آنالیز پروموتر مصنوعی SP-DD در مقابل تنش های محیطی

مرجان بحرآبادی[۱]، فرهاد شکوهی فر[۲]، محمدعلی ابراهیمی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور کرج

۲. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور کرج

Email: marjanbahrabadi@yahoo.com

چکیده

ارزیابی الگوی بیان یک پروموتر مصنوعی در شرایط محیطی مختلف جهت استفاده از آن در برنامه های دستورزی ژنتیکی گیاهان ضروری است. در این تحقیق، عمکرد پروموتر مصنوعی SP-DD در شرایط محیطی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور سازه مصنوعی حامل این پروموتر از طریق روش اگروباکتریوم به برگهای توتون *Nicotiana benthamiana* منتقل گردید و حساسیت آن نسبت به تنشهای محیطی گرما، سرما و اشعه ماورا بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. تحقیق فوق نشان داد که پروموتر استفاده شده در پاسخ به تنشهای گرما و سرما حساسیت اندکی نشان می دهد ولی تنش اشعه ماورا بنفش بر القا آن بی اثر است. عدم حساسیت پروموترهای القاپذیر با پاتوژن نسبت به تنشهای محیطی، به عنوان یک امتیاز مثبت ارزیابی شده و اختصاصا حساسیت این پروموترها را نسبت به عامل القا کننده آنها (پاتوژنها) محدود می کند.

کلمات کلیدی: پروموتر مصنوعی، اگروباکتریوم، *Nicotiana benthamiana* ، پروموتر القاپذیر با پاتوژن

مقدمه

پروموترهای القایی ابزار بسیار مهمی در مهندسی ژنتیک بوده و بیان ژنهای تحت کنترل آنها می تواند در مراحل خاص توسعه یک ارگانیزم، بافت یا تحت شرایط القایی مشخص بررسی و تنظیم شود (۱). رونویسی ژنهای پاسخ دهنده به پروموترهای القاپذیر با پاتوژن، با تحریک پاتوژن انجام می شود. مولکولهای ویژه پاتوژن که به عنوان محرک (inducer) شناخته می شوند شامل قطعات پروتئین، پپتید، لیپید یا پلی ساکارید ناشی از دیواره سلولی، غشا خارجی و یا حاصل یک پروسه ترشحی پاتوژن می باشند و با القا پروموتر، زنجیره ای از پاسخهای پیام رسانی دفاعی را در گیاه به راه می اندازند که به مقاومت گیاه نسبت به حمله پاتوژن منجر می شود (۲). بسیاری از پروموترهای القاپذیر با پاتوژن رایج، سطوحی از بیان پایه را نشان می دهند که آنها را برای اهداف بیوتکنولوژیک نامناسب می سازد. با توجه به ویژگیهای یک پروموتر ایده آل القا پذیر با پاتوژن از جمله عدم بیان در شرایط عاری از بیماری و عدم بیان در شرایط تنشهای محیطی، در بسیاری از مطالعات، از پروموترهای مصنوعی استفاده می شود (۳). در ساختار این پروموترها از اجزائی چون توالی های حداقل پروموتری و عناصر تنظیمی سیس استفاده می شود که هدف آن افزایش بیان و قدرت ژن نسبت به عامل القا کننده و کاهش بیان پایه پروموتر می باشد (۱).

با استفاده از روش تزریق اگروباکتریوم حاوی سازه های ژنی مصنوعی به برگهای گیاه (اگروباکتریوم)، آنالیز بیان پروموترهای مصنوعی در مدت کوتاهی قابل انجام شدن است. بعلاوه اثر محرکهای خارجی مانند تنشهای محیطی، مواد شیمیایی یا آلودگی پاتوژنی هنگام استفاده از روش اگروباکتریوم با اعمال تیمارهای زنده و غیر زنده پس از اگروباکتریوم در گیاه کامل می تواند ارزیابی شود (۴). بر این اساس در تحقیق انجام شده، به هدف آنالیز *in vivo* قدرت پاسخدهی پروموتر مصنوعی و القاپذیر به پاتوژن SP-DD نسبت به تنشهای محیطی،

یک بررسی بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم در برگهای گیاه توتون بنتامیانا انجام شد و اثر برخی تنشهای محیطی (سرما، گرما، اشعه ماورا بنفش) بر القا این پروموتر، پس از اگروواینجکشن آن به گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. پاسخدهی هر چند اندک پروموتر القایی SP-DD به اعمال تنشهای محیطی سرما و گرما، لزوم بررسی بیشتر و اعمال تغییرات ساختاری در این پروموتر (تغییر در تکرار عنصر سیس به کار رفته و یا تلفیق این عنصر با سایر عناصر سیس در ساختار پروموتر به هدف حذف کامل تحریک پذیری با تنشهای سرما و گرما) را ضروری می سازد.

مواد و روشها

گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* در شرایط استاندارد گلخانه در سن ۸ هفتگی مورد استفاده قرار گرفت. از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 که حاوی سازه القایی pSP-DD (۵) بود برای بررسیهای آنالیز پروموتر القایی، سویه GV3101 حاوی سازه pGCGi (۶) به عنوان کنترل مثبت و از سویه GV3101 فاقد سازه به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سویه های اگروباکتریوم از آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

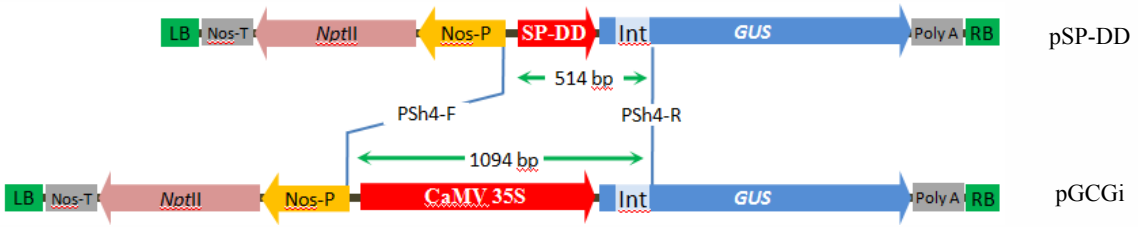
سلول های مستعد و تراریختی سویه GV3101 به روش انجماد آنی انجام شد (۷). تایید کلنی های تراریخت با روش کلنی PCR و با استفاده از آغازگرهای PSh4-F/R انجام شد. آماده سازی سلول ها جهت تزریق بر اساس روش یانگ و همکاران انجام شد (۴). سلولهای اگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی سازه pGCGi و فاقد سازه نیز به صورت جداگانه جهت تزریق به روش ذکر شده آماده شدند.

عمل اگروواینجکشن در برگهای کاملا توسعه یافته گیاهان توتون بنتامیانا (چهار برگ بالایی از هر گیاه) با سرنگ ۱ میلی لیتر بدون سوزن انجام گرفت. سوسپانسیونهای باکتریایی به فضای بین سلولی قسمت پشتی برگهای متصل به گیاه تزریق شدند. به سه نقطه از پشت هر برگ تزریق صورت گرفت (به یک سوم فوقانی برگ GV3101 فاقد سازه، به یک سوم سمت چپ باکتریهای حاوی سازه pGCGi و به یک سوم سمت راست باکتریهای حاوی سازه pSP-DD). از هر سازه دو تکرار در هر برگ تزریق شد. سپس روی گیاهان با پوشش پلاستیکی پوشانده شد و در ژرمیناتور دمای ۲۲ درجه سانتیگراد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری شدند. پوشش پلاستیکی روز بعد حذف شده و گیاهان به مدت حداقل دو روز در همان محیط باقی ماندند. ۴۸ ساعت پس از اگروواینجکشن، تیمارهای محیطی شامل سرما (دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت)، گرما (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت) و اشعه ماورا بنفش (اشعه UVB مستقیم به مدت نیم ساعت) اعمال شدند و سپس دیسکهای برگی در بافر سنجش ژن GUS قرار گرفتند.

فعالیت ژن بتاگلوکرونیداز به روش سنجش هیستوشیمیایی ارزیابی شد (۸). تصویر برداری از دیسک های برگی پس از تیمار در محلول سنجش و حذف کامل کلروفیل با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال (Dino-Lite مدل Am-313 T Plus ساخت کشور تایوان) انجام شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه قدرت القایی پروموتر SP-DD در پاسخ به تنش های محیطی با استفاده از روش بیان موقت در گیاه توتون بنتامیانا مورد بررسی قرار گرفت. این پروموتر در ناقل pSP-DD قرار داشته و حامل توالی مضاعف از عنصر القائی D Box است که در بالادست توالی حداقل پرومتر CaMV 35S قرار دارد. ژن گزارشگر GUS اینترونددار در پایین دست سیستم پروموتری مزبور ادغام شده است. همچنین ناقل pGCGi حامل پروموتر کامل CaMV 35S و ژن گزارشگر GUS اینترونددار بعنوان کنترل مثبت در مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). سویه GV3101 فاقد سازه نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

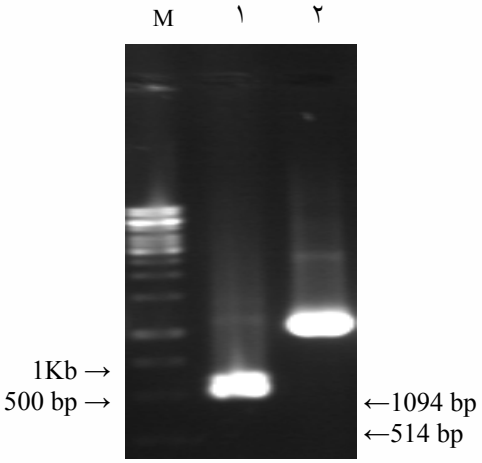


شکل ۱- نمای شماتیک منطقه T-DNA سازه های pSP-DD و pGCGi نشان دهنده مجموعه ژن گزارشگر، گزینشگر، موقعیت اتصال آغازگرهای اختصاصی و اندازه باندهای قابل تکثیر

به ترتیب از چپ به راست؛ LB: مرز چپ، Nos-T: پایان دهنده نوپالین سنتاز، *Npt*II : نئومایسین فسفوترانسفراز، Nos-P: پروموتر نوپالین سنتاز، SP-DD: پروموتر القاپذیر با پاتوژن، CaMV 35S: پروموتر 35S ویروس موزاییک گل کلم، Int: اینترون، GUS: ژن بتا گلوکرونیداز، Poly A: دنباله پلی آدنیلاسیون، RB: مرز راست

تراریختی و تایید مولکولی سویه باکتری

دو پلاسمید ژنی تایید شده حاوی سازه pSP-DD و سازه pGCGi سویه GV3101 منتقل گردید. انتخاب باکتریهای ترانسفورم شده با استفاده از محیط حاوی کانامایسین و نیز مطالعه الگوی PCR با پرایمرهای اختصاصی PSh4-F/R، انتقال پلاسمیدهای مذکور به اگروباکتریوم را تایید نمود (شکل ۲). رسوب اگروباکتریوم پس از کشت و قرار گرفتن در محیطهای القا و تزریق، به روش اگروایجکشن به گیاه انتقال یافت.

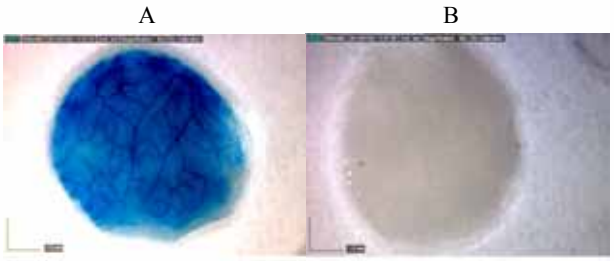


شکل ۲- تایید تراریختی کلنی های سویه GV3101 اگروباکتریوم با سازه های pSP-DD و pGCGi

۱ و ۲ به ترتیب الگوی باندی محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی PSh4-F/R مربوط به باکتری تراریخت حامل سازه pSP-DD (۵۱۴ bp) و سازه pGCGi (۱۰۹۴ bp)، M: نشانگر وزنی ۱ kb

بررسی برهمکنش سویه و گیاه جهت بیان موقت

از گیاه بنتامیانا *Nicotiana benthamiana* برای بررسی بیان موقت سویه GV3101 حامل ناقل pGCGi بعنوان کنترل استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق سوسپانسیون سلول به برگهای گیاه با سنجش هستوشیمیائی فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز صحت سازگاری سویه و گونه بنامیانا تایید شد (شکل ۳–الف). علاوه بر این عدم بیان درونی ژن بتاگلوکرونیداز در برگ های تزریق شده سا سویه فاقد ناقل بعنوان کنترل منفی مورد بررسی و تایید قرار گرفت (شکل ۳– ب).



شکل ۳– بیان موقت اگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی ناقل pGCGi به گیاه توتون *Nicotiana benthamiana*

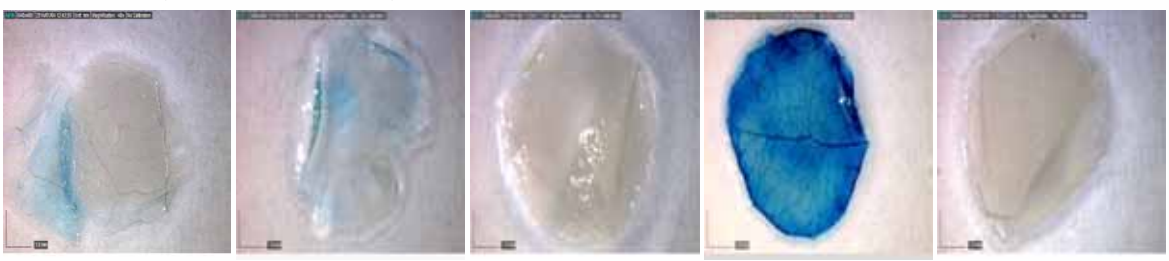
A: نمونه برگی نشان دهنده بیان موقت ژن گزارشگرGUS در pGCGi ، B: نمونه برگی نشان دهنده عدم بیان داخلی ژن GUS در گیاه

تصاویر با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال Dino-Lite با بزرگنمائی ۴ برابر تهیه شده است

اعمال تنش های محیطی شامل گرما، سرما و اشعه ماورا بنفش

پس از انتخاب گیاه، با توجه به اینکه یک پروموتر مناسب القا پذیر با پاتوژن بایستی تنها در هنگام حمله پاتوژنها فعال بوده و در شرایط عاری از بیماری (مانند شرایط تنشهای محیطی)، غیر فعال باشد (۱،۹)، اثر برخی تنشهای محیطی مانند سرما، گرما و اشعه UV بر روی پروموتر مصنوعی مورد استفاده اعمال شد. بدین منظور دیسک های برگی از محل تزریق نمونه ها تحت تنش قرار گرفت و سپس فعالیت پروموتر با سنجش فعالیت ژن گزارشگر بتاگلوکرونیداز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بدست آمده نشان داد در نمونه های دریافت کننده سازه pSP-DD در اثر تیمار گرما و سرما فعالیت محدود آنزیم بتاگلکرونیداز قابل مشاهده است. همچنین این سازه در اثر القا تیمار UV، ژن GUS را در هیچ یک از تکرارها بیان نکرد (شکل ۴). سازه pGCGi نیز به عنوان شاهد مثبت و GV3101 بدون سازه به عنوان شاهد منفی به کار رفتند.



شکل ۴– اثر تیمار گرما، سرما و اشعه UV در القا سازه pSP-DD در مقایسه با کنترلهای مثبت و منفی

ایجاد رنگ آبی نشان دهنده بیان اندک ژن GUS در اثر تنشهای سرما و گرما می باشد

تصاویر با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال Dino-Lite با بزرگنمائی ۴ برابر تهیه شده است

بیان اندک سازه القایی pSP-DD با تیمارهای سرما و گرما، می تواند ناشی از فعال شدن سیستم دفاعی گیاه در پاسخ به این تنش ها باشد که سبب شده است تا حدی بیان پروموتر SP-DD را القاء نمایند. این امر حساسیت همزمان پروموتر مصنوعی القا پذیر به پاتوژنها را با عوامل متنوع و گاهی متناقض محیطی سبب می شود (۱۰).

با این حال اثر القایی اندک تنشهای محیطی روی پروموتر القایی مورد مطالعه در این بررسی نشان دهنده حساسیت کم عناصر D به کار رفته در ساختار این پروموتر به تیمارهای سرما و گرما می باشد هر چند با تغییر در تعداد عناصر سیس به کار رفته یا ادغام آنها با سایر عناصر می توان کارایی پروموترهای مصنوعی القا پذیر با پاتوژن را به نحو چشمگیری تغییر داد. از طرفی عدم حساسیت این سازه نسبت به تیمار اشعه UV یک ویژگی مناسب برای این سازه محسوب می شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آزمایشگاه زیستا شرکت دانش بنیان زیست تروند آرین به جهت فراهم نمودن شرایط آزمایشگاهی انجام پایان نامه تشکر می نمائیم.

برخی از منابع

1. **Gurr, S.J. and Rushton, P.J. (2005)** Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *TRENDS in Biotechnology*, 23, 275-282.
2. **Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J. (1996)** Resistance gene-dependent plant defense responses .*The Plant Cell*, 8, 1773.
3. **Shokouhifar, F., Zamani, M., Motallebi, M., Mosavi, A. and Malboobi, M. (2010)** Construction and functional analysis of a pathogen inducible synthetic promoter in response to some biotic and abiotic stresses in Canola. *Iran. J .Plant Path*, 45, 49-51.
4. **Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000)** In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal*, 22, 543-551.
5. **Shokouhifar, F. (2009)** Construction and functional analysis of pathogene inducible promoters in Canola, in Biotechnology. National Institute of Genetic engineering and Biotechnology: Tehran. p. 204(In Farsi).
6. **Shokouhifar, F., Mottalebi, M. and Zamani, M.R. (2014)** Construction of pGCGi, an expression vector carries intron containing GUS and analysis using micro-bombardment and agroinjection. *Iranian Journal of Plant Biology*, Submited, 6+(In Farsi).
7. **Weigel, D. and Glazebrook, J. (2005)** Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. CSH protocols, 2006, 1031-1036.

SP-DD synthetic promoter Expression analysis in response to environmental sterees

Marjan Bahrabadi[1], Farhad Shokouhifar[2], Mohammad Ali Ebrahimi[3]
1. Master of Science Student in karaj Payam noor University
2. Assistant Professor of Research Center for Plant Sciences, Mashhad Ferdowsi University
3. Associate Professor of Agriculture Biotechnology Department in karaj Payam noor University
Email:marjanbahrabadi@yahoo.com

Abstract:
evaluate expression pattern of a synthetic promoter in response to different environmental conditions is an important step in application of the promoter in a plant genetic manipulation program. In this study, the performance of SP-DD synthetic promoter was considered in different environmental situations. For this purpose, the artificial construct carrying this promoter was transfered through Agroinjection to the leaves of *Nicotiana benthamiana* and its sensitivity was evaluated to the heat, cold and UV radiation treatments. The results revealed that the promoter used has little sensitivity in response to heat and cold stresses but the ultraviolet light has no effect on the promoter induciblity. Pathogen inducible promoter insensitivity towards environmental stresses evaluates as a positive score, and limits these promoter sensitivities only to their inducible cause (pathogens).

Keywords
Synthetic promoters, Agroinjection, *Nicotiana benthamiana*, Pathogen inducible promoter