نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲ (ص۶۴۴-۶۳۵)

همسانه‌سازی عامل رونویسی *WDREB2* گندم در ناقل بیان pBI121 و انتقال به گوجه‌فرنگی به‌منظور ایجاد تحمل به تنش سرما

سیما سازگاری[۱] و علی نیازی[۲*]
۱ و۲، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۹/۱۳)

چکیده

تنش‌های غیرزیستی از قبیل خشکی و سرما، تأثیرات مضری بر رشد و عملکرد گیاهان دارند و تحمل به آنها از جمله اهداف اصلی اصلاح گیاهان بوده است. افزایش تحمل به چند تنش با استفاده از انتقال یک ژن تنظیمی مانند عوامل رونویسی که در مسیرهای تنظیمی متعددی دخالت دارند، ممکن است. تحقیقات انجام‌گرفته تاکنون حاکی از موفقیت در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزنده با استفاده از عوامل تنظیمی بوده است. این پژوهش با هدف همسانه‌سازی ایزوفرم آلفا ژن *WDREB2* در ناقل بیان مناسب گیاهی و انتقال این ژن به گیاه گوجه‌فرنگی به‌منظور بهبود تحمل به تنش سرما انجام گرفت. عامل رونویسی *WDREB2* یکی از عوامل رونویسی مهم در گندم بوده و در تحمل به تنش‌های غیرزیستی مؤثر است. همسانه‌سازی ژن *WDREB2* در ناقل بیان pBI121 و انتقال این ژن به گیاه گوجه‌فرنگی توسط *tumefaciens Agrobacterium* سویهٔ C58 انجام گرفت. به‌منظور تأیید تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی استخراج DNA و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. وجود قطعهٔ مربوط به ژن *WDREB2*، تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی را تأیید می‌کند. تأیید بیان ژن *WDREB2* با استفاده از تکنیک RT PCR پس از استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. زیست‌سنجی گیاهان تراریخت و شاهد با تیمار گیاهان در دمای۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌منظور اعمال تنش سرما انجام گرفت. مقایسهٔ علائم فنوتیپی تنش سرما بین گیاهان شاهد و تراریخت، نقش این ژن را در القای تحمل تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: **انتقال ژن، تنش سرما، عامل رونویسی *WDREB2*، گوجه‌فرنگی.**

مقدمه

گیاهان در طول زندگی خود با گسترهٔ وسیعی از تنش‌های محیطی روبه‌رو هستند. خشکی و سرما از تنش‌های اصلی محیطی هستند که رشد گیاهان را به‌شدت محدود می‌کنند. آثار منفی این دو تنش بر گیاه، بسیار مشابهند و بیشتر مسیرهای بررسی‌شده در پاسخ‌های مولکولی و فیزیولوژیکی گیاهان به این تنش‌ها مشترک است(Shinozaki *et al*., 2000). تحمل به تنش‌های غیرزیستی، همواره از اهداف مهم اصلاح نباتات کلاسیک بوده است. مهندسی ژنتیک از طریق جداسازی و انتقال ژن‌های مؤثر، به افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی منجر شده است. با استفاده از فنون انتقال ژن، موانع انتقال ژن‌های مفید به گیاهان رفع شده و با حفظ خصوصیات مطلوب گیاه، ژن‌های مفید از هر منبعی، در مدتی کوتاه‌تر از روش‌های سنتی به ژنوم گیاه وارد می‌شوند. ازآنجا که تحمل به تنش‌های غیرزیستی از جمله صفات کمی است و تعداد زیادی ژن آن را کنترل می‌کنند، انتقال و بیان یک ژن عملکردی نمی‌تواند به تغییرات کامل در پاسخ گیاه به تنش‌ها و ایجاد تحمل در سطح مطلوبی در گیاه منجر شود (Sakuma *et al*., 2006). عوامل رونویسی که در تنظیم مسیرهای انتقال پیام (Signal transduction pathway) و بیان ژن‌ها دخیلند، در گروه ژن‌های تنظیمی قرار دارند و کاندیدهای مناسبی برای انتقال و

* نویسنده مسئول: علی نیازی تلفن: ۰۲۶۳۲۲۲۱۴۸۲ E-mail: niazi@shirazu.ac.ir

افزایش تحمل در گیاهان هستند. این عوامل با عناصر تنظیمی سیس موجود در ناحیهٔ راه‌انداز ژن‌های زیادی که در پاسخ به تنش‌ها مؤثرند برهمکنش نشان می‌دهند و سبب تنظیم بیان آنها می‌شوند (Sakuma *et al*., 2006). عوامل رونویسی DREB (Dehydration responsive element binding factor) عضوی از خانوادهٔ AP2/ERF هستند. این خانواده گروه مهمی از عوامل رونویسی را شامل می‌شود که در مسیرهای غیروابسته به ABA در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش بسزایی دارند (Shinozaki *et al*., 2000). عامل رونویسی *WDREB2* یا *TaDREB* در گندم، یک پروتئین متصل به توالی CRT/DRE را کد می‌کند (Nakashima *et al*., 2009). توالی CRT/DRE در ناحیهٔ راه‌انداز ژن‌های پایین‌دست و درگیر در پاسخ به تنش‌های آبی، دماهای کم و غیروابسته بهABA وجود دارند و پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های DREB به این توالی متصل شده و از این طریق سبب تنظیم بیان ژن‌ها می‌شوند (Kasuga *et al*., 1999).

افزایش بیان ژن‌های *DREB1B*/*CBF* (C repeat binding factor/Dehydration responsive element binding یا *DREB1A*/*CBF*3) تحت کنترل راه‌انداز 35S به ایجاد گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت با افزایش تحمل به تنش‌های خشکی، شوری و سرما انجامیده است (Liu *et al*., 1998; Kasuga *et al*., 1999) . تجزیهٔ ترانسکریپتوم گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از تکنیک میکرواری بیش از ۴۰ ژن هدف را برای عامل رونویسی *DREB1*/*CBF* نشان می‌دهد (Maruyama *et al*., 2004). نمونه‌هایی از این ژن‌ها، فسفولیپازC، پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA، پروتئین‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌های LEA و بازدارنده‌های پروتئاز است. تجزیه‌های زیست‌سنجی گیاهان توتون تراریخت نشان داده که بیان فرم گاما عامل رونویسی *WDREB2* تحت راه‌انداز 35S CaMV در توتون، سبب افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی، شوری و سرما شده است (Kobayashi *et al*., 2008). افزایش بیان ژن *CBF*1 آرابیدوپسیس در گوجه‌فرنگی، تحت کنترل راه‌انداز 35S، به افزایش تحمل گوجه‌فرنگی‌های تراریخت نسبت به تنش کم‌آبی انحامیده است، ولی رشد و ارتفاع گیاهان تراریخت، کمتر از گیاهان شاهد بوده است (Hsieh *et al*., 2002).

گوجه‌فرنگی از گیاهان حساس به تنش کم‌آبی و به‌ویژه سرما محسوب می‌شود. مهم‌ترین مراحل حساسیت به سرما در گیاه، مراحل رویشی، تشکیل و رسیدگی میوه است (Weiss & Egea-Cortines, 2009). حساسیت به سرما، دورهٔ رشد این گیاه را محدود می‌کند و بر کیفیت محصول تأثیر نامطلوب می‌گذارد. با توجه به اهمیت تنش‌های غیرزیستی خشکی و سرما و خسارت‌های ناشی از آنها در گیاهان، در این پژوهش ایزوفرم فعال عامل رونویسی *WDREB2* به‌عنوان ژن تنظیم‌کنندهٔ مؤثر در پاسخ به تنش‌های سرما و خشکی در ناقل بیان مناسب، همسانه‌سازی شده به‌منظور بهبود تحمل به تنش‌ها و به گیاه گوجه‌فرنگی انتقال داده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سویه‌های باکتری

به‌منظور تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی از رقم Super-queen استفاده شد که از ارقام دارای عملکرد مناسب است، ولی به‌دلیل دیررس بودن، به تنش‌های محیطی از جمله سرما و خشکی بسیار حساس است. باکتری *Escherichia coli* سویهٔ DH5α و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویهٔ C58 به‌منظور همسانه‌سازی ژن *WDREB2* به‌کار گرفته شد. باکتری‌های مورد نظر از مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز تهیه شد.

همسانه‌سازی ژن *WDREB2* در ناقل بیان pBI121

در این تحقیق از ایزوفرم آلفای ژن *WDREB2* جداسازی‌شده از گندم هگزا پلوئید *Triticum aestivum* برای انتقال استفاده شد (Sazegari & Niazi., 2012). جداسازی این ژن از منبع cDNA، با استفاده از RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی دارای توالی آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I قبلاً صورت پذیرفته و توالی آن در پایگاه NCBI با شمارهٔ دسترسی HQ171443 ثبت شده است. این ژن در ناقل کلونینگ pTZ57RT همسانه‌سازی شده بود. به‌منظور بیان ژن *WDREB2* و ساخت سازهٔ بیان، از ناقل بیان گیاهی pBI121 حاوی ژن *gus* استفاده شد. ژن *gus* در این ناقل تحت کنترل

راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهندهٔ NOS-ter قرار دارد. مکان‌های برشی مربوط به دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I در ناحیهٔ پلی‌لینکر ناقل pBI121، امکان همسانه‌سازی ژن مورد نظر را فراهم کرده است. همسانه‌سازی با استفاده از کیت Cloning Kit(fermentase) صورت پذیرفت. مراحل ساخت سازهٔ بیان ژن *WDREB2* به‌ترتیب به‌صورت استخراج پلاسمید pBI121 به‌روش جوشاندن برای استفاده در واکنش هضم آنزیمی، هضم آنزیمی ناقل گیاهی pBI121 و pTZ با هدف آزاد شدن ژن *gus* و ژن *WDREB2* با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I، خالص‌سازی قطعهٔ مربوط به ژن *WDREB2* و پلاسمید pBI121 هضم‌شده از ژل آگارز براساس دستورالعمل کیت GeneJET™Gel Extraction Kit (fermentas)، تهیهٔ مخلوط ligation برای اتصال ژن *WDREB2* به ناقل بیان PBI121 و انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *Ecoli* سویهٔ DH5α با استفاده از کیت Cloning Kit (fermentase) انجام پذیرفت. به‌منظور تأیید نهایی توالی ژن *WDREB2* پلاسمید نوترکیب pBI 121 به شرکت Macrogen در کرهٔ جنوبی ارسال و تعیین توالی شد. پس از آن، پلاسمید نوترکیب pBI121 استخراج شد و تراریختی پلاسمیدهای pBI121 نوترکیب به درون سلول‌های مستعد *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 به‌روش استاندارد انجماد و ذوب (freeze- thaw) انجام گرفت.

مواد گیاهی و انتقال ژن *WDREB2* به گیاه

انتقال ژن به لپه‌های جوان گیاهان گوجه‌فرنگی صورت گرفت. برای این کار، بذر گیاهان گوجه‌فرنگی پس از ضدعفونی در محیط MS نصف غلظت کشت شد. بذور کشت‌شده تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. لپه‌های جوان ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی بذور به‌عنوان ریزنمونه برای تراریختی استفاده شدند. به‌منظور تهیهٔ محیط کشت گیاهی از محیط کشت MS آماده ساخت شرکت Duchefa استفاده شد. همهٔ محیط‌های کشت استفاده‌شده، بر پایهٔ این محیط با افزودن هورمون و آنتی‌بیوتیک‌های لازم تهیه شدند. جدول ۱ ترکیبات محیط کشت‌های مختلف به‌کاررفته در تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی را نشان می‌دهد.

جدول۱. ترکیبات به‌کاررفته در محیط‌های کشت بافت گوجه‌فرنگی

محیط کشت(Culture medium)	ترکیبات افزوده (Additional components)
محیط کشت بذر(Germination medium)	30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar- MS- pH 5/8
محیط پیش‌کشت (Preculture medium)	2 mg l^{-1} ZT- 30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar-MS- pH 5/8
محیط همکشتCo-cultivation medium-I	30 g l^{-1} sucrose- MS- pH 5/8
محیط همکشتCo-cultivation medium-II	100 µM AS- 2 mg l^{-1} ZT- 0/1 mg l^{-1} IAA- 30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar- MS- pH 5/2
محیط انتخابی شاخه‌زاییSelection medium	50 mg l^{-1} kanamycin- 200 mg l^{-1} timentin- 1 mg l^{-1} ZT- 0/1 mg l^{-1} IAA- 30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar- MS- pH 5/8
محیط انتخابی ریشه‌زاییRooting medium-I	50 mg l^{-1} kanamycin- 200 mg l^{-1} timentin- 0/2 mg l^{-1} IAA- 30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar-MS- pH 5/8
محیط ریشه‌زاییRooting medium-II	50 mg l^{-1} kanamycin- 30 g l^{-1} sucrose- 8 g l^{-1} agar- MS- pH 5/8

به‌منظور کشت اگروباکتریوم و آماده‌سازی برای تلقیح از محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ریفامپیسین با غلظت ۵۰ µg/ml استفاده شد. باکتری کشت‌داده‌شده ۱۰ برابر با LB مایع رقیق شد و ۴ ساعت در شرایط تاریکی در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشد کند. باکتری‌های

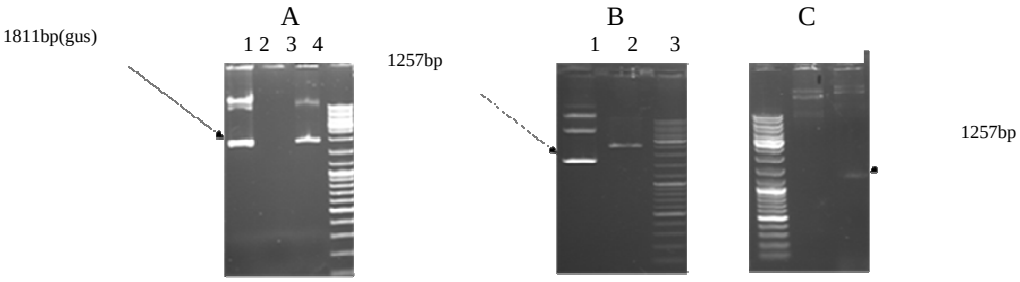
رشدیافته در دمای محیط و با سرعت g ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در ml۱۰ از محیط همکشتیI حل شد و برای تلقیح ریزنمونه‌ها به‌کار گرفته شد. برای تلقیح لپه‌های جداشده از گیاهچه‌ها پس از ایجاد زخم و نگهداری در محیط پیش‌کشت به‌مدت ۴۸ ساعت، در سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شد. پس از اجرای مراحل تلقیح و کشت ریزنمونه‌ها در محیط همکشتی به‌مدت ۷۲ ساعت، به‌منظور بازیابی مستقیم، ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی شاخه‌زایی برای شش هفته منتقل شدند. پس از خارج شدن جوانۀ ساقه، رشد نوساقه‌ها و برگ‌های اولیه، گیاهچه‌ها به محیط ریشه‌زایی I و II به‌مدت دو و یک هفته منتقل شدند. پس از ظهور و رشد ریشه‌ها در محیط ریشه‌زایی I و II، گیاهچه‌های تراریخت به گلدان‌های با خاک کاملاً استریل منتقل شده و روی گلدان‌ها به‌منظور حفظ رطوبت، با پلاستیک پوشانده شد. تغذیۀ گیاهان طی این مدت تا رسیدن به رشد مناسب، با محیط MS مایع با غلظت ۱/۴ صورت گرفت.

تأیید تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی

برای تأیید تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی، استخراج DNA به‌روش CTAB از برگ گیاهان گوجه‌فرنگی انجام گرفت (Gawel *et al.*, 1991). برای تکثیر ژن *WDREB2* واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SDREB طراحی‌شده به‌وسیلۀ نرم‌افزار VectorNTI با توالی'5'CGGGAGCCAAATCGGGTGAG3 و '5'GGTCCAAGCCATCCAGGTAGAGAGG3 از ارقام گندم به‌عنوان کنترل مثبت، گوجه‌فرنگی شاهد و تراریخت انجام گرفت. به‌منظور تأیید و بررسی بیان ژن *WDREB2* در سطح RNA از تکنیک Real-timePCR استفاده شد. استخراج RNA از لاین‌های تراریخت تأییدشده با PCR، ارقام شاهد گوجه‌فرنگی و همچنین از گندم با استفاده از کیت(Plus-) RNX^{TM} شرکت سیناژن انجام گرفت. پس از استخراج RNA به‌منظور حذف آلودگی RNA، تیمار با آنزیم DNase صورت گرفت. برای اطمینان از صحت اجرای مراحل استخراج، ۵ میکرولیتر از کل RNA استخراج‌شده بر روی ژل الکتروفورز شد. غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ تعیین شد. سنتز رشتۀ اول cDNA از غلظت یکسان از تمام RNAهای استخراج‌شده با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت fermentas و آغازگر oligo dT صورت گرفت. واکنش RT PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی RDREB طراحی‌شده به‌وسیلۀ نرم‌افزار VectorNTI با توالی 5'AGGATGCTGCCCGTGCTTATG3' و '5'TCTGAGTGGTTGGTGGATGTTGTAG3 برای ژن *WDREB2* انجام شد. واکنش real-time PCR با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq II شرکت تاکارا صورت گرفت. به‌منظور مقایسۀ تحمل گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت با گیاهان شاهد از روش زیست‌سنجی استفاده شد. برای بررسی زیست‌سنجی گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد، لاین‌های گوجه‌فرنگی تراریخت تأیید شد و لاین‌های گوجه‌فرنگی شاهد به انکوباتور با دمای ثابت ۴ درجۀ سانتی‌گراد به‌منظور اعمال تنش سرما انتقال یافتند. تأثیر تنش سرما بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان در فواصل زمانی معین ۴، ۱۰ و ۲۴ ساعت بررسی شد.

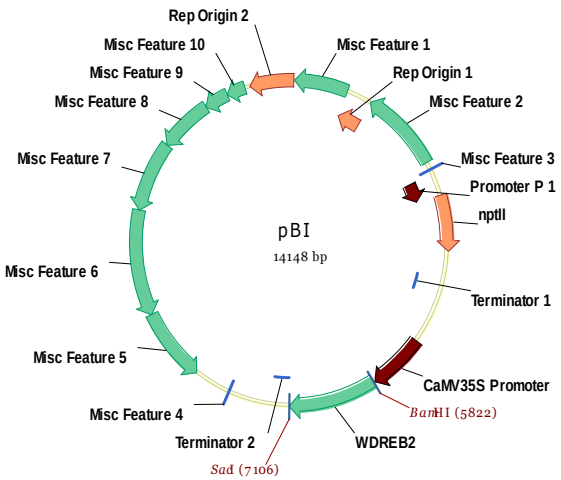
نتایج و بحث

هضم آنزیمی ناقل pBI با هدف آزاد شدن ژن *gus* (شکل ۱A) و هضم آنزیمی ناقل *WDREB2* +pTZ با هدف آزاد شدن ژن *WDREB2* (شکل ۱B) با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I انجام گرفت و بعد از آن همسانه‌سازی با استفاده از کیت کلونینگ Fermentas صورت پذیرفت. به‌منظور تأیید حضور ژن *WDREB2*، استخراج پلاسمید و هضم سازۀ ساخته‌شده با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از کلونی‌های نوترکیب صورت گرفت (شکل ۱C). استفاده از دو آنزیم برای همسانه‌سازی، نیاز به تعیین جهت صحیح قرارگیری ژن در ناقل را مرتفع کرد. در سازۀ مورد نظر، ژن *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S قرار دارد. این سازه خصوصیات مناسب برای تراریختی گیاه با استفاده از اگروباکتریوم را داشته و وجود ژن تحمل به کانامایسین، امکان انتخاب گیاهان تراریخت باززایی‌شده را فراهم کرده است (شکل ۲).

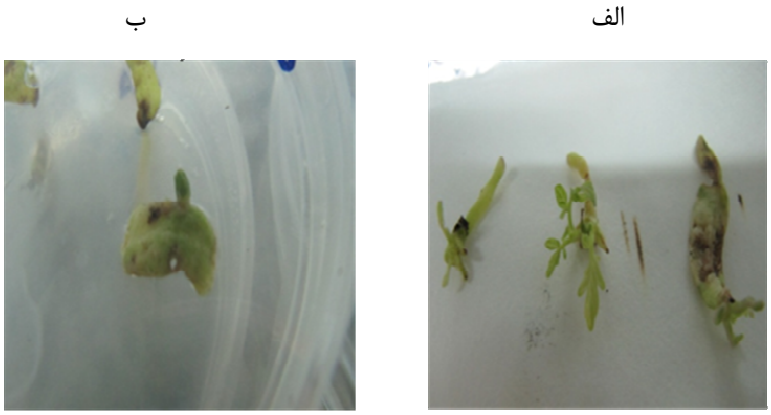


شکل ۱A. الکتروفورز محصول هضم ناقل pBI با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I جهت آزاد شدن ژن *gus* به طول ۱۸۱۱bp.راهک ۱ و۳ . ناقل pBI برش‌یافتهٔ دارای ژن *gus*. راهک۴. نشانگر وزنی۱۰۰ bp؛ شکل ۱B. نقوش الکتروفورز محصول هضم ناقل pTZ دارای ایزوفرم آلفا ژن *WDREB2* جهت آزادسازی ژن (۱۲۵۷bp)*WDREB2*. راهک ۱- ناقل pTZ هضم‌شده. راهک۲. ناقل pTZ هضم‌نشده. راهک۳. نشانگر وزنی۱۰۰bp؛ شکل ۱C. نقشهٔ الکتروفورزی محصول هضم ناقل PBI121 دارای ایزوفرم آلفای ژن *WDREB2* با آنزیم‌های برشی BamHI و *Sac*I. راهک ۱. نشانگر وزنی ۱۰۰ bp. راهک۲. ناقل pBI هضم‌نشده. راهک۳. ناقل pBI هضم‌شده.

سازهٔ نوترکیب pBI121+*WDREB2* به اگروباکتریوم منتقل شد و پس از تأیید مجدد با اجرای PCR و برش با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I ، برای انتقال به کوتیلون‌های گیاه گوجه‌فرنگی استفاده شد. با توجه به اینکه گوجه‌فرنگی از جمله گیاهان حساس به تنش‌های سرما و کم‌آبی محسوب می‌شود (Bhatnagar *et al.*, 2009)، انتقال و بیان ژن *WDREB2* با هدف بهبود تحمل به تنش سرما در گیاه گوجه‌فرنگی انجام گرفت. عوامل متعددی از جمله نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیبات محیط کشت، ساختار ناقل بیان و سویهٔ اگروباکتریوم استفاده‌شده، در تراریختی گیاه گوجه‌فرنگی به‌وسیلهٔ اگروباکتریوم مؤثر است. اگرچه در کشت بافت و باززایی گیاه گوجه‌فرنگی ریزنمونه‌های مختلف مانند برگ‌های بالغ، ساقه، محور زیر لپه و لپه استفاده می‌شود، در بیشتر تحقیقات بررسی‌شده، برای انتقال ژن به گوجه‌فرنگی ریزنمونهٔ لپه کاربرد دارد (Chyi & Phillips., 1987; Frary & Earle.,1996). در این تحقیق نیز از لپهٔ جوان گیاهچه‌های ۱۵-۱۰روزه قبل از خروج برگ‌های اولیه برای تراریختی استفاده شد. پس از مراحل تلقیح و همکشتی ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی شاخه‌زایی منتقل شدند. بعد از خروج شاخه از کناره‌های لپه‌ها و ظاهر شدن برگ‌های اولیه، انتقال شاخه‌های باززایی‌شده دارای برگ‌های اولیه به محیط ریشه‌زایی صورت گرفت (شکل ۳).



شکل۲. نقشهٔ سازهٔ pBI + *WDREB2*. شکل نشان‌دهندهٔ ناقل pBI121 نوترکیب حاوی ژن *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S است.



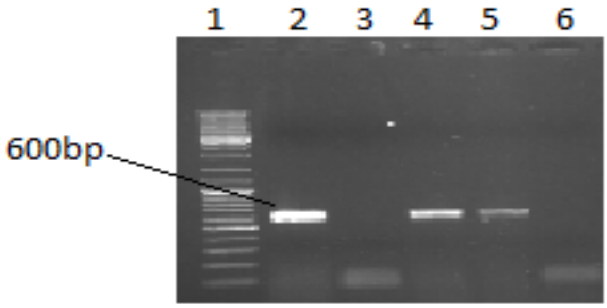
شکل ۳. شاخه‌زایی ریزنمونه‌های لپهٔ گوجه‌فرنگی در محیط انتخابی شاخه‌زایی. الف) شاخهٔ رشدیافته همراه با جوانه‌های برگ؛ ب) جوانهٔ ساقهٔ خارج‌شده از کنارهٔ لپه.

به‌منظور ریشه‌زایی در گیاهان باززایی‌شده از هورمون IAA استفاده شد، هرچند که به‌دلیل تمایل زیاد گیاهان گوجه‌فرنگی در ریشه‌زایی، افزودن هورمون چندان لازم نیست (شکل۴). بعد از ظهور جوانه‌های ریشه و توسعهٔ آنها، گیاهان جوان باززایی‌شده به‌منظور سازگاری، به خاک استریل منتقل شدند. در این مدت تغذیهٔ گیاهان با محیط MS مایع بدون قند صورت گرفت و به‌منظور حفظ رطوبت، پوشش پلاستیکی روی گلدان‌ها قرار داده شد.

شکل ۴. ریشه‌زایی گیاه باززایی‌شده در محیط انتخابی. الف) ریشهٔ خارج‌شده از گیاه؛ ب)گیاه در محیط ریشه‌زایی ج و د)گیاهان جوان باززایی‌شدهٔ منتقل‌شده به خاک در مرحلهٔ سازگاری.

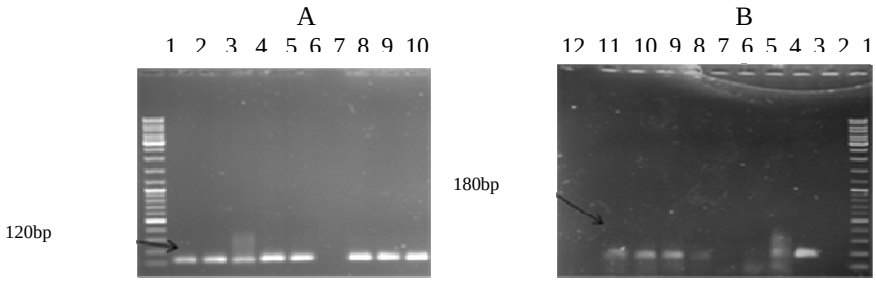
برای تأیید تراریختی، استخراج DNA و واکنش PCR بر روی گیاهان تراریخت احتمالی و شاهد انجام گرفت. پس از پایان واکنش، محصول واکنش روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل۵). وجود قطعهٔ ۶۰۰bp در گندم و گیاهان گوجه‌فرنگی، تراریختی و حضور ژن *WDREB2* را در گیاهان گوجه‌فرنگی بازیابی‌شده تأیید می‌کرد. عدم مشاهدهٔ قطعه در گیاهان غیرتراریخت بیانگر نبود این ژن در ژنوم گیاه گوجه‌فرنگی است. این ژن در شرایط نرمال در گیاه وجود ندارد و عامل رونویسی گندم است، هرچند که توالی‌های مشابه ژن *CBF* در گوجه‌فرنگی مشخص شده است. برای تأیید بیان ژن *WDREB2* در گیاهان تراریخت استخراج RNA از برگ گیاهان تراژنی و گیاه شاهد صورت گرفت. از آنجا که انتقال این ژن به

گوجه‌فرنگی تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S صورت گرفته و بیان ژن به‌صورت دائمی انجام می‌گیرد، برای بررسی بیان ژن به اعمال تنش غیرزنده نیاز نیست.



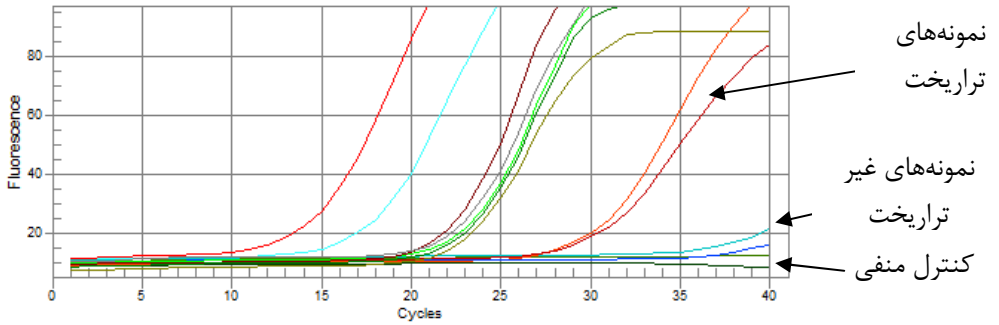
شکل ۵ . نقوش الکتروفورزی PCR محصول با آغازگر SDREB4 از نمونهٔ برگ گیاه گوجه‌فرنگی تراریخته با سازهٔ PBI121+WDREB.۱- نشانگر وزنیbp ۱۰۰، ۲. باند bp ۶۰۰ حاصل از آغازگر SDREB درگیاه گندم، ۳.گوجه‌فرنگی شاهد، ۵،۴. باند bp ۶۰۰ حاصل از آغازگر SDREB درگیاه گوجه‌فرنگی تراریخته، ۶.کنترل منفی.

علاوه بر این استخراج RNA از برگ گیاهان گندم غیرتراریخت که دارای ژن *WDREB2* هستند، به‌عنوان کنترل مثبت تحت تنش سرما با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، پس از ۸ ساعت با استفاده از کیت RNX(plus) صورت گرفت. با توجه به وجود دو باند مربوط به RNA ریبوزمی ۱۸sو ۲۸s، حضور Total RNA تأیید شد. شفافیت و شدت باندهای ۱۸sو ۲۸s و علاوه بر آن بیشتر بودن غلظت باند مربوط به 28s rRNA، نشان‌دهندهٔ کیفیت مناسب RNA استخراج‌شده برای اجرای مراحل بعدی بود. به‌منظور تأیید بیان ژن *WDREB2* از روشReal-time PCR و RT PCR استفاده شد. ژن کنترل داخلی Elongation factor، از جمله ژن‌های خانه‌دار است که همواره و در همهٔ سلول‌ها بیان می‌شوند. در این تحقیق از ژن کنترل داخلی گوجه‌فرنگی به‌عنوان ژن کنترل مناسب که در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت بیان می‌شوند استفاده شده و تأیید بیان ژن *WDREB2* با استفاده از مقایسهٔ بیان این ژن با ژن کنترل داخلی در نمونه‌های مختلف صورت گرفته است. به‌صورت تئوری باید در ارقام تراریخت گوجه‌فرنگی هر دو ژن کنترل داخلی و *WDREB2* و در ارقام شاهد گوجه‌فرنگی تنها ژن کنترل داخلی بیان شوند. در ارقام گندم که به‌عنوان کنترل مثبت در بیان ژن *WDREB2* استفاده شده هر دو ژن کنترل داخلی و *WDREB2* بیان می‌شوند. محصولات پس از اتمام واکنش RT PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و مشاهده شدند. نتایج واکنش‌ها بیان ژن *WDREB2* را در ارقام گوجه‌فرنگی تأیید کرد (شکل۶).



شکل 6A . نقشهٔ الکتروفورزی محصول RT PCR با آغازگر اختصاصی ژن DREB و ژن کنترل داخلی Elongation factor راهک ۱. نشانگر وزنی bp ۱۰۰. راهک۲. ۶ باند ۱۲۰bp در گوجه‌های تراریخت. راهک۸- گندم. راهک ۹و۱۰ . باند ۱۲۰bpدر گوجه‌فرنگی شاهد؛ شکل 6B. نقشهٔ الکتروفورزی محصول Real-time PCR ژن *WDREB2*. راهک ۱. نشانگر وزنی bp ۱۰۰. راهک۲و ۶ . گوجه‌فرنگی شاهد. راهک ۳. گندم. راهک ۴و۵ و۷. ۱۰ ارقام گوجهٔ تراریخت.

نتایج آزمون Real-time PCR نشان‌دهندهٔ بیان بالا در بعضی از گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد غیرتراریخت است که به‌طور کلی فاقد این ژن است (شکل‌های ۷ و ۸). روش کیفی زیست‌سنجی با استفاده از تیمار گیاهان تراریخت و شاهد در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت. مقایسهٔ علائم فنوتیپی ناشی از تنش سرما بین لاین‌های تراریخت تأییدشده و ارقام شاهد صورت گرفت. با اینکه بنابر گزارش Egawa *et al.*, (2006) ژن *WDREB2* در شرایط تنش به سرعت پاسخ می‌دهد و بیان آن در ساعات نخست پس از تنش القا می‌شود، تفاوت مشهودی از نظر مقاومت به سرما بین گیاهان تراریخت و شاهد پس از ۴ ساعت تنش سرما مشاهده نشد. تنش سرما به‌مدت ۱۰ و ۲۴ ساعت آثار مشهودی در گیاهان ایجاد کرد.



شکل ۷. نمودار تکثیر آزمون Real time PCR. این آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن WDREB2 و الگوی cDNA برای همهٔ نمونه‌ها انجام گرفت. در گیاهان تراریخت، تکثیر مشاهده شد، ولی در گیاهان غیرتراریخت تکثیر دیده نشد. از آب به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد که هیچ تکثیری نشان نداد.

شکل ۸. زیست‌سنجی گیاه تراریخت در مقایسه با گیاه شاهد در شرایط تنش سرما در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد پس از ۲۴ ساعت. الف)گیاه شاهد؛ ب)گیاه تراریخت.

این علائم شامل پژمردگی و چروکیدگی برگ‌ها، مرگ جوانهٔ برگ و خم شدن ساقه در گیاهان شاهد بود. شدت این علائم به حدی بوده که حتی پس از قرارگیری در محیط بدون تنش جوانه برگ رشد نکرد و برگ‌های جوان قادر به خروج از آنها نبودند. این علائم در ارقام تراریخت مشاهده نشد (شکل ۸). تحقیقات و گزارش‌های بیان‌شده تاکنون، حاکی از موفقیت در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزنده با استفاده از عوامل رونویسی DREB بوده است. انتقال ایزوفرم گامای ژن *WDREB2* تحت کنترل راه‌انداز 35S CaMV به توتون توسط Kobayashi *et al.*, (2008) صورت گرفته که به افزایش تحمل به چندین تنش غیرزنده منجر شده است. افزایش بیان ژن‌های *DREB1B/CBF* یا *DREB1A/CBF3* تحت کنترل راه‌انداز 35S نیز به ایجاد گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت با افزایش تحمل به تنش‌های خشکی، شوری و سرما انجامیده است (Liu *et*

al., 1998; Kasuga *et al*., 1999). در این تحقیق از ایزوفرم آلفای ژن *WDREB2* جداسازی‌شده از رقم گندم سرداری برای تراریختی رقم Superqueen گوجه‌فرنگی استفاده شد. براساس نتایج این تحقیق، همانند سایر گزارش‌ها، انتقال عوامل رونویسی DREB، به ایجاد تحمل به تنش‌های غیرزیستی منجر می‌شود و نقش این عوامل را در ایجاد تحمل به تنش‌های غیرزیستی تأیید می‌کند. با توجه با اینکه استفاده از راه‌انداز القایی به جای راه‌انداز 35S در سازهٔ ساخته‌شده، به بیان ژن *WDREB2* در زمان‌های مناسب تحت تنش منجر می‌شود و از بیان دائمی ژن جلوگیری می‌کند، کاربرد آن می‌تواند از کاهش انرژی و بنیهٔ گیاه ممانعت کرده و گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت با حفظ رشد طبیعی و افزایش تحمل به تنش‌های غیرزنده را ایجاد کند. با اینکه راه‌انداز عمومی برای بیان ژن‌ها کاربرد فراوانی دارد، گزارش‌های زیادی مبنی بر کاهش رشد و اتلاف انرژی گیاه ناشی از بیان دائم ژن تحت این نوع راه‌اندازها وجود دارد. این مورد به‌خصوص در مورد ژن‌های القایی تحت شرایط زمانی و مکانی شایان توجه است. در این پژوهش آثاری از تأخیر در رشد گیاه تراریخت در مقایسه با نمونهٔ شاهد با شرایط یکسان در گلدان تا حدودی مشاهده شد. به‌طور کلی کاربرد راه‌انداز عمومی و استفاده از راه‌اندازهای القایی برای بیان این عامل رونویسی در تحقیقات توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، عامل رونویسی *WDREB2* گندم به‌عنوان یکی از عوامل رونویسی مهم در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی به گوجه‌فرنگی منتقل شده است. با توجه به اینکه گوجه‌فرنگی از جمله گیاهان حساس به تنش‌های غیرزنده به‌خصوص سرما و کم‌آبی محسوب می‌شود، انتقال این ژن به گیاه گوجه‌فرنگی، می‌تواند به بهبود تحمل این گیاه مهم جالیزی به تنش‌های غیرزنده و افزایش محصول منجر شود.

نتایج این تحقیق نقش این عامل رونویسی مهم را در تنش سرما و امکان استفاده از این ژن به‌منظور ایجاد ارقام گوجه‌فرنگی با تحمل زیاد به تنش سرما تأیید می‌کند. *لاین‌های* تراریخت حاصل از این پژوهش پس از تأیید مولکولی از نظر وجود ژن *WDREB2* خارجی و بیان این ژن با استفاده از PCR و روش RT PCR از نظر ایجاد تحمل به تنش سرما به‌روش زیست‌سنجی بررسی شدند و نتایج نشان داد که ارقام تراریخت گوجه‌فرنگی در مقایسه با ارقام شاهد در شرایط تنش سرما تحمل نشان می‌دهند. به‌طور کلی پیشرفت در زمینهٔ اصلاح گیاهان برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی، متکی بر فهم روشن مسیرهای القای تحمل به تنش‌ها و تراریختی پایدار گیاهان با استفاده از ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش‌ها است.

سپاسگزاری

مؤلفان وظیفهٔ خود می‌دانند که از همکاری صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوری کشور (INSF) برای حمایت‌های مالی در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی کنند.

REFERENCES

1. Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V. & Sharma, K. (2009). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell*, 27,411-424.
2. Chyi, Y. S. & Phillips, G. C. (1987). High efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Lycopersicon based on conditions favorablefor regeneration. *Plant Cell Reports*, 6,105–108.
3. 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.
4. Frary, A. & Earle, ED. (1996). An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, 16, 235–240.
5. Gawel, N.L.; Jarret, R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa and Ipomoea*. *Plant Molecular Biology*, 9, 262-266.
6. Hsieh, TH., Lee, JT., Charng, Y. & Chan, MT. (2002). Tomato plants ectopically expressing arabidopsis *CBF*1 show enhanced resistance to water deficit stress**.** *Plant Physiology*, 130, 613-626.

7. 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. *Natural Biotechnology*, 17, 287–291.
8. 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.
9. Nakashima, K., Ito, Y. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in arabidopsis and grasses. *Plant Physiology*, 149, 88-95.
10. Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Plant Biology*, 103,18822–18827.
11. Sazegari, S. & Niazi, A. (2012). Isolation and molecular characterization of wheat (*Triticum aestivum*) Dehydration Responsive Element Binding Factor (DREB) isoforms. *Aaustralian Journal of Crop Sience*, 6,1037-1044.
12. Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 217-223.
13. Liu, Q., Sakuma, Y., Abe, H., Kasuga, M., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an ERF/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12, 165–178.
14. Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/*CBF*3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal*, 38, 982-993.
15. Raghothama, KG. (2000). Phosphate transport and signaling. Current *Opinion in Plant Biology*, 3, 182 187.
16. Weiss, J, Egea-Cortines, M. (2009). Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Applied Genetics*, 50, 311-319.
17. Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology*, 53,247–273.