همسانه‌سازی و ارزیابی فعالیت پیشبر القایی *Rd29A* در گیاهان تراریخت توتون

حسن رهنما* و حقیقت وکیلیان

کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۵

چکیده

پیشبر *Rd29A* به وسیله واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از گیاه *Arabidopsis thaliana* همسانه‌سازی شد. ناقل دوگانه بیانی pBI-RD-GUS با اتصال توالی *RD29A* به ژن *gus* ساخته شد. سازه اخیر به همراه pBI121 با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* برای تراریختی گیاه توتون مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابیهای مولکولی گیاهان تراریخته توتون حضور و فعالیت ژن *gus* تحت پیشبرهای *Rd29A* و *CamV35S* را تأیید نمود. تأثیر تیمارهای مختلف تنشی مانند شوری (NaCl)، خشکی (PEG) و آبسزیک اسید (ABA) نشان داد که این پیشبر *Rd29A* برخلاف پیشبر همیشه فعال *CaMV35S* تنها تحت اثر تنشهای غیرزیستی القاء می‌شود. القاء پذیری پیشبر *Rd29A* توسط ABA نشان دهنده نقش سیگنالی این ماده در مسیر ترارسانی علامتی تنشهای غیرزیستی می‌باشد. با توجه به اینکه بیان دائمی ژنهای مقاومت به تنش تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* در بسیاری از موارد مانع رشد طبیعی گیاهان تراریخته می‌شود، بنابراین پیشبر القایی *Rd29A* می‌تواند جایگزینی مناسب برای تراریختی گیاهان متحمل به تنش باشد.

واژه های کلیدی: پیشبر القایی، تراریختی، تنش غیر زیستی، توتون،Rd29A

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۷۰۳۵۳۶-۰۲۶ ، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

مقدمه

خشکی، شوری و دمای پایین سه عامل محیطی مهمی هستند که رشد و نمو و تولید گیاه را محدود می‌نماید. به طور کلی تنشهای غیرزیستی مجموعه‌ای از پاسخهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و نموی را در گیاه القاء می‌نمایند که باعث کاهش خسارت به گیاه می‌شوند (۱، ۲، ۱۰).

با پیشرفت زیست‌فناوری و به ویژه مهندسی ژنتیک، امکان افزایش مقاومت گیاهان به تنشهای غیرزیستی چشم اندازی امید بخش به همراه داشته است. یکی از جنبه‌های مهم فناوری تراریختی گیاهان بیان کنترل شده تراژنها می‌باشد. پیشبرها بخشی از توالی DNA در بالادست ژنها هستند که نقش مستقیمی در کارآیی و چگونگی بیان آنها دارند. پیشبرها را می‌توان به طور کلی در سه دسته دائمی، القایی و اختصاصی بافت قرار داد.

از جمله مهم ترین پیشبرهایی که برای تولید گیاهان تراریخته متحمل به تنشهای غیرزیستی استفاده شده است می‌توان به پیشبر *CaMV35S*، یوبی‌کوتین۱، و اکتین اشاره نمود. این پیشبرها همیشه فعال بوده و در تمامی بافتها و شرایط با قدرت بالایی باعث بیان ژن می‌شوند. به عنوان مثال، در مواردی که ضروری است میزان بیان تراژن بالا باشد (مانند *LEA3A*) استفاده از یک پیشبر قوی مانند *CaMV35S* اجتناب ناپذیر خواهد بود.

با این وجود، تولید دائمی مولکولهایی مانند ترهالوز (۱۷) یا پلی آمین‌ها (۴) باعث رشد غیرطبیعی گیاه در شرایط طبیعی می‌شود. همچنین، تولید این دسته از ترکیبات می تواند از نظر متابولیکی برای گیاه هزینه‌بر و گران باشد. در چنین شرایطی، استفاده از یک پیشبر القاء شونده با تنش

www.SID.ir

بسیار مطلوب خواهد بود. مطالعات انجام شده در گیاهان نشان داده است که ژنهای متعددی با این تنشها ارتباط دارند. برخی از این ژنها تحت شرایط تنشی القاء می شوند. بنابراین استفاده از پیشبر این ژنها می‌تواند در تنظیم بیان ژن در گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گیرد. آنچه مسلم است، یک پیشبر القایی ایده‌آل نه تنها باید در غیاب عامل القایی هیچ گونه بیان ژنی را سبب نشود بلکه این بیان باید برگشت‌پذیر و وابسته به دز هم باشد.

به منظور شناسایی عناصر فعال سیس و ترانس دخیل در بیان ژن، ناحیه تنظیم رونویسی ژنهای القاء شونده توسط سرما و خشکی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۹). بیشتر پیشبرهای القاء شونده توسط تنش دارای یک عنصر فعال سیس اختصاصی تنش هستند که توسط یک عامل رونویسی مناسب شناسایی می‌شود. برای مثال، *rd29A* و *rd29B* از جمله ژنهای حساس به تنش هستند اما تحت شرایط تنشی به صورت محتلفی القاء می‌شوند. پیشبر *Rd29A* شامل دو عنصر *DRE* و *ABRE* است. خشکی، شوری بالا و دمای پایین باعث القای این پیشبر می‌شود (۲۱). در حالی که پیشبر *Rd29B* تنها دارای عنصر *ABRE* بوده و القای آن وابسته به هورمون ABA می‌باشد. فرابیان عامل رونویسی *DREB1A* تحت کنترل پیشبر القایی *Rd29A* نسبت به پیشبر *CaMV35S* باعث شد که گیاه رشد و فنوتیپ ظاهری بهتری داشته باشد (۱۰).

پیشبر القایی *Rd29A* نه تنها در *Arabidopsis thaliana*، توتون و گندم مورد مطالعه قرار گرفته است (۷، ۲۰) بلکه به صورت متصل به ژن گزارشگر *gus* به سیب زمینی هم منتقل شده است (۲۴). در این پژوهش، فعالیت القایی پیشبر *Rd29A* پس از همسانه‌سازی از گیاه آرابیدوپسیس در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

ساخت ناقل پلاسمید pBI-RD-GUS : توالی DNA پیشبر *Rd29A* از بانک ژن (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) و با شماره دسترسی Ay577523 مربوط به گیاه آرابیدوپسیس به دست آمد. براساس این توالی آغازگرهای اختصاصی این پیشبر (F-Rd: 5´-AAG CTT GCC ATA GAG CAT TTC AA-3´ و R-Rd: 5´-TCC AGA TTC CAA AGA TTT TTC T-3´) برای تکثیر قطعه ای به طول ۹۱۰ جفت باز طراحی و ساخته شد. برای استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۶) از برگهای گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد. از DNA استخراج شده به عنوان الگو جهت جداسازی پیشبر *Rd29A* به وسیله واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. برای انجام PCR از دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه استفاده گردید. در ادامه ۳۵ چرخه با شرایط زیر انتخاب شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد؛ اتصال یک دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و بسط دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد؛ در پایان ۴ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد.

پس از تکثیر، همسانه‌سازی پیشبر *Rd29A* در ناقل T/A (ناقل pTZ57R/T) (InsTAclone™ PCR Cloning Kit# K1214, Fermentas) صورت گرفت. به منظور همسانه سازی پیشبر *Rd29A* در پلاسمید pBI121، ابتدا با استفاده از آنزیمهای برشی *XbaI* و *Hin*dIII پیشبر *Rd29A* از ناقل کلونینگ جدا شده و جایگزین پیشبر *CaMV35S* در بالادست ژن *gus* پلاسمید pBI121 قرار گفت (۱۸). جهت تأیید الحاق پیشبر در پلاسمیدpBI121 آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی *Rd29A* و هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *XbaI* و *Hin*dIII انجام شد. پس از تأیید نهایی سازه نوترکیب حاصل که pBI-RD-GUS نامگذاری شد (شکل ۱)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefacien*s انجام گرفت. سلولهای

Archive of SID

www.SID.ir

مستعد سویه *AGLO1* باکتری *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد تراریخت گردیدند (۱۸) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین (۷۵ mg/l) در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۳ روز کلنیها ظاهر شدند. تأیید تراریختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *Rd29A* انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 به عنوان کنترل در تراریختی استفاده شد.

تراریختی گیاه توتون : جهت ارزیابی کارآیی پیشبر *Rd29A* کاست ژنی pBI-RD-GUS برای تراریختی گیاه توتون (رقم Xanti) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور مقایسه پیشبر القایی *Rd29A* با پیشبر دائمی *CaMV35S* از ناقل دوگانه pBI121 به عنوان کنترل استفاده شد. تراریختی گیاه توتون با روش Horch و همکاران (۸) انجام شد. بدین منظور قطعات جداکشت برگی گیاه توتون با کشت سوسپانسیون سلولی شبانه سویه های اگروباکتریومی حاوی پلاسمیدهای pBI-RD-GUS و pBI121 آلوده شد. قطعات جداکشت برگی آلوده شده به محیط MS جامد (۱۴) حاوی ۲ میلی گرم/لیتر BAP، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم/لیتر ساکارز کشت شد. بعد از ۴۸ ساعت هم کشتی نمونه ها به محیط کشت MS حاوی هورمونهای فوق و عامل گزینش گر کانامایسین ۱۰۰ میلی گرم/ لیتر و آنتی بیوتیک سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی گرم/ لیتر (برای حذف آلودگی اگروباکتریومی) منتقل شدند. نمونه‌ها در شرایط نوری ۴۰۰۰ لوکس، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت به مدت ۳ هفته قرار گرفتند. پس از ظهور اندامهای هوایی، ساقه‌هایی که به اندازه کافی رشد کرده بودند به محیط ریشه‌زایی شامل محیط 1/2 MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر اندول بوتیریک اسید (IBA) و آنتی-بیوتیکهای کانامایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند.

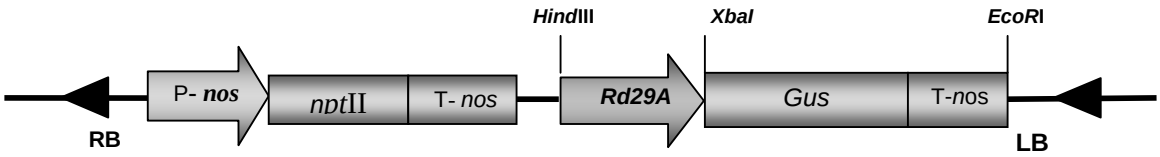
نمونه‌های ریشه‌دار شده در محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین به گلدان (با ترکیب خاکی ماسه، پرلیت، پیت و ورمیکولیت به نسبتهای ۴۰ درصد، ۴۰ درصد، ۵ درصد و ۱۵ درصد) منتقل شدند.

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته: آنالیز PCR: برای اثبات حضور ژنهای منتقل شده به گیاه توتون پس از استخراج DNA از گیاهان (۱۸) از روش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی پیشبر *Rd29A* (قبلا ذکر شد)، ژنهای *gus* (F-gus: 5´-GGT GGG AAA GCG AGA CGA-3´ و R-gus: 5´-ACC TAA GGC CGT ATC AAT-3´) و nptII (F-nptII:5´-GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC-3´ و R-nptII:5´-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GC-3´) استفاده شد. انجام PCR در همه نمونه‌ها در شرایط دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه، و ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و مرحله بسط یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در پایان ۴ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. در نهایت نمونه‌های تکثیر شده بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده و آنالیز باندها پس از عکسبرداری انجام شد.

روش ارزیابی بیان ژن *gus* در گیاهان توتون تحت شرایط تنش: به منظور بررسی بیان ژن *gus* با استفاده از پیشبر القایی *Rd29A* و همچنین پیشبر دائمی *CaMV35S* و نقش این پیشبرها در شرایط مختلف تنشی، گیاهان تراریخته توتون حاوی سازه‌های ژنی Rd29A-GUS و-CaMV35S GUS تحت تیمارهای تنشی مختلف قرار گرفتند. پس از انجام تیمارهای مختلف نمونه‌های برگی به منظور ارزیابی هیستوشیمیایی ژن *gus* در تیوبهای حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc برای ۳۸-۳۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده گرفته و سپس در الکل ۷۰ درصد شسته شدند (۹).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- سازه نوترکیب pBI-RD-GUS مورد استفاده در تراریختی گیاه توتون

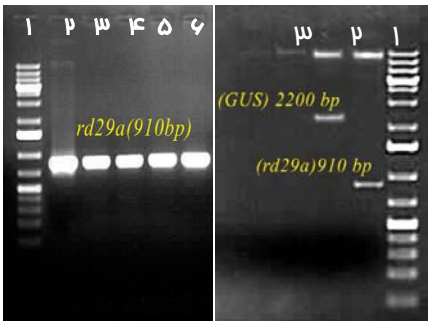
تنش شوری NaCl : غلظتهای مختلف از NaCl (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰و ۳۰۰) mM در محیط پایه MS تهیه گردید و قسمتی از بافت برگی گیاه تراریخته و شاهد به مدت ۶ ساعت در این محلول جهت اعمال تیمار شوری در دمای اتاق غوطه‌ور گردید. با آزمون هیستوشیمیایی GUS بیان ژن *gus* مورد بررسی قرار گرفت.

تیمار تنش خشکی (PEG): تیمارهای PEG (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) در محیط پایه MS تهیه گردید و قسمتی از بافت برگی گیاهان تراریخته و شاهد به مدت ۶ ساعت در این محلول جهت اعمال تیمار خشکی در دمای اتاق غوطه‌ور گردید. از آزمون هیستوشیمیایی GUS برای بررسی القاء پذیری پیشبرها استفاده شد.

تنش ABA : محلول پایه‌ای از محیط MS که حاوی ۱۰۰ میکرومول (µM) ABA بود تهیه گردید سپس قطعات تازه برگی از گیاهان تراریخته با ژن Rd29A-GUS و CaMV35S-GUS در این محلول به مدت ۶ ساعت غوطه‌ور گردیده و سپس جهت بررسی القاء پذیری پیشبر آزمون هیستوشیمیایی GUS انجام شد.

نتایج

ساخت حامل پلاسمیدی pBI-RD-GUS : پیشبر *Rd29A* از ژنوم گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از روش PCR جداسازی گردیده و در نهایت جایگزین پیشبر *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 وارد شد (شکل ۱). با استفاده از آنالیزهای مختلف از جمله هضم آنزیمی با آنزیمهای *Xba*I – *Hin*dIII (جهت جداسازی پیشبر *Rd29A*) و *Xba*I-*Eco*RI (جهت جداسازی ژن *gus*)، حضور پیشبر و ژن *gus* در سازه جدید نوترکیب pBI-RD-GUS تأیید شد (شکل ۱ و ۲).



الف ب

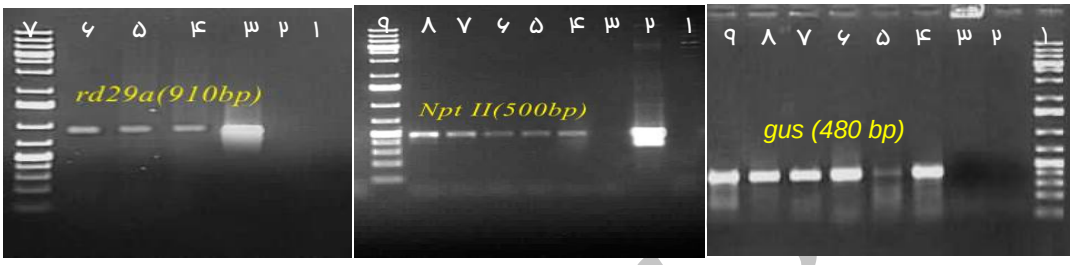
شکل ۲: همسانه‌سازی و تایید سازه ژنی pBI-RD-GUS. الف- تکثیر پیشبر ۹۱۰ جفت بازی *Rd29A* از آرابیدوپسیس (۱- نشانگر وزن مولکولی 1 kb ladder، ۲-۶ : قطعات تکثیرشده حاصل از چند محصول PCR). ب- هضم ناقل نوترکیب pBI-RD-GUS با استفاده از آنزیمهای محدود کننده (۱- نشانگر وزن مولکولی 1 kb ladder، ۲- پیشبر *Rd29A* جدا شده با دو آنزیم *Hin*dIII-*Xba*I، ۳- ژن *gus* جدا شده با دو آنزیم *Xba*I-*Eco*RI).

تولید گیاهان تراریخته توتون: گیاه توتون به عنوان گیاه مدل با استفاده از آگروباکتریوم سویه AGLO1 حاوی وکتور pBI121 وpBI-RD-GUS تلقیح شد. پس از تلقیح ریزنمونه‌ها جهت باززایی به محیط MS حاوی هورمون‌های باززایی و عامل انتخابگر کانامایسین منتقل شدند (شکل ۳- الف). نمونه‌های باززا شده پس از ریشه‌زایی در محیط ریشه‌زایی حاوی کانامایسین (شکل ۳- ب) به گلدان منتقل شدند (شکل ۳- ج).

Archive of SID

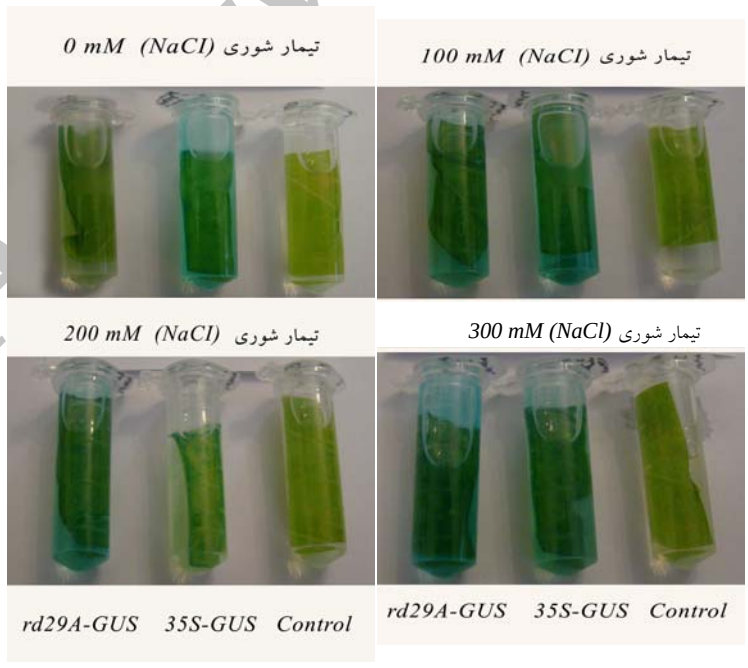
www.SID.ir

شکل ۳- مراحل تولید گیاهان تراریخت توتون. الف- مرحله باززایی در محیط انتخابی ب- مرحله ریشه‌زایی در محیط حاوی کانامایسین ج- مرحله انتقال به گلدان



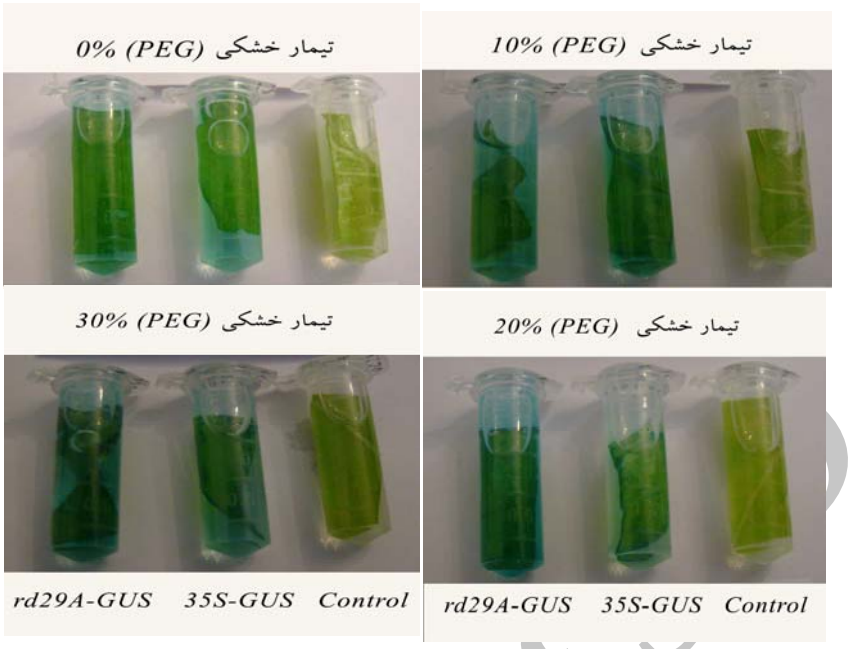
الف ب ج

شکل ۴- آزمون مولکولی گیاهان توتون تراریخت احتمالی با روش PCR. الف- تأیید حضور ژن *gus* در گیاهان تراریخت (۱- نشانگر وزن مولکولی، ۲- کنترل منفی (آب)، ۳- کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)، ۴- کنترل مثبت (پلاسمید) ، ۹-۵ گیاه تراریخت احتمالی). ب- تأیید حضور ژن *npt*II (۱- کنترل منفی (آب)، ۲- کنترل مثبت (پلاسمید)، ۳- کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)، ۸-۴- گیاهان تراریخت احتمالی، ۹- نشانگر وزن مولکولی). ج- تأیید حضور پیشبر *Rd29A* (۱- کنترل منفی (آب)، ۲- کنترل منفی (گیاه تراریخت)، ۳- کنترل مثبت (پلاسمید)، ۶-۴- گیاهان تراریخت احتمالی، ۷- نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Roche آلمان)

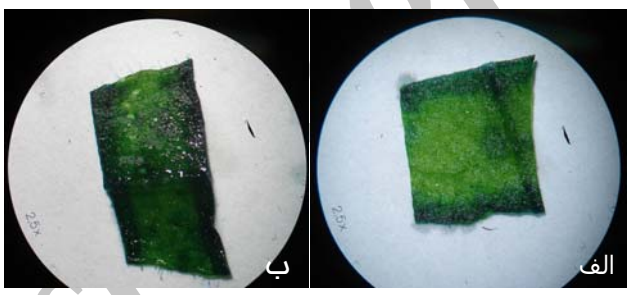


شکل ۵- اثر تیمارهای شوری (NaCl) بر بیان ژن *gus* تحت کنترل پیشبرهای مختلف

www.SID.ir



شکل ۶- اثر تیمارهای مختلف خشکی (**PEG**) بر نمونه‌های برگی گیاهان تراریخت توتون



شکل ۷- اثر تیمار ABA بر بیان ژن *gus* تحت کنترل پیشبرهای مختلف. تأثیر تیمار ۱۰۰ میکرومولار ABA در گیاهان تراریخته حاوی پیشبر *Rd29A* (الف) و پیشبر *CaMV35S* (ب).

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت توتون: انجام آنالیزهای مولکولی بر روی گیاهان تراریخت توتون حاوی سازه‌های ژنی RD-GUS و CaMV35S-GUS با استفاده از روش PCR و ظهور قطعاتی به طول ۴۸۰ و ۵۰۰ جفت باز به ترتیب حاکی از حضور ژنهای *gus* و *npt*II در تمامی لاینهای تراریخت بود (شکل ۴- الف و ب). بررسی حضور پیشبر *Rd29A* در گیاهان تراریخت حاوی سازه Rd29A-GUS با استفاده از روش PCR و تولید قطعه ای به طول ۹۱۰ جفت باز هم نشان داد که این پیشبر در گیاهان تراریخته مورد نظر وجود دارد (شکل ۴- ج)

ارزیابی عملکر پیشبرها تحت تیمارهای تنشی: به منظور بررسی بیان ژن *gus* تحت پیشبر القایی *Rd29A* و همچنین پیشبر *CaMV35S* در گیاهان تراریخت توتون، این گیاهان تحت تیمارهای تنشی قرار گرفته و بیان ژن *gus* در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تأثیر غلظتهای مختلف NaCl (۰، ۱۰۰، ۲۰۰و ۳۰۰ میلی مولار) در گیاهان تراریخت و شاهد نشان داد که با افزایش میزان NaCl میزان بیان ژن *gus* در بافتهای حاوی Rd29A-GUS، افزایش یافت که نشان دهنده این موضوع

www.SID.ir

می‌باشد که پیشبر *Rd29A* تحت شرایط تیمار شوری باعث افزایش بیان ژن *gus* یا القای بیشتر آن می‌شود و اینکه در گیاهان تراریخته CaMV35S–GUS با افزایش غلظت NaCl تغییری در میزان بیان ژن *gus* صورت نگرفت که نشان می‌دهد پیشبر *CaMV35S* تحت تیمار شوری در افزایش القاء و بیان ژن *gus* نقشی ندارد (شکل ۵).

همچنین آزمون هیستوشیمیایی GUS نشان داد که با افزایش غلظت PEG بعد از ۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد میزان بیان ژن *gus* (میزان رنگ‌پذیری) در بافتهایی که حاوی Rd29A-GUS بودند افزایش قابل ملاحظه‌ای دیده شد. در حالی که در گیاهان حاوی ژن CaMV35S-GUS با افزایش درصد PEG تغییر چندانی در بیان ژن *gus* اتفاق نمی‌افتد. می‌توان نتیجه گرفت تیمار خشکی یکی از عوامل تنشی مهم است که با القای پیشبر *Rd29A* سبب بیان بیشتر ژن *gus* می‌شود (شکل ۶).

تنش ABA : آبسزیک اسید به عنوان یک علامت در مسیر پیام رسانی خشکی عمل می کند (۲۳). نتایج حاصل از بررسی تأثیر ABA بر القاپذیری و بیان ژن *gus* نشان داد که ABA به عنوان یک عامل باعث القای پیشبر *Rd29A* و در نتیجه بیان بیشتر ژن *gus* می‌شود. درصورتی که در بیان ژن *gus* تحت پیشبر *CaMV35S* تغییر چندانی ندارد (شکل ۷).

بحث

پیشبر ژن یکی از مهم ترین عناصر تنظیمی در سطح رونویسی است که بیان زمانی و مکانی ژن را تحت کنترل خود دارد. این عناصر از عوامل کلیدی در بیان ژنهای خارجی در گیاهان تراریخت محسوب می‌شوند (۲۱و ۲۵). تحقیقات زیادی در زمینه تنظیم بیان ژن در گیاهان عالی بر روی ژنهای تنظیم شونده توسط نور، ژنهای القاء شونده توسط هورمونها و ژنهای حساس به تنش صورت گرفته است (۱۱). در این میان پیشبر القاء شونده توسط تنشهای غیرزیستی (*Rd29A*) یکی از شاخص‌ترین پیشبرها محسوب می‌شود که توجه زیادی برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به تنشهای غیرزنده را به خود جلب نموده است. همان گونه که ذکر شد، در مورد بسیاری از فرآورده-های تراژنی مانند سنتز اسمولیت‌ها (مانند ترهالوز، پلی آمین‌ها، مانیتول، سوربیتول، گلیسین- بتایین و ...) که فشار متابولیکی و انرژیایی زیادی را به گیاه تحمیل می‌کند، رشد گیاه در برخی از موارد دچار اختلال می‌شود. این ترکیبات در اغلب موارد برای ارتقای تحمل گیاهان تراریخت با تنشهای غیرزیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بدیهی است زمانی که گیاه تحت تنش قرار ندارد سنتز این ترکیبات توسط گیاه چندان ضرورتی نخواهد داشت. القای سنتز آنها در زمان مواجه با تنش می‌تواند ضمن کاهش هزینه انرژی گیاه و جلوگیری از اختلال در رشد طبیعی آن، شرایط لازم برای افزایش مقاومت به تنش را در گیاه فراهم آورد. در چنین مواردی بهتر است از یک پیشبر القایی مانند *Rd29A* استفاده شود (۳).

در این مطالعه، همسانه‌سازی و فعالیت پیشبر القایی *Rd29A* در گیاه توتون تراریخت مورد مطالعه قرار گرفت. وجود عناصر فعال سیس حساس به تنش یا ABA در پیشبر یکی از نشانه‌های اصلی برای القاء پذیری آن تحت تنش است اما این امر لزوماً به این معنی نیست که وقتی این پیشبر به ناحیه رمزکننده یک ژن متصل می‌شود باز هم عمل نماید (۱۵). بنابراین لازم است ابتدا پیشبر همسانه-سازی شده به صورت متصل به یک ژن گزارشگر در یک گیاه مدل مورد آزمایش قرار گیرد. بدین منظور در این پژوهش پس از همسانه‌سازی پیشبر *Rd29A* از گیاه آرابیدوپسیس، عملکرد آن در بیان القایی ژن گزارشگر *gus* در گیاهان تراریخت توتون مورد مطالعه قرار گرفت.

نتاج حاصل از مطالعه اخیر نشان داد که وقتی گیاهان تراریخت توتون تحت تنش شوری و خشکی قرار می-گیرند بیان ژن *gus* در آنها القاء می‌شود. از طرف دیگر با

www.SID.ir

افزایش میزان تنش، میزان بیان ژن *gus* هم تشدید می‌گردد. در مقابل بیان ژن *gus* در گیاهان تراریخت توتونی که در آن از پیشبر دائمی *CaMV35S* برای کنترل بیان ژن استفاده شده چه در غیاب تنش و چه در حضور تنش همواره صورت می‌گیرد. هرچند برای تأیید نهایی ضروری است که بیان ژن به صورت کمی بررسی شود ولی مطالعات چشمی هم نشان داد که با افزایش میزان تنش (غلظت نمک یا پلی اتیلن گلیکول) میزان بیان ژن هم افزایش می یابد. بنابراین ویژگی القاء پذیری وابسته به دز پیشبر *Rd29A* می‌تواند اهمیت زیادی در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به تنشهای غیرزیستی داشته باشد. نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار هورمونی ABA بر بیان ژن *gus* در گیاهان تراریخت توتون نشان داد که تحت تأثیر هورمون ABA بیان ژن *gus* در گیاهان تراریخته حاوی پیشبر *Rd29A* القاء می‌گردد.

همان گونه که ذکر شد ABA به عنوان یک علامت یا سیگنال در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار دارند عمل می‌کند. نقش اصلی ABA در تنظیم بیان ژنهایی است که در داخل سلول تحت شرایط تنش اسمزی قرار می‌گیرند و در نهایت باعث تنظیم شرایط اسمزی و تعادل آبی در سلولهای محافظ سلول می‌شود (۵).

پیشبر *Rd29A* حاوی حداقل دو نوع از عناصر فعال *cis* می‌باشد که در مسیر القای ژن *rd29A* توسط کم‌آبی، شوری بالا و دمای پایین درگیر است. یکی از این عناصر *DRE* است که در شرایط تنش دمای پایین شوری و خشکی عمل می‌کند. پیشبر *Rd29A* حاوی سه موتیف *DRE*عملکردی است. تظاهر ژن وابسته به *DREB1* به وسیله دمای پایین و تجمع پروتئینهای DREB1 در شروع القاء تظاهر ژن وابسته به *DRE*، *rd29A* نقش دارد (۱۳). *DRE* هم‌چنین در اولین فرصت (۲۰ دقیقه) روی پاسخ دهی به تنش کم‌آبی و شوری در *rd29A* تأثیر می گذارد.

پروتئینهای DREB2 تحت شرایط شوری بالا و خشکی فعال شده سپس باعث فعال شدن ژن *rd29A* وابسته به *DRE* می‌شوند. ABA در این فرآیند سریع، هیچ نقشی ندارد به طوری که بیوسنتز ABA در یک ساعت اولیه کم آبی مشاهده نشده است. دیگر عنصر *cis* فعال ABRE می باشد. این عنصر در القای آهسته و ثانویه *rd29A* بعد از تجمع ABA تحت شرایط تنش کم‌آبی و شوری بالا نقش ایفاء می‌کند. بیوسنتز ABA تحت شرایط تنش شوری بالا و کم آبی بعد از ۲ ساعت اتفاق می‌افتد و تجمع ABA باعث القای بیان ژن *rd29A* می‌شود (۱۲). تظاهر ژنهای *ABRE* به وسیله تنشهای شوری و خشکی القاء می‌شود و سپس پروتئینها AREB تجمع یافته مانند فعال کننده‌های نسخه‌بردار در تظاهر ژنهای *rd29A* وابسته به ABA عمل می‌کنند. به علاوه برهمکنش بین سیستمهای تنظیمی *DREB/DRE* و *AREB/ABRE* برای تظاهر آرام *rd29A* در شرایط خشک و شوری بالا و ABA خارجی ضروری می باشد. این ترکیبات عمومی ممکن است به عنوان عوامل هم‌افزایشی واسطه باشند که بین تنشهای اسمزی و پاسخ به ABA عمل کنند. این مطالعات پیشنهاد می‌کند که بر همکنش *DREB* با *AREB* در تظاهر ژنهایی که با ABA القاء می‌شوند در بافتهای رویشی تحت تنش نقش ایفاء می‌کند (۲۲). بنابراین با توجه به حضور عنصر *ABRE* در پیشبر *Rd29A* به نظر می‌رسد تنش خشکی و شوری به احتمال زیاد با استفاده از این سیگنال در القای پیشبر عمل می‌کنند.

در آزمایشهای انجام شده توسط Xiong و همکاران (۲۲) تأثیر همزمان تنشهای غیرزیستی بر روی بیان ژن *luc* مورد بررسی قرار گرفت. این محققان با انتقال ژن *luc* تحت کنترل پیشبر *Rd29A* به گیاه آرابیدوپسیس مشاهده کردند که در شرایط دمای طبیعی (۲۲ درجه سانتی‌گراد) تنش اسمزی و ABA اثر هم افزایی بر بیان ژن *luc* دارد. همچنین، جایگزینی پیشبر *CaMV35S* با *Rd29A* در بیان ژن *DREB1A* نشان داد که این پیشبر ضمن اینکه اثرات

Archive of SID

www.SID.ir

منفی بر رشد گیاه را تا حد زیادی کاهش می‌دهد باعث القای بیان ژن *DREB1A* در شرایط تنشی نیز می‌شود (۱۰، ۱۱).

Wu و همکاران (۲۱) با انتقال ژن *gfp* تحت کنترل پیشبر *Rd29A* به گیاه نیشکر نشان دادند که تحت تیمار حشکی بیان ژن *gfp* در این گیاه القاء می‌شود. جفرسون و همکاران (۹) نشان دادند که بیان ژن *gus* تحت پیشبر *CaMV35S* تحت هر شرایطی القاء می‌شود که این نتیجه در طی پژوهش حاضر هم به دست آمد. Renying و همکاران (۱۶) از ژن *BADH* تحت پیشبر *Rd29A* جهت انتقال به گیاه عنبر سائل (*Liqudambar formosana* L.) استفاده کردند. نتایج به دست آمده نشان دادند که ژن *BADH* تحت پیشبر *Rd29A* در شرایط تنش شوری بیان می‌شوند. همچنین در گیاهانی که با ژن *BADH* و پیشبر *Rd29A* تراریخت شدند فعالیت SOD (سوپراکسید دیسموتاز) و POD (پراکسیدازها) تحت تنش شوری افزایش پیدا می‌کند.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش پیشبر *Rd29A* همسانه‌سازی شده از گیاه آرابیدوپسیس تحت شرایط تنشی القاء می‌شود. بنابراین، اگر ژنهای مؤثر در تحمل به تنشهای غیرزیستی تحت کنترل این پیشبر جهت افزایش مقاومت گیاهان به این تنشها مورد استفاده قرار گیرند اثرات سوء ناشی از فرابیان دائمی ژنها را می‌توان تا حد زیاد مرتفع کرد.

منابع

۱. جعفریه یزدی ا، مجد ا، فلاحیان ف، خاور نژاد ر، برنارد ف، جاویدفر ف (۱۳۸۵) بررسی اثر تنش خشکی و آبسزیک اسید برونزاد بر ساختار مریستم زایشی، دانه های گرده، صفات ریخت شناسی، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه کلزا (Brassica napus). مجله زیست شناسی ایران، جلد ۱۹، ص ۱۲۵-۱۳۵.

۲. دولت آبادیان آ، مدرس ثانوی س ع م، شریفی م (۱۳۸۸) اثر تنش کم آبی و محلول پاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea maize* L.). مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، ص ۴۰۷-۴۲۲.

3. Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V. and Sharma, K. K. (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. Plant Cell Reports, 27: 411-24.

4. Capell, T., Escobar, C., Lui, H., Burtin, H., Lepri, O. and Christou, P. (1998) Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. Theoretical and Applied Genetics, 97: 246–254.

5. Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, SY. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. Journal of Biological Chemistry, 275: 1723–1730.

6. Dellaporta, S. L, Wood, J. and Hicks J. B. (1983) A plant DNA minipreprationr: version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.

7. Gao, S. Q., Chen, M. and Ma, Y. Z. (2005) Activity of *rd29A* promoter in wheat immature embryonic calli. Acta Agronomica Sinica, 31: 150-153.

8. Horsch, R.B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229- 1231.

9. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) Gus fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. EMBO Journal, 6: 3901-3907.

10. 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.

11. Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. Plant Cell Physiology, 45: 346–350.

12. Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994) Cloning of cDNA for

Archive of SID
www.SID.ir

genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of *three* ERDs as HSP cognate genes. Plant Mol. Biol., 25: 791-798.

13. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis.* Plant Cell, 10: 1391–1406.
14. Murashig, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plantarum 15: 473-479.
15. Rai M., He, C. and Wu, R. (2009) Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. Transgenic Research, 18: 787–799.
16. Renying, Z., Guirong, Q. and Zongxiu, S. (2007) Transgene expression in Chinese sweetgum driven by the salt induced expressed promoter. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 88:101–107.
17. Romero, C., Belles, J.M., Vaya, J.L., Serrano, R. and Culianez-Macia, F.A. (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. Planta, 201: 293–297.
18. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Rapid isolation of yeast DNA. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
19. Shinwari, Z.K. (1999) Function and regulation of genes that are induced by dehydration stress. Bioscience Agric 5: 39–47.
20. Sun, X. H. and Chen, M. J. (2002) A Brief Account of Promoter Cloning. Acta Edulis Fungi 9: 57-62.
21. Wu, Y., Zhou, H., Que, Y. X., Chen, R. K. and Zhang, M. Q. (2008) Cloning and identification of promoter Prd29A and its application in sugarcane drought resistance. Sugar Tech., 101: 36-41.
22. Xiong, L., Ishitani. M. and Zhu, J. K. (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. Plant Physiology, 119:205–211.
23. Zhang, J., Jia, W., Yang J. and Ismail, A. M. (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crops Research, 97: 111–119.
24. Zhang, N., Si, H. J. and Wang, D. (2005) Cloning of *rd29A* gene promoter from *Arabidopsis thaliana* and its application in stress-resistance transgenic potato. Acta Agronomica Sinica, 31:159-164.
25. Zhu, X. Y., Jing, Y., Chen, G. C., Wang, S. M. and Zhang, C. L. (2003) Solute levels and osmoregulatory enzyme activities in reed plants adapted to drought and saline habitats. Plant Growth Regulation, 41: 165-172.

Archive of SID

www.SID.ir

Cloning and functional analysis of inducible promoter *Rd29A* in transgenic tobacco plants

Rahnama H. and Vakilian H.

Iran Agricultural Biotechnology Research Center, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Stress inducible promoters are key elements in development of transgenic abiotic resistant plants. Abiotic stress inducible promoter *Rd29A* was cloned by Polymerase chain reaction (PCR) from *Arabidopsis thaliana* genomic DNA. pBI-RD-GUS binary vector constructed by replacing *CaMV35S* promoter of vector pBI121 by *Rd29A*. The new recombinant vector pBI-RD-GUS as well as pBI121 was transferred to tobacco by *Agrobacterium tumefaciencs* system. PCR and GUS histochemical assay of transgenic tobacco plants confirmed transformation events. Stress induciblity of the promoters studied by histochemical GUS assay of transgenic leaves under stress conditions. The assay showed that promoter *Rd29A*, in contrast of *CaMV35S*, induced by dehydration, NaCl and ABA. *Rd29A* induction by ABA confirmed the signaling role of it in stress signal transduction pathways. Therefore, if abiotic stress resistance genes are driven by *rd29*A in the transformed plant, the disadvantage, like small figure, low growth rate etc, to transgenic plant due to the over-expression of exogenous genes can be greatly reduced.

Key words: Abiotic stress, Inducible Promoter, *Nicotiana tabbacum*, *Rd29A*, Transformation

Archive of SID

www.SID.ir