جداسازی ارتولوگ ژن ABF2 در کلزا (*Brassica napus*) و بررسی ویژگیهای مولکولی آن

هومن راضی و فاطمه آتشی شیرازی

به ترتیب استادیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

مقدمه

تنش خشکی از مهم ترین تنش های غیر زنده و بزرگترین چالش برای کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک است که موجب کاهش چشمگیر عملکرد محصولات زراعی می شود. بهبود ژنتیکی گیاهان زراعی در جهت تحمل خشکی یکی از راهبردهای اصلی مبارزه با آثار منفی خشکی است. مهندسی ژنتیک با استفاده از ژن های رمز کننده پروتئین های مؤثر در مسیرهای متابولیکی مرتبط با تنش خشکی، یک استراتژی موثر برای ایجاد گیاهان تراریخت متحمل به خشکی می باشد.

در گیاهان، میزان بیان بسیاری از ژن ها به وسیله متصل شدن پروتئین هایی به نام عوامل رونویسی به مکان هایی با توالی خاص که در نواحی پروموتوری آن ژن ها قرار دارد ، تنظیم می شود. از مهم ترین آن ها می توان به یک خانواده از عوامل رونویسی که به توالی های عملگر سیس ABRE متصل می شوند، اشاره کرد. این عوامل رونویسی AREB یا ABF نامیده می شوند. برخی از اعضای این گروه از عوامل رونویسی همچون AREB1(ABF2) در یک مسیر وابسته به اسید آبسیزیک در پاسخ به تنش های غیرزنده دخالت دارند. افزایش بیان ژن ABF2 در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس موجب افزایش تحمل به تنش خشکی شده است.

کلزا (*Brassica napus*) از مهم ترین گیاهان روغنی است که سطح زیر کشت و تولید آن در جهان در دو دهه اخیر به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. خشکی از موثرترین عوامل محدود کننده سطح کشت و راندمان تولید کلزا می باشد. ارتباط فیلوژنتیکی بسیار نزدیک آرابیدوپسیس با گونه های زراعی جنس براسیکا امکان بهره مندی از اطلاعات تفصیلی آرابیدوپسیس را برای شناسایی و جداسازی ژن های مشابه در ژنوم کلزا فراهم می کند. بنابراین شناسایی و بررسی ژن ABF2 در کلزا به عنوان یک عامل رونویسی کلیدی بالقوه موثر بر تحمل تنش خشکی که تاکنون شناسایی و جداسازی نشده است، می تواند اطلاعات ارزشمندی درباره واکنش کلزا نسبت به خشکی فراهم کند. اهداف این پژوهش به شرح زیر است

۱- جداسازی و توالی یابی ارتولوگ ژن ABF2 در کلزا (BnABF2).

۲- تعیین خصوصیات ساختاری و مولکولی پروتئین BnABF2.

۳- بررسی تغییرات بیان ژن ABF2 در کلزا در شرایط بدون تنش و با تنش آبی.

مواد و روشها

بذور رقم کلزای پاییزه SLM046 در تعدادی گلدان در گلخانه کشت شدند و در مرحله ۳-۴ برگی از گیاهان مورد نظر، نمونه های برگی تهیه شد. پرایمرهای اختصاصی از اگزون اول ژن ABF2 در آرابیدوپسیس (AF093545) طراحی شد. پس از استخراج RNA و سنتز رشته اول cDNA از کلزا، با استفاده از واکنش های زنجیره ای پلیمراز قطعه ای از ناحیه اگزونی ژن *BnABF2* به طور اختصاصی تکثیر شد. سپس همسانه سازی قطعه cDNA مورد نظر و تعیین توالی نوکلئوتیدی آن با استفاده از پرایمرهای همگانی صورت گرفت. به منظور دستیابی به توالی کامل cDNA از روش RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) استفاده شد. برای انجام RACE ´5 سه پرایمر آنتی سنس با هدف انجام واکنشهای زنجیرهای پلیمراز به صورت آشیانه ای و برای انجام RACE ´3 یک پرایمر سنس از ناحیه ای نزدیک به انتهای قطعه cDNA توالی یابی شده طراحی شدند. پس از استخراج RNA و سنتز رشته اول cDNA ، با استفاده از واکنشهای زنجیره ای پلیمراز قطعه های cDNA به طور اختصاصی تکثیر شدند. همسانه سازی قطعه های cDNA مورد نظر و تعیین توالی نوکلئوتیدی آنها انجام شد. همچنین DNA از رقم مورد مطالعه کلزا استخراج شد و با استفاده از چندین جفت پرایمر و چندین مرحله تکثیر و همسانه سازی قطعات مورد نظر، توالی ژنومی BnABF2 بدست آمد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور تعیین شباهت بین توالی حاصل و ژن ABF2 در آرابیدوپسیس و ویژگیهای مولکولی پروتئین ژن ABF2 در کلزا انجام شد.

تغییرات بیان ژن در شرایط بدون تنش و اعمال تنش رطوبتی بررسی گردید. نمونه برداری از برگ گیاه در شرایط بدون تنش و در فاصله های زمانی معین پس از اعمال تنش انجام شد. پس از استخراج RNA و سنتز رشته اول cDNA از هریک از نمونه ها ، تغییرات بیان ژن ABF2 در شرایط اعمال تنش رطوبتی با روش Semi-Quantitative RT-PCR ارزیابی شد. بدین منظور با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی، قطعه cDNA به طول ۴۰۰ bp از ژن BnABF2 تکثیر شد. در این روش از توالی نوکلئوتیدی ژن اکتین (AF111812) در کلزا پرایمرهایی طراحی و به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

نتایج

در این پژوهش برای اولین بار ارتولوگ ژن ABF2 در کلزا (BnABF2) جداسازی و توالی یابی شد. توالی کامل cDNA این ژن دارای ۱۴۵۷ bp است. این توالی با شماره دسترسی HE 616527 در GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) به ثبت رسید. محتمل ترین ORF این ژن در توالی کامل cDNA به طول ۱۱۲۲ bp با کدون آغاز ATG شروع و با کدون خاتمه TGA پایان می یابد. ناحیه ترجمه نشده بالا دستی (5'-UTR) دارای طول ۱۴۰ bp و ناحیه ترجمه نشده پایین دستی (3'-UTR) دارای طول ۱۹۵ bp می باشد. توالی کامل cDNA توالی یابی شده با توالی های موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه بلاست مقایسه شد. قطعه توالی یابی شده بالاترین درصد تشابه را با ژن ABF2 در آرابیدوپسیس (AtABF2) نشان

داد که دلیل بر صحت توالی یابی و جداسازی صورت گرفته می باشد. میزان شباهت توالی کامل cDNA و ORF ژن BnABF2 با ناحیه های متناظر در ژن AtABF2 به ترتیب ۷۰٪ و ۷۷/۳٪ می باشد.

توالی ژنومی BnABF2 به طول ۲۰۳۵bp بدست اورده شد. از مقایسه قطعات توالی یابی شده DNA ژنومی و cDNA ناحیه های اگزونی و اینترونی ژن مورد مطالعه تعیین شدند. این ژن دارای چهار اگزون به ترتیب دارای طول ۹۵۲ bp، ۷۲ bp، ۳۰ bp و ۷۱ bp می باشد. نتیجه حاصل از مقایسه این داده ها با اطلاعات موجود از ژن AtABF2 نشان داد که هر دو دارای ساختار ژنی مشابهی می باشند. در ناحیه های کدکننده این دو ژن تشابه بیشتری دیده می شود اما در ناحیه های اینترونی و UTRها تفاوت وجود دارد.

ژن ABF2 پروتئینی به طول ۳۷۳ اسید آمینه و وزن ملکولی ۴۰ کیلو دالتون با میزان شباهت ۸۱/۳٪ با توالی پروتئینی AtABF2 را رمز می‌کند. پروتئین BnABF2 یک پروتئین آبدوست دارای یک دامنه bZIP از اسید آمینه شماره ۲۹۹ تا ۳۱۴ می باشد. ساختمان ثانویه پروتئین BnABF2 از مارپیچ آلفا (۳۴/۵۸٪) و پیچ های تصادفی (۵۶/۸۴٪) که با صفحات بتا (۰/۸٪) و رشته خطی (۷/۷۷٪) در ارتباطند ساخته می شود. نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی نشان می دهد که پروتئین های BnABF2 و AtABF2 با هم در یک گروه قرار می گیرند و شباهت زیادی بین این دو وجود دارد. این نتیجه نشان داد که آرابیدوپسیس و گونه های براسیکا از لحاظ فیلوژنتیکی با هم خویشاوند هستند و توالی های مشابه بین ژن های ارتولوگ آنها وجود دارد.

مقایسه بیان ژن ABF2 در شرایط بدون تنش و تنش رطوبتی نشان داد که ژن ABF2 در کلزا در شرایط بدون تنش، بیان ضعیف و در شرایط اعمال تنش، افزایش بیان دارد. بررسی تغییرات بیان ژن ABF2 با روش Semi- Quantitative RT- PCR در شرایط اعمال تنش رطوبتی نشان داد بیشترین میزان بیان در ۴۸ ساعت تنش رطوبتی، تقریبا ۴ برابر میزان بیان در شرایط بدون تنش می‌باشد. نتایج بررسی بیان ژن BnABF2 می تواند دلیلی بر نقش احتمالی این ژن القا شونده به عنوان یک ژن مؤثر در تحمل تنش خشکی در کلزا باشد.

کلمات کلیدی: تنش خشکی، ژن ABF2 و کل