

انتقال عامل رونویسی *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 کارشناسی ارشد، دانشیار و کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز

Yarizade A¹, Niazi A^{*1}, Sazegari S¹

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 مضر 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 به ABA 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 می‌شوند. بیان ژن *WDREB2* یا *TaDREB* تحت تاثیر تنش خشکی، سرما، اسیدآسیزیک 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 پایین دست و بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی شود.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن
تنش‌های غیرزیستی
عامل رونویسی *WDREB2*
گندم
Real time PCR

مقدمه

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 اسیدآبسیزیک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Liu et al. 2008). در برنج انتقال ژن‌های *ABF3* و *CBF3/DREB1A* 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 C58 و LBA4404 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 *NPTII*) بوده و ژن *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز *CaMV35S* و خاتمه‌دهنده NOS قرار دارد. مکان‌های مربوط به آنزیم برشی *BamHI* در سمت ۵' و آنزیم برشی *SacI* در سمت ۳' ژن قرار دارد (شکل ۱). یک کلنی از آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نو ترکیب pBI121 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت

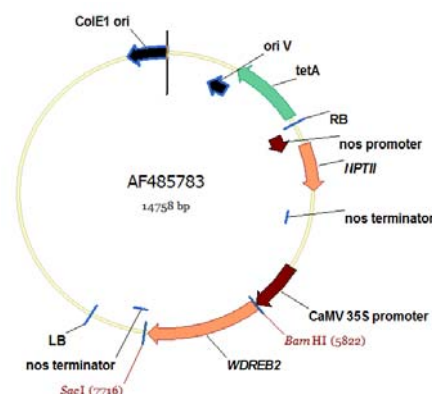
فرآورده‌های ژن‌های القاپذیر به وسیله تنش در گیاهان را می‌توان به دو گروه تقسیم‌بندی کرد: گروه اول پروتئین‌هایی که در تحمل به تنش‌های غیرزیستی فعالیت می‌کنند مانند چاپرون‌ها، اسموتین، پروتئین‌های ضد انجماد، آنزیم‌های کلیدی برای بیوستتر اسمولیت‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و پروتئین‌های متعدد. گروه دوم پروتئین‌های 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 آبسزیک و دو مسیر تنظیمی مستقل از اسید آبسزیک وجود دارند. مسیرهای وابسته به اسید آبسزیک شامل ژن‌های *AREB/ABF*، *MYB* و *MYC* و مسیرهای مستقل از اسید آبسزیک شامل خانواده عوامل رونویسی *AP2/ERF* است که دارای زیر خانواده (*AP2*) *ERF*، *APETALA2*، *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 انتهایی 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

مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بذره‌های 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 (جدول ۱) 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 جنین‌های کشت شده روی محیط پیش‌کشت، به زیر هود منتقل شدند. ۴۰۰ میکرو مولار استوسرینگان، ۷۹ میکرو لیتر عصاره توتون و توین ۲۰ با غلظت ۰/۱ درصد به محلول باکتری اضافه شد. جنین‌ها به فالكون حاوی محلول باکتری انتقال در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از یک ساعت، جنین‌ها در زیر هود به تشک پتری حاوی محیط هم‌کشتی منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۴ روز تشک‌های پتری زیر هود منتقل شد و جنین‌ها به کاغذ صافی اتوکلاو شده منتقل سپس شستشوی جنین‌ها با آنتی‌بیوتیک سفوناکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. بعد از ۴۰-۳۰ ثانیه جنین‌ها به محیط استراحت منتقل و در شرایط اتاق رشد نگهداری شدند. بعد از یک هفته گیاهان به محیط انتخابی دارای ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین (جدول ۱) 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

(Murashige and Skoog 1962) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک‌های 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 ۵۰۰ 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.



شکل ۱- 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 آنتی‌بیوتیک‌های 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 فالكون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی الکل ۷۰ درصد ریخته و به مدت ۹۰ ثانیه تکان داده شد. سپس الکل خارج، هیپوکلریت سدیم دو درصد و ۲۴۰ میکرو لیتر ترایتون ۱۰ درصد (ترایتون ۱۰۰X) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه شیک شدن، بذرها را ۴-۵ بار با آب مقطر اتوکلاو شده در زیر هود شستشو و در تشک 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

جدول ۱- ترکیب‌های محیط کشت‌های مختلف مورد استفاده در تراریختی گیاهان گندم

ترکیب	نوع محیط
پیش کشت	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر
هم کشتی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، استوسرینگون ۴۰۰ میلی گرم در لیتر، BAP یک میلی گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی گرم در لیتر
محیط استراحت	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی گرم در لیتر
انتخابی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی گرم در لیتر، BAP یک میلی گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی گرم در لیتر، جنتامایسین ۵۰ میلی گرم در لیتر
باززایی	MS ۴/۴ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی گرم در لیتر، BAP یک میلی گرم در لیتر، NAA ۰/۰۱۸ میلی گرم در لیتر، جنتامایسین ۲۵ میلی گرم در لیتر
ریشه زایی	MS ۲/۲ گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کازئین هیدرولیزات ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر، BAP یک میلی گرم در لیتر، NAA ۰/۱۸ میلی گرم در لیتر، سولفات مس دو میلی گرم در لیتر، سفوتاکسیم ۴۰۰ میلی گرم در لیتر

آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. همچنین با استفاده از آغازگرهای تخصصی ژن *WDREB* واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 پلیمرز 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 پلیمرز 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

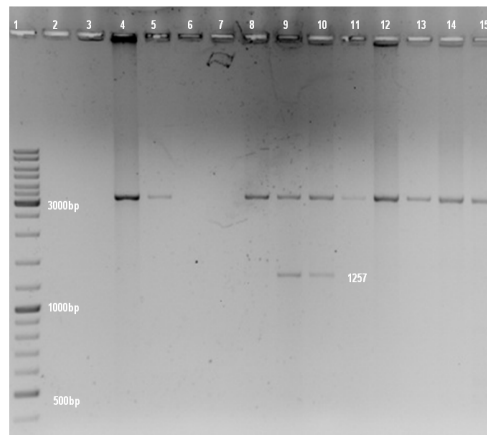
اختصاصی ژن *WDREB2* با توالی‌های آغازگر 5'-CGGGATCCGACAAGATTGCGAACGCTAGA-3' و 3'-CGGAGCTCCCAGCAAACACCATAGACA-5' و استفاده شد. در این واکنش پلاسمید دارای ژن *WDREB2* به عنوان کنترل مثبت و گیاه گندم غیر تراریخت به عنوان کنترل استفاده شدند. پس از اتمام واکنش، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی 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 RNXTM (-Plus) شرکت سیناژن انجام شد. به منظور حذف آلودگی ژنومی RNA های استخراج شده از آنزیم DNase I شرکت فرمتاز 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 پلیمرز انجام شد که هیچ گونه آلودگی مشاهده نشد. سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت فرمتاز 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

LBA4404 تأثیر 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 تأثیر گذار پاسخ گندم به باززایی در کشت بافت است (Farooq et al. 2004; Dodig et al. 2006; Mitic et al. 2006) به تنش شيراز 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 تأثیر 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 پائینی 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

تراریخت و عدم وجود آن در گیاه شاهد، تراریخت بودن گیاهان گندم و حضور ژن *WDREB2* در ۲۰ عدد از گیاهان باززایی شده را تایید می‌کند (شکل ۲). همچنین جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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.

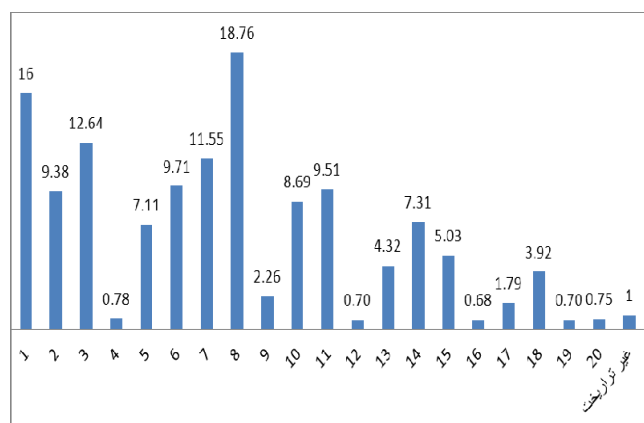


شکل ۲- الگوی الکتروفورزی محصول PCR با آغازگر تخصصی ژن *WDREB2* (۱ نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ۲ کنترل منفی؛ ۴ کنترل مثبت؛ ۵ گیاه شاهد، ۱۰ و ۱۱ باند ۱۲۵۷ جفت بازی حاصل از آغازگر تخصصی ژن *WDREB2* که ژن انتقال یافته را نشان می‌دهد. عدم مشاهده باند ۱۲۵۷ در بقیه نمونه‌ها عدم تراریختی را نشان می‌دهد.

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 (شکل ۲).

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،

می کنند که ژن *DREB2* عاملی مهم در تنظیم بیان ژن های وابسته به تنش بوده و ژن های *DREB* تنظیم کننده مرکزی پاسخ به تنش های محیطی و تحمل در گیاهانی که در معرض شرایط متغیر محیطی قرار می گیرند، می باشند. بنابراین دست یابی به سطح بیان بالای این عوامل رونویسی که منجر به بیان بیشتر مجموعه ای از ژن های پاسخ دهنده به تنش می شوند، باعث بهبود تحمل گیاهان نسبت به تنش های مختلف شده و افزایش محصول در شرایط تنش را در پی خواهد داشت.



شکل ۳- الگوی بیان ژن *WDREB2A* در گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد با روش Real-time PCR. نمودارهای ستونی نشان دهنده مقدار کمی شده بیان ژن انتقال یافته تحت راه انداز قوی CaMV35S می باشد که در اکثر نمونه ها افزایش بیان چشمگیری نسبت به گیاه شاهد مشاهده می شود.

نتیجه گیری

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

داخلی گیاهان تک لپه نسبت به این آنتی بیوتیک نسبت می دهند (Wlimink and Dons 1993). هنگامی که ژن *NptII* به عنوان نشانگر گزینشگر مورد استفاده قرار می گیرد و عامل انتخابی کانامایسین از کارایی لازم برخوردار نباشد، استفاده از دیگر آنتی بیوتیک های مشابه مانند جنتامایسین پیشنهاد می شود. 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 بافت های تراریخت سبز باقی ماندند.

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 نشان دهنده میزان بیان بالای ژن در بیشتر گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد غیرتراریخت می باشد (شکل ۳). در این گیاهان افزایش بیان بین ۲ تا ۱۹ برابر نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد. عدم افزایش بیان در بعضی از نمونه های مثبت می تواند به دلیل قرار گرفتن ژن در مناطق هتروکروماتینی باشد. این نتایج به دو دلیل می تواند ارزشمند باشد، اول این که کارایی مناسب راه انداز 35S جهت بیان ژن در گیاهان تک لپه را نشان می دهد و دوم اینکه بیان بسیار بالای ژن *WDREB2* می تواند باعث افزایش بیان ژن های پایین دست شده و بهبود تحمل به تنش های مختلف محیطی را باعث شود. مطالعات قبلی این را ثابت می کند که بیان افزایش یافته ژن *WDREB* تحت راه اندازهای مختلف منجر به تجمع محصولات ژن های پایین دست القا پذیر به وسیله تنش و بهبود تحمل به انواع تنش های محیطی غیرزیستی شده است. به عنوان مثال بیان افزایش یافته *OsDREB2B* در آرابیدوپسیس باعث افزایش بیان ژن های هدف *WDREB2A* و تحمل به تنش های 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 پژوهش های انجام شده ثابت

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.

انتقال داده شد که بیان بسیار بالای این ژن در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با توجه به بیان بالای بدست آمده انتظار می‌رود ژن‌های 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

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. *Biotechnologia 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, Kurdistan 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.

- 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, Vishnudasana 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-Shinozaki 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-Doering 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.