌های ژنی مورد استفاده در انتقال ژن به کالوس‌های چغندر قند (a): سازه حاوی ژن *GUS* اینترون دار تحت کنترل پیشبر CaMV 35S القا شونده با اتانول (b): سازه حاوی ژن *GUS* اینترون دار تحت کنترل پیشبر دایمی CaMV 35S

Figure 1. Constructs used for gene transfer into calli of sugar beet. a. The construct containing gus-intron gene under control of the ethanol induced promoter. b. The construct containing gus-intron gene under control of the CaMV 35S promoter.

میلی‌لیتر محلول CPW15S (نمک‌های CPW به همراه ۰/۹٪ مانیتول، ۰/۲۵ Mm n-propyl gallate و ۰/۱۵٪ ساکارز) با دقت روی سوسپانسیون پروتوپلاست ریخته شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول 9M (۰/۹٪ مانیتول و 1mM CaCl₂, 2 H₂O) اضافه شد. با انجام سانتریفوژ با سرعت ۵۵g به مدت ۱۰ دقیقه، سلول‌های نگهبان روزنه در لایه 9M جمع‌آوری شدند. پروتوپلاست‌های جمع‌آوری شده در داخل آلژینات کلسیم قرار داده شدند و در محیط کشت K&P تغییر یافته مطابق روش پیشنهاد شده کشت شدند (Hall et al. 1993).

انتقال ژن به کالوس‌های حاصل از کشت پروتوپلاست

پس از ۱۸ روز، صفحه آلژینات کلسیم حاوی پروتوپلاست‌ها به صورت نوارهایی با عرض پنج ۵ میلی‌متر برش داده شده و به محیط کشت جامد PGo حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند (De Greef & Jacobs 1979). پس از یک هفته، نوارهای آلژینات با آگروباکتریوم تلقیح شدند. سلول‌های آگروباکتریوم سویه AGLO حاوی ناقل ژن *GUS* به همراه پیشبر دایمی CaMV 35S و یا پیشبر القا شونده با اتانول، در محیط کشت LB به صورت شبانه کشت داده شدند. سپس رسوب باکتری در محیط کشت مایع PGo (جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) حل شد. نوارهای آلژینات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس به محیط کشت توام PGo حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP منتقل شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. به منظور حذف آگروباکتریوم، نوارهای آلژینات به

تهیه و کشت پروتوپلاست از سلول‌های نگهبان روزنه

در این پژوهش از چغندر قند لاین NF برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد. پس از ضدعفونی بذرها چغندر قند و جوانه زنی بذور، جوانه انتهایی کشت و پس از چهار هفته، از برگ‌های جوانه‌های انتهایی برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد (Hall et al. 1993). حدود ۱/۵ گرم پهنک برگ استریل تهیه و در داخل همزن برقی حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد به مدت دو دقیقه با سرعت کم خرد گردید. مخلوط حاصل با استفاده از غربال نایلونی ۳۰۰ میکرومتری فیلتر شده و با آب مقطر استریل شسته شد و قطعات اپیدرم روی فیلتر، به یک پتری‌دیش نه سانتی‌متری منتقل گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول CPW9Mca (نمک‌های CPW به همراه ۰/۹٪ مانیتول، ۰/۳/۸ (w/v) CaCl₂, 2H₂O) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک دقیقه با دور ۵۵g سانتریفوژ شد و روشن‌آور حذف گردید و سپس رسوب حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر محلول هضم (محلول هضم شامل نمک‌های CPW به همراه ۰/۹٪ مانیتول، mM n-propyl gallate ۰/۲۵، ۰/۵ (w/v) سلولاز RS و ۰/۳ Macerozyme R10) حل گردید. هر پنج میلی‌لیتر از محلول به یک پتری‌دیش ۶۰ میلی‌متری منتقل شد و به مدت ۱۶ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به آرامی مخلوط شد. محصول هضم از غربال‌های نایلونی ۲۹۷ و ۵۵ میکرومتری عبور داده شد. محلول فیلتر شده با یک حجم محلول فیلتر استریل شده ایزواسمتیک دارای ۷۵ درصد پرکول و ۱۵ درصد ساکارز مخلوط گردید و به ۱۲ لوله آزمایش ۱۲ میلی‌لیتری منتقل شد. در هر لوله ابتدا یک

سیستم القا شونده با اتانول در کالوس‌های تراریخت حاصل از کشت ..

متمایز سلولی را تشکیل می‌دهند که در مراحل بعد نیز کمی تغییر می‌کنند (Sack 1987). این سلول‌ها دارای ویژگی خاصی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد در شرایطی که برای سلول‌های دیگر نامساعد است، زنده بمانند. سلول‌های نگهبان فاقد پلاسمودسماتا هستند و نسبت به سایر سلول‌ها موجودیت مستقل دارند. همچنین تنها سلول‌هایی در برگ هستند که به تغییرات منظم پتانسیل اسمزی سازش یافته‌اند که آن‌هم به دلیل نقش اساسی پتانسیل اسمزی در عملکرد سلول‌های روزنه‌ای است (Sack 1987). به همین دلیل است که سلول‌های روزنه‌ای تنش‌های اسمتیک را در طی جداسازی پروتوپلاست بهتر تحمل می‌کنند (Hall et al. 1995). کالوس‌های حاصل از سلول‌های نگهبان، توان باززایی نوساقه را به میزان ۲۰ درصد دارند و از آن‌ها گیاهان کاملاً طبیعی حاصل می‌شود (۸). وجود این ویژگی‌ها، مناسب بودن این سلول‌ها را برای دستورزی ژنتیکی فراهم نموده است.

برای اطمینان از انتقال ژن *GUS* و عملکرد مناسب آن در گیاه، سنجش آنزیمی *GUS* با پیشبر CaMV 35S انجام شد. در سنجش *GUS* با روش هیستوشیمیایی با سوبسترای x-gluc، در اثر فعالیت آنزیم بتا-گلوکورونیداز ژن *GUS* ترکیب X-gluc شکسته شده و تولید رسوب آبی رنگ می‌کند. فعالیت ژن گزارشگر *GUS*، انتقال و بیان آن را نشان می‌دهد. چون ژن *GUS* مورد استفاده در ناحیه T-DNA پلاسمید دارای اینترون می‌باشد، این ژن در سیستم پروکاریوتی قابل بیان نیست، بنابراین احتمال رنگی شدن بافت در اثر آلودگی با آگروباکتریوم وجود ندارد. کالوس‌های قرار گرفته در داخل آلزینات به‌خوبی رنگ آمیزی شدند و بیان بسیار خوب ژن *GUS* را نشان دادند. نتایج این آزمون بیانگر کارایی بسیار خوب انتقال ژن به کالوس‌ها می‌باشد (شکل ۳).

برای مطالعه بیان ژن گزارشگر *GUS* تحت پیشبر القا شونده با اتانول، تعداد ۴۰ کالوس تلقیح شده با آگروباکتریوم دارای سازه مورد نظر که در محیط انتخابی علف کش بایلوپوس به مدت یک ماه رشد یافته بودند، در شرایط قبل از القا (شکل ۴- a) و بعد از القا (شکل ۴- b) با اتانول رنگ آمیزی شدند. پس از القا با اتانول، دو کالوس در چاهک‌های شماره A8 و E1 بیشترین میزان بیان ژن *GUS* را داشتند در حالی که قبل از القا با اتانول، بیان ژن مشاهده نشد. بیان ژن گزارشگر در این چاهک‌ها به میزانی نزدیک به بیان ژن *GUS* با پیشبر دائمی CaMV 35S در چاهک‌های شماره E5 و E7 بود. توانایی بیان ژن *GUS* با این پیشبر، به

محیط کشت جامد (PG1B-BC PGO) حاوی یک میلی‌لیتر هورمون BAP، ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و یک میلی‌گرم در لیتر علف‌کش بایلوپوس) حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت دو روز نگهداری شدند. پس از دو روز بر روی نوارهای آلزینات حاوی کالوس‌های تلقیح شده با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر دائمی CaMV 35S، آزمون هیستوشیمیایی *GUS* صورت گرفت و بیان موقت این ژن بررسی گردید (Sevenier et al. 1998). کالوس‌های کوچک از روی نوارهای آلزینات تلقیح شده با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر القا شونده اتانول به محیط کشت جامد PG1B-BC انتقال یافتند و به مدت ۱۵ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت، کالوس‌های رشد یافته مجدداً به محیط کشت جامد PG1B-BC انتقال یافته و پس از ۱۰ روز آزمون هیستوشیمیایی *GUS* بر روی کالوس‌های رشد یافته انجام گردید و میزان بیان ژن گزارشگر در غیاب القا کننده اتانول مطالعه شد. سپس به میزان یک میلی‌لیتر اتانول یک درصد به محیط کشت اضافه گردید و بعد از ۲۴ ساعت مجدداً، روی همان کالوس‌ها، آزمون هیستوشیمیایی *GUS* انجام شد.

آزمون هیستوشیمیایی *GUS*

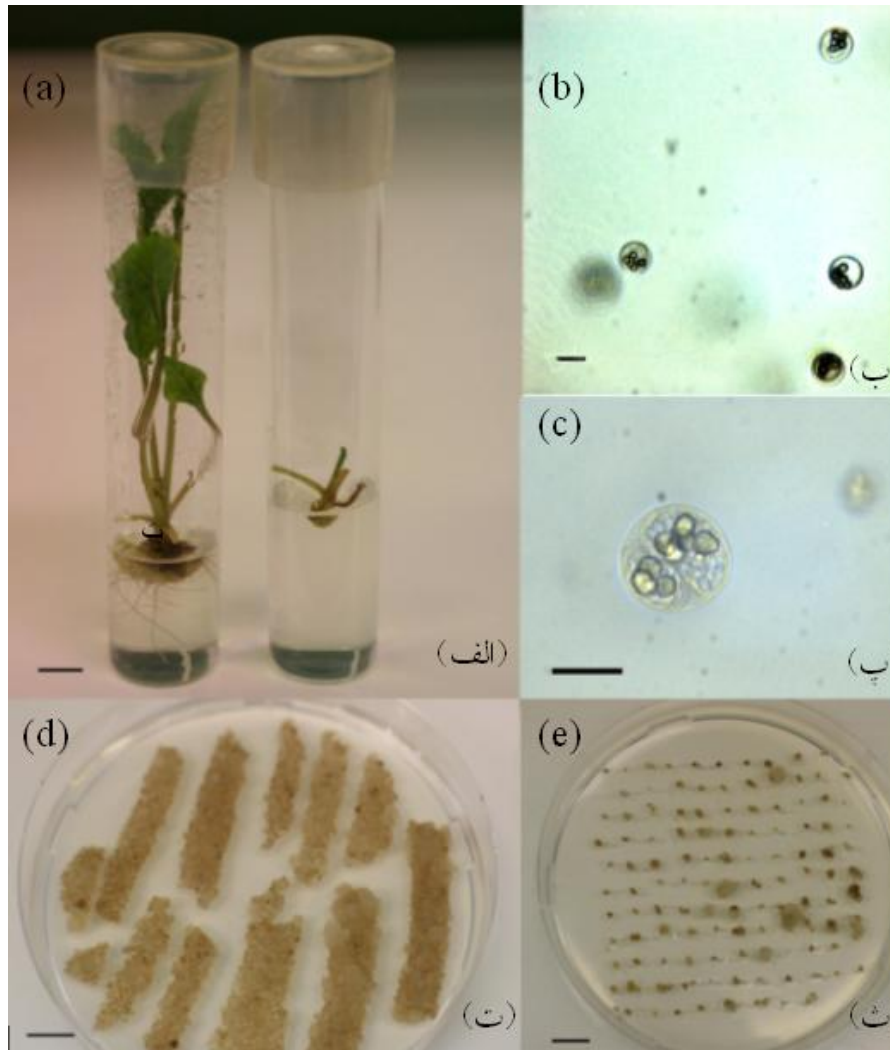
برای رنگ‌آمیزی با *GUS*، کالوس‌ها به مدت یک شب در محلول رنگ آمیزی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول رنگ آمیزی شامل Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ۱۲۵ میلی مولار، $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ نیم مولار، $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ نیم میلی مولار، Triton-x-100 به میزان ۰/۷۵٪ و ۰/۳٪ (v/v) در میلی‌لیتر X-gluc با pH=۷/۰ بود (Hall et al. 1997).

نتایج و بحث

در این پژوهش استخراج پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه با موفقیت انجام شد. اغلب پروتوپلاست‌های جدا شده دارای پلاستیدهای مشخص، ذرات نشاسته بوده (Hall et al. 1995, 1996) و قابلیت تقسیم سلولی داشتند. کشت این پروتوپلاست‌ها منجر به تولید کالوس‌های ترد در داخل آلزینات کلسیم گردید (شکل ۲). پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه برگی چغندر قند قادر به تقسیم سلولی هستند (Hall et al. 1995). سلول‌های نگهبان روزنه در اوایل نمو برگ تمایز می‌یابند و جمعیت یکنواخت و

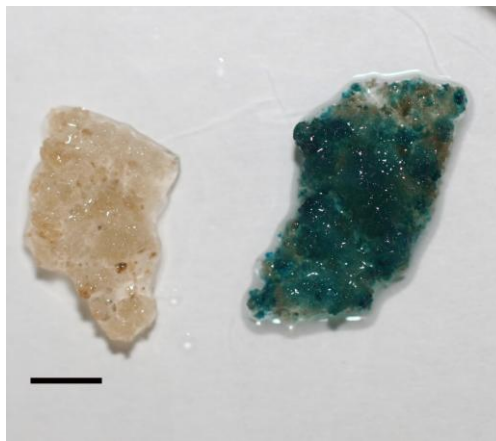
و عدم بیان این ژن در کالوس‌ها در شرایط قبل از استفاده از اتانول، کارایی این پیشبر را نشان می‌دهد.

اندازه بیان این ژن با پیشبر دائمی CaMV 35S در گیاه است (Salter *et al.* 1998). بیان زیاد ژن *GUS* با استفاده از اتانول



شکل ۲: مراحل تهیه پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه چغندر قند، کالوس و تراریختی کالوس‌ها (الف): کشت درون شیشه‌ای جوانه انتهایی و رشد برگ‌ها برای استخراج پروتوپلاست سلول‌های نگهبان روزنه (مقیاس ۱ cm) (ب): پروتوپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه (مقیاس ۲۰ μm) (پ): تقسیم سلولی یک پروتوپلاست سلول نگهبان روزنه که در داخل آلژینات کلسیم قرار گرفته است (مقیاس ۲۰ μm). (ت): نوارهای آلژینات حاوی کالوس که با آگروباکتریوم تومه فاسینس تلقیح یافته‌اند. (مقیاس ۱ cm) (ث) کالوس‌های کوچک انتقال یافته از نوارهای آلژینات به محیط کشت گزینش حاوی یک میلی گرم در لیتر علف کش بایلو فوس و رشد برخی کالوس‌های تراریخت (مقیاس ۱ cm)

Figure 2. Protoplast isolation and callus production from guard cells of sugar beet and gene transformation method, a. *In vitro* culture of shoot tips and leaves growth for guard cell protoplast isolation (bar = 1 cm) b. Guard cell protoplasts (bar = 20 μm) c. Cell division of a guard cell protoplast after stabilizing in calcium alginate (bar = 20 μm) d. The strips of alginate containing the sugar beet calli infected with *Agrobacterium tumefaciens* (bar = 1 cm) e. Transferring very tiny calli from alginate strips to selection medium containing 1 mg/l bialaphos and the growth of transgenic calli (bar = 1 cm).



شکل ۳: آزمون هیستوشیمیایی ژن *GUS* نوارهای آلژینات حاوی کالوس‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم تومه فاسینس دارای سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر 35S CaMV همراه با نوار آلژینات تلقیح نشده به عنوان شاهد (مقیاس ۰/۵ cm)

Figure 3. Histochemical *GUS* assay of alginate strips containing calli infected by *A. tumefaciens* carrying a construct with a *GUS*-intron gene under control of a CaMV 35S promoter and a fragment of alginate without transformation as control (bar = 0.5 cm).

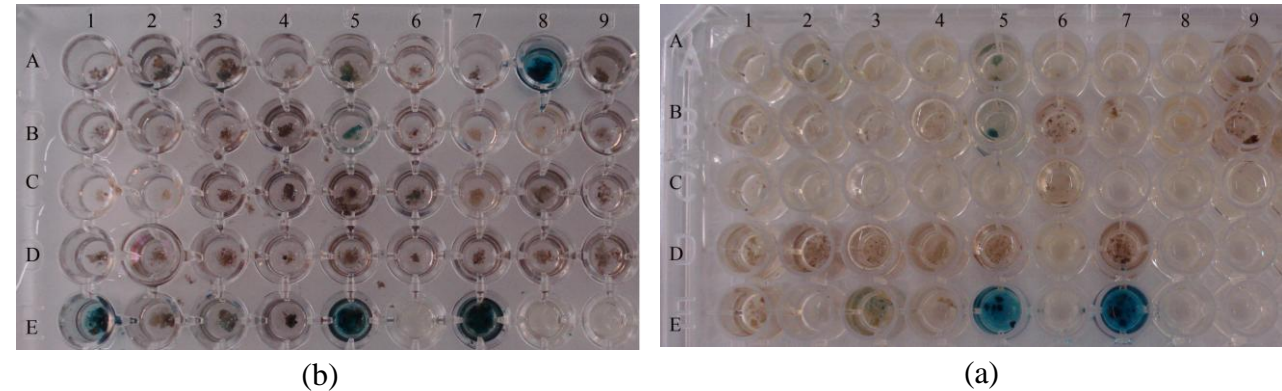
شد. در مقابل، در گیاهچه‌های گلدانی، بیان این ژن مشاهده نشد (Roslan *et al.* 2001). هم‌چنین، با استفاده از ژن لوسیفراز به‌همراه پیشبر القا شونده با اتانول نشان داده شد که در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بدون استفاده از القاکننده (اتانول) بیان ژن لوسیفراز مشاهده می‌شود ولی در گیاهچه‌های گلدانی بیان این ژن مشاهده نمی‌شود (Roslan *et al.* 2001). باید در نظر داشت که گیاهان آنزیم الکل دهیدروژناز تولید می‌کنند (Dolferus *et al.* 1994). ریشه گیاهان اندام‌هایی هستند که در شرایط بی‌هوازی تنفس تخمیری انجام می‌دهند که محصول نهایی این روش تنفس، الکل است. تجمع اتانول داخلی در ریشه ممکن است این پیشبر را فعال کند. پیشبر اتانول در گیاه توتون در شرایط بی‌هوازی مصنوعی بسیار سخت فعال می‌شود (Salter *et al.* 1998). در گیاه آرابیدوسیس رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای که در آن انتشار اکسیژن محدود است، میزان تنفس غیرهوازی در ریشه‌ها افزایش می‌یابد (Chung & ferl 1999). در پژوهش حاضر، در شرایط درون شیشه‌ای و بدون استفاده از اتانول، برخی کالوس‌ها فعالیت ژن *GUS* را نشان دادند که بیانگر حضور اتانول می‌باشد. ممکن است که کالوس‌ها نیز مانند ریشه در شرایط محدود اکسیژن محیط، تنفس بی‌هوازی انجام داده باشند و با تولید الکل موجب فعال شدن پیشبر و بیان ژن *GUS* در برخی کالوس‌ها شده‌اند، البته اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

مشخص شده است که یک ساعت پس از استفاده از عامل القا کننده (اتانول) نیز بیان ژن *GUS* قابل تشخیص است. در صورت عدم استفاده از اتانول، بیان ژن متوقف می‌گردد اما

چنان‌چه در واحد بیانی *alcR*، پیشبر دایمی *CaMV* 35S با یک پیشبر خاص بافت گیاهی جایگزین گردد، امکان تنظیم بیان ژن در یک بافت خاص فراهم می‌گردد. از اتانول برای تنظیم بیان ژن در طی نمو و در یک بافت یا اندام خاص در گیاه آرابیدوسیس استفاده شده است (Deveaux *et al.* 2003). در سازه بیانی، ژن *alcR* به‌وسیله پیشبرهای مختص بافت کنترل گردید. این پیشبرها در نواحی ویژه‌ای از جوانه رویشی و گلدهی بیان می‌شدند (Deveaux *et al.* 2003). غلظت کم اتانول تبخیر شده موجب بیان ژن در گیاهان توتون، سیب زمینی و کلزا شده است (Sweetman *et al.* 2002). در آزمایشی، تیمار یک برگ کلزا با اتانول تبخیر شده منجر به بیان ژن *GUS* فقط در همان برگ گردید و در گیاه توتون، با استفاده از اتانول نشان‌دار شده مشخص شد که اتانول به برگ‌های دیگر منتقل نشده است. بنابراین با در معرض قرار دادن قسمت‌های مختلف یک گیاه تراریخت با بخار اتانول، می‌توان بیان ژن هدف را در یک اندام مشخص کنترل کرد (Sweetman *et al.* 2002).

نتایج این پژوهش مشخص نمود که قبل از القا با اتانول، در برخی از کالوس‌ها، نظیر چاهک‌های شماره A2، A5 و B5 (شکل ۴- a)، بیان ژن *GUS* به مقدار کم مشاهده می‌شود. بیان ژن گزارشگر در کالوس‌ها در شرایط درون شیشه‌ای در غیاب اتانول خارجی، وجود شرایط القا در این محیط را نشان می‌دهد. در یک مطالعه که ژن *GUS* به همراه پیشبر القا شونده با اتانول به گیاه آرابیدوسیس منتقل شد و در گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه‌ای رشد یافته بودند، بدون استفاده از اتانول، فعالیت ژن *GUS* مشاهده

فن آوری زیستی در کشاورزی / جلد نهم / شماره یک / تابستان ۸۹
 می توان با استفاده مستمر اتانول، سطح بیان ژن را حفظ نمود.
 پیشبر القا شونده با اتانول، بسیار به اتانول حساس می باشد، به
 نحوی که با استفاده از ۰/۰۱ درصد اتانول نیز عمل القا، مشاهده
 شده است. لذا، غلظت اتانول مورد استفاده ابزار مناسبی برای
 کنترل سطح بیان ژن در این پیشبر بوده (Roslan *et al.* 2001)



شکل ۴: آزمون هیستوشیمیایی GUS کالوس های تراریخت احتمالی با سازه ژن گزارشگر *GUS* و پیشبر القا شونده با اتانول بدون تیمار با اتانول (a) و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با اتانول (b). در هر دو شکل الف و ب: چاهک های E5 و E7 حاوی کالوس های تراریخت با سازه ژن *GUS* تحت پیشبر دائمی CaMV 35S به عنوان شاهد مثبت و چاهک های A, B, C, D و E1-4 حاوی کالوس های تلقیح شده با سازه ژن *GUS* تحت پیشبر القا شونده با اتانول

Figure 4. Histochemical GUS assay of candidate transgenic calli with construct containing a *GUS* reporter gene under control of the ethanol induced promoter before treatment with ethanol (a) and after treatment with ethanol (b). In the both figures a and b: Wells E5 and E7 containing transgenic calli with a *GUS* gene under control of the CaMV 35S promoter as positive controls and wells A, B, C, D and E1- 4 containing the candidate transgenic calli with a *GUS* gene under control of the ethanol induced promoter.

تشکر و قدردانی

Tjitske و خانم و Jeroen van Arkel و Ruud de Maagd
 Riksen-Bruinsma به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش
 صمیمانه قدردانی می شود.

این پژوهش طی یک فرصت مطالعاتی در دانشگاه
 Wageningen هلند انجام شده است و هزینه آن توسط
 وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تامین شده است. از آقایان

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه های ۶۱-۶۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

Characterization of Ethanol Inducible Gene Expression System in Transgenic Sugar Beet Calli Derived From Stomatal Guard Cells

Mirzaie Asl¹, A., Moieni^{2*}, A., Salmanian³, A. H., Jalali Javaran. M². and Khodaei⁴, L.

Abstract

Controlled gene expression of transgenic plants is one of the main aim of genetic manipulations. This control can be done in transcriptional level. Ethanol inducible promoter system is suitable for external regulation of gene expression. In this study, *GUS* gene expression under the control of ethanol inducible promoter was evaluated in calli derived from sugar beet stomatal guard cell protoplasts. Protoplasts of stomatal guard cells from sugar beet leaves were isolated and calli derived from these protoplasts, were infected with *Agrobacterium* harboring *GUS* gene under the control of ethanol inducible promoter. Transformed calli were treated with ethanol and histochemical GUS assay carried out before and after treatment of calli with ethanol. Some transformed calli showed high level expression of *GUS* gene after treatment with ethanol. These calli didn't show any *GUS* gene expression before applying ethanol. The level of GUS expression after ethanol induction was comparable to constitutive *GUS* gene expression mediated by CaMV 35S promoter. Furthermore high level GUS expression in these calli demonstrated the activity of this system in sugar beet.

Keywords: Sugar beet, Gene transformation, Ethanol- inducible promoter, Protoplast, Stomatal guard cells, *GUS* reporter gene

References

- Caddick, M. X., Greenland, A. J., Jepson I., Krause, K. P., Qu N., Riddell, K. V., Salter, M.G., Schunch, W., Sonnewald U. and Tomsett, A. B. 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*. 16: 177–180.
- Chung, H. W. and Ferl, R. J. 1999. Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiology*. 121:429-436.
- De Greef, W. and Jacobs, M. 1979. *In vitro* culture of the sugar beet: description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant Science. Lett.* 17:55–61.
- Deveaux, Y., Peaucelle, A., Robberts G.R., Coen E., Simon R., Mizukami Y., Traas J., Murray J.A.H., Doonan J.H. and Laufs P. 2003. The ethanol switch: a tool for tissue-specific gene induction during plant development. *Plant Journal*. 36 : 918–930.
- Dolferus, R., Jacobs M., Peacock W.J. and Dennis E.S. 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of Arabidopsis Adh gene. *Plant. Physiol.* 105: 1075-1087.
- Felenbok, B., Sequeval Mathieu D.M., Sibley S., Gwynne D.I. and Davies R.W. 1988. The ethanol regulon of *Aspergillus nidulans*: characterization of sequence of the positive regulatory gene alcR. *Gene*. 73: 386–396.
- Hall, R. D., Pedersen, C. and Krens, F. A. 1993. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *Plant Cell Reports*. 12: 339–342.
- Hall, R. D., Riksen-Bruinsma T., Weyens, C., Lefebvre, M., Dunwel, J. M. and Krens, F. A. 1996. Stomatal guard cells are totipotent. *Plant Physiology*. 11(2): 889-892.
- Hall, R. D., Riksen-Bruinsma1, T., Weyens, G., Lefebvre, M., Dunwell, J. M., Tunen, A. V. and Krens, F. A. 1997. Sugar beet guard cell protoplasts demonstrate a remarkable capacity for cell division enabling applications in stomatal physiology and molecular breeding. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*. 48(307): 255-263.
- Hall, R. D., Verhoeven H.A. Krens F.A. 1995. Computer-assisted identification of protoplasts responsible for rare division events reveals guard cell totipotency. *Plant Physiology*. 107: 1379-1386.
- Li, R., Jia X. and Mao X. 2005. Ethanol-inducible gene expression system and its applications in plant functional genomics. *Plant Science*. 169: 463–469.
- Padidam, M. 2003. Chemically regulated gene expression in plant. *Curr.Opin. Plant Bio.* 6: 169–177.
13. Ren Z.Q., Liu H.M. and Li R.Z. 2003. Integration of genomic information and research strategy for plant functional genomics. *Letteres The Biotechnology*. 339–342.

1. Ph.D student, Plant Breeding Department, Tarbiat Modares University, Tehran

2. Assistant Professor, Plant Breeding Department, Tarbiat Modares University, Tehran

3. Assistant Professor, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran

4. PhD student, College of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy and Plant Breeding, Tehran University

*: Corresponding author

- Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R. H., Croft, K. P., Robson, F., Coupland, G., Doona, J., Laufs, P., Tomsett, A. B. and Caddick, M. X. 2001. Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 28: 225–235.
- Sack, F. D. 1987. Development and structure of stomata. In Zeiger E., Farquhar G.D., Cowan I.R. eds. *Stomatal Function*. Stanford University Press Stanford. CA. pp. 59-89.
- Salter, M. G., Paine, J. A., Riddell, K. V., Jepson, I., Greenland, A. J., Caddick, M. X. and Tomsett, A. B. 1998. Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant Journal*. 16: 127–132.
- Sevenier, R., Hall, R. D., Van der Meer, I. M., Hakkert, H. J. C., Van Tunen, A. J. and Koops, A. J. 1998. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nat. Biotechnol.* 16: 843 – 846.
- Sweetman, J. P., Chu, C., Qu, N., Greenland, A. J., Sonnewald, U. and Jepson, I. 2002. Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiology*. 129: 943–948.
- Willmer C.M. 1993. The evolution, structure and functioning of stomata. *Botanical Journal of the Scotland*. 46: 433-45.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 43-50= ۴۳-۵۰).