مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۳، سال ۱۳۸۳ (۶۲۰-۶۱۳)

بررسی پروموتور CaMV 35S با استفاده از ژن گزارشگرGUS در کلزای تراریخت (*Brassica napus*)

مختار جلالی جواران[۱]، قادر میرزا قادری[۲] و علی محمد شکیب[۳]
۱، ۲، عضو هیات علمی و دانشجوی دوره دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱۰/۳

خلاصه

نظر به اینکه بخش اعظم روغن خوراکی کشور (بیش از ۹۰٪) از خارج تأمین می‌گردد، لذا افزایش تولید دانه‌های روغنی به منظور قطع وابستگی کشور ضرورت دارد. از بین نباتات روغنی، کلزا از اهمیت خاصی برخوردار است و اصلاح برای کمیت و کیفیت روغن آن لازم است. با توجه به اینکه اصلاح گیاه روغنی کلزا با استفاده از روشهای کلاسیک وقت‌گیر، پرهزینه و گاهی غیر ممکن است، در نتیجه استفاده از تکنیکهای نوین بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک اجتناب‌ناپذیر است. مهمترین بخش هر ژن پروموتور آن است که در این تحقیق سعی شده است تا با استفاده از ژن گزارشگر GUS بررسی دقیقی در خصوص وضعیت فعالیت پروموتور ویروس موزائیک گل کلم (CaMV 35S) از نظر میزان، مکان و زمان بیان ژن صورت پذیرد. در صورت مناسب بودن پروموتور مذکور و با توجه به نحوهٔ بیان ژن گزارشگر (GUS) β-glucuronidase می‌توان از آن به منظور کنترل سایر ژنهای مورد نظر استفاده نمود. بدین منظور ابتدا در پروژهٔ مستقلی ژن GUS در ناحیهٔ پایین دست پروموتور CaMV 35S کلون شده و به گیاه کلزا منتقل گردیده بود. در این تحقیق بذور ۷ بوته کلزای تراریخت‌شده (نسل T_0) به همراه بذور گیاه شاهد (غیر تراریخت) در گلخانه کشت شد. پروتئین محلول در چهار مرحلهٔ رشدی (شامل رزت، غنچه‌دهی، تشکیل غلاف و پیری) استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری، غلظت پروتئین محلول مشخص گردید. مقادیر کلروفیلهای a، b، و کاروتنوئید بر اساس میزان جذب نور عصارهٔ استخراج شده در طول موجهای ۴۷۰، ٦٤٦ و nm ٦٦٣ اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری بین گیاهان تراریخت و شاهد از نظر میزان پروتئین، کلروفیل و کاروتنوئید مشاهده نشد ولی میزان این ترکیبات در مراحل مختلف رشدی متفاوت بوده و در مرحلهٔ تشکیل غلاف به حداکثر میزان خود رسید. علاوه بر مطالعهٔ میزان کمی کلروفیل، کاروتنوئید و پروتئین، الگوهای باندی پروتئینها در تیمارهای تراریخت و شاهد به روش SDS-PAGE بررسی شد. در گیاهان تراریخت باند پروتئینی جدید در مقایسه با شاهد در هیچ مرحله‌ای مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل از مقایسهٔ کلروفیل، کاروتنوئید و پروتئین (از نظر کمی و کیفی) می‌توان نتیجه گرفت که انتقال ژن GUS در ناحیهٔ پایین دست پروموتور CaMV 35S به کلزا باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در مقادیر رنگدانه‌ها و پروتئین کل محلول گیاه (از نظر کمی و کیفی) نمی‌گردد. با توجه به مشاهده رنگ آبی در بافتهای مختلف گیاهان تراریخت (شامل: برگ، ساقه، گل و غلاف) و در مراحل مختلف رشد گیاهان (شامل رزت، غنچه‌دهی، تشکیل غلاف و پیری) می توان نتیجه گرفت که پروموتر CaMV 35S یک پروموتر مطلوب است که در بافتهای مختلف ودر مراحل متفاوت رشد گیاه کلزا باعث بیان ژن مورد نظر می‌گردد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا استفاده از پروموتور CaMV 35S در ناحیهٔ بالا دست سایر ژنهای مفید زراعی برای انتقال ژن به کلزا مناسب است.

واژه‌های کلیدی: کلزا، ژن گزارشگر، ژن *GUS*، پروموتور *CaMV 35S*، کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین

مکاتبه کننده: مختار جلالی جواران

مقدمه

با استفاده از ژنهای گزارشگر می‌توان تغییرات الگوی تظاهر ژن کلون شده در ناحیهٔ پایین دست پروموتور مورد نظر را مطالعه نمود. یکی از کاربردی‌ترین ژنهای گزارشگر، ژن GUS (uid A) است که از E. coli مشتق شده و در امر انتقال ژن به گیاهان کاربرد فراوان دارد. این ژن باعث ایجاد پروتئین β-glucuronidase می‌شود که منجر به تجزیهٔ چندین نوع β-glucuronide از جمله گلوکرونیدهای موجود مثل X-Gluc می‌گردد (۱۷) که بدین ترتیب می‌توان مکان فعالیت این ژن را در گیاه تراریخت تشخیص داد.

به منظور انتقال ژنهای مفید به گیاه کلزا، انتخاب پروموتور مناسب و قوی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از بین پروموتورهای موجود برای بیان ژن مطلوب در گیاهان زراعی، پروموتور CaMV 35S می‌تواند بیان ژن تحت کنترل را در بافتهای مختلف (مانند برگ، شاخه، گل) و در مراحل رشد گیاه کلزا باعث شود. به منظور بررسی دقیق وضعیت کنترل ژن توسط پروموتور CaMV 35S در پروژهٔ دیگری ژن گزارشگر GUS در ناحیهٔ پایین دست این پروموتور کلون و به کلزا رقم Westar منتقل گردید (۸). این پروموتور در گیاهان به عوامل Trans-acting ویروسی نیاز ندارد، به همین جهت در بسیاری از گیاهان تک‌لپه و دولپه فعال است (۲، ۴). تصور می‌رود که این پروموتور بصورت پایدار باعث بیان ژنها می‌گردد (۱۶، ۱۷) ولی در بعضی آزمایشات بصورت اختصاصی بیان شده و در برخی بافتها فعالیت بیشتری نشان داده است (۱، ۱۲).

آزمایشات متعددی بر روی میزان فعالیت پروموتور CaMV 35S در گیاهان مختلف صورت گرفته و الگوی بیان آن در طول دورهٔ رشد بررسی شده است. در آزمایشی که فعالیت پروموتور CaMV 35S در گیاهان توتون و برنج تراریخت بررسی گردید، میزان فعالیت پروموتور در برگهای برنج، حدود ۱۰ برابر بیشتر از برگهای توتون بود ولی فعالیت آن در ریشه‌ها برای دو گیاه تقریبا برابر بود. رنگ آمیزی بافتها نشان داد که این پروموتور در سلولهای اپیدرم برگ، مزوفیل و بافتهای آوندی و همچنین در کورتکس و استوانهٔ آوندی ریشه فعالیت داشته است ولی فعالیت آن در اپیدرم ریشه اندک بود (۱۹). در آزمایشی دیگر نیز فعالیت ژن گزارشگر GUS تحت کنترل پروموتور CaMV 35S در گیاهان سیب‌زمینی و کلونهای حاصل از آنها بررسی شد و نشان داده که این پروموتور، یک پروموتور عمومی است (۲۰) . هدف از این بررسی مطالعهٔ میزان فعالیت پروموتور CaMV 35S و همینطور تاثیر ژن گزارشگر GUS بر روی مقادیر مختلف کلروفیل a، b، کاروتنوئید و پروتئین در مراحل مختلف رشد گیاهان تراریخت و نیز بررسی تغییرات الگوهای الکتروفورزی پروتئینهای محلول در برگهای کلزای تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد (غیرتراریخت) بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور ۷ بوته کلزای *Brassica napus* تراریخت حاصل از واریتهٔ Westar که قبلاً ژن گزارشگر GUS به آنها منتقل شده بود (۱۰) به همراه بذور شاهد در گلخانه و تحت شرایط یکسان در دمای ۲۰-۲۴°C و دوره نوری ۱۶ ساعت کشت شدند. تعداد ۲۵ عدد از بذور هر یک از گیاهان در یک گلدان به قطر ۲۰ سانتیمتر کشت شدند. در مرحلهٔ ۴ برگی گیاهچه‌های هر تیمار به ۴ گلدان کوچکتر منتقل شدند. نمونه‌برداری از گیاهان در ۴ مرحلهٔ رشدی (شامل مراحل روزت، غنچه‌دهی، تشکیل غلاف و در نهایت مرحلهٔ پیری)، از برگهای کاملا توسعه یافته و هم سن صورت گرفت. از هر تیمار ۴ مشاهده (مربوط به ۴ گلدان) تهیه گردید که از هر برگ یک گرم وزن نموده و در نیتروژن مایع نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان کلروفیل (a، b) و کاروتنوئید: نمونه‌ها را تک تک از نیتروژن مایع بیرون آورده و به همراه نیتروژن مایع در هاون سائیده شده تا پودرگردید. به نمونهٔ کاملاً پودر شده ۳ میلی‌لیتر از بافر استخراج پروتئین (۵۰mM Tris-HCl (pH ۷/۵)، ۲ میلی‌مول EDTA و مرکاپتواتانل ۰/۰۴٪) به آن اضافه شد. مقدار ۲۰۰µl از هر نمونه را در اپندورف ریخته و به آن ۸۰۰µl استون سرد اضافه نموده و مخلوط گردید. این نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و قسمت بالایی آنها به اپندورفهای دیگری منتقل گردید. به منظور اندازه گیری مقادیر کلروفیل a، b، کاروتنوئید مقدار جذب نور در سه طول موج ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر برای هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت شد. مقادیر کلروفیل a،

کلروفیل b و کاروتنوئید طبق معادلهٔ زیر بدست آمد (۷):

$Chl_a\ (\mu g/ml) = 12.5\ A_{663} - 2.55\ A_{646}$

$Chl_b\ (\mu g/ml) = 18.29\ A_{646} - 2.58\ A_{663}$

$Carotenoid\ (\mu g/ml) = (1000\ A_{470} - 3.27\ Chl_a - 104\ Chl_b)/229$

مقدار ۰/۷۵ میلی‌لیتر از باقیماندهٔ محلول فوق‌الذکر را به لولهٔ جدید منتقل و با همان حجم از بافر مخصوص نمونه (Tris-HCl 625 mM (pH 6.8)، ۲٪ SDS (w/v)، مرکاپتواتانل ۵٪ (حجمی/حجمی)،گلیسرول ۱۰٪ (حجمی/ وزنی) و بروموفنل بلو ۰/۰۱ ٪ (حجمی/وزنی)) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع صاف شدهٔ این اپندورفها در دو اپندورف دیگر تقسیم و تا زمان انجام الکتروفورز در ۲۰ °C- نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان پروتئینهای محلول برگی با استفاده از روش برادفورد (۳) صورت گرفت. اساس این روش اتصال کوماسی بریلیانت بلو به پروتئین و تعیین میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر می‌باشد. میزان جذب نور در ۵۹۵ نانومتر با غلظت پروتئین نسبت مستقیم دارد. برای این منظور ابتدا منحنی استاندارد رسم گردید. بدین‌ترتیب که از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی (BSA)، محلولهایی با غلظتهای ۱/۶۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محلول برادفورد (کوماسی بریلیانت بلو G-250 ۰/۰۱٪ (حجمی/وزنی)، اتانل ۴۷٪ (حجمی/حجمی) و اسید فسفریک ۸/۵٪ (حجمی/حجمی)) تهیه شد. میزان جذب نور برای پروتئین‌های استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت و خط رگرسیون پروتئینهای استاندارد ترسیم شد.

تهیه و اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها: باقیمانده نمونه‌هایی را که در هاون کوبیده و محلول استخراج پروتئین به آنها اضافه شده بود، در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ °C به مدت ۲۴ دقیقه سانتریفوژ شدند. مقدار ۱۰ µl از هر نمونه را در یک لوله آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتر با ۹۹۰ میکرولیتر از محلول برادفورد مخلوط نموده و سپس میزان جذب نوری آنها در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. با استفاده از خط رگرسیون استاندارد بدست آمده، مقدار پروتئین در نمونه‌های استخراج شده از برگهای گیاهان تراریخت و شاهد اندازه گیری شد. چون اعداد بدست آمده نشان دهندهٔ مقدار پروتئین در ۱۰ میکرولیتر بود، بنابراین اعداد بدست آمده در ۳۰۰ ضرب شد تا مقدار پروتئین در ۳ میلی‌لیتر حاصل از یک گرم برگ تازه بدست آید. زیرا برای هر نمونه از ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج به ازاء یک گرم برگ تازه استفاده شده بود. سپس این اعداد بر ۱۰۰۰ تقسیم شدند تا مقدار پروتئین بر حسب میلی‌گرم در یک گرم برگ تازه بدست آید.

الکتروفورز: نمونه‌هایی که به منظور انجام الکتروفورز آماده شده بودند، به روش SDS-PAGE (۱۳) بر روی ژل جدا کنندهٔ ۱۴٪ اکریل‌آمید بارگیری شدند. الکتروفورز به مدت ۷ ساعت در ولتاژ ۷۵ ولت صورت گرفت. در نهایت بعد از انجام الکتروفورز، ژلها به وسیلهٔ محلول رنگ آمیزی (کوماسی بریلیانت بلو ۰/۱٪ (w/v)، اسید استیک گلاسیال ۱۰٪ (v/v) ، متانول ۴۰٪ (v/v)) رنگ آمیزی شده و سپس مراحل رنگ‌بری از ژل صورت گرفت. از ژلهای رنگ‌بری شده عکس تهیه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

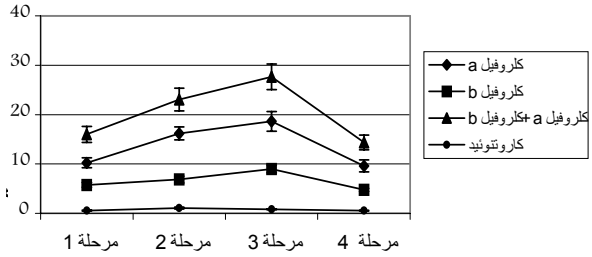
نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه داده‌های مربوط به پروتئین و کلروفیل نشان داد که در مراحل اولیهٔ رشد گیاه کلزا، میزان کلروفیلهای a و b، کاروتنوئید و همچنین پروتئین محلول در برگ کم بوده و به تدریج که گیاه رشد کرده و به مرحلهٔ تشکیل غلاف می‌رسد میزان این ترکیبات نیز به حداکثر مقدار خود افزایش می‌یابد. در مرحلهٔ چهارم، یعنی بعد از تشکیل بذر و رسیدن آنها که بتدریج برگها به زردی می‌گرایند پروتئین محلول برگ و نیز کلروفیل و کاروتنوئید به حداقل میزان خود می‌رسد. گرچه تجمع کلروفیل و کاروتنوئید در مرحلهٔ سوم به بیشترین مقدار خود رسید ولی میزان آن با مرحلهٔ دوم اختلاف معنی‌داری نشان نداد (شکلهای ۱ و۲). اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تراریخت وشاهد از نظر میزان پروتئین، کلروفیل و کاروتنوئید مشاهده نشد و می‌توان گفت که ژن GUS تحت کنترل پروموتور CaMV 35S تاثیر معنی‌داری روی میزان این ترکیبات در گیاه کلزای مورد آزمایش نداشته است.

کاروتنوئیدها در ترکیبات پروتئینی غشاء تیلاکوئید[1] وجود دارند و نقش آنها دفع رادیکالهای آزاد تولید شده در فرایند اکسیداسیون نوری توسط کلروفیل است. روند تغییرات

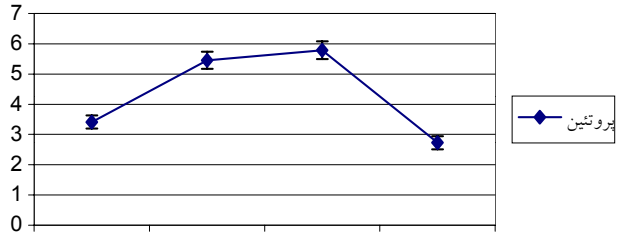
1 . Thylakoid

کاروتنوئید نیز در مراحل مختلف رشد گیاه، مشابه روند تغییرات کلروفیل و پروتئین نیست. چنین روندی در مورد این رنگ دانه‌ها در جو (۱۵) و فستوکا (۶) نیز مطالعه شده است.



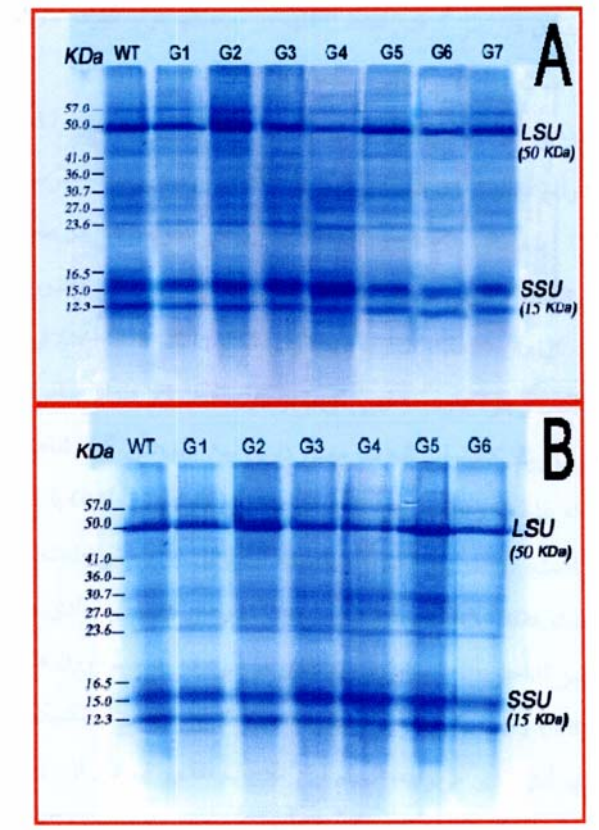
شکل ۱- مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در گیاهان تراریخت شده با ژن گزارشگر GUS، که تحت کنترل پروموتور CaMV 35S می باشد در چهار مرحلهٔ (رزت، غنچه‌دهی، تشکیل غلاف و پیری) گیاه کلزا نشان می دهد.

بررسیهای دقیق نشان داده که کلروفیل و کاروتنوئید با نسبتهای مختلفی تجزیه می‌شوند. روند کاهش میزان کاروتنوئید تقریبا مشابه کلروفیل b می باشد، در حالی که کاهش کلروفیل a در طی مراحل پیری با سرعت بیشتری صورت می گیرد (شکل ۱). دلیل این امر می تواند نگهداری کاروتنوئید در حد اشباع جهت دفع رادیکالهای آزاد تولید شده به هنگام تجزیهٔ کلروفیل می باشد (۵).



شکل ۲- مقادیر پروتئین محلول در برگ گیاهان کلزای (تراریخت شده با ژن گزارشگر GUS، تحت کنترل پروموتور CaMV 35S در چهار مرحلهٔ (روزت، غنچه‌دهی (MG1)، تشکیل غلاف و پیری) رشد گیاه کلزا را نشان می دهد.

با توجه به اینکه پروموتور CaMV 35S بسیار فعال است و در اکثر اندامهای گیاهی(از جمله ریشه، برگ، ساقه، گل) فعالیت نشان داده و منجر به ساخت آنزیم بتاگلوکرونیداز در اندامهای مختلف می‌گردد، ابتدا تصور می‌شد که میزان این آنزیم بر میزان پروتئین کل محلول برگ اثر می‌گذارد ولی در مقایسه مقادیر پروتئین گیاهان تراریخت نسل دوم (T1) با گیاهان شاهد (غیر تراریخت) اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی میزان پروتئین کل در مراحل مختلف رشد گیاهان تراریخت و شاهد تفاوت معنی داری نشان دادند (شکل ۲). به همین جهت برای بررسی دقیق‌تر تغییرات پروتئینی، الگوهای الکتروفورزی پروتئینهای کل محلول گیاهان شاهد و تراریخت مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳- الگوی باندی پروتئین محلول در برگ گیاهان کلزای تراریخت (G1-G7) و شاهد (WT) با استفاده از ژل SDS-PAGE. حجمهای پروتئین ریخته شده با توجه به داده‌های مقادیر کمی پروتئین محاسبه گردید و در هر چاهک ۲۵ µg پروتئین قرار داده شد. A، الگوی باندی پروتئینها را در مرحلهٔ رزت و B، الگوی باندی را در مرحلهٔ تشکیل غلاف نشان می‌دهد. موقعیت زیرواحد بزرگ آنزیم روبیسکو (LSU) و زیرواحد کوچک آن (SSU) در سمت راست نشان داده شده است. وزن بقیهٔ پروتئینها در سمت چپ با توجه به وزن پروتئینهای روبیسکو، از روی مقدار R.F. و وجود رابطهٔ خطی بین مقدار R.F. و لگاریتم

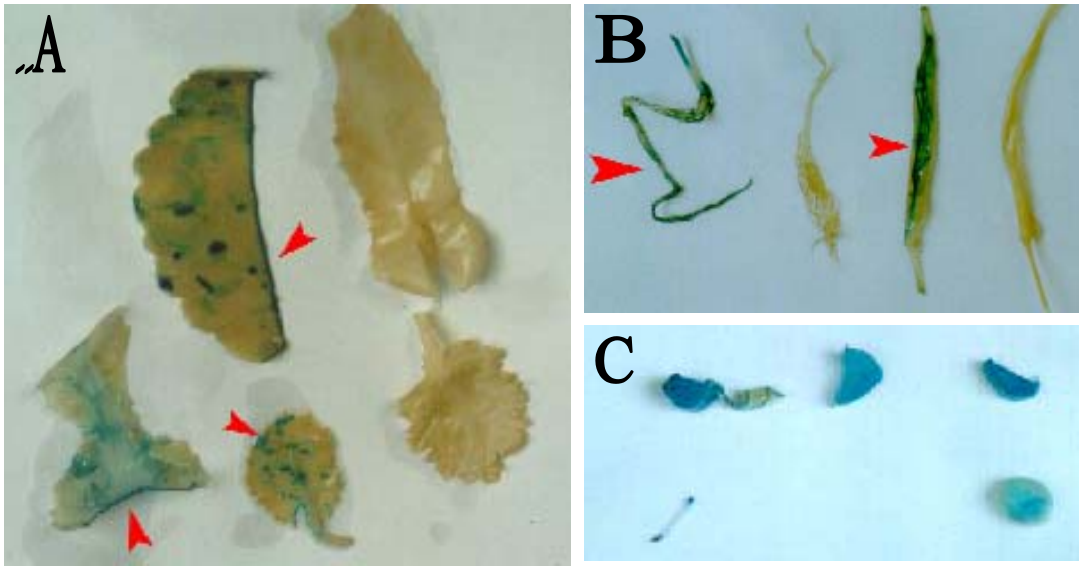
وزن مولکولی پروتئینها محاسبه شده است.

مقایسات کیفی بر روی باندهای الکتروفورزی پروتئینها با استفاده از روش SDS–PAGE نشان داد که بزرگترین باندها مربوط به زیرواحد کوچک و بزرگ آنزیم روبیسکو می‌باشد (شکل ۳). وزن ملکولی زیرواحد بزرگ روبیسکو (LSU) kDa ۵۰ و زیرواحد کوچک (SSU) kDa ۱۵ وزن دارد. روبیسکو آنزیمی است که ۵۰% پروتئین محلول برگ (۱۸) و یا ۳۰٪ کل پروتئین (۱۴) را تشکیل می‌دهد.

با توجه به داده های مربوط به مقادیر کمی پروتئین حاصل از اسپکتروفتومتری، سعی شد مقادیر برابر پروتئین (۱۰µl) در چاهکها ریخته شود. بدین ترتیب غلظت پروتئین در ستونهای مختلف با هم برابر و ستونهای ژل رنگ یکنواختی خواهند داشت. در صورتی که بخواهیم میزان کمی پروتئین را نیز در SDS–PAGE بررسی کنیم، باید حجم های مساوی پروتئین بدون در نظر گرفتن غلظت آنها در چاهکها قرار گیرد. در این صورت نمونه هایی که در آنها غلظت پروتئین بیشتر است در ژل پررنگتر مشاهده خواهند شد.

آنزیم بتاگلوکرونیداز موجود در گیاهان تراریخت حدودا kDa ۶۸/۲ وزن دارد (۱۱). الگوهای پروتئینی در دو نوع باکتری E. coli (یکی دارای فعالیت ژن GUS و دیگری فاقد این ژن) توسط جفرسون و همکارانش در سال ۱۹۸۶بررسی شده است(۱۱). باندهای حاصل از SDS–PAGE در این دو سوش در محلkDa ۶۸/۲ اختلاف بسیار جزئی را نشا ن دادند. این باند در باکتری E. coli دارای فعالیت GUS، اندکی قطورتر بود. در الکتروفورزهای پروتئینهای صورت گرفته از گیاهان شاهد و تراریخت دارای فعالیت ژن GUS اختلافی در موقعیت حدود kDa ۶۸ مشاهده نشد. گرچه این امکان وجود دارد که این آنزیم بر روی محتوا و میزان سایر پروتئینهای موجود در گیاه اثر گذاشته و مقادیر آنها را کم یا زیاد کند ولی تفاوت معنی داری بین باندهای گیاه شاهد با گیاهان تراریخت مشاهده نگردید. احتمالا بدلیل اینکه غلظت و مقدار این آنزیم در باکتری دارای ژن GUS با توجه به ژنوم کوچکتر آن نسبت به گیاه بسیار بیشتر است، در شرایط الکتروفورز ایده آل برای دو سوش مثبت و منفی، اختلاف بسیار جزئی در ضخامت باندهای موقعیت kDa ۶۸ مشاهده شده است (۱۱). پس احتمال زیادی وجود دارد که با توجه به غلظت پایین این آنزیم و نیز تداخل آن با سایر پروتئینهای موجود در گیاه با وزن مشابه، غیرقابل رؤیت باشد. برای اثبات میزان بیان ژن GUS و شناسایی آنزیم β-glucuronidase بهتر است از تکنیک Western bloting استفاده شود که به دلیل عدم دسترسی به آنتی‌بادی مربوطه، انجام این تکنیک مقدور نبود و از روش رنگ‌آمیزی بافتهای گیاهی در محلول حاوی X-gluc استفاده گردید (شکل ۴). با توجه به وزن زیاد این پروتئین شاید بهتر باشد الکتروفورز پروتئین محلول برگ با ژل جدا کننده با درصد کم (مثلا کمتر از ۱۰٪) صورت گیرد.

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق بر روی ژن GUS در کلزا و عدم تاثیر آن بر روی فعالیتهای طبیعی گیاهان تراریخت (مانند تولید کلروفیل و پروتئین)، می توان از این ژن و پروموتور CaMV 35S به منظور بهینه‌سازی روش انتقال ژن به گیاه کلزا استفاده نمود (۲). با استفاده از این سازه (ژن GUS در ناحیهٔ پایین دست پروموتور CaMV 35S) می‌توان علاوه بر بهینه سازی روش انتقال ژن اطلاعات مفیدی در خصوص نوع ریزنمونه، جوان یا پیر بودن آن و انتخاب بهترین ریزنمونه برای انتقال ژن بدست آورد. با توجه به شکل ۴ که نشان‌دهندهٔ بیان ژن گزارشگر در بخشهای مختلف گیاهان تراریخت و در مراحل مختلف رشد گیاه می‌باشد، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پروموتور CaMV35S یک پروموتور بسیار قوی می‌باشد که توانسته است بیان ژن GUS را در اندامهای مختلف و مراحل مختلف رشد گیاهان تراریخت هدایت نماید. با توجه به مجموعه مطالعات انجام شده بر روی رنگدانه‌ها (کلروفیل a، b و کاروتنوئید) و پروتئین (از نظر کمی و کیفی) و مشاهدهٔ رنگ آبی در بافتهای مختلف در مراحل رشد گیاه کلزا می‌توان نتیجه گرفت که پروموتور CaMV 35S یک پروموتور مطلوب برای انتقال ژنهای مفید (مانند مقاومت به علفکشها و بیماریها و ...) به گیاه روغنی کلزا است. لذا استفاده از پروموتور مذکور برای ژنهایی که میزان بیان بالای آنها در مراحل مختلف رشد گیاه کلزا در برگها، ساقه و گل مورد نظر باشد توصیه می‌گردد.



شکل ۴- رنگ آمیزی بافتهای مختلف گیاهان کلزای تراریخت

تصویر *A* لکه های آبی رنگ را در برگهای گیاهان کلزای تراریخت و شاهد بعد از رنگ‌آمیزی در مراحل مختلف رشدی تفاوت نشان می‌دهد. تصویر *B* ریشه و غلاف گیاهان تراریخت و شاهد را نشان می‌دهد. تصویر C نیز مقطع عرضی ساقه و دمبرگ را بعد از رنگ‌آمیزی در گیاهان تراریخت کلزا، نشان می‌دهد.

REFERENCES

1. Battraw, M. J. & Hall, T. C. 1990. Histochemical analysis of CaMV promoter-β-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. Plant Molecular Biology, 15: 527-538.
2. Blaich, R. 1992. Function of genetic material. Activity of genes in transgenic plants. Progress in Botany, 53: 207-220.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensetive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
4. Custer, J. B. M., S. C. H. J. Snepvangers, L. Zhang, M. M. L. Campagne, & M. M. L. van-Campagne. 1999. The CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sprophytic development in microspore culture. Protoplasma, 208: 257-264.
5. Gay, A. P. & H. Thomas. 1995. Leaf development in Lolium temulentum L. photosynthesis in relation to growth and senescence. New Physiologist, 130: 159-168.
6. Gut, H., C. Ruts, P. Matile, & H. Thomas. 1987. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of festuca pratensis. Phisiologia Plantarum, 70:659-663.
7. Hille, J., F. Verheggen, P. Roelvink, H. Franssen, A. Vankammen, & Zabel. 1986. Bleomycin resistance: A new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant MolecularBiology* 7: 171-176.
8. Jalali-Javaran, M. 1999. Analaysis of glutamine synthetase during leaf senescence of Brassica napus. Thesis submitted for the degree of Philosophy of Doctor , Department of Biological Sciences, Wye College, University of London.
9. Jalali-Javaran, M., K. Murres, & V. Buchanan-Wollaston. 1998. Molecular analysis of leaf senescence in Brassica and Arabidopsis. Journal of Exprimental Botany, 49
10. Jalali-Javaran, M., K. Murres, & V. Buchanan-Wollaston. 2000. Biochemical and molecular analysis of GS gene in Brassica napus. Journal of Iran Agricultural Research, 20: 17-36.
11. Jefferson, R. A., S. M. Burgess, & D. Hirsh. 1986. β-glucuronidase from Escherichia coli as a gene fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8447-8451.
12. Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, & M. W. Bevan. 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensetive

gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal, 6: 3301-3307.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
14. Makino A., & B. Osmond. 1991. Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. Plant Physiology 96: 355-362.
15. Martinoia, E., M. J. Dalling, & P. Matile. 1982. Catabolism of chlorophyll. Demonstration of chloroplast localised peroxidative and oxidative activities. Zeitschrift fur Pflanzen Phisiologie, 107: 269-279.
16. Odell, J. J., F. Nagy, & N. H. Chua. 1985. Identification of sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature, 313: 810-812.
17. Pauk, J., I. Stefanov, S. fekete, I. Bore, I. Karsai. A. Feher, & D. Dudits. 1995. A study of different promoters (CaMV 35S and mas) and risk assessment of field use in transgenic rapeseed. Euphytica, 85: 411-416.
18. Peoples M.B., S. P. Beilhurz-Waters, R. J. Simpson, & M. J. Dalling. 1980. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Tritricum aestivum L.)*. II. chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149: 214-215.
19. Schnurr, J. A. & D.J. Guerra,. (2000). The CaMV 35S promoter is sensetive to shortered photoperiod in transgenic tobacco. Plant Cell Reports, 19: 279-282.
20. Sung, S. K., S. B. Choi, J. S. Jeon, K. W. Lee, & M. C. Park. 1994. Expression patterns of CaMV 35S promoter-GUS in transgenic potatoes and their clonal progenies. Journal of Plant Biology, 37: 17-25.

Analysis of CaMV 35S Promoter Activity Using GUS Reporter Gene in Transgenic *Brassica napus*

M. JALALI JAVARAN[1], GH. MIRZA GHADERI[2], A. M. SHAKIB[3]
1, Scientific Member, Ph. D. Student, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres,
2, Staff Member, Research Institute of Biotechnology, Karaj, Iran
Accepted Dec. 3, 2003

SUMMARY

Considering the fact that a great part (more than 90%) of edible oil consumed in Iran is imported, increasing the domestic oil seed production is necessary to reduce this dependence. Among oil plants, rapeseed (*Brassica napus*) is most suitable and breeding on this plant is necessary for quality and quantity of its oil. Due to the fact that classical plant breeding methods are time consuming, expensive and incases impossible, therefore the new methods of biotechnology and genetic engineering are inevitably used in place of classical methods. In transferring useful genes to plants, the most important part of each gene is the promoter. The purpose of this research was to investigate the precise activities of promoter using the GUS reporter gene. For optimum results, CaMV 35S (Cauliflower mosaic virus) could be used as a suitable promoter regarding gene expression, and to control other genes. To achieve this, in a separate project of the GUS reporter gene (β-glucuronidase) behind cauliflower mosaic virus promoter had been coloned and introduced to rapeseed. The seeds of 7 transformed rapeseed plants (T0) with this gene as well as the control seeds (non-transformed) were planted in greenhouse. Total soluble protein content was extracted from the leaves at 4 different stages of growth (Rosette, Young Green, Mature Green and Senescence leaves), protein concentrations being spectrophotometrically measured. The amounts of chlorophyll a, b and carotenoid were determined according to the absorbance rates of extracts at 470, 646, 663 nm, the data were collected, and statistically analyzed. The results showed no significant difference between transgenic plants and control in terms of protein, chlorophyll and their carotenoid contents. In different stages of plant growth, variable amount of pigments were observed and in mature green stage these pigments reached their apex level. Besides the study of the quantity of chlorophyll, carotenoid and protein, the protein patterns were studied too using SDS-PAGE method. The results showed no new recognizable band in either transgenic or control plants at any stage. With regard to the results, when comparing chlorophyll, carotenoid and protein (quantitatively and qualitatively), one can conclude that transfer of GUS gene downstream of CaMV 35S promoter to rapeseed can not cause significant changes in the amount of either pigments or total soluble protein. Thus it's suitable to use promoter CaMV 35S upstream of useful genes for transferring genes to rapeseed.

Key words: Rapeseed, GUS gene, CaMV 35S promoter, Chlorophyll, Carotenoid, Protein, Transgenic plant.