بهبود تحمل به خشکی چاوی چندساله با بیان ژن *RD29A-IPT*

سمیه اسماعیلی خویگانی[*1]، حسن صالحی[2]، مرتضی خوشخوی[2]، علی نیازی[3]
[*1] دکتری گیاهان زینتی بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
[2] استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
[3] استاد پژوهشکده زیست فناوری دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
*نویسنده مسئول: esmaili.somayeh@yahoo.com

چکیده

برای افزایش تحمل به خشکی در رقم‌های Grassland و Numan چاوی چندساله، از پیشبر انگیزشی RD29A در شرایط تنش خشکی برای افزایش بیان ژن *IPT* و در نتیجه افزایش میزان سایتوکینین‌های درون‌زا استفاده شد. هدف از انجام این پژوهش، تعیین گیاهان متحمل به خشکی در میان گیاهان تراریخت RD29A-IPT، ناتراریخت و برخی نمونه های محلی چاوی چندساله در شرایط تنش (۱۰ روز) و ۲ هفته پس از بازیابی بر اساس نتایج HPLC و RT-PCR می‌باشد. نتایج HPLC نشان داد، میزان سایتوکینین‌های برگ و ریشه در گیاهان تراریخت شامل NC4، GM24، GM12، GM21 بالاتر از گیاهان ناتراریخت و نمونه‌های محلی می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد، iPA نوع غالب سایتوکینین در برگ و ریشه چاوی چندساله در شرایط تنش خشکی می‌باشد. افزون بر این، واکاوی بیان ژن *IPT*، نتایج HPLC و واکاوی-های مورفوفیزیولوژیک و مولکولی گیاهان تراریخت را بیشتر تایید نمود.

کلمات کلیدی: ایزوپنتنیل ترانسفراز، ایزوپنتنیل آدنین، بیان ژن، چاوی چندساله، سایتوکینین.

مقدمه

در سال‌های اخیر بیشتر کشورها به ویژه ایران با مسئله کم آبی رو به رو هستند. نیاز آبی بالا یکی از مشکلات جدی در برخی از گیاهان زینتی وارداتی به ویژه سبزفرش‌ها می‌باشد. برنامه‌های به نژادی سنتی به طور عمده به دلیل نبود ژرم پلاسم-های برتر و متحمل به تنش‌ها در باریک برگ‌ها و همچنین به دلیل درک ضعیف مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیک برای تحمل به تنش در گونه‌های سبزفرش محدود شده است (Bonos and Huang, 2006). چاوی چندساله[1] از مهم‌ترین گونه‌های سبز فرش برای زمین‌های ورزشی، گلف و فضای سبز در نواحی معتدل می‌باشد. با وجود ویژگی‌های خوب این سبزفرش مانند استقرار سریع، بافت لطیف و رنگ بسیار زیبا، تحمل به خشکی آن به نسبت ضعیف می‌باشد. افزون بر این چاوی چندساله گیاهی دگرگرده افشان و به شدت خود ناسازگار می‌باشد. از این رو بهبود ژنتیکی چاوی چندساله با به‌نژادی سنتی مشکل می‌باشد (Thorogood *et al*. 2002). ژن *IPT*، کد کننده آنزیم ایزوپنتنیل ترانسفراز که آنزیم کلیدی در سنتز سایتوکینین می‌باشد. سایتوکینین‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که در انتهای ریشه‌های در حال رشد فعال تولید می‌شوند و نقش مهمی در تنظیم رشد و پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزیستی[2] دارند. هدف این پژوهش، بررسی بیان ژن *IPT* و تعیین نوع و افزایش میزان سایتوکینین‌های درون‌زا در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد.

[1]. *Lolium perenne* L.
[2].Abiotic stresses

IrHC2019

مواد و روش‌ها

گیاهان تراریخت دو رقم Grassland و Numan با انتقال ژن *IPT* تحت پیشبر[۳] انگیزشی *RD29A* در پژوهش پیشین توسط Esmaeili و همکاران (۲۰۱۹) از ۳ ریز نمونه پینه، مریستم و بذر تولید شدند. افزون بر این برخی نمونه‌های محلی چاوی چندساله از استان فارس جمع آوری شده نیز همزمان با گیاهان تراریخت و ناتراریخت در گلدان‌های با اندازه ۷ دارای مخلوط خاکی ۱ به ۲ کود دامی پوسیده و خاک دانشکده کشاورزی کشت شدند. پس از یک ماه استقرار در گلخانه پژوهشی بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز برای بررسی تحمل به خشکی ارزیابی شدند. پس از اعمال تیمار خشکی به مدت ۱۰ روز، نمونه‌های برگ گیاهان برای استخراج RNA و نمونه‌های برگ و ریشه برای تعیین میزان هورمون سایتوکینین استفاده شد. نمونه‌های ریشه پس از تمام شدن مرحله بازیابی برای تعیین اندازه گیری‌ها استفاده شدند. میزان سایتوکینین برگ و ریشه گیاهان تراریخت، ناتراریخت و برخی از نمونه‌های محلی چاوی چند ساله با استفاده از HPLC اندازه گیری شدند. (Doumas and Zaerr, 1988; Merewitz *et al.*, 2011a; Merewitz *et al.*, 2010b). پس از ۱۰ روز تنش خشکی، از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخت و ناتراریخت برای استخراج RNA نمونه‌برداری شد. استخراج RNA بر اساس دستور کیت استخراج RNA گیاهی (توپاز ژن، کرج، ایران) انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از نانودراپ انجام و برای مقایسه ظاهری RNA روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) cDNA بر اساس دستور کارخانه سازنده آن انجام شد. برنامه‌های واکنش RT-PCR برای ژن داخلی (*Eef-1 α*) با توالی‌های اختصاصی آغازگرهای (F) GGCTGATTGTGCTGTGCTTA و (R) CTCACTCCAAGGGTGAAAGC و برای ژن هدف (*IPT*) با توالی‌های اختصاصی آغازگرهای (F) GCCTCTACCTGGACGACA و (R) GCTTGTGGCGGATGATGTG در دمای اولیه واسرشت ^{o}C ۹۴ (۴ دقیقه)، مرحله واسرشت دمای ^{o}C ۹۴ (۱ دقیقه) و مرحله اتصال دمای ^{o}C ۶۵ (۱ دقیقه)، مرحله طویل شدن دمای ^{o}C ۷۲ (۲۵ ثانیه) و مرحله طویل شدن نهایی دمای ^{o}C ۷۲ (۵ دقیقه) انجام شد.

نتایج و بحث

انواع مختلفی از سایتوکینین‌ها در گیاهان وجود دارند، نوع غالب سایتوکینین‌ها در باریک برگ ها ایزوپنتنیل آدنین (iPA) و زاتین رایبوزاید (ZR) هستند که در پاسخ به تنش های گیاهی نقش دارند (Xu *et al.*, 2009). میزان کل سایتوکینین‌های برگ و ریشه در پاسخ به تنش خشکی در گیاهان ناتراریخت در مقایسه با گیاهان تراریخت کاهش یافت. به طور کلی، ریشه های گیاهان تراریخت میزان سایتوکینین کل بالاتری نسبت به گیاهان ناتراریخت نشان دادند (جدول ۱ و ۲). افزایش تجمع سایتوکینین کل بیشتر به دلیل افزایش میزان iPA می‌باشد. در شرایط تنش خشکی انتقال سایتوکینین‌ها به طور معمول از ریشه‌ها به شاخساره کاهش می دهد (Shashidhar et al., 1996). در بررسی‌های پیشین ثابت شده است که iPA و ZR به طور قابل توجهی در شرایط تنش خشکی در برخی گونه‌های گیاهی شامل برنج، اروای خزنده کاهش می یابد (Bano et al., 1993; DaCosta & Huang, 2007b). افزون بر این، بررسی‌های پیشین بر گیاه تراریخت اروای خزنده با افزایش بیان SAG12-IPT بیان قوی ژن *IPT* در برگ‌ها و ریشه‌ها در شرایط تنش خشکی شد که می‌تواند با افزایش در میزان‌های iPA و ZR درون‌زا در برگ ها و ریشه مرتبط باشد (Merewitz, 2010, 2011a, Xu et al., 2016). به طور مشابهی تمام گیاهان تراریخت میزان iPA بالاتری نسبت به گیاهان ناتراریخت پس از ۱۰ روز از تنش خشکی نشان دادند. در میان گیاهان تراریخت، لاین GC4 بالاترین میزان سایتوکینین کل در مقایسه با دیگر گیاهان نشان داد. گرچه میزان iPA برگ در لاین GM21 بالاتر از دیگر گیاهان بود. بیشترین میزان ZR در برگ و ریشه GM24 یافت شد. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده توسط Xu و همکاران (۲۰۱۶) همسویی دارد. آن‌ها نشان دادند ریشه-

[3]. Promoter

IrHC2019

های لاین تراریخت*SAG12-IPT* (S41) اروای خزنده[۴] میزان سایتوکینین درون‌زای بالاتری نسبت به ریشه‌های گیاهان ناتراریخت در شرایط تنش خشکی دارا می‌باشد.

بر اساس نتایج RT- PCR، ژن داخلی *eEF-1α* در تمام گیاهان تراریخت و ناتراریخت بیان شد. بیان ژن *IPT* درتمام گیاهان تراریخت تایید شد به جز GC9 (۳) و NS22 (۲۲). ژن *IPT* به شدت در GM12 (۲۰)، GM24 (۲۱)، GC8 (۸)، GC6 (۱۲)، NC12 (۱۰)، NC14 (۱۴) و GC3 (۱۶) پس از ۱۰ روز تنش خشکی بیان شد. در واقع نتایج RT- PCR بیان ژن *IPT* در لاین‌های تراریخت که از پیش در آزمایش DNA بلات ثابت شده بود (GC8 و GM12) را نیز تایید نمود. افزون بر این، لاین‌های تراریخت تحمل به خشکی بالاتری در نتیجه افزایش میزان بیشتر سایتوکینین درون‌زا در برگ‌ها و ریشه‌ها نشان دادند.

جدول ۱. واکاوی HPLC برای میزان ZR، DHZR، iPA و سایتوکینین کل در برگ گیاهان تراریخت، ناتراریخت و برخی از نمونه‌های محلی در شرایط تنش خشکی.

گیاهان تیمار شده	میزان سایتوکینین برگ (pmol g^{-1})			
	ZR	DHZR	iPA	Total CK
GW	۲/۹٤±۰/۰۲	٤/۲۰±۰/۰۱	۳/٦۳±۰/۰٤	۱۰/۷٦±۰/۰٥
NW	۱/٤٥±۰/۰۲	۳/۱۸±۰/۰۱	۳/۲٦±۰/۰۱	۷/۸۹±۰/۰۲
NC1	۲/۲٥±۰/۰۳	٤/۱۳±۰/۰۱	٦/۷۲±۰/۰۱	۱۳/۱۱±۰/۰۳
NC4	۳/٤٤±۰/۰۷	۳/۷۲±۰/۰۷	٥/۲۹±۰/۰۹	۱۲/٤٥±۰/۰٤
NC12	۲/۱۲±۰/۱۹	٥/۷٥±۰/۲۰	۷/٤۸±۰/۳۷	۱٥/۳٥±۰/٥۳
NC13	۳/۱٥±۰/۰٤	٥/٦٥±۰/۰۳	۸/۱۳±۰/۰۳	۱٦/۹٤±۰/۰٥
NC14	۲/۷۱±۰/۰۹	٤/٥۰±۰/۰٥	٦/٥۳±۰/۰٤	۱۳/۷٥±۰/۱۳
GC3	۱/۹۹±۰/۲۹	۳/۹۲±۰/۰۹	٤/۹۰±۰/۰٥	۱۰/۸۱±۰/۳۰
GC4	٤/۳۰±۰/۰۳	۹/۷۷±۰/۱۲	۷/٤۷±۰/۰۲	۲۱/٥٥±۰/۱٤
GC5	۲/۰۸±۰/۰٤	٦/۲٤±۰/۱۳	٤/۱۰±۰/۰٦	۱۲/٤۲±۰/۱٦
GC6	۲/۹٤±۰/۰۳	٥/٦۲±۰/۰۹	٦/۹۰±۰/۳٦	۱٥/٤٦±۰/٤۲
GC8	٤/۱٥±۰/۰۳	٦/۱۷±۰/۲۳	٥/۸٦±۰/۲۲	۱٦/۱۸±۰/۲۹
GC9	۱/۱۳±۰/۰٤	٤/۸۰±۰/۰۲	٦/۱۰±۰/۰٤	۱۲/۰۳±۰/۰۸
GC16	۲/۰۱±۰/۰۳	٦/۸۰±۰/۱۲	٥/۹٦±۰/۰۹	۱٤/۷۸±۰/۲۰
NS14	۲/٦٦±۰/۱۸	٤/٥۸±۰/۲٤	٦/٦٤±۰/۱۹	۱۳/۸۸±۰/٦۱
NS22	۱/۷۱±۰/۱۸	۲/۳۰±۰/۰۳	۳/۹۸±۰/۰٤	۷/۹۹±۰/۲۲
GM12	۲/۷۸±۰/۱٤	٥/۹٥±۰/۰٥	۸/۱۱±۰/۱۸	۱٦/۸٤±۰/۳۰
GM21	۳/۹۷±۰/۰۷	٦/۱٥±۰/۰۹	۸/٤٤±۰/۰٤	۱۸/٥٦±۰/۱۷
GM24	٤/۳۱±۰/٤٥	٦/۷۲±۰/۱٦	۹/۱٦±۰/۰۳	۲۰/۱۸±۰/۳٤
Cham sohrabkhani	۲/۱۰±۰/۰٦	۳/۷۱±۰/۱۸	٤/۸۰±۰/۱۲	۱۰/٦۰±۰/۲٤
Delkhan	۱/٦۰±۰/۰۲	۳/۷۰±۰/۲۳	۳/۳۹±۰/۲۸	۸/٦۹±۰/٥۲
Komehr1	۲/۰٥±۰/۱۱	٤/۹۸±۰/۰۸	٦/۱۲±۰/۰۸	۱۳/۱٤±۰/۲۷
Margon	۲/٦۳±۰/۲۱	٦/۱۷±۰/۰۱	٥/٤۰±۰/۰٥	۱٤/۲۰±۰/۳۰
Tange Ardakan	۲/۰٥±۰/۰۳	۳/۹۸±۰/۰٤	٤/٤٤±۰/۰۸	۱۰/٤۷±۰/۰۸

داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.G: رقم Grassland، N: رقم Numan.
C: گیاهان تولید شده از پینه، M: گیاهان تولید شده از مریستم، S: گیاهان تولید شده از بذر.

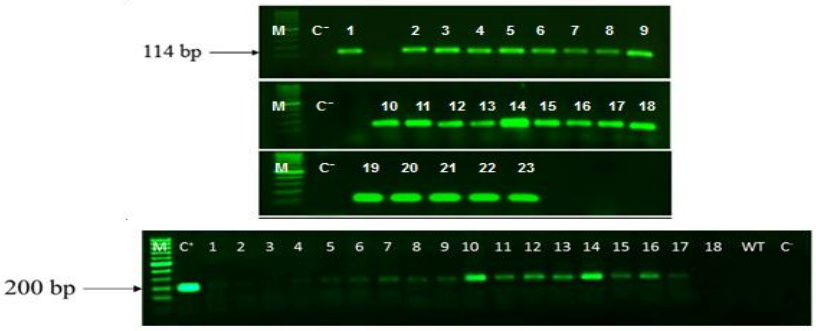
[4]. *Agrostis stolonifera* L. 'Penncross'

IrHC2019

جدول ۲. واکاوی HPLC برای میزان ZR، DHZR، iPA و سایتوکینین کل در ریشه گیاهان تراریخت، ناتراریخت و برخی از نمونه‌های محلی در شرایط تنش خشکی.

گیاهان تیمار شده	میزان سایتوکینین ریشه (pmol g^{-1})			
	ZR	DHZR	iPA	Total CK
GW	۲/۱۵±۰/۱۳	٤/۱۹±۰/۱۸	۳/۰۲±۰/۰۷	۹/۳٦±۰/۳۱
NW	۱/٦٤±۰/۱۳	۳/۰۹±۰/۱۰	۲/۹۹±۰/۲۱	۷/۷۳±۰/۰۸
NC1	۲/۹۳±۰/۱۸	۹/۳۷±۰/۰۸	۸/۲٥±۰/۲٦	۲۰/٥٥±۰/۳۱
NC4	٤/۰٥±۰/۰٥	۷/۱٥±۰/۰٥	٦/۳٦±۰/۰٤	۱۷/٥٦±۰/۰٦
NC12	۳/۳۱±۰/۲٥	۷/۹۰±۰/۰٦	۹/۲۰±۰/٥۱	۲۰/٤۱±۰/۷۰
NC13	٥/۲۷±۰/۱۳	۱۱/٦۹±۰/۲۱	۱۰/٦۳±۰/۳٦	۲۷/٥۹±۰/۲۸
NC14	٦/۰۷±۰/۰۹	۱۲/۳۱±۰/۰۹	۹/٥۱±۰/۰۹	۲۷/۹۰±۰/۱۰
GC3	۳/۸۸±۰/۱۹	۷/۲۷±۰/۰۷	٦/۷٥±۰/۱٥	۱۷/۹۰±۰/٤۰
GC4	٥/۱۳±۰/۰٤	۱۰/۱۸±۰/۰٦	۱۲/٦۹±۰/۱۹	۲۷/۹۹±۰/۱۲
GC5	٤/۲٥±۰/۰٥	۸/٥۹±۰/۲٥	۷/۱۹±۰/۰۹	۲۰/۰۳±۰/۱٦
GC6	۳/۱۲±۰/۰۷	۷/٥٥±۰/۰۳	۸/۹۹±۰/۰۹	۱۹/٦٦±۰/۰٥
GC8	٤/۸۷±۰/۰۸	۹/۷۸±۰/۱۳	۹/۰۰±۰/۰۹	۲۳/٦٥±۰/۲۷
GC9	٤/۱۲±۰/۰۸	۸/۱۱±۰/۰۹	۹/۱۸±۰/۳۹	۲۱/٤۱±۰/۳۸
GC16	٥/۱٦±۰/۰٥	۱۰/۱٤±۰/۰۹	۹/۱۱±۰/۰٤	۲٤/٤۱±۰/۱۸
NS14	۷/٤۲±۰/۱۰	۱۲/۸۷±۰/۰۷	۱۲/۲٦±۰/۰٥	۳۲/٥٤±۰/۲۲
NS22	٤/٤٤±۰/۲۷	۸/۳٤±۰/۰٦	۷/٥۹±۰/۲۱	۲۰/۳۷±۰/۱۱
GM12	٦/٤۷±۰/۲۸	۱۱/۹۷±۰/۰۹	۱۲/۳۲±۰/۰۷	۳۰/۷۷±۰/٤۰
GM21	٦/۲۱±۰/۰۱	۱۱/٦٦±۰/۱٤	۱۳/۲۹±۰/۰۳	۳۱/۱٦±۰/۱۷
GM24	۷/۲۱±۰/۰۲	۱۳/۱۷±۰/۰۲	۱٦/۹۱±۰/۱۳	۳۷/۲۹±۰/۱٦
Cham sohrabkhani	۳/۰۰±۰/۰۳	٥/۸۱±۰/۰۹	۷/۰۲±۰/۰۹	۱٥/۸٤±۰/۱٦
Delkhan	۲/۷۸±۰/۱٤	٥/۷۰±۰/۲٦	٤/۸۳±۰/۱۳	۱۳/۳۰±۰/٥۲
Komehr1	٤/۸٦±۰/۱۳	٦/۹۲±۰/۰۷	۹/۱۷±۰/۰۸	۲۰/۹٥±۰/۱۳
Margon	٤/۱٤±۰/۱۷	۸/۱٦±۰/۰٤	۷/۸۱±۰/۱٥	۲۰/۱۱±۰/۲٤
Tange Ardakan	۳/۹۲±۰/۱٥	٥/٥۸±۰/۲۳	٦/۹۳±۰/۱٦	۱٦/٤۳±۰/٥۳

داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.G: رقم Grassland، N: رقم Numan.
C: گیاهان تولید شده از پینه، M: گیاهان تولید شده از مریستم، S: گیاهان تولید شده از بذر.



شکل ۱. واکاوی RT- PCR از گیاهان تراریخت و ناتراریخت با آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی *eEF-1α* (بالا) و ژن هدف *IPT* در شرایط تنش خشکی.M: مارکر، وزن مولکولی (۱۰kb)، C^+: کنترل مثبت (پلازمید)، WT: گیاهان ناتراریخت، C^-: آب (پایین).

IrHC2019

منابع

Esmaeili, S., Salehi, H., Khosh-Khui, M., Niazi, A., Tohidfar, M. and Aram, F. 2019. Isopentenyl Transferase (*IPT*) gene transfer to perennial ryegrass through sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT), vacuum and heat treatment. Molecular Biotechnology, 61: 332-344.

Xu, Y., Tian, J., Gianfagna, T. and Huang, B. 2009. Effects of *SAG12-ipt* expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) under heat stress. Plant Growth Regulation, 57: 281.

Xu, Y., Burgess, P., Zhang, X. and Huang, B. 2016. Enhancing cytokinin synthesis by overexpressing *ipt* alleviated drought inhibition of root growth through activating ROS-scavenging systems in *Agrostis stolonifera*. Journal of Experimental Botany, 67: 1979-1992.

The improvement of drought tolerance of perennial ryegrass by expression of *RD29A-IPT* gene

Somayeh Esmaeili Khuygani[1]*, Hassan Salehi[2], Morteza Khosh-Khui, Ali Niazi[3]

[1*] PhD in Ornamental Plants, Dept. of Horticultural Science, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz

[2] Prof., of Dept. of Horticultural Science, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz

[3] Prof., of Dept. of Institute of Biotechnology, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz

[*]*Corresponding Author: esmaili.somayeh@yahoo.com*

Abstract

To improve drought tolerance in 'Grassland' and 'Numan' cultivars of perennial ryegrass, an inducible drought stresses a promoter (*RD29A*) was used to drive IPT gene under drought stress to increase endogenous cytokinins. The objective of this study was to determine drought tolerant plants among RD29A-IPT, WT and some local accessions perennial ryegrass under drought stress (10 days) and 2 weeks after recovery based on HPLC and RT-PCR analyzes. HPLC results showed that leaf and root cytokinins in transgenic plants include NC4, GM24, GM12, GM21 was higher than non-transgenic plants and local accessions. It was also found, iPA is the dominant type of cytokinin in perennial ryegrass under drought stress in both leaves and roots that enhanced drought tolerance of plants. In addition, the analysis of IPT gene expression confirmed the results of HPLC and morpho-physiological and molecular analyzes of transgenic plants.

***Keywords*:** Isopentenyl transferase, Isopentenyl adenine, Gene expression, *Lolium perenne* L., Cytokinin

IrHC2019