

ساخت ناقل‌های حاوی ترکیبات ژنی *WRII* و *LPAAT* و انتقال آن‌ها به گیاه توتون

سحر داشچی^۱، حسن رهنما^{۲*}، کیانوش چقامیرزا^۳ و کتابون زمانی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲- دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۴- استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵)

چکیده

در گیاهان دانه‌روغنی تعدادی از ژن‌های دخیل در مسیر ساخت تری‌آسیل‌گلیسرول شناسایی شده‌اند که تغییر در بیان این ژن‌ها سبب افزایش محتوای روغن دانه شده است. ژن‌های *WRII* و *LPAAT* از ژن‌های کلیدی در این مسیر سنتزی هستند که بیش‌باین این ژن‌ها می‌تواند سبب افزایش محتوای روغن شود. در این تحقیق به منظور افزایش میزان روغن دانه، ناقل‌های بیانی حامل ژن‌های *WRII* و *LPAAT* طراحی و ساخته شدند. ژن‌های سنتزی *WRII* و *LPAAT* با استفاده از آنزیم‌های برشی اختصاصی از ناقل همسانه‌سازی *PGH.WRII* و *PGH.LPAAT* جدا و به صورت منفرد و جفتی در ناقل حدواسط *PGH.O3.2.2* که حامل پیشبرهای اختصاصی *SBP* و *Napin* و خاتمه‌گر *E9* می‌باشد، همسانه‌سازی شدند. کاست‌های ژنی به ناقل بیانی دوگانه *pBin19* وارد شدند. ناقل‌های نهایی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه *EHA105* منتقل و جهت بررسی صحت ساخت و بیان قطعه ژنی، در تراریختی گیاه مدل توتون به کار گرفته شدند. ارزیابی مولکولی گیاهان تراریخت، حضور و فعالیت ژن *WRII* و *LPAAT* را تأیید کرد. بذور حاصل از گیاهان تراریخت در نسل بعد در محیط کشت حاوی کانامایسین، گیاهچه‌هایی سالم و قوی تولید کردند.

واژگان کلیدی: توتون، روغن دانه، *WRII*، *LPAAT*، *Agrobacterium tumefaciens*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

مقدمه

دانه‌های روغنی مهم‌ترین منبع تولید روغن خوراکی هستند. میزان مصرف روغن خوراکی در کشور ما در حدود ۱/۵ میلیون تن در سال است، از این مقدار ۹۰ تا ۹۵ درصد از طریق واردات تأمین می‌شود (Helali, 2018). محتوای روغن یک صفت پلی‌ژنیک و متأثر از محیط است، بنابراین دست‌کاری آن مشکل می‌باشد. محققین با استفاده از روش‌های مرسوم اصلاح‌نباتات مانند انتخاب لاین‌های خالص و به‌کارگیری واریته‌های اصلاحی جهش‌یافته موفق به افزایش محتوای روغن دانه به میزان ۴۵-۴۰ درصد شده‌اند، با این حال بهبود درصد روغن با استفاده از روش‌های اصلاحی مرسوم به‌دلیل کمبود تنوع ژنتیکی، بسیار محدود شده است (Savadi et al., 2016). با پیشرفت دانش و تکنیک‌های زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک، امکان انتقال ژن‌های مؤثر در مسیر تولید روغن چشم‌اندازی امیدبخش به‌وجود آورده است. روغن‌های گیاهی به‌طور عمده از تری‌اسیل‌گلیسرول (TAG) تشکیل شده‌اند که در دانه به‌عنوان منبع کربن و انرژی ذخیره شده در رشد گیاه نقش ایفا می‌کند. در گیاهان، TAGها از گلیسرول-۳-فسفات و آسیل‌کوآنزیم چرب در شبکه آندوپلاسمی ساخته می‌شوند. ساکارز از طریق بافت‌های گیاهی وارد سلول شده و توسط ساکارزستتاز به گلوکز-۶-فسفات (G-6-P) تبدیل می‌شود. سپس توسط گلیکولیز در کلروپلاست به پیروات تبدیل می‌شود. پیروات در کلروپلاست به استیل‌کوآنزیم A تبدیل و برای ساخت زنجیره‌های اسیدچرب به‌کار می‌رود. اسیدهای چرب از کلروپلاست خارج و تبدیل به آسیل‌کوآنزیم A فعال می‌شوند. در شبکه آندوپلاسمی TAGها توسط آسیلاسیون پی در پی به گلیسرول-۳-فسفات تبدیل می‌شوند (Savadi et al., 2016; Van Erp et al., 2014).

WRINKLED1 (*WRII*) یک عامل رونویسی ۴/۸ کیلو دالتونی را رمزگذاری کرده که این عامل رونویسی متابولیسم کربوهیدرات‌های دخیل در فرآیندهای نموی از جمله رشد دانه و بلوغ جنین را تنظیم می‌کند (Ma et al., 2013; Cernac and Benning, 2004). لیزوفسفاتیک اسیدآسیل‌ترانسفراز (*LPAAT*) یکی از آنزیم‌های مهم در ساخت TAG است که در شبکه آندوپلاسمی واقع شده و تبدیل لیزوفسفاتیدیک اسید (LPA) را به فسفاتیدیک اسید (PA) کاتالیز می‌کند. علاوه‌بر این اسیدچرب را به موقعیت sn-2 از گلیسرول در سنتز TAG اضافه می‌کند (Bourgis et al., 1999; Snyder et al., 2009). آنزیم *LPAAT* جریان کربن را در مسیر تولید TAG کنترل می‌کند. این ژن‌ها باعث تولید اسیدچرب تک غیراشباع ۱۶ و ۱۸ کربنه می‌شوند؛ بنابراین، این ژن‌ها ترکیب اسیدهای چرب را تغییر داده و در نهایت موجب افزایش محتوای روغن کل می‌شوند ولی عملکرد دقیق آن‌ها شناخته نشده است (Chen et al., 2015; Snyder et al., 2009).

تحقیقات انجام شده روی ژن *WRII* در گیاهان آرابیدوپسیس (Van Erp et al., 2014; Riechmann et al., 2000) و کلزا (Liu et al., 2009; Kim et al., 2012) و ژن *LPAAT* در گیاهان آرابیدوپسیس با منشأ کلزا (Maisonneuve et al., 2010) و منشأ بادام‌زمینی (Chen et al., 2015) نشان داد که بیش‌بیان این ژن‌ها موجب افزایش روغن دانه شد. بنابراین، شناسایی و بررسی عملکرد این دو ژن می‌تواند نقش مهمی در افزایش روغن محصولات دانه‌روغنی داشته باشد. مهندسی ژنتیک با افزایش جریان کربن و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر تولید تری‌آسیل‌گلیسرول موجب افزایش روغن گیاه شده است (Savadi et al., 2016). پیشبرهای اختصاصی علاوه‌بر مقابله با هدر رفت انرژی، با فراهم کردن محیط مناسب برای فرآیندهای پس از رونویسی سبب بهبود بیان ژن می‌شوند. پروتئین‌های حامل ساکارز یا SBPها (Sucrose binding protein) اولین بار در گیاه سویا شناسایی شدند. آن‌ها عضوی از گروه 7S گلوبولین‌های ذخیره‌ای بذر می‌باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهد اتصال محکمی بین بخش‌هایی از پروتئین‌های حامل ساکارز

ساخت ژن *WRII* و *LPAAT* در ابتدا توالی cDNA ژن‌های *WRII* و *LPAAT* به ترتیب با منشأ آراییدوپسیس و کلزا از پایگاه NCBI دریافت شدند. در مرحله بعد با توجه به اینکه کدون‌های ترجیحی موجود هدف تأثیر مثبتی در افزایش بیان ژن دارند (Hamid et al., 2020)، با استفاده از نرم‌افزار Optimizer بهینه‌سازی کدونی بر اساس توالی ژنومی انجام شد. همچنین جایگاه برشی آنزیم‌های *XhoI*، *AvrII* و *SacI* جهت همسانه‌سازی ژن درون ناقل PGH.O3.2.2 به توالی مورد نظر اضافه شد. بر این اساس توالی آغازگرهای *WRII* و *LPAAT* طراحی و ساخته شد (جدول ۱).

پیشبرها و توالی آغازگر آن‌ها: توالی DNA پیشبرهای SBP (Sucrose binding protein) مربوط به گیاه *Vicia faba* و Napin با منشأ کلزا (*Brassica napus*) به آدرس <https://patents.google.com/patent/US9428757B2/en> به دست آمد. بر این اساس توالی آغازگرهای اختصاصی پیشبر SBP و Napin طراحی و ساخته شد (جدول ۱).

توالی ژن‌های *WRII* و *LPAAT*، به صورت مصنوعی توسط شرکت Generay Biotech (Shanghai) ساخته شد. آنزیم‌ها و محلول‌های مورد نیاز برای واکنش PCR از شرکت سیناژن و شرکت فرمتاز تهیه شدند. تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش اتصال، واکنش هضم، انتقال محصول به باکتری‌های مستعد و همچنین استخراج DNA پلاسمیدی مطابق با دستورالعمل سامبروک و راسل انجام شد (Sambrook and Russel, 2001). خالص‌سازی قطعات از روی ژل با استفاده از کیت High Pure PCR Purification (Roche) انجام شد.

تهیه ناقل‌های تک‌ژنی pBin19.W (pBin19.WRII) و pBin19.L (pBin19.LPAAT): ژن‌های *WRII* و *LPAAT* با هضم آنزیمی جایگاه‌های برشی *XhoI* و *AvrII* از ناقل PGH.O3.2.2 جدا و پس از خالص‌سازی از ژل یک درصد در پایین دست توالی پیشبری SBP در ناقل حدواسط PGH.O3.2.2 که با آنزیم‌های *SpeI* و *Sall* هضم شده بود، همسانه‌سازی شدند.

(SBP) و غشای پلاسمایی سلول وجود دارد. این اتصالات نشان می‌دهد که پروتئین مربوط نقش مهمی در جذب ساکارز در غشای پلاسمایی داشته و با فراهم آوردن منابع کربن، عامل مؤثری در مراحل رشدی گیاه می‌باشد (Krugel and Kuhn, 2013). پروتئین Napin نیز نوعی پروتئین ذخیره‌ای بذری بوده و اولین بار در گیاه کلزا شناسایی شد که توسط یک خانواده ژنی کد شده و متعلق به خانواده 2S پروتئین‌های بذری آلبومین می‌باشد. این پروتئین موجب بیان ژن‌های مؤثر در رشد جنین و تغییر در پروفایل اسیدهای چرب می‌شود. ساخت این پروتئین محدود به فاز بلوغ دانه بوده و حدود ۴۰-۲۰ درصد از پروتئین بذری را تشکیل می‌دهد. این پروتئین در گیاهان تک‌لپه در آندوسپرم و دولپه‌ای‌ها در جنین بیان می‌شود. همچنین موجب فعالیت‌های ضد قارچی شده و با افزایش اسیدآبسیزیک ستر آن القاء می‌شود (Rask et al., 1998; Swarnalatha Devi et al., 2010). در این تحقیق، به منظور بهبود محتوی و کیفیت روغن ارقام تجاری گلرنگ ایرانی، سه ناقل بیانی حامل ژن‌های *WRII*، *LPAAT* و *WIII + LPAAT* تحت پیشبرهای اختصاصی SBP و Napin و خاتمه‌گر E9 طراحی و همسانه‌سازی گردید. در مرحله‌ی بعد ناقل‌های حاصل به منظور بررسی امکان انتقال صحیح و بیان آن‌ها در گیاه، به گیاه مدل توتون منتقل شدند.

مواد و روش‌ها

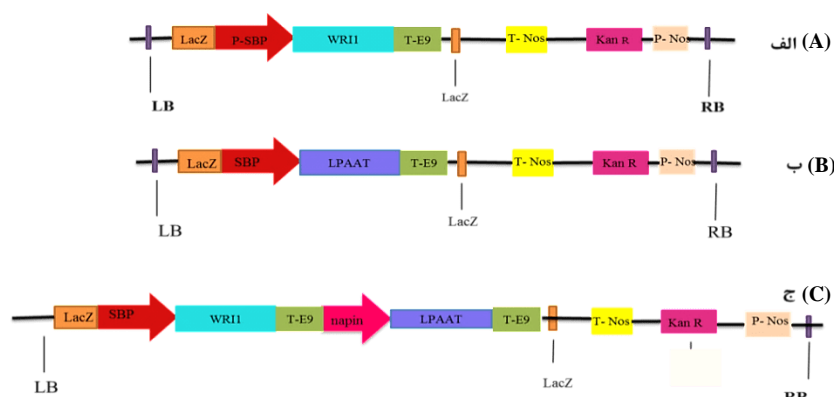
باکتری‌های مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه XILblue (Cinna Gen B16-50c) به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر ناقل تهیه شده و از باکتری *A. tumefaciens* سویه EHA105 جهت انتقال ژن هدف به گیاه توتون استفاده شد.

ناقل‌ها: از ناقل حدواسط PGH.O3.2.2 دارای پیشبرهای بذری SBP و Napin و خاتمه‌گر E9 و همچنین ناقل بیانی pBin19 دارای ژن *LacZ* و نشانگر انتخابی کانامایسین استفاده شد (شکل ۱). ناقل مذکور دارای دو ژن مقاومت به کانامایسین یکی در خارج ناحیه T-DNA برای گزینش باکتری و دیگری در داخل این ناحیه برای انتخاب گیاه می‌باشد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای *WR11*، *Napin*، *SBP* و *LPAAT* استفاده شده

Table 1. Sequences of *WR11*, *Napin*, *SBP* and *LPAAT* primers were used

پیشبر / ژن Promoter / gene	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر (۵'-۳') Primer sequence (5'-3')	طول قطعه (جفت‌باز) Fragment length (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)
SBP	Patent	F: AAA CTC TGA TTG AAC CTAC R: GGA TTC TTT GTG TTG TAC	574	56
Napin	Patent	F: TAT GTG TGT GCT GTG AGA R: GTG TAA CAA GAC GGA TTC	363	56
<i>LPAAT</i>	NM_001316026.1	F: GCT GCT GCT GTT ATT GTT CC R: CAT AGT TGG TGG TGG AGA AG	700	58
<i>WR11</i>	NM_115292.4	F: GATTGTGATTGGTGGGCTGG R: CTAACCAGAATGGACGTGGGA	326	59



شکل ۱- طرح شماتیک ساخت ناقل‌های الف: *pBin19.W*؛ ب: *pBin19.L*؛ ج: *pBin19.W.L*

Figure 1. Schematic design of constructs A: *pBin19.W*; B: *pBin19.L* and C: *pBin19.W.L*
ناقل *pBin19* حامل نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین، تحت پیشبر و خاتمه‌گر *nos*، ژن *LacZ*، توالی‌های مرزی چپ (LB) و راست (RB) *pBin19* vector carrying the kanamycin selective marker under *nos* promoter and terminator, *LacZ* gene, left (LB) and right border (RB) sequences

تأیید شد و ناقل‌های حاصل به ترتیب *pBin19.W* و *pBin19.L* نام‌گذاری شدند.

جهت ساخت ناقل *pBin.W*، صحت جداسازی ژن *WR11* و درج آن در ناقل حدواسط PGH.O3.2.2 با هضم آنزیمی *HindIII* و به ترتیب مشاهده باندهای ۳۷۷۰ و ۲۹۱۱ جفت‌بازی مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲: الف). ناقل بیانی *pBin19.W* توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی پیشبر *SBP* (شکل ۲: ب) و الگوی هضم آنزیمی *HindIII* (شکل ۲: ج) تأیید شد.

صحت ساخت ناقل حدواسط *O3.2.2.LPAAT*، با هضم توسط آنزیم‌های *PstI* و *HindIII* مورد تأیید قرار گرفت. بدین ترتیب که هضم با آنزیم *HindIII*، تولید قطعات ۲۸۸۵ و ۳۶۲۳ جفت‌بازی و هضم با آنزیم *HindIII* و *PstI* قطعات

تأیید ساخت ناقل‌های *O3.2.2.W* و *O3.2.2.L* با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی بررسی شد. سپس کاست‌های ژنی *WR11* و *LPAAT* با استفاده از آنزیم برشی *HindIII* جداسازی شد و هرکدام در ناقل بیانی *pBin19* که با همین آنزیم هضم شده بود (برای جلوگیری از خودالحاقی^۱ از آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شد) همسانه‌سازی شد. تأیید همسانه‌سازی ابتدا با استفاده از روش Colony PCR باکتری‌های *E.coli* رشد کرده بر روی محیط حاوی کانامایسین (نشانگر آنتی‌بیوتیکی موجود روی ناقل *pBin19*) بررسی شد. در ادامه برای بررسی بیشتر از کلونی‌های مثبت، کشت مایع تهیه و پس از استخراج پلاسمید، صحت ساخت ناقل جدید با روش PCR و بررسی الگوی هضم آنزیمی

1- Self- ligation

آنتی‌بیوتیکی موجود روی ناقل pBin19 با استفاده از روش Colony PCR بررسی شدند. برای تکمیل اطلاعات حاصل از کلونی‌های مثبت، کشت شبانه تهیه و پس از استخراج پلاسمید، تأیید ساخت نهایی ناقل نیز توسط آزمون PCR (شکل ۴: ه) با آغازگر *LPAAT* (۷۰۰ جفت‌باز)، جلورونده SBP و برگشتی *WRII* (۲۹۰۰ جفت‌باز) و هضم با آنزیم *HindIII* و خروج قطعات ۵۸۳۵ و ۱۱۸۰۳ جفت‌بازی (شکل ۴: و) انجام گرفت. سپس هر سه ناقل نوترکیب به‌طور مستقل، با روش ذوب و انجماد به اگروباکتریوم سویه EHA105 (حاوی ناقل مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفامپسین ۷۵ mg/l) منتقل شدند تا ناقل‌های حاصل در سایر مراحل انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.

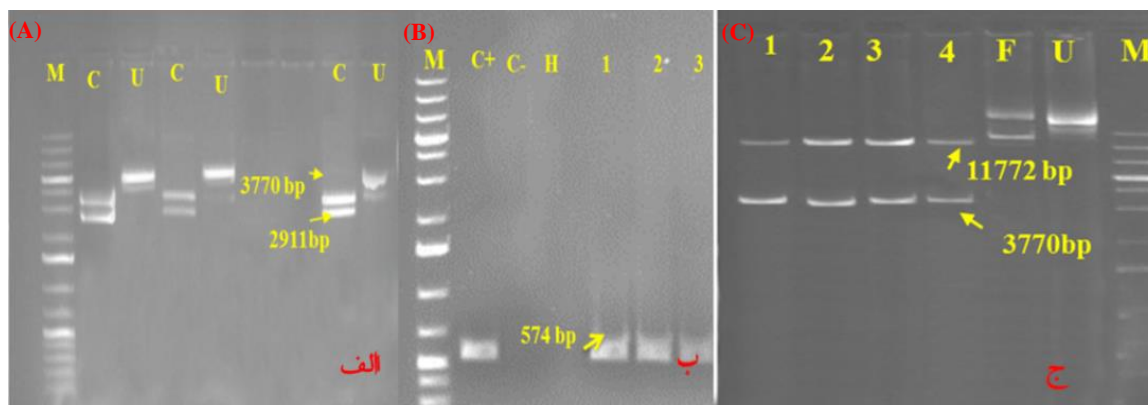
تراریختی گیاه توتون: از روش استاندارد دیسک برگی جهت تراریختی برگ توتون استفاده شد (Zakerghoran et al., 2014). بعد از ساقه‌زایی، گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط ریشه‌زایی (شامل محیط پایه MS + ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) تحت همان شرایط شاخه‌زایی به‌مدت دو هفته نگهداری شدند و پس از ریشه‌زایی به گلدان‌های حاوی پیت (۴۰ درصد)، پرلیت (۴۰ درصد)، ورمیکولیت (۲۰ درصد) منتقل شدند.

آنالیزهای مولکولی: DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان باززایی شده در محیط انتخابی، به روش CTAB با اندکی تغییرات استخراج شد (Soni and Murray, 1994). حضور ژن *WRII* و *LPAAT* به‌ترتیب با استفاده از PCR آغازگرهای اختصاصی SBP و *LPAAT* و همچنین ژن داخلی *Actin* مورد تأیید قرار گرفت. واکنش PCR با توجه به شرایط بهینه انجام شد، همچنین از آغازگرهای ژن *Vir* برای تأیید عدم آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش RT-PCR: استخراج RNA از ۴ گیاه تراریخته تصادفی و یک گیاه تیپ وحشی (گیاه غیر تراریخته) طبق پروتکل وو و همکاران (Wu et al., 2002) و همراه با تیمار DNase انجام گردید.

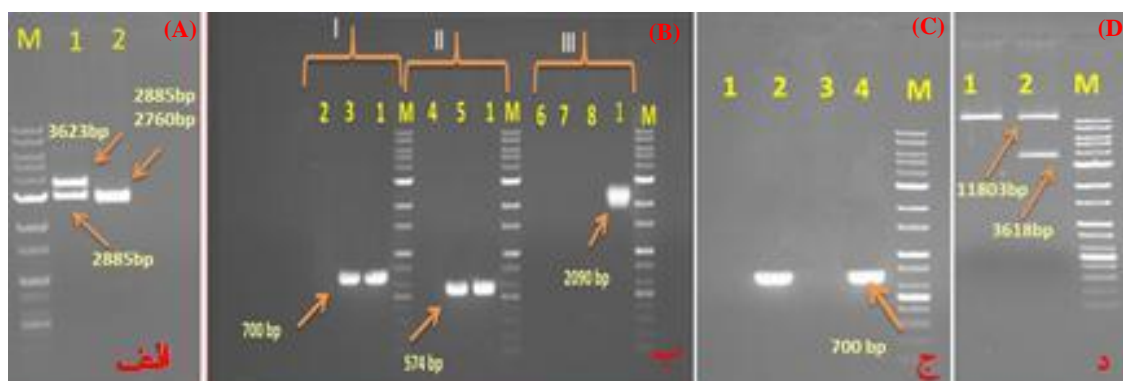
۲۷۶۰ و ۲۸۸۵ جفت‌بازی (قطعات روی هم افتاده) نمود (شکل ۳: الف). در تأیید با آزمون PCR از آغازگرهای *LPAAT*، SBP و هر دو با هم (برگشتی *LPAAT* و جلورونده SBP) استفاده شد و به‌ترتیب قطعات ۷۰۰، ۵۷۴ و ۲۰۹۰ جفت‌بازی ایجاد کرد (شکل ۳: ب). در تأیید با آزمون PCR، آغازگر *LPAAT* باند ۷۰۰ جفت‌بازی را تکثیر نمود (شکل ۳: ج). در مرحله بعد برای ساخت ناقل pBin19.L، هضم با آنزیم *HindIII* دو قطعه ۳۶۱۸ و ۱۱۸۰۳ جفت‌بازی تولید کرد (شکل ۳: د).

ساخت ناقل دوزنی pBin19.W.L: قطعه ژنی *WRII* پس از هضم توسط آنزیم‌های *SacI* و *AvrII*، جایگزین قطعه ژنی اول هضم شده با آنزیم‌های *SacI* و *SpeI* در ناقل حدواسط PGH.O3.2.2 شد. با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *SalI* و *XbaI* باند ۲۰۱۱ و ۶۶۴۴ جفت‌بازی مشاهده شد (شکل ۴: الف). جهت تأیید ورود ژن *WRII* آزمون PCR با آغازگرهای جلورونده SBP و برگشتی *WRII* انجام و قطعه ۲۹۰۰ جفت‌بازی ایجاد شد (شکل ۴: ب). در مرحله بعد، برای همسانه‌سازی ژن *LPAAT* در ناقل حدواسط، ژن مذکور از ناقل PGH.LPAAT با آنزیم‌های *AvrII* و *XhoI* جدا و با انجام واکنش هضم در ناقل حدواسط توسط آنزیم‌های *SalI* و *AvrII* این ژن در ناقل حدواسط همسانه‌سازی شد. پس از انتقال محصول واکنش اتصال در هر مرحله به باکتری‌های مستعد و کشت باکتری‌ها بر روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین (نشانه‌گر آنتی‌بیوتیکی موجود روی ناقل حدواسط O3.2.2) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، DNA پلاسمیدی از آن‌ها به‌منظور تأیید ساخت ناقل O3.2.2.W.L با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی استخراج شد. در این مرحله نیز تأیید الحاق ژن، توسط آزمون PCR (شکل ۴: ج) با آغازگر اختصاصی *LPAAT* (باند ۷۰۰ جفت‌باز)، جلورونده SBP و برگشتی *WRII* (باند ۲۹۰۰) و همچنین هضم با آنزیم‌های برشی *HindIII* و مشاهده قطعه ۲۸۸۵ و ۵۸۶۱ جفت‌بازی (شکل ۴: د) انجام گرفت. در نهایت قطعه ژنی حاوی هر دو کاست ژنی *WRII* و *LPAAT* توسط آنزیم برشی *HindIII* جداسازی شد و در ناقل بیانی pBin19 که با همین آنزیم هضم شده بود، همسانه‌سازی شد. باکتری‌های *E.coli* رشد کرده بر روی محیط واجد کانامایسین (نشانه‌گر



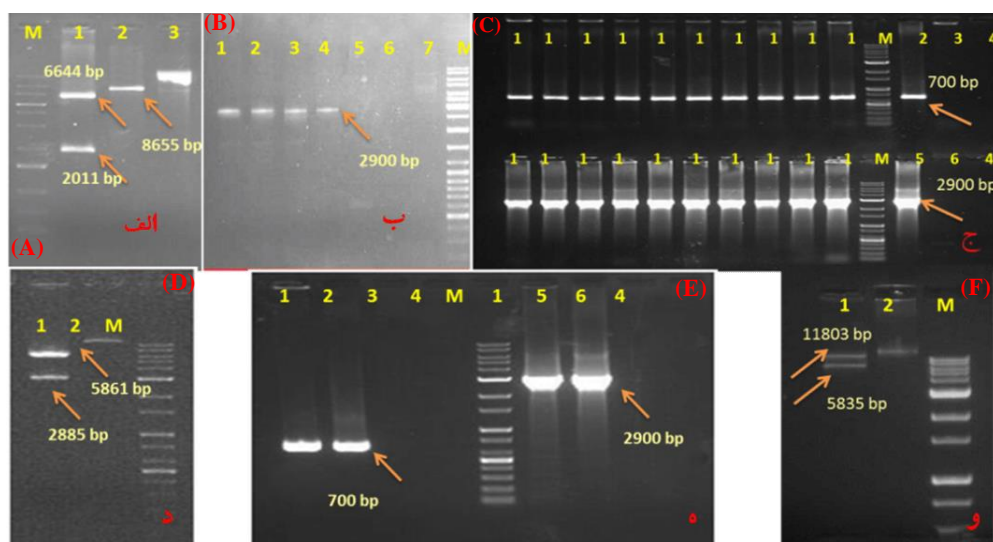
شکل ۲- الف: تأیید ناقل حدواسط O3.2.2.W با استفاده از الگوی هضم آنزیمی *HindIII* محدودگر و خروج قطعات ۳۷۷۰ و ۲۹۱۱ جفت‌بازی؛ C: قطعه برش خورده، U: قطعه برش نخورده. ب: تأیید ناقل ژنی pBin19.W با استفاده از الگوی PCR و تکثیر قطعه ۵۷۴ جفت‌بازی، ۱، ۲، ۳: کلون‌های تأیید شده، C+: O3.2.2، C-: pBin19، H: H₂O. ج: تأیید ناقل ژنی pBin19.W با استفاده از الگوی آنزیمی *HindIII* محدودگر و خروج قطعه ۳۷۷۰ و ۱۱۷۷۲ جفت‌بازی؛ ۱، ۲، ۳، ۴: کلون‌های تأیید شده، F: کلون‌های کاذب، U: قطعه برش نخورده. در تمام ژل‌ها از نشانگر مولکولی 1Kb+ (M) استفاده شده است.

Figure 2. A: Confirmation of the intermediate construct of O3.2.2.W using the enzymatic digestion pattern of the *HindIII* restriction enzyme and the isolation of 3770 and 2911 bp fragments; C: Cut, U: Un cut. B: Confirmation of pBin19.W gene construct using PCR pattern and amplification of 574 bp fragment; 1,2,3: Confirmed clones, C+: O3.2.2, C-: pBin19, H: H₂O. C: Confirmation of pBin19.W gene construct using *HindIII* enzymatic digestion pattern and isolation of 3770 and 11772 bp fragments; 1,2,3,4: Approved clones, F: False clone, U: Un cut. 1Kb + molecular marker (M) was used in all gels.



شکل ۳- الف: تأیید ناقل حدواسط O3.2.2.L با استفاده از الگوی هضم آنزیمی *HindIII* و *PstI*؛ ۱: هضم با آنزیم *HindIII* و ایجاد قطعات ۲۸۸۵ و ۳۶۲۳ جفت‌بازی، ۲: هضم با آنزیم *HindIII* و *PstI*: ۲۸۸۵، ۲۷۶۰ جفت‌بازی؛ ب: تأیید ناقل ژنی O3.2.2.L با استفاده از الگوی PCR، (I) تکثیر با آغازگر *LPAAT*، (II) تکثیر با آغازگر *SBP*، (III) تکثیر با آغازگرهای *SBP* و *LPAAT* (چاهک‌ها شامل ۱: O3.2.2.L، ۲: C- = *WR11*، ۳: C+ = *LPAAT*، ۴: C- = *LPAAT*، ۵: C+ = O3.2.2، ۶: C- = *LPAAT*، ۷: C- = *WR11*، ۸: C- = O3.2.2)؛ ج: تأیید درج صحیح کاست ژنی در ناقل pBin19.L با استفاده از الگوی PCR، (۱: C- = pBin19، ۲: C+ = *LPAAT*، ۳: C- = O3.2.2)؛ د: تأیید ناقل pBin19.L با استفاده از هضم آنزیمی *HindIII* (۱: pBin19، ۲: pBin19.L).

Figure 3- A: Confirmation of the intermediate structure of O3.2.2.L using the enzymatic digestion pattern of *HindIII* and *PstI* restriction enzymes: 1. Digestion with *HindIII* enzyme and creation of 2885 and 3623 bp fractions, 2. Digestion with *HindIII* and *PstI*: 2885, 2760 bp; B: Confirmation of O3.2.2.L gene construct using PCR pattern, (I) amplification with *LPAAT* primer, (II) amplification with *SBP* primer, (III) amplification with *SBP* and *LPAAT* primers. (Wells include 1: O3.2.2.L, 2: C- = *WR11*, 3: C+ = *LPAAT*, 4: C- = *LPAAT*, 5: C+ = O3.2.2, 6: C- = *LPAAT*, 7: C- = *WR11*, 8: C- = O3.2.2); C: Confirmation of correct insertion of gene cassette in pBin19.L construct using PCR pattern (1: C- = pBin19, 2: C+ = *LPAAT*, 3: C- = O3.2.2, 4: pBin19.L); D: Confirmation of pBin19.L construct using *HindIII* enzymatic digestion pattern (1: pBin19, 2: pBin19.L).



شکل ۴- الف: تأیید ورود ژن *WR11* به ناقل حدواسط O3.2.2 با استفاده از الگوی هضم با آنزیم *SalI* و *XbaI*: (O3.2.2.WR11، O3.2.2، Un Cut؛ ۳)؛ ب: تأیید ورود ژن *WR11* به ناقل حدواسط با استفاده از الگوی PCR با آغازگرهای *WR11* و *SBP* (چاهک‌های ۱-۴: O3.2.2.W، O3.2.2، False؛ ۵؛ ۶: C- = *LPAAT*، ۷: Master mix without DNA)؛ ج: تأیید ورود ژن *LPAAT* به ناقل حدواسط با استفاده از الگوی PCR ردیف بالا: تکثیر با آغازگر *LPAAT* و ظهور قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی و ردیف پایین تکثیر با آغازگرهای *SBP* و *ATW* و ظهور قطعه ۲۹۰۰ جفت‌بازی (۱: O3.2.2.W.L، ۲: C+= *LPAAT*، ۳: C- = O3.2.2، ۴: Master mix without DNA، ۵: C+= O3.2.2.W، ۶: C- = *LPAAT*)؛ د: تأیید ورود ژن *LPAAT* به ناقل حدواسط استفاده از الگوی هضم با آنزیم *HindIII* و خروج قطعات ۵۸۶۱ و ۲۸۸۵ در چاهک شماره یک و چاهک شماره دو پلاسمید هضم نشده است؛ ه: تأیید ناقل pBin19.W.L با استفاده از آغازگر *LPAAT* از سمت چپ و ظهور قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی و آغازگرهای *SBP* و *ATW* از سمت راست و ظهور قطعه ۲۹۰۰ جفت‌بازی (۱: pBin19.W.L، ۲: C+= *LPAAT*، ۳: C- = O3.2.2، ۴: Master mix without DNA، ۵: C+= pBin19، ۶: 1Kb+)؛ و: تأیید ناقل pBin19.W.L با استفاده از هضم آنزیمی *HindIII* و خروج قطعات ۵۸۳۵ و ۱۱۸۰۳ جفت‌بازی (۱: pBin19.W.L، ۲: pBin19) در تمام ژل‌ها از نشانگر مولکولی 1Kb+ استفاده شده است.

Figure 4. A: Confirmation of *WR11* gene insertion to the intermediate structure of O3.2.2 using the digestion pattern with *SalI* and *XbaI* enzymes: 1: O3.2.2.W, 2: O3.2.2, 3: Uncut; B: Confirmation of *WR11* gene insertion to the intermediate construct using PCR pattern with *SBP*, *WR11* primers, wells 4-1: O3.2.2.WR11, 5: False, 6: C- = *LPAAT*, 7: Master mix without DNA; C: Confirmation of *LPAAT* gene insertion to the intermediate construct using top row PCR pattern: amplification with *LPAAT* primer and appearance of 700 bp fragment and bottom row amplification with *SBP*, *ATW* primers and appearance of 2900 bp fragment (1: O3.2.2.W.L, 2: C+= *LPAAT*, 3: C- = O3.2.2, 4: Master mix without DNA, 5: C+= O3.2.2.WR11, 6: C- = *LPAAT*); D: Confirmation of *LPAAT* gene insertion to the construct by intermediate using of *HindIII* enzyme digestion pattern and exit of 5861 and 2885 fragments in well number one and well number two of plasmid not digested; E: Confirmation of pBin19.W.L construct using *LPAAT* primer from left and appearance of 700 bp fragment and *SBP* and *ATW* primers from right and emergence of 2900 bp fragment (1: pBin19.W.L, 2: C+= *LPAAT*, 3: C- = O3.2.2, 4: Master mix without DNA, 5: C+= pBin19, 6: 1Kb+); F: Confirmation of pBin19.W.L structure using *HindIII* enzymatic digestion and exit of 5835 and 11803 bp fractions (1: pBin19.W.L, 2: pBin19). 1Kb + molecular marker was used in all gels.

WR11 و *LPAAT* به صورت سه واکنش جداگانه انجام شد. cDNA حاصل بعد از رقیق‌سازی در دمای -20°C نگهداری گردید. برای بررسی کیفیت و همچنین همسانی غلظت cDNAهای حاصل، ابتدا از آغازگرهای ژن مرجع *Actin* در واکنش PCR استفاده گردید و نتیجه واکنش بر روی ژل آگارز بررسی گردید. سپس PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و *WR11* و *LPAAT* تحت

سنجش کمی و کیفی RNAهای استخراج شده، با استفاده از بررسی نسبت $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ تعیین گردید. علاوه بر این جهت سنجش کیفی RNAهای استخراج شده، یک میکرولیتر از هر استخراج بر روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز گردید. رونویسی معکوس از روی RNAها به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای *nptII* و همچنین آغازگر برگشتی اختصاصی ژنهای *nptII*

شرایط ذکر شده انجام شد (Hamid *et al.*, 2018). در نهایت محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد تفکیک شد. **آنالیز بیان:** به منظور شناسایی گیاهان تراریخته از طریق بررسی بیان کانامایسین، بذور حاصل از گیاهان T₀ و یا نتاج گیاهان تراریخته (گیاهان T₁) در محیط‌های حاوی کانامایسین کشت شدند. غلظت استفاده شده برای تأیید تراریختگی مشابه غلظت استفاده شده در محیط انتخابی و برابر ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در این آزمایش انتظار می‌رفت که گیاهان تراریخته به صورت سالم و طبیعی در محیط انتخابی رشد کنند، در حالی که گیاهان شاهد و یا غیر تراریخت عدم رشد یا اختلال در رشد نشان دهند.

نتایج و بحث

در طراحی ناقل‌های آگروباکتریوم به منظور انتقال هم‌زمان چند ژن استراتژی‌های مختلفی به کار گرفته شده‌اند. اولین استراتژی، روش مخلوط دو باکتری است که دو ناحیه T-DNA در دو پلاسمید جداگانه و در دو سلول آگروباکتریوم جداگانه قرار گرفته‌اند. در روش دیگر، از یک سلول باکتری استفاده می‌شود، این روش خود دو حالت دارد در حالت اول ژن‌ها در یک ناحیه T-DNA و در فاصله کمی از هم قرار می‌گیرند (McCormac *et al.*, 2001) و در حالت دیگر، پلاسمیدهای مستقل، حامل T-DNA‌های مختلف بوده ولی در یک سلول آگروباکتریوم قرار می‌گیرند (Wang *et al.*, 2003). در انتقال ناقل دارای کاست هر دو ژن در یک ناحیه T-DNA به گیاه، به دلیل اینکه هر دو ژن در منطقه یکسانی از ژنوم قرار می‌گیرند، شرایط بیان هر دو شبیه به یکدیگر خواهد بود در حالی که در انتقال چند ناقل جداگانه و یا یک باکتری حامل پلاسمیدهای متعدد هر یک از ژن‌ها در منطقه کاملاً متفاوتی از ژنوم درج خواهند شد و در نتیجه با توجه به اثر مکانی الگوی بیانی مشابهی نخواهند داشت. بر این اساس به نظر می‌رسد انتقال دو ژن *WRII* و *LPAAT* تحت نواحی تنظیمی مستقل در یک ناحیه T-DNA استراتژی بهتری است چرا که در صورت درج ناحیه T-DNA در منطقه مناسبی از ژنوم امکان بیان مشابه هر دو ژن وجود دارد. به علاوه استفاده از پلاسمیدهای متعدد در باکتری‌های مستقل و یا استفاده از یک پلاسمید با چندین ناحیه T-DNA به عنوان حامل ممکن است سبب ادغام ژن‌ها در کروموزوم‌های مختلف شده و بنابراین طی نسل‌های بعد به دلیل

تفرق صفات احتمال حضور هر دو ژن در یک گیاه تراریخت بسیار کم می‌شود. دیگر مزیت انتقال هم‌زمان دو ژن *WRII* و *LPAAT* تحت نواحی تنظیمی مستقل در یک ناحیه T-DNA استفاده از یک ژن گزینشگر برای هر دو ژن است. علاوه بر این گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که بیان هم‌زمان دو یا چند ژن مؤثر در مسیر تولید اسیدچرب در یک گیاه تراریخت، به دلیل اثر هم‌افزایی آن‌ها، مؤثرتر از انتقال تک‌ژنی آن‌ها می‌باشد (Zhu *et al.*, 2007). بنابراین، در این تحقیق علاوه بر طراحی ناقل‌های بیانی تک‌ژنی، ناقل دارای هر دو ژن *WRII* و *LPAAT* با پیشبر و خاتمه‌دهنده مستقل نیز ساخته شد تا امکان بیان هم‌زمان هر دو ژن و ایجاد اثر هم‌افزایی مثبت آن‌ها فراهم شود. ایرادی که ممکن است بر انتقال هم‌زمان دو ژن در یک ناحیه T-DNA بر یک پلاسمید وارد شود بزرگ شدن ناحیه T-DNA است که در نتیجه ممکن است ناحیه مذکور به صورت ناقص درج شود. با توجه به اینکه در این پژوهش از cDNA دو ژن *WRII* و *LPAAT* استفاده شده است (به طوری که طول کل ناحیه T-DNA، ۵۸۳۵ جفت‌باز است)، جهت اطمینان از درج کامل ناحیه T-DNA از آغازگرهای انتهایی بخش T-DNA استفاده کرد (Esfahani *et al.*, 2011).

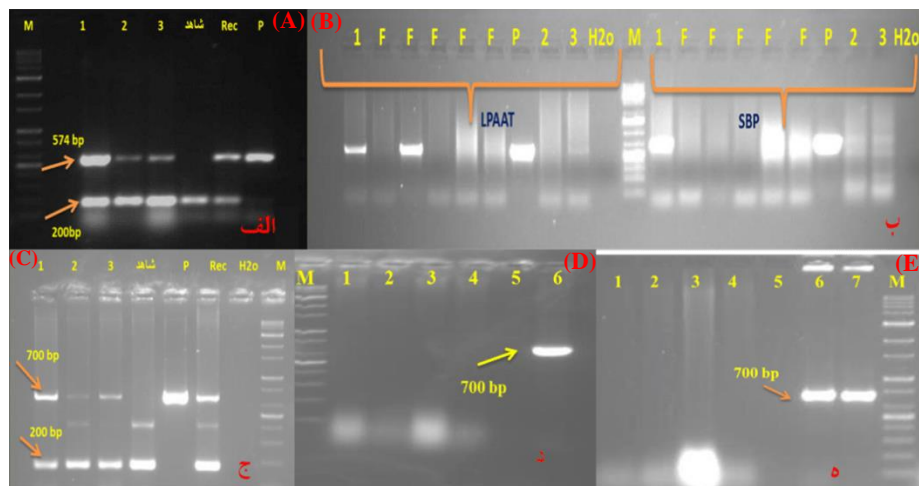
ارزیابی گیاهان تراریخت: ساخت ناقل‌های بزرگ علاوه بر مشکلات زیاد در هم‌سانسازی، موانعی در انتقال هم دارد؛ بنابراین قبل از انتقال به گیاه اصلی لازم است انتقال صحیح آن در گیاهان مدل بررسی شود که در صورت عدم انتقال و بیان صحیح، ممکن است به موارد دیگر از جمله موانع فیزیولوژیکی مرتبط باشد. گیاهان تراریخت احتمالی باززایی شده از محیط انتخابی حاوی کانامایسین با روش PCR بررسی شدند. آنالیز PCR روی DNA ژنومی گیاه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی وجود قطعات ژنی را تأیید کرد. یکی از مشکلات عمده روش‌های PCR، نداشتن یک کنترل داخلی است. کنترل داخلی یا Reconstructed یک توالی هدف از DNA موجود در لوله است که به صورت هم‌زمان با توالی هدف تکثیر می‌شود. در PCR فاقد کنترل داخلی، پاسخ منفی می‌تواند نشان دهنده عدم وجود توالی هدف در واکنش و یا باز داشته شدن واکنش، عدم فعالیت صحیح دستگاه ترموسایکلر، فعالیت ضعیف DNA پلی‌مراز و همچنین حضور مواد بازدارنده در نمونه باشد. با به کارگیری کنترل داخلی،

دورژنی حاکی از حضور ژن‌های *WRII* و *LPAAT* در گیاهان تراریخت بود (شکل ۵: الف، ب و ج).

همچنین جهت بررسی عدم آلودگی نمونه‌ها به آگروباکتریوم از آغازگرهای *Vir* و آزمون PCR استفاده شد (شکل ۵: د و ه). گیاهانی که آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی مثبت و ژن *Vir* منفی بودند، به‌عنوان گیاهان تراریخت انتخاب و به گلدان منتقل شدند. بذور حاصل از گیاهان تراریخت احتمالی در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کاشته شد. بعد حدود یک ماه بذور حاصل از گیاهان تراریخت، گیاهچه‌هایی قوی تولید نمود ولی گیاهچه‌های حاصل از بذور شاهد ضعیف و کوچک بود (شکل ۶).

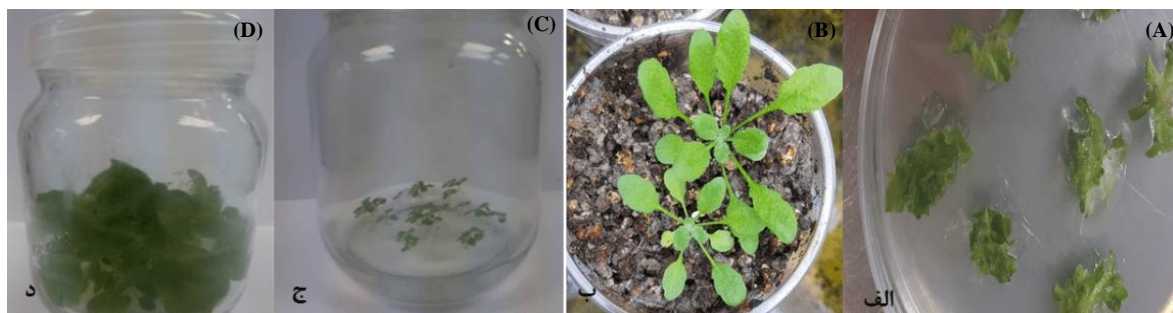
نمونه‌های دارای باند حاصل ژن منتقل شده مثبت تلقی می‌شوند (Shah Hosseiny et al., 2015).

ناقل‌های ژنی به آگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل و پس از تأیید، جهت تراریختگی ریزنمونه‌های بزرگی استفاده شدند. گیاهانی که پس از دو ماه (محیط‌ها هر دو هفته یک‌بار واكشت شدند) در محیط انتخابی کانامایسین زنده ماندند برای تأیید تراریختگی با آزمون PCR توسط آغازگر ژن داخلی *Actin* (۲۰۰ جفت‌باز) و آغازگرهای اختصاصی به‌شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند. انجام آنالیزهای مولکولی به روی گیاهان تراریخت توتون حاوی ناقل‌های ژنی pBin19.W، pBin19.L و pBin19.W.L با استفاده از روش PCR و ظهور قطعاتی به‌طول ۵۷۴ و ۷۰۰ جفت‌باز به‌ترتیب در ناقل‌های تک‌ژنی و هر دو قطعه در ناقل



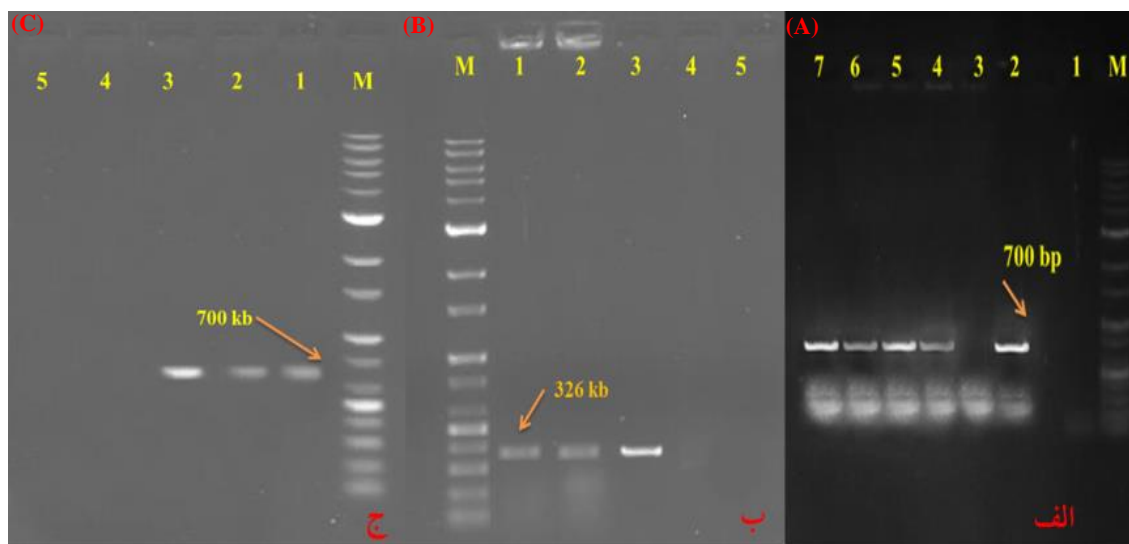
شکل ۵- الف: تأیید حضور ژن pBin19.W در گیاهان تراریخت. ۱، ۲، ۳: رویدادهای تراریخت احتمالی، شاهد: گیاه غیر تراریخت (کنترل منفی)، P: Plasmid (کنترل مثبت)؛ ب: تأیید حضور ژن pBin19.W.L در گیاهان تراریخت با استفاده از PCR و آغازگرهای *LPAAT* و *SBP*؛ ۱: گیاه تراریخت احتمالی، ۲ و ۳: گیاه شاهد (کنترل منفی)، H2o: Master mix without DNA؛ ج: تأیید حضور ژن pBin19.L در گیاهان تراریخت. ۱، ۲، ۳: گیاه تراریخت احتمالی، شاهد: گیاه غیر تراریخت، P: پلاسمید (کنترل مثبت)، H2o: Master mix without DNA؛ د: نتایج حاصل آزمون مولکولی گیاهان تراریخت احتمالی pBin19.W با روش PCR و آغازگر *Vir*. ۱، ۲، ۳: گیاه تراریخت احتمالی، ۴: گیاه شاهد (کنترل منفی)، ۵: H2o (Master mix without DNA)؛ ه: نتایج حاصل آزمون مولکولی گیاهان تراریخت احتمالی pBin19.W.L و pBin19.L با روش PCR و آغازگر *Vir*. ۱: گیاه تراریخت احتمالی (pBin19.W.L)، ۲، ۳ و ۴: گیاه تراریخت احتمالی (pBin19.L)، ۵: H2o (Master mix without DNA)؛ ۶ و ۷: پلاسمید (کنترل مثبت).

Figure 5. A: Confirmation of the presence of pBin19.W gene in transgenic plants. 1, 2, 3: Possible transgenic events, Control: Non-transgenic plant (negative control), Rec: Reconstructed, P: Plasmid (positive control); B: Confirmation of the presence of pBin19.W.L gene in transgenic plants using PCR and *LPAAT* and *SBP* primers. 1. Possible transgenic plant, 2 and 3: control plant (negative control), H2o: Master mix without DNA; C: Confirmation of the presence of pBin19.L gene in transgenic plants. 1, 2, 3: Possible transgenic plant, control: non-transgenic plant, P: plasmid (positive control), H2o: Master mix without DNA, Rec: Reconstructed; D: Results of molecular test of possible transgenic plants pBin19.W by PCR and primer: *Vir* 1,2,3: possible transgenic plant, 4: control plant (negative control), 5: (Master mix without DNA) H2o: negative control, 6: Plasmid (Positive control); E: Results of molecular test of possible transgenic plants pBin19.W.L and pBin19.L by PCR and *Vir* primer. 1: Possible transgenic plant (pBin19.W.L). 2, 3 and 4: possible transgenic plant (pBin19.L). 5: H2o (Master mix without DNA). 6 and 7: Plasmid (Positive control).



شکل ۶- مراحل تشکیل گیاه تراریخت. الف: باززایی از ریزنمونه برگ‌گی توتون در محیط کشت انتخابی؛ ب: کاشت گیاه تراریخت احتمالی در گلدان؛ ج: کاشت بذور گیاه شاهد توتون در محیط کشت انتخابی؛ د: کاشت بذور حاصل از گیاهان تراریخت نسل T0 در محیط کشت انتخابی

Figure 6. Transgenic plant formation. A: Regeneration of tobacco leaf explants in selective medium; B: Planting a possible transgenic plant in a pot; C: Planting tobacco control seeds in selective medium; D: Planting seeds of T₀ generation of transgenic plants in selective medium.



شکل ۷- الکتروفورز محصولات RT-PCR. الف: RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII*؛ ۱: Master mix without DNA؛ ۲: کنترل مثبت (RT-PCR with transgenic DNA)؛ ۳: کنترل منفی (RT-PCR with non-transgenic DNA)؛ ۴: رویداد ۲ از بخش الف شکل ۵؛ ۵: رویداد ۳ از بخش الف شکل ۵؛ ۶: رویداد ۱ از بخش ب شکل ۵؛ ۷: رویداد ۱ از بخش ج شکل ۵؛ ب: RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *WR11*؛ ۱ و ۲: رویداد ۲ و ۳ از بخش الف شکل ۵؛ ۳: کنترل مثبت (RT-PCR with transgenic DNA)؛ ۴: کنترل منفی (RT-PCR with non-transgenic DNA)؛ ۵: Master mix without DNA؛ ج: RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *LPAAT*؛ ۱: رویداد ۱ از بخش ب شکل ۵؛ ۲: رویداد ۱ از بخش ج شکل ۵؛ ۳: کنترل مثبت (RT-PCR with transgenic DNA)؛ ۴: کنترل منفی (RT-PCR with non-transgenic DNA)؛ ۵: Master mix without DNA؛ M: نشانگر مولکولی 1Kb plus

Figure 7. Electrophoresis of RT-PCR products. A: RT-PCR analysis with *nptII* specific primers. 1: H₂O: Master mix without DNA. 2: Positive control (RT-PCR with transgenic DNA). 3: Negative control (RT-PCR with non-transgenic DNA). 4: Event 2 of Section A Figure 5. 5: Event 3 of Section A Figure 5. 6: Event 1 of Section B Figure 5. 7: Event 1 of Section; B: RT-PCR analysis with *WR11* specific primers. 1,2: Event 2 and 3 of Section A Figure 5. 3: Positive control (RT-PCR with transgenic DNA). 4: Negative control (RT-PCR with non-transgenic DNA). 5: H₂O: Master mix without DNA; C: RT-PCR analysis with *LPAAT* specific primers. 1: Event 1 of Section B Figure 5. 2: Event 1 of Section C Figure 5. 3: Positive control (RT-PCR with transgenic DNA). 4: Negative control (RT-PCR with non-transgenic DNA). 5: H₂O: Master mix without DNA. M: Molecular5 marker 1Kb plus

(برای ژن *nptII* هیچ بانندی مشاهده نشد). ارزیابی‌های انجام شده در گیاهان تراریخت توتون حضور ژن‌های *WR11* و *LPAAT* را تأیید نمود. پس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مانع جدی از لحاظ انتقال ناقل حامل ژن‌های مؤثر در مسیر تولید تری‌آسیل‌گلیسرول وجود ندارد. از آنجایی که این تحقیق بخشی از پروژه انتقال ژن به گیاه گلرنگ بود، پس می‌توان به انتقال این ناقل‌ها به گیاه گلرنگ امیدوار بود. همچنین به نظر می‌رسد انتقال توأم دو ژن *WR11* و *LPAAT* استراتژی بهتری باشد زیرا در صورت درج آن‌ها در منطقه مناسبی از ژنوم امکان بیان مشابه هر دو ژن وجود دارد.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به‌خاطر فراهم آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

همچنین به منظور بررسی بیان ژن انتقال یافته در گیاهان تراریخته حاصل، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII*، *WR11* و *LPAAT* و cDNA حاصل از گیاهان تراریخته و شاهد واکنش PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR مطابق شکل ۷ نشان داد که ژن *nptII* حداقل در رویدادهای ۴، ۵، ۶، ۷ و ژن‌های *WR11* و *LPAAT* در رویدادهای ۱ و ۲ بیان می‌شود. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش PCR روی cDNA گیاهان شاهد (غیرتراریخته) با همان شرایط، بانندی نشان نداد.

قابل ذکر است که جهت بررسی عدم آلودگی DNA، واکنش PCR بر روی RNAهای استخراج شده از گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* انجام شد و نتایج الکتروفورز محصول PCR نشان داد که هیچ‌یک از نمونه‌های RNA آلودگی DNA ندارند.

References

- Bourgis, F., Kader, J.C., Barret, P., Renard, M., Robinson, D., Robinson, C., Delseny, M. and Roscoe, T.J. (1999). A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape. *Plant Physiology*, **120**: 913-921.
- Cernac, A. and Benning, C. (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **40**: 575-585.
- Chen, S., Lei, Y., Xu, X., Huang, J., Jiang, H., Wang, J., Cheng, Z., Zhang, J., Song, Y., Liao, B. and Li, Y. (2015). The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene AhLPAT2 increases the lipid content of transgenic arabidopsis seeds. *PLOS ONE* **10**: 1-23.
- Esfahani, K., Motallebi, M. and Zamani, M.R. (2011). Construction of plant expression vectors harboring *chitinase* (chit42) and *glucanase* (bgn13.1) genes from trichoderma species. *Iranian Journal of Biology*, **24**: 880-894 (In Persian).
- Hamid, R., Marashi, H., Tohidfar, M. and Malekzadeh-shafaroudi, S. (2020). Transgenic cotton expressing synthesized antifungal *NaD1* gene confers enhanced resistance to fusarium wilt and verticillium wilt. *Iranian Journal Modern Genetic*, **14**: 297-308 (In Persian).
- Hamid, R., Marashi, H., Tohidfar, M. and Malekzadeh-Shafaroudi, S. (2018). Optimization of regeneration and parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of commercial cultivar of cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Iranian Journal Modern Genetic*, **12(4)**: 597-606. (In Persian).
- Helali, A. (2018). *Investigating the Share of Domestic and Imported Oilseeds in the Supply of Household Oil*. Research Institute for Planning, Agricultural Economics and Rural Development. Research Services Management, Karaj, Iran (In Persian).
- Kim, H., Uk Kim, H. and Chung Suh, M. (2012). Efficiency for increasing seed oil content using WRINKLED1 and DGAT1 under the control of two seed-specific promoters, FAE1 and Napin. *Journal of Plant Biotechnology*, **39**: 242-252.

- Krugel, U. and Kuhn, C.** (2013). Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein-protein interactions. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 1-7.
- Liu, J., Hua, W., Zhan, G., Wei, F., Wang, X., Liu, G. and Wang, H.** (2009). Increasing seed mass and oil content in transgenic Arabidopsis by the overexpression of *WR11*-like gene from Brassica napus. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 9-15.
- Ma, W., Kong, Q., Arondel, V., Kilaru, A., Bates, P.D., Thrower, N.A., Benning, C. and Ohlrogge, J.B.** (2013). *WRINKLED1*, A Ubiquitous Regulator in Oil Accumulating Tissues from Arabidopsis Embryos to Oil Palm Mesocarp. *PLOS ONE*, **8**: 1-13.
- Maisonneuve, S., Jacques Bessoule, J., Lessire, R., Delseny, M. and Roscoe, T.J.** (2010). Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in arabidopsis. *Plant Physiology*, **152**: 670-684.
- McCormac, A.C., Fowler, M.R., Chen, D.F. and Elliott, M.C.** (2001). Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation. *Transgenic Research*, **10**: 143-155.
- Rask, L., Ellerstrom, M., Ezcurrea, I., Stalberg, K. and Wycliffe, P.** (1998). Seed-specific Regulation of the Napin Promoter in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology*, **152**: 595-599.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**: 2105-2110.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. and Ohlrogge, J.B.** (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell*, **14**: 1191-1206.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Savadi, S., Naresh, V., Kumar, V. and Ramachandra, B.S.** (2016). Seed-specific overexpression of arabidopsis *DGAT1* in Indian mustard (*Brassica juncea*) increases seed oil and seed weight. *Botany*, **94**: 177-184.
- Shah Hosseiny, M.H., Ghahri, M., Mahmoudi, M.A. and Moslemi, E.** (2015). Standardization of diagnostic PCR by internal amplification control. *Biological Journal of Microorganism*, **4**: 55-68 (In Persian).
- Snyder, C.L., Yurchenko, O.P., Siloto, R.M.P., Chen, X., Liu, Q., Mietkiewska, E. and Weselake, R.J.** (2009). Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *New Biotechnology*, **26**: 11-16.
- Soni, R. and Murray, J.A.** (1994). Isolation of intact DNA and RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **2**: 474-476.
- Swarnalatha Devi, I., Dinesh kumar, V., Ansari, N.A. and Sivasankar, A.** (2010). Studies on the expression pattern of seed-specific napin promoter (BcNAI) in transgenic (*Nicotiana tabacum* L.) tobacco seeds. *International Journal of Environmental Science and Development*, **1**: 20-23.
- Van Erp, H., Kelly, A.A., Menard, G. and Eastmond, P.J.** (2014). Multigene engineering of triacylglycerol metabolism boosts seed oil content in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **165**: 30-36.
- Wang, Y., Kausch, A.P., Chandlee, J.M., Luo, H., Ruemmele, B.A., Browning, M. and Goldsmith, M.R.** (2003). Co-transfer and expression of *chitinase*, *glucanase*, and *bar* genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Science*, **165**: 497-506.
- Wu, Y., Llewellyn, D.J. and Dennis, E.S.** (2002). A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, **20**: 213-218.
- Zakerghoran, B., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D. and Siahmard, M.** (2014). Cloning, transformation and stable expression of a fusion of human interferon *gamma* and *bar* genes in Tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi). *Plant Genetic Reserches*, **1(1)**: 27-36.

Zhu, H., Xu, X., Xiao, G., Yuan, L. and Li, B. (2007). Enhancing disease resistances of Super Hybrid Rice with four antifungal genes. *Science China Life Sciences*, **50**: 31-39.

Construction of Plant Expression Vectors Harboring *WR11* and *LPAAT* Genes and Its Transformation in Tobacco Plants

Sahar Dashchi¹, Hassan Rahnama^{2,*}, Kianoosh Cheghamirza³ and Katayun Zamani⁴

- 1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
- 2- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
- 4- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: September 14, 2020 – Accepted: February 13, 2021)

Abstract

In oilseed crops, a number of genes involved in the production of triacylglycerol have been identified that changes in their expression have increase the seed oil content. *WR11* and *LPAAT* are key genes in this synthetic pathway that their overexpression can increase the oil content. In this study, the expression vectors carrying *WR11* and *LPAAT* genes were designed and constructed for genetic transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. The synthetic *WR11* and *LPAAT* genes were isolated from the PGH.*WR11* and PGH.*LPAAT* cloning vector using specific restriction enzymes and then cloned in the PGH.O3.2.2 intermediate vector under the control of SBP and Napin promoters and E9 terminator. Finally, the genetic cassettes were transferred to the plant transformation pBin19 binary vector. The resulting constructs were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and were used for genetic transformation of tobacco plants. Molecular analysis of transgenic plants confirmed the presence and activity of *WR11* and *LPAAT* genes. Seeds from transgenic plants were selected on the medium containing kanamycin and developed strong and healthy seedlings.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Oil seed, Tobacco, *WR11*, *LPAAT*

* Corresponding Author, E-mail: hrahnama@abrii.ac.ir