بررسی بیان داخلی ژن بتا گلوکرونیداز در تعدادی از گیاهان

مرجان بحرآبادی[1*]، فرهاد شکوهی فر[2]، محمدعلی ابراهیمی[3]
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
* نویسنده مسئول: Email: marjanbahrabadi@yahoo.com

چکیده

ژن باکتریایی بتاگلوکرونیداز (GUS) با منشا *Escherichia coli*، یکی از رایجترین ژنهای گزارشگر در بررسی‌های بیان ژن در گیاهان می باشد. فعالیت داخلی آنزیم بتا گلوکرونیداز به جز در باکتریها، در قارچها و حیوانات نیز توصیف شده است ولی در گیاهان تا چندی پیش گزارشات کمی در ارتباط با فعالیت داخلی این ژن ثبت شده بود. اکنون مشخص شده که بسیاری از گیاهان سطوح متفاوتی از فعالیت داخلی GUS یا شبه GUS دارند که می تواند با فعالیت ژن گزارشگر GUS وارد شده به گیاه تداخل داشته باشد. برای جلوگیری از ایجاد نتایج اشتباه ناشی از این تداخل، قبل از استفاده از ژن GUS به عنوان گزارشگر بایستی بیان داخلی این ژن در موجود هدف مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه به هدف ارزیابی فعالیت داخلی آنزیم بتا گلوکرونیداز در گیاهان مختلف، بررسیهای هیستوشیمیایی فعالیت داخلی ژن GUS در برگهای چند گیاه انجام شد. در بین ده گیاه مورد مطالعه، دو گیاه چغندرقند و کالانکوئه فعالیت داخلی مشابه GUS را بروز دادند. هر گونه کاربرد بعدی این دو گیاه به هدف بررسی انتقال ژن یا آنالیز پروموتر با استفاده از ژن گزارشگر GUS، بایستی با استفاده از راهکارهای حذف یا کاهش بیان داخلی ژن GUS همراه باشد. از طرفی گیاهان مزبور می توانند به عنوان منبعی برای استخراج ژن بتا گلوکرونیداز با منشا گیاهی محسوب شوند.

واژه های کلیدی: ژن بتا گلوکورونیداز، ژن گزارشگر، فعالیت داخلی GUS، بررسی‌های هیستوشیمیایی
محور مقاله: زیست فناوری

مقدمه

استفاده وسیع از ژن گزارشگر *uidA* (GUS) به عنوان یک نشانگر قابل انتخاب در تراریختی ژنتیکی گیاهان (1-2)، بیانگر این تصور عمومی است که گیاهان فاقد آنزیم GUS می باشند. با اینحال گزارشهایی از شناسایی فعالیت GUS در برخی بافتها به خصوص در بافتهای نابالغ تعدادی از گونه های گیاهی پس از انکوباسیون طولانی مدت در بافر سنجش GUS وجود دارد. در یک مطالعه فعالیت GUS در لایه مغذی تاپتوم و دانه گرده گیاهان غیر تراریخته سیب زمینی، گوجه فرنگی و

توتون مشاهده شده است (3). همچنین پس از بررسی ۵۲ گونه گیاهی برای مطالعه بیان داخلی GUS به روش فلورومتریک یا هیستوشیمیایی، فعالیت GUS در بافتهایی مانند جدار میوه، پوسته بذر، اندوسپرم یا جنین تعدادی از گونه های مورد آزمایش گزارش شده است (4). در برخی موارد فعالیت داخلی GUS به وجود باکتریهای همزیست داخلی موجود در گیاهان و یا آلودگی باکتریایی در طی روند بررسی GUS منسوب شده است (5-6). درباره بیوشیمی، فیزیولوژی و الگوی بیان داخلی ژن GUS در گیاهان اطلاعات کمی وجود داشته و بیشتر تلاشها تا کنون برای حذف فعالیت زمینه این ژن به هدف جلوگیری از بروز نتایج اشتباه مثبت متمرکز شده است (7) و راهکارهایی در این خصوص ارائه شده است(8).

در این مطالعه، به هدف ارزیابی فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در بافت برگ گیاهان مختلف و جلوگیری از تداخل بیان داخلی ژن در زمان استفاده از ژن گزارشگر GUS و نیز معرفی منابع جدیدی برای جداسازی ژن GUS گیاهی، بیان داخلی این ژن در بافت برگ تعدادی از گیاهان مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد در برگ تعدادی از گیاهان مورد مطالعه فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز قابل ردیابی است.

مواد و روشها

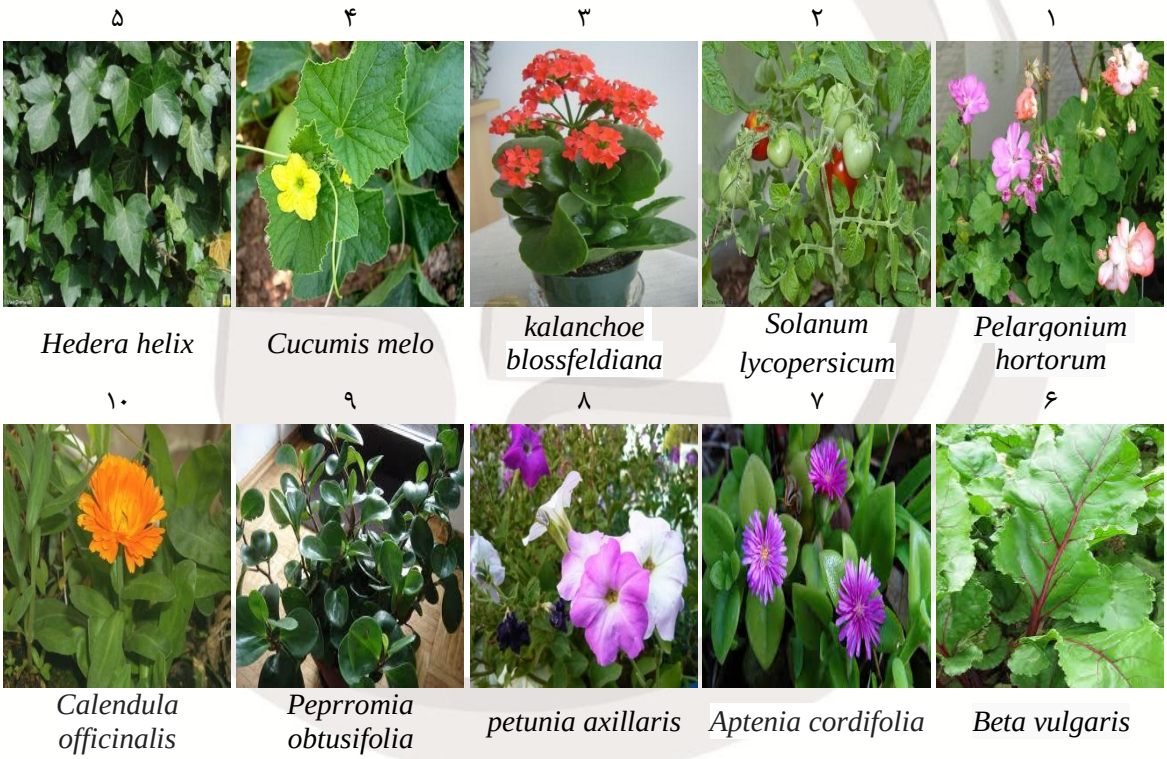
بافت برگی گیاهان شمعدانی (*Pelargonium hortorum*)، گوجه فرنگی (*solanum lycopersicum*) ، کالانکوئه (*kalanchoe blossfeldiana*)، خربزه (*Cucumis melo*)، عشقه (*Hedera helix*)، چغندرقند (*Beta vulgaris*)، گل یخ (*Aptenia cordifolia*)، اطلسی (*petunia axillaris*)، قاشقی (*Peprromia obtusifolia*) و همیشه بهار (*Calendula officinalis*) برای بررسی بیان داخلی ژن GUS مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان خربزه (رقم خاتونی) و گوجه فرنگی از گلخانه شرکت زیست تروند آرین جمع آوری شدند. گیاهان کالانکوئه، عشقه و اطلسی از محوطه پردیس دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. سایر گیاهان از گلفروشی‌های سطح شهر خریداری شدند. بررسی هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز بر اساس روش جفرسون و همکاران (9) با اندکی تغییرات، انجام شد. بافر سنجش هیستوشیمیایی GUS حاوی بافر فسفات ۱ مولار با PH= ۷، تریتون X-100 (۰/۱٪)، EDTA نیم مولار با PH= ۸، پتاسیم فریسیانید ۵۰ میلی مولار، پتاسیم فروسیانید ۵۰ میلی مولار، مرکاپتو اتانل، X-Gluc ۰/۱ مولار (پیش ماده ژن GUS) و آب مقطر دوبار یونیزه (DDW) تهیه شد. پس از ضد عفونی سطحی برگها، بافر سنجش هیستوشیمیایی GUS به نواحی پشت برگهای سالم گیاهی با سرنگ ۱ میلی لیتر بدون سوزن تزریق شده و از این نقاط برای مطالعه بیان داخلی ژن GUS، دیسک برگی تهیه شد. دیسکهای برگی بلافاصله در بافر سنجش GUS و در دمای۳۷ درجه برای مدت یک شب قرار گرفتند. سپس طی چندین مرحله، در الکل ۷۰ درصد و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد کلروفیل زدایی شدند.

جهت تصویر برداری از میکروسکوپ دیجیتال (Dino-Lite مدل Am-313 T Plus ساخت کشور تایوان) استفاده شد. بدین منظور پس از حذف کامل کلروفیل، دیسک های برگی بر روی لام قرار داده شدند. برای جلوگیری از خشک شدن، چند قطره اتانل ۷۰ درصد به نمونه ها اضافه شد. فاصله دوربین با نمونه ها با قرار دادن روی پایه میکروسکوپ تثبیت شد. بزرگنمائی دوربین روی ٤ تنظیم گردید. تصویر برداری با استفاده از برنامه نرم افزاری اختصاصی دوربین (Dinocapture 2.0) انجام شد. جهت ثبت شاخص بزرگنمائی ابتدا با تنظیم دستی دستگاه تصویر واضح شد سپس بزرگنمائی روی دستگاه قرائت شد و در

کادر بزرگنمائی در ردیف ابزار نرم افزار وارد شد. تصویر برداری با گزینه capture نرم افزار انجام شد. کیفیت تصاویر تهیه شده از طریق گزینه انتقال روی Dpi ۳۰۰ تنظیم شد.

نتایج و بحث

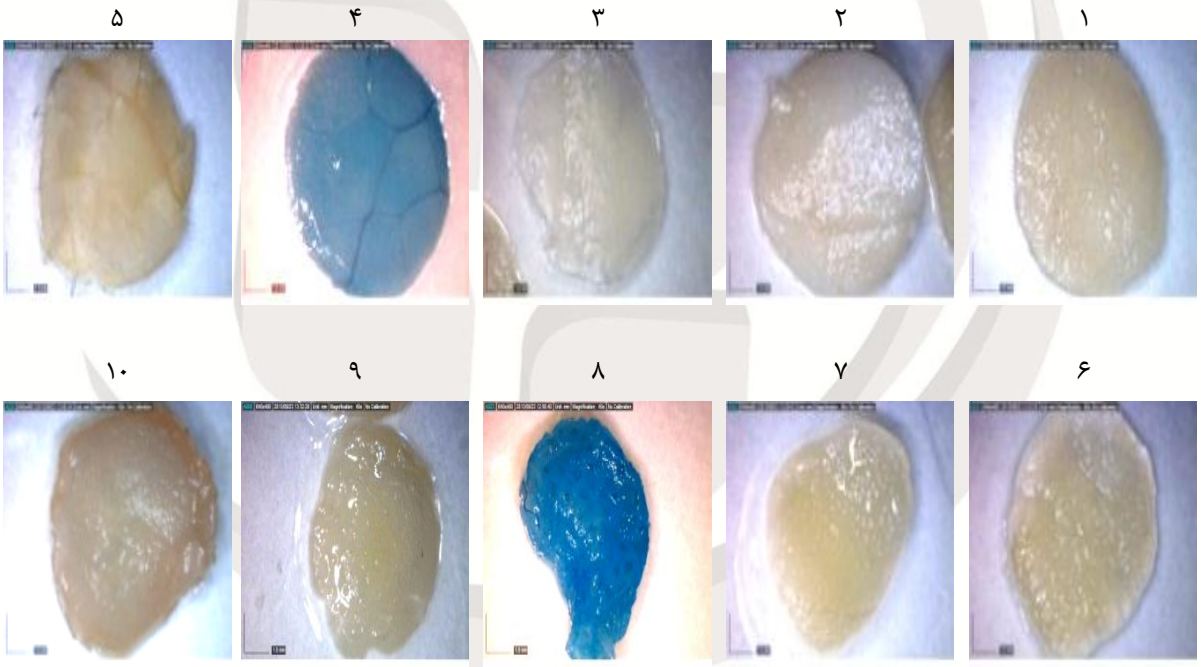
این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت داخلی آنزیم بتا گلوکرونیداز در برگ گیاهان مختلف انجام شد. از برگ ده گیاه زینتی، زراعی و جالیزی برای بررسی بیان داخلی ژن GUS استفاده شد (شکل ۱). در بین گیاهان مزبور، برگهای گیاه اطلسی در سه مرحله گیاهچه ای، قبل از گلدهی و همزمان با گلدهی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱- اسامی علمی و تصاویر گیاهان مورد استفاده برای بررسی وجود بیان داخلی ژن GUS؛
۱- شمعدانی، ۲- گوجه فرنگی، ۳- کالانکوئه، ۴- خربزه، ۵- عشقه،
۶- چغندرقند، ۷- گل یخ، ۸- اطلسی، ۹- قاشقی و ۱۰- همیشه بهار

برای بررسی بیان داخلی ژن GUS در هر یک از گیاهان، بافر سنجش یا رنگ آمیزی GUS که حاوی سوبسترای آنزیم بتا گلوکرونیداز می باشد، به سطح پشتی برگهای سالم گیاهان مورد مطالعه به صورت متصل به گیاه تزریق شد و سپس از این مناطق دیسکهای برگی تهیه شد. دیسکهای تهیه شده مورد بررسی هیستوشیمیایی (کیفی) قرار گرفتند و برای تشخیص دقیق ژن GUS با اتانول کلروفیل زدایی شدند (10). اتانل علاوه بر کلروفیل زدایی برای نگهداری طولانی مدت نمونه ها نیز مناسب است.

در این مطالعه، تغییر رنگ نمونه ها به آبی به طور محسوسی در دو گیاه کالانکوئه و چغندر قند مشاهده شد که بیانگر فعالیت داخلی شبیه GUS در بافت برگ این دو گیاه می باشد. در گیاهان شمعدانی، گوجه فرنگی، خربزه، عشقه، گل یخ، اطلسی (در هر سه مرحله گیاهچه، قبل از گلدهی و در زمان گلدهی)، قاشقی و همیشه بهار، بیان داخلی ژن GUS مشاهده نشد و یا مقدار آن کمتر از حد تشخیص با روش کنونی بود (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی بیان داخلی ژن GUS در ده گیاه مورد مطالعه

۱- شمعدانی، ۲- گوجه فرنگی، ۳- خربزه، ۴- چغندر قند ۵- عشقه

۶- گل یخ، ۷- اطلسی، ۸- کالانکوئه ۹- همیشه بهار ۱۰-قاشقی.

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

نتیجه سنجش هیستوشیمیایی در این مطالعه نشان دهنده وجود فعالیت شبیه GUS در برگهای گیاهان کالانکوئه و چغندرقند می باشد که در انطباق با برخی از نتایج بدست آمده در تحقیقات دیگر راجع به وجود بیان داخلی ژن GUS در گیاهان مختلف می باشد. برای مثال در یک مطالعه، فعالیت درونی مشابه GUS در برگهای گیاه چغندرقند مشاهده شده است (11). همچنین در مطالعه دیگری وجود فعالیت درونی بتا گلوکرونیداز در گیاه جو مشاهده شده و راهکارهایی برای حذف آن

پیشنهاد شده است (8). در تحقیق دیگری فعالیت مشابه GUS در گیاهان مدل آرابیدوپسیس، برنج، توتون و ذرت مشاهده شده است و ثابت شده که در این رابطه علاوه بر اهمیت PH بافر سنجش برای شناسایی فعالیت GUS در گیاهان مختلف و نیز نقش هورمونهای گیاهی در تنظیم بیان ژن GUS، به نظر می رسد بیان GUS در گیاهان ارتباط زیادی با مرحله رشدی آنها داشته باشد و بافتهای جوان فعالیت GUS بیشتری را نسبت به بافتهای مسن از خود بروز دهند (7).

نتایج این تحقیق بیانگر فعالیت داخلی مشابه GUS در تعدادی از گیاهان عالی بوده و کاربرد این ژن را برای استفاده به عنوان ژن گزارشگر در بررسیهای انتقال ژن و تحقیقات مشابه در این گیاهان با محدودیت روبرو می کند. البته راهکارهایی مانند تنظیم PH بافر سنجش (11)، افزودن متانول به محیط انکوباسیون (12) و افزایش دمای محیط انکوباسیون به ٦٠ درجه سانتیگراد (13) برای حذف اثر فعالیت مشابه GUS در اندامهای گیاهی وجود دارد. از طرفی وجود بیان داخلی ژن GUS در گیاهان می تواند به عنوان یک مزیت محسوب شود و گیاهان فوق به عنوان منبعی برای جداسازی ژن GUS مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت آزمایشگاه زیستا شرکت زیست تروند آرین به سبب مهیا نمودن امکانات مورد نیاز این آزمایش تشکر و قدردانی می شود.

برخی از منابع

1. **Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (**1987**) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6, 3901.
2. **Gilissen, L.J., Metz, P.L., Stiekema, W.J. and Nap, J.-P.** (**1998**) Review: Biosafety of E. coli β-glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic research*, 7, 157-163.
3. **Plegt, L. and Bino, R.J.** (**1989**) β-Glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 216, 321-327.
4. **Hu, C.-y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T.** (**1990**) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Reports*, 9, 1-5.
5. **Tör, M., Mantell, S.H. and Ainsworth, C.** (**1992**) Endophytic bacteria expressing β-glucuronidase cause false positives in transformation of Dioscorea species. *Plant Cell Reports*, 11, 452-456.
6. **Wilson, K.J., Hughes, S. and Jefferson, R.** (**1992**) The Escherichia coli gus operon: Induction and expression of the gus operon in E. coli and the occurrence and use of GUS in other bacteria.
7. **Sudan, C., Prakash, S., Bhomkar, P., Jain, S. and Bhalla-Sarin, N.** (**2006**) Ubiquitous presence of β-glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. *Planta*, 2 ,24 .864-853