ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۶۴- ۳۵۷

انتقال عامل رو نویسی *WDREB2* به گندم با استفاده از آگروباکتریوم جهت بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی

Agrobacterium-mediated transformation of *WDREB2* transcription factor to wheat for improvement of tolerance to abiotic stresses

عادل یاری زاده[۱]، علی نیازی*[۱]، سیما سازگاری[۱]

۱- به ترتیب کارشناسی‌ارشد، دانشیار و کارشناسی‌ارشد، دانشگاه شیراز

Yarizade A[1], Niazi A[*1], Sazegari S[1]

1. MSc Student, Associate Professor, MSc Student, Shiraz University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazi@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

چکیده

تنش‌های غیرزیستی از قبیل خشکی، سرما، شوری اثرات مضری بر رشد و عملکرد گیاهان دارند و تحمل به آن‌ها از جمله اهداف اصلی اصلاح کنندگان گیاهان است. عوامل رونویسی DREB عضوی از خانواده AP2/ERF هستند. بررسی ناحیه راه اندازی ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش‌های آبی و دماهای پایین و غیر وابسته بهABA منجر به کشف یک ناحیه ۹ جفت بازی با توالی TACCGACAT شد که آن را DRE نامیده‌اند. پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های *DREB* به این توالی متصل و منجر به تنظیم بیان ژن‌ها می شوند. بیان ژن *WDREB2* یا *TaDREB* تحت تاثیر تنش خشکی، سرما، اسیدآبسیزیک و شوری القا می‌شود. با استفاده از روش انتقال ژن مبتنی بر آگروباکتریوم، این ژن به گندم انتقال داده شد که آنالیز مولکولی با استفاده از PCR تراریخت بودن ۲۰ گیاه از ۴۰ گیاه بدست آمده را تایید کرد. همچنین بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR نشان داد که بیشتر گیاهان تراریخت به میزان ۲ تا ۱۹ برابر نسبت به گیاه غیرتراریخت افزایش بیان داشته‌اند. این افزایش بیان که کارایی راه انداز 35S را در گیاهان تک‌لپه‌ای ثابت می‌کند، می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن‌های پایین‌دست و بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی شود.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن
تنش‌های غیرزیستی
عامل رونویسی WDREB2
گندم
Real time PCR

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

فرآورده‌های ژن‌های القاپذیر به وسیله تنش در گیاهان را می‌توان به دو گروه تقسیم‌بندی کرد: گروه اول پروتئین‌هایی که در تحمل به تنش‌های غیرزیستی فعالیت می‌کنند مانند چاپرون‌ها، اسموتین، پروتئین‌های ضد انجماد، آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز اسمولیت‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و پروتئازهای متعدد. گروه دوم پروتئین‌های تنظیمی که در تنظیم بیان ژن فعالیت می‌کنند مانند عوامل رونویسی، پروتئین کینازها و فسفاتازها می‌باشند. بررسی بیان ژن‌های القاپذیر به وسیله تنش، حداقل پنج مسیر تنظیمی متفاوت برای بیان ژن در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و سرما را پیش‌بینی کرده است (Yamaguchi- Shinazaki and Shinozaki 2005). سه مسیر تنظیمی وابسته به اسید آبسیزیک و دو مسیر تنظیمی مستقل از اسید آبسیزیک وجود دارند. مسیرهای وابسته به اسید آبسیزیک شامل ژن‌های *ABF / AREB* ، *MYB* و *MYC*، *NAC* و مسیرهای مستقل از اسید آبسیزیک شامل خانواده عوامل رونویسی AP2/ERF است که دارای زیر خانواده (AP2) APETALA2، ERF، RAV و DREB می‌باشد (Uno et al. 2000; Yamaguchi-Shinozaki and Nakashima 2005; Olsen et al. 2005). بررسی ناحیه راه‌انداز ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش‌های آبی و سرما و غیروابسته به ABA منجر به کشف یک ناحیه ۹ جفت بازی با توالی TACCGACAT شده که آن را DRE نامیده‌اند (Kasuga et al. 1999). عامل رونویسی *WDREB2* یا *TaDREB* در گندم، عضوی از خانواده DREB بوده و یک پروتئین متصل به توالی CRT/DRE را کد می‌کند و بیان آن تحت تاثیر تنش‌های خشکی، سرما و شوری القا می‌شود (Egawa et al. 2006). توالی اسیدآمینه‌ای ۷۸ تا ۱۳۵ در ژن *DREB2A*، توالی مربوط اتصال به DNA می‌باشند و سیگنال‌های مکان‌یابی هسته‌ای در قسمت انتهای N قرار دارند (Sakuma et al. 2006). ارتولوگ ژن *DREB2* در گیاهان مختلفی از جمله برنج، گندم، ذرت و یونجه شناسایی شده‌اند (Agarwal et al. 2007) و بیشتر آنها به تنش‌های کم‌آبی و شوری پاسخ می‌دهند. ژن *WDREB2* دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون است که نتیجه فرایند ویرایش پس از رونویسی در این ژن ۳ ایزوفرم مختلف آلفا، بتا و گاما بوجود می‌آید. (Egawa et al. 2006). انتقال و بیان ژن *ZmDREB2A* در گیاه آرابیدوپسیس منجر به افزایش تحمل به تنش‌های سرما، خشکی و گرما شده است و بررسی‌های ریزآرایه نشان می‌دهد که ۴۴ ژن در گیاهان تراژن افزایش بیان داشته‌اند (Qin et al. 2007). در گل داوودی میزان بیان *DvDREB2A* به طور معنی‌داری با تنش‌های گرما، سرما، خشکی، شوری و اسیدآبسزیک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Liu et al. 2008). در برنج انتقال ژن‌های *CBF3/DREB1A* و *ABF3* از آرابیدوپسیس منجر به افزایش تحمل به تنش‌های خشکی، شوری و سرما شد (Oh et al. 2005). انتقال ژن *GmDREB2* سویا به آرابیدوپسیس و افزایش بیان آن منجر به بهبود تحمل به خشکی و شوری شد (Chen et al. 2007). تجزیه‌های زیست‌سنجی گیاهان توتون نشان می‌دهد که بیان فرم گامای عامل رونویسی *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز عمومی CaMV35S در توتون به طور معنی‌داری منجر به افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی، شوری و سرما شده است (Kobayashi et al. 2008). باتوجه به اهمیت تنش‌های غیرزیستی و خسارت‌های ناشی از آن‌ها در گیاهان، این پژوهش با هدف بهبود تحمل گندم به تنش‌های محیطی غیرزیستی انجام گرفت.

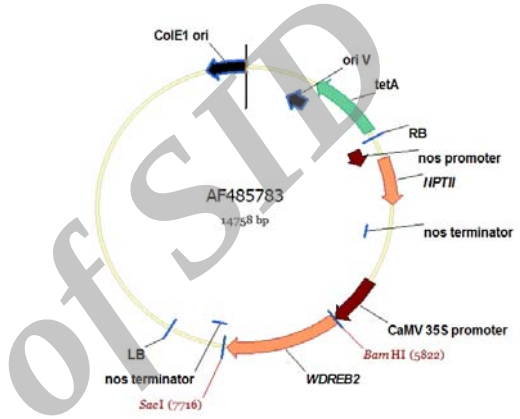
مواد و روش‌ها

آماده کردن سازه ژنی *WDREB2* و کشت باکتری

ایزوفرم فعال ژن *WDREB2* که در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه شیراز از گندم مقاوم به تنش رقم سرداری جداسازی و در پایگاه اطلاعات زیست‌فناوری NCBI به شماره HQ171443 ثبت شده است، برای استفاده در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (Sazegari and Niazi 2012). این ژن در حامل بیان pBI121 همسانه‌سازی شد و به باکتری آگروباکتریوم سویه‌های LBA4404 و C58 با روش استاندارد انجماد و ذوب (Sambrook and Russel 2001) انتقال داده شد. حامل بیان *pBI121* دارای ژن نشانگر انتخابی تحمل به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (نئومایسین فسفوترانسفراز II*NPT*) بوده و ژن *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS قرار دارد. مکان‌های مربوط به آنزیم برشی *Bam*HI در سمت ′۵ و آنزیم برشی *Sac*I در سمت ′۳ ژن قرار دارد (شکل۱). یک کلنی از آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pBI121 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت

Archive of SID
www.SID.ir

(Murashige and Skoog 1962) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین کشت و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا OD آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به یک برسد. باکتری‌های رشد یافته، در دمای محیط و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع فوقانی دور ریخته و رسوب حاصله در ۱۰ میلی‌لیتر محیط موراشیگ و اسکوگ حل شد، به OD یک رسانده شد و از آن برای تلقیح ریز نمونه‌ها استفاده شد.



شکل۱- اجزاء حامل بیان pBI121 استفاده شده برای انتقال ژن *WDREB2* به گندم

تراریختی ریزنمونه‌های گندم

به منظور تهیه محیط کشت گیاهی از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ آماده ساخت شرکت Duchefa استفاده شد. تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده، بر پایه این محیط با افزودن هورمون و آنتی بیوتیک‌های مورد نیاز مطابق جدول ۱ تهیه شدند.

تلقیح، انتخاب و باززایی گیاهان تراریخت

در این مطالعه بذر دو رقم گندم حساس به تنش، شیراز و الموت استفاده شد. برای ضدعفونی، بذرها را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی الکل ۷۰ درصد ریخته و به مدت ۹۰ ثانیه تکان داده شد. سپس الکل خارج، هیپوکلریت سدیم دو درصد و ۲۴۰ میکرولیتر ترایتون ۱۰ درصد (ترایتون ۱۰۰x) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه شیک شدن، بذرها را ۵-۴ بار با آب مقطر اتوکلاو شده در زیر هود شستشو و در تشتک پتری استریل حاوی کاغذ صافی اتوکلاو شده قرار داده شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اتوکلاو شده حاوی قارچ کش کلوتری مازول یک درصد روی آنها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بذرهای خیسانده شده به زیر هود منتقل و جنین‌گیری انجام شد. جنین‌های جدا شده (۵۰ عدد در هر پتری، ۸۰۰ عدد در کل دوره) به محیط پیش‌کشت (جدول۱) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و شرایط اتاق رشد نگهداری شدند. سپس تلقیح طبق مراحل زیر انجام شد. بعد از رشد باکتری و رسیدن به غلظت مناسب جنین-های کشت شده روی محیط پیش‌کشت، به زیر هود منتقل شدند. ۴۰۰ میکرو مولار استوسرینگان، ۷۹ میکرولیتر عصاره توتون و توین ۲۰ با غلظت ۰/۱ درصد به محلول باکتری اضافه شد. جنین‌ها به فالکون حاوی محلول باکتری انتقال در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از یک ساعت، جنین‌ها در زیر هود به تشتک پتری حاوی محیط هم‌کشتی منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۴ روز تشتک-های پتری زیر هود منتقل شد و جنین‌ها به کاغذ صافی اتوکلاو شده منتقل سپس شستشوی جنین‌ها با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. بعد از ۴۰-۳۰ ثانیه جنین-ها به محیط استراحت منتقل و در شرایط اتاق رشد نگهداری شدند. بعد از یک هفته گیاهان به محیط انتخابی دارای ۵۰ میلی-گرم آنتی‌بیوتیک گزینش‌گر جنتامایسین (یا ۱۰۰ میلی گرم کانامایسین) منتقل شدند (جدول۱) و به مدت ۲۱ روز در این محیط قرار داده شد و هر ۷ روز زیرکشت انجام شد. در مرحله بعد گیاهان انتخاب شده به مدت ۱۴ روز به محیط باززایی جهت تولید ساقه‌های جدید منتقل شدند. گیاهچه‌های باززایی شده به محیط ریشه‌زایی منتقل شد و تا ریشه‌زایی مناسب در این محیط نگهداری شدند. گیاهچه‌های بدست آمده از مراحل قبل به گلدان با ترکیب پیت موس و پرلایت اتوکلاو شده به نسبت ۲:۱ منتقل شده و تا رشد مناسب در اتاق رشد نگهداری شدند.

تایید تراریختی

برای تایید تراریختی گیاهان ابتدا استخراج DNA طبق پروتکل استاندارد روش مینی‌پرپ انجام شد (Gawel and Jarret 1991) و از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با چرخه حرارتی دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳/۵ دقیقه و آغازگرهای

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- ترکیب‌های محیط کشت‌های مختلف مورد استفاده در تراریختی گیاهان گندم

ترکیب	نوع محیط
پیش‌کشت	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز۳۰ گرم در لیتر
هم‌کشتی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۷ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، استوسرینگون ۴۰۰ میلی گرم در لیتر، BAP یک میلی‌گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی گرم در لیتر
محیط استراحت	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز۳۰ گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر
انتخابی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر ، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر،BAP یک میلی‌گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی‌گرم در لیتر، جنتامایسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر
باززایی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر ، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر ، BAP یک میلی‌گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی گرم در لیتر، جنتامایسین ۲۵ میلی گرم در لیتر
ریشه‌زایی	MS ۲/۲ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، BAP یک میلی‌گرم در لیتر، NAA ۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر، سولفات مس دو میلی‌گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر

اختصاصی ژن *WDREB2* با توالی‌های آغازگر F5'- CGGGATCCGACAAGATTGCGAACGCTAGA -3' و R 5'-CGGAGCTCCCGACCAAACACCATAGACA-3' استفاده شد. در این واکنش پلاسمید دارای ژن *WDREB2* به عنوان کنترل مثبت و گیاه گندم غیر تراریخت به عنوان کنترل استفاده شدند. پس از اتمام واکنش، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز یک درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد تا از وجود قطعه مورد نظر اطمینان حاصل شود.

مقایسه میزان بیان ژن *WDREB2* در گیاهان تراریخت نسبت گیاه شاهد غیر تراریخت با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX^{TM} (-Plus) شرکت سیناژن انجام شد. به منظور حذف آلودگی ژنومی RNA های استخراج شده از آنزیم DNase I شرکت فرمنتاز استفاده شد. پس از استفاده از DNase، کیفیت و کمیت RNA ها با استفاده از ژل آگاروز یک درصد (حجمی/ وزنی) و دستگاه نانودراپ تعیین شد. سپس به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA آغازگر تخصصی ژن *WDREB2* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد که هیچ گونه آلودگی مشاهده نشد. سنتزcDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت فرمنتاز و آغازگر Oligo dT طی دو مرحله بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. به منظور اطمینان از ساخت cDNA، ۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش یافته روی ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. همچنین با استفاده از آغازگرهای تخصصی ژن *WDREB* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد تا ساخته شدن cDNA مورد تایید قرار گیرد.

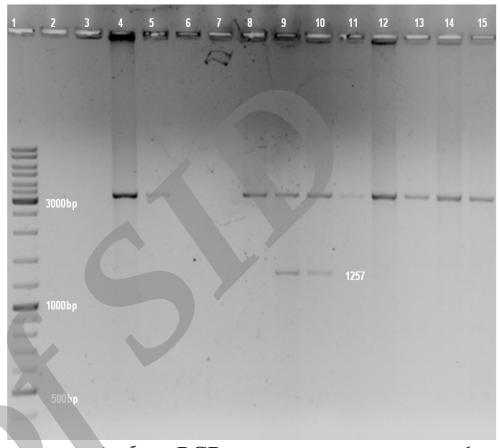
واکنش Real-Time PCR با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq II شرکت تاکارا صورت گرفت. میزان مواد به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *WDREB2* و ژن کنترل داخلی یکسان بود و تنها آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر این دو ژن با هم متفاوت بود. چرخه دمایی استفاده شده شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، اتصال (WDREB2) ۴۷ درجه سانتی‌گراد و کنترل داخلی ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، توسعه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ذوب ۵۰ تا ۹۵ (هر نیم درجه سانتی‌گراد) استفاده شد.

نتایج و بحث

در پایان مرحله تراریختی تعداد ۴۰ گیاه بدست آمد که هر کدام از یک ریز نمونه اولیه مجزا بود. به منظور بررسی حضور ژن *WDREB2* در این گیاهان از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی ژن استفاده شد. پلاسمید *pBI121* حاوی ژن *WDREB* به عنوان کنترل مثبت و گیاه شاهد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. وجود قطعه ۱۲۵۷ جفت بازی در گیاه گندم

Archive of SID
www.SID.ir

تراریخت و عدم وجود آن در گیاه شاهد، تراریخت بودن گیاهان گندم و حضور ژن *WDREB2* در ۲۰ عدد از گیاهان بازیابی شده را تایید می‌کند (شکل۲) . همچنین جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر اختصاصی آگروباکتریوم و DNA گیاهان تراریخت به عنوان رشته الگو استفاده شد. عدم مشاهده باند نشان دهنده عدم آلودگی به باکتری آگروباکتریوم می‌باشد.



شکل۲- الگوی الکتروفورزی محصول PCR با آغازگر تخصصی ژن *WDREB2* ۱) نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ۲) کنترل منفی؛ ۳) کنترل مثبت؛ ۵) گیاه شاهد، ۱۰ و ۱۱ باند ۱۲۵۷ جفت بازی حاصل از آغازگر تخصصی ژن *WDREB2* که ژن انتقال یافته را نشان می‌دهد. عدم مشاهده باند ۱۲۵۷ در بقیه نمونه ها عدم تراریختی را نشان می‌دهد.

ژن *WDREB2* دارای سه ایزوفرم مختلف آلفا، بتا و گاما می‌باشد که نتیجه فرایند ویرایش پس از رونویسی در این ژن است. این ژن دارای ۴ اگزون و سه اینترون می‌باشد و هر سه رونوشت دارای اگزون ۴ هستند (Egawa et al. 2006). از آنجا که از cDNA برای انتقال استفاده شده است، قطعه ۱۲۵۷ جفت بازی نشان‌دهنده cDNA انتقال یافته است و قطعه ۳۰۰۰ جفت بازی ژن اصلی گیاه به همراه اینترون‌ها را نشان می‌دهد. گیاهان تراریخت هم دارای قطعه ۱۲۵۷ جفت بازی و هم دارای ژن اصلی که ۳۰۰۰ جفت بازی می‌باشند اما گیاهان شاهد فاقد قطعه ۱۲۵۷ جفت بازی انتقال یافته می‌باشند (شکل۲).

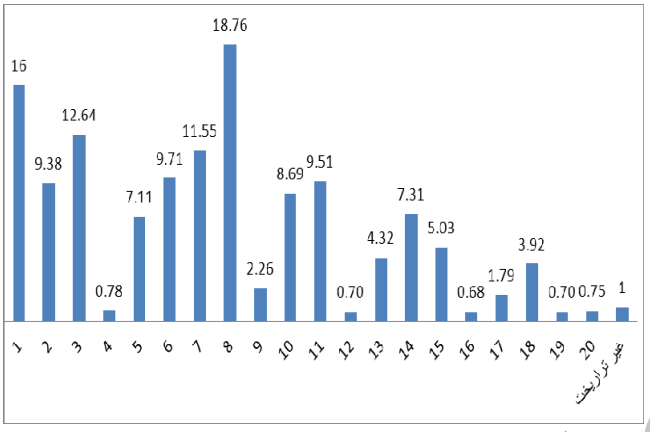
سویه آگروباکتریوم از جمله عواملی است که در موفقیت انتقال ژن به گیاهان با آگروباکتریوم نقش مهمی دارد (Razzaq et al. 2010). استفاده از سویه‌های باکتری آگروباکتریوم C58، LBA4404 تاثیر سویه بر راندمان انتقال ژن را به اثبات رساند به طوری که سویه LBA4404 عملکرد بهتری را نشان داد و کلیه گیاهان بدست آمده حاصل استفاده از این سویه بود ما نتوانستیم از سویه C58 گیاه تراریختی بدست بیاوریم. دلیل ممکن برای اختلاف در کارایی این سویه‌ها بین گونه‌ها، رقم‌ها و حتی ریزنمونه‌ها می‌تواند به دلیل اختلاف در گیرنده‌های سلول گیاهی درگیر در اتصال باکتری به بافت هدف باشد (Sahrawat et al. 2003). با توجه به این که ژنوتیپ از جمله عوامل تاثیر گذار پاسخ گندم به باززایی در کشت بافت است (Farooq et al. 2004; Dodig et al. 2006; Mitic et al. 2006) از دو رقم گندم حساس به تنش شیراز و الموت مورد استفاده شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ الموت دارای باززایی بهتری بود و تنها از این ژنوتیپ، گیاه تراریخت بدست آمد. در مطالعه Nasircilar et al. (2006) نشان داده شد که باززایی به شدت تحت تاثیر ژنوتیپ قرار می‌گیرد. پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های مختلف به آگروباکتریوم را به وجود بازدارنده‌هایی مانند ۲ هیدروکسی، ۷ متیل بنزوکسازین (MDIBOA) که در ذرت وجود دارد، نسبت می‌دهند (Karami et al. 2009).

بازدهی انتقال ژن در گیاهان نسبت پایینی است که این بازدهی در گیاهان تک‌لپه به مراتب پایین‌تر می‌باشد. در این پژوهش از مجموع ۸۰۰ جنین بالغ گندم که به عنوان ریزنمونه استفاده شد ۴۰ گیاه وارد مرحله ریشه‌زایی شد. از این تعداد، ۲۰ گیاه با استفاده از انجام PCR تراریخت تشخیص داده شد. بازدهی تراریختی ۲/۵ درصد بالاتر از بازدهی ۱/۲۸ درصد تراریختی به دست آمده توسط Patnaik et al. (2006) بود که از جنین بالغ گندم به عنوان ریزنمونه استفاده کردند. با استفاده از سویه LBA4404 و حامل فوق دوگانه با عامل گزینشگر هایگرومایسین بازدهی تراریختی ۲/۳ بدست آوردند (Przetakiewicz et al. 2004). کانامایسین یکی از معمول‌ترین عوامل گزینشگری است که برای انتخاب گیاه تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرد اما این سیستم انتخابی برای استفاده در گیاهان تک‌لپه از کارایی لازم برخوردار نیست. در این تحقیق نیز استفاده از کانامایسین به عنوان عامل انتخابی نتیجه‌ای در بر نداشت که همسو با نتایج بدست آمده دیگر پژوهش‌ها می‌باشد. عدم کارایی کانامایسین را به تحمل

Archive of SID
www.SID.ir

داخلی گیاهان تک لپه نسبت به این آنتی بیوتیک نسبت می‌دهند (Wlimink and Dons 1993). هنگامی که ژن *Npt*II به عنوان نشانگر گزینشگر مورد استفاده قرار می‌گیرد و عامل انتخابی کانامایسین از کارایی لازم برخوردار نباشد، استفاده از دیگر آنتی بیوتیک‌های مشابه مانند جنتامایسین پیشنهاد می‌شود. در این پژوهش نیز هنگامی که جنتامایسین (G418) با کانامایسین جایگزین شد نتایج بهتر و در نهایت گیاهان تراریخت بدست آمد. این آنتی بیوتیک به خوبی باعث سفید شدن بافت غیر تراریخت شده و بافت‌های تراریخت سبز باقی‌ماندند.

روش Real-Time PCR یک روش بسیار دقیق جهت تعیین مقدار الگوی اولیه است (Jan et al. 2006). نتایج بدست آمده از آزمون Real Time PCR نشان‌دهنده میزان بیان بالای ژن در بیشتر گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد غیرتراریخت می‌باشد (شکل۳). در این گیاهان افزایش بیان بین ۲ تا ۱۹ برابر نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد. عدم افزایش بیان در بعضی از نمونه‌های مثبت می‌تواند به دلیل قرار گرفتن ژن در مناطق هتروکروماتینی باشد. این نتایج به دو دلیل می‌تواند ارزشمند باشد، اول این که کارایی مناسب راه‌انداز 35S جهت بیان ژن در گیاهان تک‌لپه را نشان می‌دهد و دوم اینکه بیان بسیار بالای ژن *WDREB2* می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های پایین دست شده و بهبود تحمل به تنش‌های مختلف محیطی را باعث شود. مطالعات قبلی این را ثابت می‌کند که بیان افزایش یافته ژن *WDREB* تحت راه‌اندازهای مختلف منجر به تجمع محصولات ژن‌های پایین دست القاپذیر به وسیله تنش و بهبود تحمل به انواع تنش‌های محیطی غیرزیستی شده است. به عنوان مثال بیان افزایش یافته *OsDREB2B* در آرابیدوپسیس باعث افزایش بیان ژن‌های هدف *WDREB2A* و تحمل به تنش‌های خشکی و گرما شد. بیان افزایش یافته *ZmDREB2A* ذرت در آرابیدوپسیس منجر به بهبود تحمل به خشکی و دمای بالا شد (Qin et al. 2007). بیان افزایش یافته *PgDREB2A* در توتون منجر به افزایش تحمل به تنش اسمزی شد و بیان افزایش یافته *PeDREB2* در آرابیدوپسیس منجر به بهبود تحمل به شوری شد (Shen et al. 2003; Oh et al. 2005; Bhatnagar-Mathur et al. 2006; Sakuma et al. 2006; Schramm et al. 2008). لذا نتایج پژوهش‌های انجام شده ثابت می کنند که ژن *DREB2* عاملی مهم در تنظیم بیان ژن‌های وابسته به تنش بوده و ژن‌های *DREB* تنظیم کننده مرکزی پاسخ به تنش‌های محیطی و تحمل در گیاهانی که در معرض شرایط متغییر محیطی قرار می‌گیرند، می‌باشند. بنابراین دست یابی به سطح بیان بالای این عوامل رونویسی که منجر به بیان بیشتر مجموعه‌ای از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌شوند، باعث بهبود تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های مختلف شده و افزایش محصول در شرایط تنش را در پی خواهد داشت.



شکل۳- الگوی بیان ژن *WDREB2A* در گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد با روش Real-time PCR . نمودارهای ستونی نشان‌دهنده مقدار کمی شده بیان ژن انتقال یافته تحت راه‌انداز قوی CaMV35S می‌باشد که در اکثر نمونه ها افزایش بیان چشمگیری نسبت به گیاه شاهد مشاهده می‌شود

نتیجه گیری

گندم (*Triticum* spp) مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا است و تنش‌ها مهمترین عامل کاهش‌دهنده عملکرد این غله مهم می‌باشند. از آنجا که تحمل به تنش‌های غیرزیستی صفتی کمی است و به وسیله تعداد زیادی از عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، انتقال تنها یک ژن عملکردی نمی‌تواند منجر به ایجاد تمامی تغییرات سلولی لازم جهت ایجاد تحمل به تنش شود. در حالی که شناسایی و انتقال ژن‌های تنظیمی به گیاهان منجر به القای چندین مسیر موثر در تحمل به تنش‌ها شده و تحمل گیاهان به تنش را افزایش می-دهد. در این پژوهش فرم فعال عامل رونویسی *WDREB2* به عنوان یکی از ژن‌های تنظیمی مهم که از گیاه گندم متحمل به تنش سرداری جدا شد، به گندم حساس به تنش رقم الموت

Archive of SID
www.SID.ir

انتقال داده شد که بیان بسیار بالای این ژن در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با توجه به بیان بالای بدست آمده انتظار می‌رود ژن-های پایین دست دارای عناصر *cis* افزایش بیان پیدا کرده و بهبود تحمل در گیاه حساس بوجود آید. به طور کلی پیشرفت در زمینه به‌نژادی گیاهان برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی متکی به فهم روشن مسیرهای القای تحمل به تنش‌ها و تراریختی پایدار گیاهان با استفاده از ژن‌های موثر در تحمل به تنش‌ها می‌باشد. با توجه به جایگاه مهم گندم در جیره غذایی انسان، استراتژیک بودن این محصول و قرار گرفتن کشور در کمربند خشکی، این پژوهش می‌تواند نقشی ارزنده در بهبود تحمل گندم به تنش‌ها داشته باشد.

منابع

Agarwal P, Agarwal PK, Nair S, Sopory SK, Reddy MK (2007) Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. Molecular Genetics and Genomics 277:189-198.

Bihani P, Char B, Bhargava S (2011) Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation. Journal of Agricultural Science 149: 95-101.

Chen M, Wang Q, Cheng X, Xu Z, Li L, Ye X, Xia L, Ma Y (2007) GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochemical and Biophysical Research Communications 353:299-305

Dodig D, Nikolic R, Mitic N (2006) Tissue culture response of different wheat genotypes, environmental effect and association with plant traits. Options Mediterraneennes, series A, No. 81.

Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S (2006) Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. Genes and Genetic Systems 81:77-91.

Enriquez-Obregon GA, Vazquez-padron R, Prieto-sansonov D, Perez M, Selman-Housein G (1997) Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. Biotecnologia Aplicada 14:169-174.

Enriquez-Obregon GA, Vazquez-padron R, Prieto-sansonov D, de la Riva G, Selman-Housein G (1998) Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. Planta 206:20-27.

Farooq M, Rashid H, Hsanullah I, Chaudhry Z, Marwat KB (2004) Comparative tissue culture response of wheat cultivars and evaluation of regenerated plants. Pakistan Journal of Biological Sciences 7:406-408.

Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA extraction protocol for Musa and Ipomea. Plant Molecular Biology Reporter 9:250-254.

Gupta K, Agarwal PK, Reddy MK, Jha B (2010) SbDREB2A, an A-2 type DREB transcription factor from extreme halophyte *Salicornia brachiata* confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. Plant Cell Reports 29:1131-7.

Hansen G, Shillito R, Chilton M (1997) T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. In: Proceedings of The National Academy of Sciences of USA 94:11726-11730.

Hu T, Metz S, Chay C, Zhou HP, Biest N (2003) *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. Plant Cell Reports 21:1010-1019.

Jan H, Kerstin E, Ivo R, Thomas U (2006) Heiko Funke-Kaiser Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. Journal of Molecular Medicine 84:901-910.

Karami O, Esna-ashari M, Kurdistani GK, Aghavaisi B (2009) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. Biologica Plantarum 53:201-212.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17:287-291.

Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S (2008) Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. Transgenic Research 17:755-767.

Koncz C, Nemeth K, Redei G, Scell J (1994) Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Academic publisher, Springer Netherlands 167-189.

Keresa S, Baric M, Sarcevic H, Marchetti S (2003) Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Die Bodenkultur 54:155-161.

Archive of SID

www.SID.ir

Liu L, Zhu K, Yang Y, Wu J, Chen F, Yu D (2008) Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). Journal of Plant Research 121:215-226.

Mitic N, Dodig D, Nikolic R (2006) Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. Genetika 38:183-192.

Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. Plant Biotechnology Journal 9:230-249.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 153: 473-497.

Nasircilar AG, Turgut K, Fiskin K (2006) Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. Pakistan Journal of Botany 38:637-645.

Olsen AN, Ernst H, Leggio L Skirver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. TRENDS in Plant Science 10:79-87.

Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J (2005*) Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic Stress without stunting growth. Plant Physiology 138:341-351.

Ozgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C (1996) Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter *durum wheat* genotypes. Plant Breeding 155:455-458.

Patnaik D Khurana P (2001) Wheat biotechnology: a minireview. Electronic Journal of Biotechnology 4:74-102.

Patnaik D, Vishnudasan D, Khurana P (2006) Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of Triticum aestivum and *Triticum durum*. Current Science 91:307-317.

Przetakiewicz A, Karas A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2004) Agrobacterium mediated transformation of polyploid cereals. The efficiency of selection and transgene expression in Wheat. Cellular and Molecular Biology Letters 9:903-917.

Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. Plant Journal 50:54-69.

Razzaq R, Ma Z, Wang H (2010) Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L): a review. Triticeae Genomics and Genetics 1:1-7.

Sahrawat AK, Becker D, Lutticke S, Lorz H (2003) Genetic improvement of Wheat via alien gene transfer, an assessment. Plant Science 165:1147-1168.

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozakia K (2006) Functional analysis of an arabidopsis transcription Factor, DREB2A, Involved in drought-responsive gene expression. Plant Cell 18:1292-1309.

Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual,. 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sazgari S, Niazi A (2012) Isolation and molecular characterization of Wheat (*Triticum aestivum*) Dehydration Responsive Element Binding Factor (DREB) isoforms. Australian Journal of Crop Science 6:1037-1044.

Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, Ganguli A, Englich G, Vierling E, von Koskull-Do¨ ring P (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. Plant Journal 53:264-274.

Shen YG, Zhang W, He S, Zhang J (2003) An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Teoretical and Applied Genetics 106:923.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biology 6:410-417.

Sood P, Bhattacharya A, Sood A (2011) Problems and possibilities of monocot transformation. Biologia Plantarum 55:1-5.

Turhan H, Baser I (2004) Callus induction from mature embryo of winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). Asian Journal of Plant Sciences 3:17-19.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Plant Cell 97:11632-11637.

Wilmink A, Dons J (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. Plant Molecular Biology Reporter 11:165-185.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. Trends in Plant Science 10:88-94.

Archive of SID

www.SID.ir