

## بررسی میزان فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در بافت‌های مختلف گیاهان تنباکوی تراریخت

علیرضا عباسی<sup>۱</sup>، فریبا ابویی مهریزی<sup>۲\*</sup>، لارس فول<sup>۳</sup> و اوو سونوالد<sup>۴</sup>  
۱، ۲، استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران  
۳، ۴، استادن، دانشگاه ارلانگن، نورنبرگ، آلمان  
(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۱ - تاریخ تصویب: ۸۹/۶/۳۱)

### چکیده

هر ژن از سه بخش اصلی شامل پیشبرنده، بدنه اصلی ژن و خاتمه‌دهنده تشکیل شده است که بدون پیشبرنده امکان بیان ژن وجود ندارد. عموماً پیشبرنده برای هر ژن اختصاصی می‌باشد و منجر به تنظیم محصول نهایی ژن می‌گردد. یکی از عمومی‌ترین پیشبرنده‌هایی که توسط مهندسين ژنتیک گیاهی جهت بیان ژن در گیاهان استفاده می‌گردد پیشبرنده *CaMV35S* می‌باشد. اگرچه فرض کلی بر این است که *CaMV35S* یک پیشبرنده دائمی می‌باشد، اما بعضی گزارش‌ها مبین این موضوع است که این پیشبرنده در همه بافت‌ها و در همه انواع سلول‌ها بیان نمی‌شود. به علاوه اطلاعات قابل دسترس درباره نحوه بیان این پیشبرنده در همه سلول‌های ممکن و بافت‌های مختلف و در مراحل اولیه نمو ناقص می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های اشاره شده در فوق در این تحقیق جزئیاتی از فعالیت این پیشبرنده در بافت‌های مختلف گیاه تنباکو مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی فعالیت این پیشبرنده از گیاهان تراریخته تنباکویی که یکی از آنزیم‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز ویتامین E آن به کمک روش RNAi و تحت پیشبرنده *CaMV35S* غیرفعال گردیده بود استفاده شد. خاموشی ژن مسئول آنزیم ذکر شده منجر به کاهش محتوی ویتامین E در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد می‌گردد. به همین خاطر محتوی ویتامین E بافت‌های مختلف از جمله ریشه، برگ، قسمت‌های مختلف گل، بذرها، بالغ و غیربالغ محاسبه گردید و میزان درصد کاهش ویتامین E نسبت به شاهد به عنوان فعالیت پیشبرنده در نظر گرفته شد. نتیجه بررسی‌ها نشان داد که این پیشبرنده در بافت‌های برگ، کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی بیان بسیار بالا در بافت‌های ریشه، در بذور نابالغ بیان متوسط و در بذور بالغ بیان بسیار پایینی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پیشبرنده *CaMV35S*، RNAi، بیان ژن، بذور بالغ، گیاه تنباکو، گیاه تراریخته.

### مقدمه

سوئیچ‌های اختصاصی تشکیل یافته از مواد ژنتیکی DNA، پیشبرنده (Promoter) نام دارند. این قطعات ژنتیکی در بالا دست ژن قرار می‌گیرند و دارای

موجودات زنده جهت بیان ژن‌های خود به سوئیچ‌های اختصاصی همان ژن احتیاج دارند که این

هم ممکن است به دلیل تفاوت در کیفیت و کمیت فاکتورهای تنظیم‌کننده باشد. هر چند که پیشبرنده *CaMV35S* به عنوان یک پیشبرنده عمومی و دائمی جهت انجام عملیات انتقال ژن و بیان ژن خارجی در سیستم‌های گیاهی در نظر گرفته می‌شود (Odell et al., 1985). با این حال بعضی گزارش‌ها وجود دارد که عنوان می‌کنند. این پیشبرنده در همه سلول‌ها و همه انواع بافت‌های گیاهی فعال نمی‌باشد (Williamson et al., 1989; Yang et al., 1990; Terada et al., 1990; Benfey et al., 1989).

غالب مطالعاتی که جهت تعیین فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* صورت گرفته است از بررسی‌های هیستوشیمیایی ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز حاصل شده است (Yang et al., 1990; Benfey et al., 1989; Benfey et al., 1990a; Batraw et al., 1990; Jefferson et al., 1987). علاوه بر مطالعات هیستوشیمیایی، Sunilkumar et al. (2002) پروتئین فلورسنت سبز را با پیشبرنده *CaMV35S* الحاق کرده و به گیاه پنبه منتقل نمودند و سپس به بررسی فعالیت این پیشبرنده در بافت‌های مختلف پرداختند.

در مسیر بیوسنتز ویتانین E، آنزیم‌های مختلفی وجود دارند که توسط ژن‌های مختلف رمز می‌گردند، از جمله آنزیم‌های مؤثر می‌توان به هموجنتیسیت فیتیل ترانسفراز (Homogentisate Phytol Transferase (HPT))، توکوفرول سیکلاز (Tocopherol Cyclase (TC)) و گاما توکوفرول متیل ترانسفراز ( $\gamma$ -Tocopherol Methyl Transferase ( $\gamma$ -TMT)) اشاره کرد که به ترتیب منجر به تولید متیل فیتیل بنزوکوبونون (2-Methyl-1,4-Benzo-Quinone (MPBQ))، گاما توکوفرول ( $\gamma$ -Tocopherol) و دلتا توکوفرول ( $\delta$ -Tocopherol) در نهایت آلفا و بتا توکوفرول می‌گردد. با وجود مزیت‌هایی که هر کدام از دو سیستم ذکر شده جهت بررسی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* دارند در این تحقیق از گیاهانی که در آنها یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز ویتامین E توسط مکانیسم RNAi تحت پیشبرنده *CaMV35S* خاموش شده است استفاده گردید. اگر این خاموشی به طور کامل صورت گیرد هیچ ویتامین E در گیاه وجود نخواهد داشت. با بررسی میزان ویتامین E باقیمانده و

قسمت‌هایی هستند که به عنوان حسگر عمل می‌کنند تا به علائمی که از ژن‌های دیگر و یا از محیط صادر می‌شوند پاسخ دهند. این علائم به ژن القاء می‌نمایند که چه موقع، کجا، چه مقدار و برای چه مدتی روشن باشد و در غیر این صورت خاموش بماند. بنابراین بر طبق نیاز و در مرحله نمو خاص اجازه تنظیم محصول نهایی که پروتئین، آنزیم و یا هورمون می‌باشد، صادر می‌گردد. پیشبرنده‌ها بر اساس نوع و یا درجه کنترل بیان ژن به انواع دائمی و القائی تقسیم می‌شوند. پیشبرنده‌های دائمی مستقل از فاکتورهای محیطی و نمو در همه بافت‌ها بیان می‌شوند و از آنجا که مشروط به فاکتورهای داخلی نیستند، معمولاً این پیشبرنده‌ها در بین تمامی گونه‌ها فعال می‌باشند. در صورتی که پیشبرنده‌های القایی به فاکتورها و ترکیباتی که حاصل شرایط محیطی و محرک‌های خارجی قابل کنترل مصنوعی هستند بستگی دارد. از فاکتورهای فیزیکی مؤثر در این نوع پیشبرنده‌ها، نور، گرما، زخم و از فاکتورهای شیمیایی مؤثر آنتی‌بیوتیک‌ها، الکل و علف‌کش‌ها را می‌توان نام برد (Veylder et al., 1997; Peebles et al., 2007).

Odell et al. (1980) پیشبرنده‌ای را جدا کردند که مسئول رونویسی ژنوم ویروس موزائیک گل کلم بود که این ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته است و بسیاری از گیاهان خانواده کلمی‌ها و به طور خاص براسیکاها را آلوده می‌کند. این پیشبرنده که *CaMV35S* نام گرفت پیشبرنده‌ای همیشه روشن و بنابراین دائمی و قوی می‌باشد و گیاه قادر به خاموش کردن آن نمی‌باشد. ژن‌هایی که جهت تراریخت کردن گیاهان استفاده می‌شوند معمولاً موزائیک‌های ساختگی از DNA می‌باشند که مشتمل بر یک پیشبرنده شناخته شده که در گیاه هدف می‌تواند فعال باشد به همراه اطلاعاتی برای پروتئین خاص و در نهایت یک توالی تنظیم‌کننده در پایان می‌باشد.

مهندسی ژنتیک عموماً از پیشبرنده *CaMV35S* به عنوان یک پیشبرنده قوی و دائمی استفاده می‌کند که استفاده از آن منجر به سطوح بالای بیان ژن در غالب سلول‌ها و بافت‌های گیاهان دو لپه در مراحل مختلف نمو گیاه می‌شوند. به هر حال این پیشبرنده در تک‌لپه‌ای‌ها بخصوص غلات اثرات کمتری دارد که آن

شرایط مشابه قبل تیمار گردید و پس از سانتریفیوژ محلول رویی برداشته شد و به محلول قبل اضافه گردید و جهت اندازه‌گیری محتوی ویتامین E مورد استفاده قرار گرفت (Abbasi et al., 2007).

#### اندازه‌گیری میزان توکوفرول

میزان توکوفرول موجود در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC و ستون C18 اندازه‌گیری شد. سری‌های مختلف غلظت از استانداردهای توکوفرول‌های مختلف تهیه شد و پس از تهیه منحنی استاندارد و مقایسه سطوح زیر منحنی نمونه‌ها با سطوح زیر منحنی استانداردها میزان توکوفرول در نمونه‌های مربوطه محاسبه گردید (Abbasi et al., 2007).

#### نتایج و بحث

##### ارزیابی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در برگ

برگ‌های جوان گیاهان شاهد و تراریخته HPT:RNAi تنباکو که به مدت ۵ هفته در گلخانه در حال رشد بودند جهت ارزیابی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در برگ‌های سبز تنباکو مورد استفاده قرار گرفتند و سپس از برگ‌های نمونه‌گیری شده توکوفرول استخراج گردید. همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود در گیاهان شاهد میزان توکوفرول کل ۴۰/۳ نانوگرم در سانتی‌مترمربع سطح برگ می‌باشد در صورتی که این میزان در گیاهان تراریخته به ۶/۷۵ نانوگرم در سانتی‌مترمربع سطح برگ می‌رسد که کاهش معنی‌داری در حدود ۸۳ درصد در آنها مشاهده می‌گردد.

Benfey et al. و Yang & Christou (1990) بیان این پیشبرنده را در برگ‌های گیاه تنباکو (1990a) و سویا گزارش نمودند و همچنین Yang & Christou (1990) فعالیت بالای این پیشبرنده را در سلول‌های محافظ سویا با استفاده از آنالیز GUS نشان دادند و سپس Sunilkumar & Rathore (2001) بیان این پروموتور را در همه سلول‌های برگ گیاه پنبه گزارش کردند. نتایج حاصل از این تحقیق موافق با تحقیقات ذکر شده در بالا بیانگر فعالیت این پیشبرنده در برگ‌های گیاهان تنباکوی تراریخت می‌باشد و ضمناً کاهش ۸۳ درصدی میزان توکوفرول کل در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد نمایانگر فعالیت بسیار زیاد

مقایسه آن با گیاه شاهد می‌توان در بافت‌های مختلف میزان کارایی خاموشی و به دنبال آن، میزان فعالیت پیشبرنده را برآورد نمود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و شرایط رشد

بذور گیاهان تنباکوی وحشی واریته *Nicotiana tobaccum cv. samsun NN* و گیاهان تراریخته HPT:RNAi ضد عفونی گردیدند و در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و تحت دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی (شدت نور  $50 \mu E m^2 s^{-1}$  و دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی ۵۰ درصد نگهداری شدند. با اتمام مرحله جوانه‌زنی بعد از آنکه گیاهچه‌ها به مرحله شش برگی رسیدند به خاک منتقل گردیدند و تحت شرایط ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و دمای ۲۱-۲۵ درجه قرار گرفتند. در این مرحله از برگ‌ها نمونه‌گیری شد و نمونه‌های حاصل در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این گیاهان در حال رشد سپس در شرایط فوق تا رسیدن به مرحله گلدهی و تولید بذر در گلخانه حفظ گردیدند. از این گیاهان در مرحله گلدهی از قسمت‌های مختلف گل، شامل کاسبرگ، گلبرگ، تخمدان و پرچم نمونه‌گیری شد و بعد از گرده‌افشانی و تشکیل بذر در مراحل مختلف تشکیل بذر نمونه‌گیری انجام شد و در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شدند تا جهت اندازه‌گیری‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

##### استخراج توکوفرول

جهت یکنواختی نمونه‌گیری در مورد برگ، به کمک استوانه‌های با قطر یک سانتی‌متر از برگ‌های مشابه (برگ شماره ۵ از پایین) نمونه‌گیری شد و در مورد قسمت‌هایی از گیاه مثل بذر و اجزاء گل که امکان استفاده از این روش وجود نداشت نمونه‌گیری وزنی صورت گرفت. به نمونه‌های حاصل بسته به میزان بافت مورد استفاده ۶ تا ۸ برابر حجم نمونه، متانول اضافه گردید و هموژنیزه گردید و سپس نمونه یکنواخت شده در دمای ۳۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شد و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. محلول روئی برداشته شد و مجدداً دو تا چهار حجم حجم متانول به رسوب باقیمانده اضافه شد و در

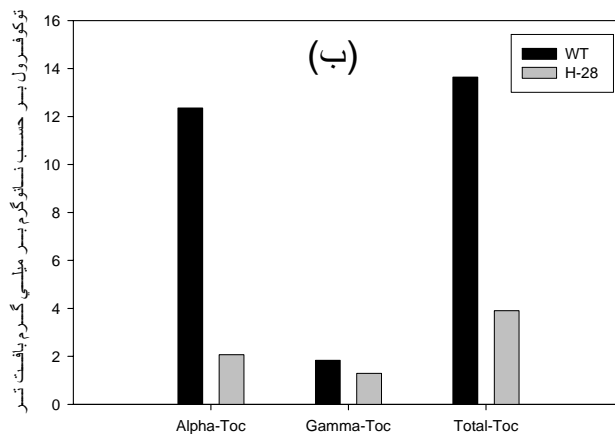
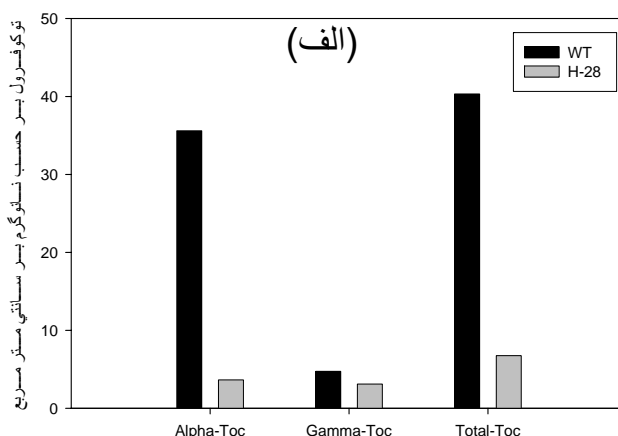
میلی‌گرم وزن تر ریشه می‌باشد در صورتی که میزان توکوفرول در ریشه گیاهان تراریخته ۴/۱ نانوگرم در میلی‌گرم وزن تر ریشه محاسبه گردید.

Batraw & Hall و همچنین Benfey et al. (1989) و همچنین (1990) فعالیت ژن GUS تحت پیشبرنده *CaMV35S* را در سلول‌های نوک ریشه گزارش کردند و سپس Sunilkumar et al. (2002) بروز فلورسانس حاصل از تراریختگی گیاه پنبه با پروتئین فلورسانس سبز را در سلول‌های اپیدرم ریشه و همچنین فعالیت *CaMV35S* را در تمام مراحل رشد گیاه در ریشه گزارش نمودند. نتایج حاصل از این تحقیق نیز بیانگر این واقعیت است که میزان توکوفرول دستخوش کاهش نسبتاً بالایی در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد می‌گردد که این کاهش در میزان متابولیت نهایی بیانگر فعالیت ۵۶ درصدی این پیشبرنده در بافت ریشه می‌باشد.

پیشبرنده *CaMV35S* در برگ‌های گیاه تنباکوی تراریخت می‌باشد.

#### ارزیابی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در ریشه

به منظور ارزیابی فعالیت و بیان ژن تحت کنترل پیشبرنده *CaMV35S* در ریشه‌های گیاهان تنباکوی تراریخت از ریشه‌های در حال رشد گیاهان شاهد و تراریخته حاوی سازه ژنی HPT:RNAi تنباکو که در گلخانه به مدت ۵ هفته در حال رشد بودند نمونه‌گیری صورت گرفت. توکوفرول بافت ریشه گیاهان شاهد و تراریخت به روش ارائه شده در مواد و روش‌ها استخراج و سپس میزان توکوفرول نمونه‌ها محاسبه گردید. نتایج محاسبه میزان توکوفرول در ریشه گیاهان شاهد و تراریخته در شکل ۱-ب ارائه گردیده است. همان طور که در شکل ۱-ب نشان داده شده است میزان توکوفرول کل در ریشه گیاهان شاهد تنباکو ۱۳/۷ نانوگرم در



شکل ۱- میزان توکوفرول استخراج شده از بافت‌های رویشی برگ‌های گیاهان شاهد و تراریخته تنباکو (الف) توکوفرول استخراج شده از ریشه، (ب) توکوفرول استخراج شده از ریشه

مقایسه این دو میزان نشان می‌دهد که ترازیخت شدن گیاه منجر به کاهش ۸۷ درصدی این متابولیت در گیاهان ترازیخت نسبت به گیاهان شاهد می‌گردد که موید فعالیت بسیار زیاد این پیشبرنده در بافت پرچم می‌باشد (شکل ۲-د).

به منظور بررسی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در بافت مادگی گل نیز از کلاله‌های گیاهان شاهد و ترازیخته تنباکو نمونه‌گیری شد و توکوفرول از بافت مربوطه استخراج گردید. میزان توکوفرول موجود در گیاهان شاهد و ترازیخته محاسبه و مقایسه گردید. همان طور که در شکل ۲-ج نشان داده شده است فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در کلاله گیاهان ترازیخت منجر به کاهش ۷۶ درصدی میزان متابولیت مورد نظر نسبت به گیاهان شاهد گردیده است که این کاهش شدید میزان متابولیت نشانه خاموشی ژن و فعالیت بسیار زیاد این پیشبرنده در این بافت می‌باشد. ضمناً برای بررسی بیشتر فعالیت این پیشبرنده از کل بافت مادگی (مجموع تخمدان، کلاله و استیل) متابولیت استخراج گردید که منجر به کاهش تقریباً برابر با بافت مادگی گردید (داده نشان داده نشده است).

در مطالعات انجام شده توسط Benfey et al. (1989) بیان پیشبرنده *CaMV35S* در کاسبرگ، گلبرگ، بساک و گرده اندام گل گیاه اطلسی، در مطالعات Benfey & Chua (1989) بیان این پیشبرنده در کاسبرگ و گلبرگ گیاه تنباکو، در مطالعات Wilkinson et al. (1997) بیان آن در کاسبرگ، گلبرگ و میله پرچم گیاه آراییدوپسیس، در مطالعات Assad-Garcia et al. (1992)، بیان این پیشبرنده در خامه، بساک و تخمدان گیاه توماتیلو و در مطالعات Sunilkumar & Rathore (2001)، بیان پیشبرنده *CaMV35S* در اجزاء مختلف اندام گل گیاه پنبه گزارش گردید.

#### ارزیابی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در بذر

همانطور که قبلاً ذکر شد یک پیشبرنده ساختاری دائمی واقعی باید در تمام بافت‌ها از مراحل اولیه نمو گیاه مثل زیگوت تا انتهای مراحل نمو بیان گردد. اکثر مقالات ارائه شده در رابطه با ایجاد گیاهان ترازیخته اشاره دارند که پیشبرنده *CaMV35S* در اندام بذر هیچ

#### ارزیابی فعالیت پیشبرنده *CaMV35S* در اندام زایشی

گزارش‌های جامعی در رابطه با بیان پیشبرنده *CaMV35S* در قسمت‌های مختلف گل وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق میزان بیان پیشبرنده *CaMV35S* در قسمت‌های مختلف اندام گل در گیاه تنباکوی ترازیخت نیز از مواردی بود که مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام این قسمت از تحقیق جهت بررسی میزان فعالیت پیشبرنده در اجزا مختلف اندام گل در گیاه تنباکو به طور مثال از کاسبرگ، گلبرگ پرچم و مادگی نمونه‌گیری شد و توکوفرول از اجزای نام برده استخراج گردید و سپس میزان توکوفرول نمونه‌های حاصل محاسبه گردید که نتایج حاصل به شرح زیر می‌باشد.

استخراج توکوفرول از کاسبرگ و محاسبه میزان نهایی توکوفرول در نمونه حاصل از کاسبرگ نشان داد که گیاهان شاهد دارای ۱۸/۵ نانوگرم توکوفرول بر سانتی‌مترمربع سطح برگ می‌باشند در صورتی که این میزان در کاسبرگ گیاهان ترازیخته HPT:RNAi به ۶/۲۵ نانوگرم توکوفرول بر سانتی‌مترمربع سطح کاسبرگ می‌رسد. مقایسه میزان توکوفرول کل در کاسبرگ‌های گیاه شاهد نسبت به گیاه ترازیخته موید کاهش ۶۶ درصدی این متابولیت در گیاهان ترازیخته است که نشان می‌دهد فعالیت این پیشبرنده در کاسبرگ گل‌های گیاه تنباکوی ترازیخت نسبتاً زیاد می‌باشد (شکل ۲-الف).

همانطور که در شکل ۲-ب نشان داده شده است استخراج و محاسبه میزان توکوفرول در گلبرگ گیاهان شاهد و ترازیخته نشان می‌دهد که میزان این متابولیت در گیاهان ترازیخته نسبت به شاهد با کاهش ۸۷ درصدی مواجه گردیده است که این میزان کاهش دلیل بر فعالیت بسیار زیاد این پیشبرنده در این جز از اندام گل در گیاه تنباکوی ترازیخت می‌باشد.

جهت بررسی میزان فعالیت این پیشبرنده در بافت پرچم گیاه تنباکوی ترازیخت بساک‌های گیاهان شاهد و ترازیخته جدا گردید و میزان توکوفرول در این جز از اندام گل نیز محاسبه شد. محاسبه میزان توکوفرول در بافت پرچم نشان داد که گیاه شاهد دارای ۹۰ نانوگرم توکوفرول در میلی‌گرم بافت تر و گیاهان ترازیخته دارای ۱۱ نانوگرم توکوفرول در میلی‌گرم بافت تر می‌باشد که

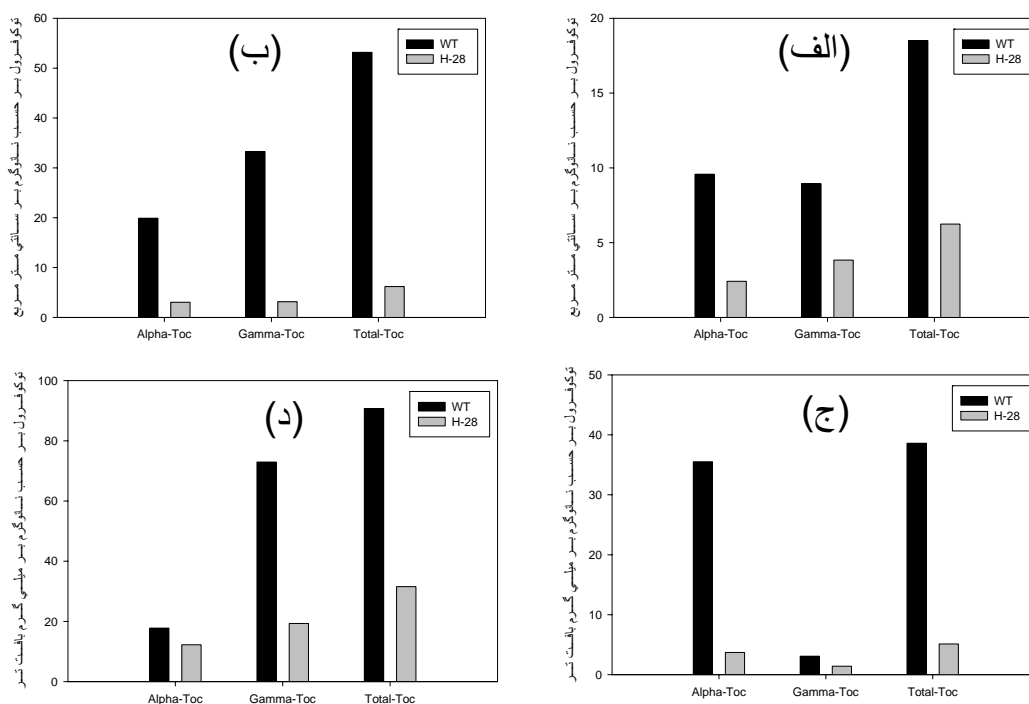
پایین تر می‌باشد شکل (شکل ۳-الف).

سپس از بذور نابالغ و بالغ توکوفرول استخراج گردید که مقایسه میزان توکوفرول در بذور رسیده گیاهان غیرتراریخت و تراریخت نمایانگر کاهش بسیار کم این متابولیت در گیاهان شاهد و تراریخت می‌باشد. همان طور که در شکل ۳-ب مشخص گردیده است میزان توکوفرول در بذور رسیده گیاهان تراریخته ۱۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش نشان می‌دهد که این میزان کاهش بیانگر فعالیت ۱۷ درصدی این پیشبرنده در بذور رسیده گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد می‌باشد.

در مطالعات Sunilkumar & Rathore (2001) اولین نشانه‌های قابل مشاهده بیان پیشبرنده *CaMV35S* در بذر ۱۳ روز پس از گرده‌افشانی ذکر شده است اما در این تحقیق نتیجه بررسی میزان توکوفرول در مادگی ۵ تا ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی نشان داد که در گیاهان تراریخته میزان توکوفرول در حدود ۴۱ درصد نسبت به گیاهان غیر تراریخت کاهش یافته است که این میزان کاهش به معنی فعالیت قابل توجه این پیشبرنده در این

بیانی ندارند. جهت بررسی و تأیید یا رد این موضوع از بافتی که در آن بذر تشکیل می‌گردد نمونه‌گیری شد به این صورت که ابتدا همان طور که در قسمت اجزای گل شرح داده شد از گل نارس قبل از گرده‌افشانی و سپس از مادگی به مدت ۵ تا ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی، بذور نارس و در نهایت بذور رسیده نمونه‌برداری شد و از هر کدام از نمونه‌ها به طور جدا گانه توکوفرول استخراج گردید و سپس میزان توکوفرول برای هر مرحله محاسبه گردید.

همانطور که در شکل ۲-ج نشان داده شده است در مادگی و قبل از گرده‌افشانی کاهش ۷۶ درصدی از متابولیت در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد مشاهده گردید و نتیجه بررسی‌ها بر روی مادگی گیاهان شاهد و تراریخت ۵ تا ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی نشان داد که در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخت میزان توکوفرول در حدود ۴۱ درصد کاهش یافته است که این میزان کاهش به معنی فعالیت قابل توجه پیشبرنده *CaMV35S* در این مرحله می‌باشد هرچند که این کاهش نسبت به سایر قسمت‌های ذکر شده در قبل



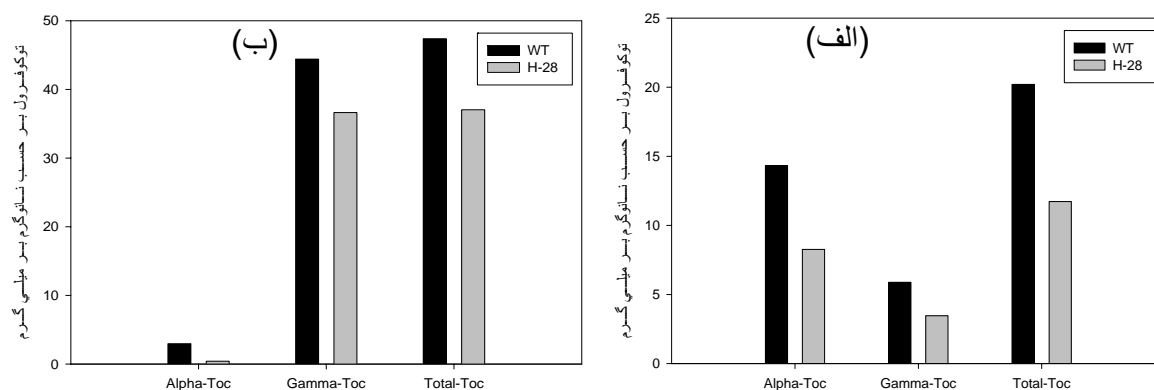
شکل ۲- میزان توکوفرول استخراج شده از اجزاء مختلف گل در گیاهان شاهد و تراریخته تنباکو

(الف) توکوفرول استخراج شده از کاسبرگ، (ب) توکوفرول استخراج شده از گلبرگ، (ج) توکوفرول استخراج شده از بافت کلاله مادگی،

(د) توکوفرول استخراج شده از بافت پرچم گیاهان شاهد و تراریخته تنباکو

مراحل رشدی گیاه و در تمامی بافت‌ها بیان می‌گردد اما بیان آن در بافت‌های مختلف متفاوت است به گونه‌ای که این پیشبرنده طبق نتایج این تحقیق در بافت‌های برگ، کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی بیان بسیار بالایی را نشان می‌دهد و در بافت‌های ریشه و بذور نابالغ بیان متوسط این پیشبرنده مشاهده می‌گردد و در مقابل در بذور بالغ هر چند بیان بسیار پایین است اما میزان خاموشی ۱۷ درصدی بیانگر بیان غیرقابل چشم‌پوشی در این بافت می‌باشد.

مرحله می‌باشد هرچند که این کاهش نسبت به سایر قسمت‌ها پایین‌تر می‌باشد. دلیل این تفاوت ممکن است به دلیل بیان کم پیشبرنده و در نهایت بیان پایین ژن و عدم توانایی در تعیین میزان کم نور فلورسانس باشد که این مشکل در این تحقیق با بررسی میزان توکوفرول با استفاده از دستگاه HPLC مرتفع گردید. در مجموع نتایج این تحقیق همانند سایر نتایج ارایه شده در این موضوع مؤید این واقعیت است که پیشبرنده *CaMV35S* یک پیشبرنده دائمی است که در تمامی



شکل ۳- میزان توکوفرول استخراج شده از بذور گیاهان شاهد و تراریخته تنباکو

(الف) توکوفرول استخراج شده از بذور نابالغ، (ب) توکوفرول استخراج شده از از بذور بالغ گیاهان شاهد و تراریخته تنباکو

## REFERENCES

- Abbasi, A. R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U. & Voll, L. M. (2007). Specific roles of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*, 143, 720–738.
- Assad-Garcia, N., Ochoa-Alejo, N., Garcia-Hernandez, E., Herrera- Estrella, L. & Simpson, J. (1992). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomatillo (*Physalis ixocarpa*) and tissue specific and developmental expression of the CaMV 35S promoter in transgenic tomatillo plants. *Plant Cell Rep*, 11, 558–562.
- Battraw, M. J. & Hall, T. C. (1990). Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- $\beta$ -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol*, 15, 527–538.
- Benfey, P. N. & Chua, N.-H. (1989). Regulated genes in transgenic plants. *Science*, 244, 174–181.
- Benfey, P. N., Ren, L. & Chua, N.-H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J*, 8, 2195–2202.
- Benfey, P. N., Ren, L. & Chua, N.-H. (1990a). Tissue specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J*, 9, 1677–1684.
- Benfey, P. N., Ren, L. & Chua, N.-H. (1990b). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J*, 9, 1685–1696.
- James, V. A., Neibaur, I. & Altpeter, F. (2008). Stress inducible expression of the *DREB1A* transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge) enhances abiotic stress tolerance. *Transgenic Res*, 17, 93–104.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6, 3901–3907.
- Odell, J. T., Nagy, F. & Chua, N.-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810–812.
- Peebles, C. A., Gibson, S. I., Shanks, J. V. & San, K. Y. (2007). Characterization of an ethanol-inducible promoter system in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Prog*, 23, 1258–1260.

12. Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C. & Rathore, K. (2002). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology*, 50, 463–474.
13. Sunilkumar, G. & Rathore, K. S. (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Mol Breed*, 8, 37–52.
14. Terada, R. & Shimamoto, K. (1990). Expression of CaMV 35SGUS gene in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet*, 220, 389–392.
15. Veylder, L. De, Van Montagu, M. & Inzé, D. (1997). Herbicide safener-inducible gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 38, 568–577.
16. Wilkinson, J. E., Twell, D. & Lindsey, K. (1997). Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot*, 48, 265–275.
17. Williamson, J. D., Hirsch-Wyncott, M. E., Larkins, B. A. & Gelvin, S. B. (1989). Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 90, 1570–1576.
18. Yang, N.-S. & Christou, P. (1990). Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Dev Genet*, 11, 289–293.