زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره یازدهم، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۴۷-۶۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۴/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۷/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۸/۲۲

بهینه‌سازی شرایط باززایی و تراریختی گیاه کلزا، رقم‌های Hyola 308 و RGS003

رضا گلیجانی‌مقدم، مصطفی مطلبی *، محمدرضا زمانی و حبیب رضانژاد
گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی غلظت مناسب BAP برای باززایی دو رقم مهم گیاه کلزا و همچنین مطالعهٔ تأثیر زمان‌های پیش‌کشت، هم‌کشت و نیز غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون (acetosyringon) بر تراریختی آنهاست. بدین منظور از دو رقم مهم کلزا (Hyola 308 و RGS003) که در تولید بذرهای مورد نیاز کشور استفاده می‌شود برای انتقال ژن گزارشگر GUS با واسطه آگروباکتریوم، استفاده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تکرار برای هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۳ تکرار برای زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت و استوسیرینگون انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، میزان باززایی رقم Hyola 308 به ۱۱۲ درصد و رقم RGS003 به ۱۲۰ درصد افزایش یافت. تراریختی ارقام مورد استفاده که روی محیط کانامایسین رشد کرده بودند با استفاده از آزمون PCR و بیان ژن توسط سنجش فعالیت GUS اثبات گردید. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه طول دوره پیش‌کشت، طول دوره هم‌کشت و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون بر میزان تراریختی ارقام مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان تراریختی در رقم Hyola 308 (۳۳ درصد) در شرایط ۱۰۰ میکرومولار غلظت استوسیرینگون، و ۴۸ ساعت برای زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت، و در رقم RGS003 (۳۸ درصد) در ۵۰ میکرومولار غلظت استوسیرینگون، زمان پیش‌کشت ۴۸ ساعت و زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت به دست آمد و هر دو نسبت به سایر تیمارها در گروه‌های آماری جداگانه قرار گرفتند. از شرایط بهینه به دست آمده برای انتقال ژن‌های هدف به این ارقام می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلزا، باززایی، تراریختی، ژن *GUS*، BAP

مقدمه

کلزا گیاهی مهم از نظر تأمین مواد غذایی مورد نیاز بشر است. با توجه به مصرف بالای روغن در کشور که سالانه حدود ۱/۵ میلیون تن است و ۸۰ درصد آن از واردات تأمین می‌شود، به نظر می‌رسد که استفاده از این گیاه برای کاهش واردات روغن و افزایش خودکفایی کشور در تولید مواد غذایی مورد نیاز، مناسب باشد. برای پاسخگویی به نیاز جمعیت رو به افزایش بشر

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: motalebi@nigeb.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۶۳

Archive of SID
www.SID.ir

تلاش‌های به‌نژادی و به‌زراعی کلزا به افزایش کیفیت و کمّیت محصول منجر شده، اما کافی نبوده است. بنابراین، استفاده از روش‌های انتقال ژن برای دستیابی به رقم‌های مقاوم به بیماری‌ها، آفات و علف‌کش‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به دولپه‌ای بودن گیاه کلزا، انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم یکی از مناسب‌ترین و کارآمدترین روش‌های انتقال ژن به این گیاه به حساب می‌آید. روش انتقال ژن به صورت پایدار و نیز باززایی در برخی از گونه‌های *Brassica* ارزیابی و آزمایش شده است (Takasaki *et al*., 1997; wang *et al*., 1999; Bhalla and Singh, 2008; Hao *et al*., 2010). از آنجا که فرآیند تراریختی گیاهان متأثر از ژنوتیپ آنهاست و در حال حاضر در کشور از دو رقم R line Hyola 308 و RGS003 در تهیه بذرهای کلزا به منظور استفاده زراعی بهره‌برداری می‌شود، در این مطالعه لازم بود ابتدا روش کشت بافت آنها در شرایط *in vitro* بهینه‌سازی شود. از آنجا که هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) در تحریک شاخه‌زایی عمل می‌کند (Kern and Meyer 1986; Singh *et al*., 2002; Dennis, 2003)، در این تحقیق غلظت‌های مختلف این هورمون در محیط‌کشت برای دستیابی به بالاترین میزان شاخه‌زایی در کلزا استفاده شد. از این شرایط برای فرآیند تراریختی گیاه کلزا توسط آگروباکتریوم استفاده گردید.

همچنین، با توجه به گزارشات موجود در خصوص تأثیر زمان پیش‌کشت و هم‌کشت بر میزان تراریختی (Radke *et al*., 1988; Moloney *et al*., 1989; Takasaki *et al*., 1997)، در این تحقیق، برای بهینه‌سازی روش تراریختی تیمارهایی نظیر طول مدت پیش‌کشت ریز نمونه، زمان هم‌کشتی بین ریز نمونه و آگروباکتریوم و نیز نقش غلظت‌های مختلف استوسیرینگون بررسی و مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سویه‌های باکتری

بذرهای رقم‌های R line Hyola 308 و GRS003 کلزا، از شرکت دانه‌های روغنی تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه گردید.

پلاسمیدها و مواد مورد استفاده

در این تحقیق، از پلاسمید pBI121 (از شرکت Novagen) به منظور تهیه سازه‌های ژنی برای انتقال به گیاه استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از آنزیم *Taq*-polymerase (از شرکت Fermentas) استفاده گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بیولوژی مولکولی و نیز کیت خالص‌سازی DNA از شرکت Roche تهیه شد. مواد مورد نیاز برای تهیه محیط‌کشت گیاهی و باکتریایی و نیز تنظیم‌کننده رشد گیاهی (BAP) از شرکت Sigma تهیه گردید.

آماده‌سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه

بذرهای کلزا به روش ارایه شده توسط Moloney و همکاران (۱۹۸۹) ضد عفونی و برای جوانه زدن روی محیط‌کشت جوانه‌زنی (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸) کشت داده شدند. بذرهای کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۲۵۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برگ‌های لپه‌ای گیاهان ۵ روزه که طول دمبرگ آنها حدود

Archive of SID

www.SID.ir

۲ میلی‌متر بود، جدا شدند و پس از حذف جوانه انتهایی، روی محیط پیش‌کشت (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸) کشت شدند. ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم هستند. پلاسمید pBI121 به روش انجماد و ذوب با استفاده از کلرید کلسیم (۲۰ میلی‌مولار) و ازت مایع به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل گردید (Sambrook and Russell, 2001).

از کشت شبانه آگروباکتریوم تراریخت شده (OD_{650}=1) رسوب تهیه شد (با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه)، سپس باکتری‌های رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. دمبرگ‌های برگ‌های لپه‌ای به مدت ۹۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار داده شدند. سپس برگ‌های لپه‌ای روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا نسبتاً خشک گردند. سپس در محیط هم‌کشتی (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸)، کشت داده شده، در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس ریز نمونه‌ها به محیط انتخابی القاء نوساقه (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸)، که حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم است، منتقل شدند. ریز نمونه‌ها هر ۲ هفته یک‌بار به محیط مشابه واکشت شدند. در هفته سوم نوساقه‌های متعددی در سطح فوقانی برخی از ریزنمونه‌ها به وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه‌های تولید شده روی محیط انتخابی فوق سبز و زنده باقی ماندند، بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید و یا ارغوانی شده، از بین رفتند. به نظر می رسد که نوساقه‌های زنده مانده، پلاسمید pBI121 را دریافت نموده، تراریخت شده‌اند. برای تعیین درصد باززایی از روش زیر استفاده شد:

$$\frac{\text{تعداد نوساقه‌های باززا شده}}{\text{به تعداد ریزنمونه‌ای مورد استفاده}} \times ۱۰۰$$

نوساقه‌های سبز باززایی شده در محیط گزینش‌گر، جدا شده و به محیط طویل شدن نوساقه (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸)، حاوی ۲۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم است، منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مریستم فعال، نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی (محیط MS با غلظت یک برابر، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۸ گرم در لیتر آگار و اسیدیته ۵/۸) انتقال داده شدند. لازم به ذکر است بعضی از نمونه‌ها در همان محیط طویل شدن نوساقه، ریشه‌دار شده، نیازی به انتقال به محیط ریشه‌زایی نداشتند.

استخراج DNA ژنومی گیاه و PCR

DNA ژنومی از برگ گیاه کلزا به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) همراه با تغییراتی استخراج گردید: ۵۰۰ میلی‌گرم از برگ گیاهان مقاوم به کانامایسین و شاهد پس از انجماد با ازت مایع با استفاده از پودر شیشه در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ساییده شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر استخراج TNE (۵۰ Tris-HCl

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌مولار، EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار، NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸) به پودر اضافه و به شدت تکان داده شد. به محلول همگن حاصل ۶۰ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد افزوده، به مدت نیم ساعت به طور ملایم مخلوط گردید. سپس ۱۵۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و ۱۳۰ میکرولیتر CTAB ۱۰ درصد اضافه شد. محلول همگن حاصل به آرامی مخلوط و ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد (با هم زدن ملایم در هر ۵ دقیقه) نگهداری گردید. مخلوط حاصل بین دو لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری استریل تقسیم گردید و به هر لوله مقدار ۳۷۵ میکرولیتر مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه شده، به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. پس از سانتریفیوژ ۱۵ دقیقه‌ای در g ۱۳۰۰۰، فاز رویی که حاوی DNA ژنومی بود، به لوله استریل منتقل گردید. DNA ژنومی با افزودن ۱/۲ حجم ایزوپروپانول ۱۵دقیقه سانتریفیوژ (g۱۳۰۰۰) رسوب‌دهی شد. رسوب حاصل با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در دمای اتاق، در ۵۰-۷۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون شده، حل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به منظور تکثیر ژن *GUS* از آغازگرهای GUSF/GUSR و برای تکثیر ژن *npt*II از آغازگرهای NPTIIF/NOSR استفاده گردید (جدول ۱). PCR اختصاصی، پس از بهینه‌سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۳۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و یک واحد آنزیم *Taq*-polymerase (سینا ژن، ایران) و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (برای هر دو PCR) و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گردید. پس از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگاروز یک درصد، الکتروفورز گردید.

مطالعه هیستوشیمیایی فعالیت آنزیمی GUS

دیسک‌های برگ از گیاهان در مرحله ۵ برگی به لوله‌های اپندورف منتقل و توسط روش هیستوشیمیایی، فعالیت GUS بررسی شد (Cervera, 2004). با استفاده از سیستم تصویربرداری میکروسکوپی، بیان و فعالیت آنزیم بتا-گلوکروناز در بافت برگ‌ها مشاهده و تصویربرداری شد.

طرح آزمایشی و تحلیل آماری

برای بررسی اثر غلظت‌های متفاوت BAP در ۶ سطح ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ میلی‌گرم در لیتر بر باززایی دو رقم کلزای مورد مطالعه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار اجرا شد. همچنین، اثر زمان پیش‌کشت در ۳ سطح صفر، ۴۸ و ۷۲ ساعت، زمان هم‌کشت در ۲ سطح ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت استوسیرینگون در ۳ سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و نیز اثر متقابل آنها در تراریختی دو رقم کلزا مورد مطالعه نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار بررسی گردید. همهٔ داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تحلیل آماری شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی
GUSF	5'-GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3'
GUSR	5'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCATC-3'
NPTIIF	5'-GTCGCCTAAGGTCAGTATCAGCTA-3'
NOSR	5'-CGCGATAATTTATCCTAGTTTGC-3'

نتایج

با توجه به اهمیت دو رقم R line Hyola 308 و RGS003 در تولید بذرهای کلزا در کشور و با در نظر گرفتن این مطلب که میزان باززایی در کلزا تحت تأثیر ژنوتیپ است و از طرفی عدم وجود اطلاعات مورد نیاز در این دو رقم، بهینه‌سازی شرایط باززایی و انتقال ژن در این ارقام ضروری است. از آنجا که در انتقال ژن به گیاه کلزا ریزنمونه کوتیلدون دارای فراوانی باززایی و تراریختی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها گزارش شده است (Cardoza and Stewart, 2003)، لذا در این تحقیق، از ریزنمونه کوتیلدون استفاده گردید.

انتخاب غلظت مناسب BAP (بنزیل آمینو پورین) برای باززایی در گیاه کلزا

با توجه به گزارشات موجود مبنی بر استفاده BAP به میزان ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر برای باززایی در برخی از رقم‌های کلزا (Reda *et al.*, 2006; Cardoza and Stewart, 2006)، به منظور انتخاب غلظت مناسب BAP برای باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون دو رقم Hyola 308 و RGS003 کلزا، در این تحقیق، غلظت‌های پایین‌تر (۳/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های بالاتر (۵، ۵/۵ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) و نیز غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، به عنوان ۶ غلظت متفاوت BAP در نظر گرفته شد. نتایج تجزیه واریانس برای باززایی نوساقه از دو رقم متفاوت کلزا نشان می‌دهد که بین غلظت‌های متفاوت BAP در محیط‌کشت برای باززایی نوساقه از کشت کوتیلدون، در هر دو رقم مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس غلظت BAP برای فراوانی باززایی دو رقم گیاه کلزا. ** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، آزمایش به صورت دو طرح کاملاً تصادفی مستقل برای رقم‌ها انجام شده است.

منبع تغییر	Hyola 308		RGS003	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
غلظت BAP	۵	۱/۰۲۷**	۵	۲/۰۱**
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۶	۲۴	۰/۰۳
کل	۲۹		۲۹	

مقایسه میانگین‌های سطوح مختلف غلظت BAP برای باززایی نوساقه در هر دو رقم توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که غلظت ۳/۵ میلی‌گرم BAP، بهترین غلظت برای باززایی ریز نمونه‌های کوتیلدون در هر دو رقم گیاه کلزاست. میزان باززایی در این غلظت برای رقم Hyola 308 برابر ۱۱۲ درصد و برای رقم RGS003 کلزا برابر ۱۲۰ درصد بوده است (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

این درصد در سایر غلظت‌ها، حداکثر برابر ۷۶ و ۹۶ درصد به ترتیب برای Hyola 308 و RGS003 است. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت BAP از ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان باززایی در هر دو رقم مورد مطالعه، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. با توجه به مشاهده غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (کمترین غلظت مورد بررسی) به عنوان مناسب‌ترین غلظت BAP برای باززایی هر دو رقم و بررسی نقش غلظت کمتر از ۳/۵ میلی‌گرم درلیتر بر میزان باززایی، در ادامه این تحقیق، غلظت‌های ۳، ۳/۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP نیز بررسی شد و مجدداً مشاهده گردید که میزان ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان مناسب‌ترین غلظت است (نتایج ارایه نشده است). از این تیمار هورمونی برای عمل باززایی و تراریختی نمونه‌ها با آگروباکتریوم استفاده گردید.

جدول ۳- مقایسه میانگین باززایی نوساقه‌های دو رقم مختلف گیاه کلزا در غلظت‌های متفاوت BAP. حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها است. مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین ۵ تکرار است.

غلظت BAP	میانگین باززایی (درصد)	
(mg/lit)	Hyola 308	RGS003
۳/۵	۱۱۲ [a]	۱۲۰ [a]
۴	۷۶ [b]	۹۲ [b]
۴/۵	۶۸ [bc]	۷۴ [c]
۵	۵۴ [cd]	۶۰ [d]
۵/۵	۵۲ [cd]	۴۰ [ef]
۶	۴۴ [d]	۳۲ [ef]

بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن با استفاده از ژن گزارشگر GUS

سه عامل تأثیرگذار در انتقال ژن توسط آگروباکتریوم زمان پیش‌کشت، زمان هم‌کشت و غلظت استوسیرینگون است. در این تحقیق، تأثیر زمان‌های متفاوت پیش‌کشت و هم‌کشت و نیز غلظت‌های مختلف استوسیرینگون به عنوان عامل مؤثر در فرآیند انتقال بر انتقال ژن گزارشگر GUS به ریزنمونه‌های کوتیلدون هر دو رقم کلزا بررسی شد.

عوامل یاد شده در سطوح مختلف شامل: زمان پیش‌کشت (۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، زمان هم‌کشتی(۴۸ و ۷۲ ساعت) و استوسیرینگون (غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول)، در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار بررسی گردید. با انجام این طرح آزمایشی، علاوه بر بررسی اثر عوامل اصلی، مطالعه اثر متقابل این عوامل نیز مقدور است. نتایج تجزیه واریانس برای فراوانی تراریختی هر دو رقم کلزا نشان داد که بین سطوح مختلف طول دوره پیش‌کشت، و همچنین اثر متقابل استوسیرینگون و پیش‌کشت، اثر متقابل استوسیرینگون و هم‌کشت و همچنین، اثرات متقابل سه گانه در هر دو رقم ارتباط معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) وجود دارد (جدول ۴).

مقایسه میانگین بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن برای هر دو رقم کلزا توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد و نتایج آن در جدول ۵ ارایه شده است.

نتایج حاصل از این آزمون نشان می دهد که طول دوره پیش‌کشت ۴۸ ساعت با میانگین ۱۸/۳ و ۲۰/۶ درصد، به ترتیب برای ارقام Hyola 308 و RGS003 میزان فراوانی تراریختی بیشتری نسبت به دو زمان دیگر نشان داده است. در رابطه با زمان هم‌کشتی در رقم Hyola 308، اختلاف معنی‌داری بین فراوانی تراریختی دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت وجود ندارد، در حالی که

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین تراریختی در رقم RGS003 در ۴۸ ساعت با ۱۶/۴ درصد فراوانی، اختلاف معنی‌داری را با زمان ۷۲ ساعت هم‌کشتی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف استوسیرینگون بر میزان تراریختی رقم Hyola 308 نشان داد که در غلظت‌های مختلف مورد استفاده از استوسیرینگون، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، در صورتی که غلظت ۵۰ میلی‌مولار استوسیرینگون برای رقم RGS003 (با ۲۲ درصد تراریختی)، به عنوان مناسب‌ترین غلظت به حساب می‌آید.

جدول ۴- تجزیه واریانس استوسیرینگون، مدت زمان پیش‌کشت و مدت زمان هم‌کشت برای فراوانی تراریختی دو رقم کلزا. ns و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار (non-significant) و اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد را نشان می‌دهد.

منبع تغییرات	Hyola 308		RGS003	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
استوسیرینگون	۲	۰/۴۶۳ ns	۲	۰/۳۷۶ **
پیش کشت	۲	۲/۹۰۷ **	۲	۰/۲۸۹ **
هم کشت	۱	۰/۷۴ ns	۱	۰/۱۲۳ ns
استوسیرینگون× پیش کشت	۴	۰/۸۸۰ **	۴	۰/۱۶۱ **
استوسیرینگون× هم کشت	۲	۱/۲۴۱ **	۲	۰/۰۱۲ ns
پیش کشت× هم کشت	۲	۰/۹۱ ns	۲	۰/۲۳۶ **
استوسیرینگون× پیش کشت× هم کشت	۴	۰/۹۳۵ **	۴	۰/۱۷۳ **
خطای آزمایش	۳۶	۰/۱۶۷	۷۲	۰/۰۵۵
کل	۵۴		۹۰	

جدول ۵- مقایسه میانگین سطوح مختلف مدت زمان پیش‌کشت، مدت زمان هم‌کشت و غلظت استوسیرینگون برای فراوانی تراریختی دو رقم کلزا. حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها است. مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین ۳ تکرار است.

منبع تغییرات	زمان (ساعت)	مولاریته (µM)	Hyloa 308 (درصد تراریختی)	RGS003 (درصد تراریختی)
پیش کشت	۰		۱۱/۶ a	۹/۲ a
	۴۸		۱۸/۳ b	۲۰/۶ b
	۷۲		۱۱/۱ a	۱۲/۶ a
هم کشت	۴۸		۱۴ a	۱۲ a
	۷۲		۱۳/۳ a	۱۶/۴ b
استوسیرینگون		۰	۱۲/۷ a	۱۰ a
		۵۰	۱۲/۷ a	۲۲ b
		۱۰۰	۱۰/۳۷ a	۱۰/۶ a

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه سطوح مختلف دوره پیش‌کشت در دوره هم‌کشت، غلظت‌های مختلف استوسیرینگون در دوره‌های متفاوت پیش‌کشت و همچنین، غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون در زمان‌های هم‌کشت در فراوانی تراریختی دو رقم کلزا با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد انجام شد که نتایج حاصل در جدول ۶ ارایه شده است.

نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین اثرات متقابل طول دوره پیش‌کشت در زمان هم‌کشت نشان می‌دهد که اثرات متقابل بین زمان‌های متفاوت پیش‌کشت در هم‌کشت، در رقم Hyola 308 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، هر چند زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت ۴۸ ساعت با میانگین ۱۸/۹ درصد، میزان تراریختی بیشتری را نسبت به سایر زمان‌ها از خود نشان داده است، در حالی که در رقم RGS003 زمان ۴۸ ساعت پیش‌کشت در ۷۲ ساعت هم‌کشت، با فراوانی ۲۸ درصد تراریختی، اختلاف معنی‌داری را با سایر زمان‌ها از خود نشان می‌دهد. همچنین در این رقم، کمترین اثر متقابل به زمان صفر پیش‌کشت در ۴۸ ساعت زمان هم‌کشت با ۶/۶ درصد تراریختی مربوط است.

بر اساس نتایج ارایه شده در جدول ۶، بیشترین درصد تراریختی در رقم Hyola 308 به اثر متقابل غلظت ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون با زمان ۴۸ پیش‌کشت با میانگین فراوانی ۱۵ درصد مربوط بوده، اما اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌های استوسیرینگون و زمان‌های پیش‌کشت از خود نشان نمی‌دهد، در حالی که در همین شرایط، بیشترین درصد تراریختی در رقم RGS003 با میانگین ۳۱ درصد اختلاف معنی‌داری را با سایر شرایط از خود نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون در زمان‌های هم‌کشت در هر دو رقم کلزای مورد مطالعه نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین فراوانی تراریختی وجود دارد (جدول ۶). غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون در زمان ۴۸ ساعت هم‌کشتی در رقم Hyola 308 با ۱۸ درصد و همین غلظت استوسیرینگون در زمان ۷۲ ساعت هم‌کشتی در رقم RGS003 با ۱۳/۲ درصد بیشترین میزان تراریختی را نشان می‌دهد. کمترین میزان تراریختی به غلظت صفر استوسیرینگون و زمان ۴۸ ساعت هم‌کشتی در رقم RGS003 با ۷ درصد فراوانی مربوط است که اختلاف معنی‌داری را با سایر سطوح از خود نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه طول دوره پیش‌کشت، طول دوره هم‌کشت و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون نشان می‌دهد که بیشترین میزان تراریختی در رقم Hyola 308 (۳۳ درصد) در شرایط ۱۰۰ میکرومولار غلظت استوسیرینگون و ۴۸ ساعت برای زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت و در رقم RGS003 (۳۸ درصد) در ۵۰ میکرومولار غلظت استوسیرینگون، زمان پیش‌کشت ۴۸ ساعت و زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت به دست می‌آید. هر دو نسبت به سایر تیمارها در گروه‌های آماری جداگانه قرار می‌گیرند (جدول ۷). در رقم RGS003 غلظت صفر استوسیرینگون در زمان صفر پیش‌کشت و زمان ۴۸ ساعت هم‌کشت با ۳ درصد تراریختی، کمترین میزان تراریختی را به خود اختصاص داده است (جدول ۷). از شرایط به دست آمده اختصاصی مناسب برای هر رقم کلزا برای عمل تراریختی نمونه‌ها با آگروباکتریوم استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر مدت زمان پیش‌کشت، مدت زمان هم‌کشت و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون و اثرات متقابل آنها برای فراوانی تراریختی دو رقم کلزا. حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها است. مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین ۳ تکرار است.

منبع تغییرات	مولاریته (µM)	زمان (ساعت)	Hyloa 308 (درصد تراریختی)	RGS003 (درصد تراریختی)
پیش‌کشت× هم‌کشت		۴۸×۰	۱۲/۲ a	۶/۶ a
		۴۸×۴۸	۱۸/۹ b	۱۳/۲ b
		۴۸×۷۲	۱۱/۱ a	۱۶ b
		۷۲×۰	۱۱/۱ a	۱۲ b
		۷۲×۴۸	۱۷/۶ b	۲۸ c
		۷۲×۷۲	۱۱/۴ a	۱۸ b
استوسیرینگون× پیش‌کشت	۰	۰	۱۱/۶ a	۷ a
		۴۸	۱۵ b	۱۵ b
		۷۲	۱۱/۶ a	۱۰ a
	۵۰	۰	۱۳/۳ b	۱۳ b
		۴۸	۱۵ b	۳۱ d
		۷۲	۱۰ a	۲۵ c
	۱۰۰	۰	۱۰ a	۹ a
		۴۸	۲۵ c	۲۳ c
		۷۲	۱۱/۶ a	۱۸ b
استوسیرینگون× هم‌کشت	۰	۴۸	۱۲/۲ b	۷ a
		۷۲	۱۳/۳ b	۱۰/۶ a
	۵۰	۴۸	۱۴/۲ b	۱۲/۶ b
		۷۲	۹/۶۲ a	۲۵/۲ c
	۱۰۰	۴۸	۱۸ c	۸ a
		۷۲	۱۲/۲ b	۱۳/۲ b

ارزیابی تراریختی کلزا با استفاده از آزمون سنجش بیوشیمیایی GUS و الگوی PCR

پس از چندین مرتبه گزینش گیاهچه‌های تراریخت روی محیط‌کشت حاوی کانامایسین به منظور تأیید انتقال کاست (Cassette) حاوی ژن *GUS* و ژن *nptII* به گیاهان تراریخت از روش PCR به ترتیب با آغازگرهای GUSF/R و NPTIIF/NosR استفاده شد. ژن *npt*II عامل ایجاد مقاومت به کانامایسین در گیاهان تراریخت شده، به صورت یک عامل انتخابی عمل می‌نماید. نتیجه حاصل از این PCR یک قطعه ۵۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

جفت بازی برای ژن *GUS* و یک قطعه ۱۵۵۰ جفت بازی برای ژن *npt*II است که برابر قطعات مورد انتظار بوده، تأیید کننده انتقال ژن به گیاه کلزاست (شکل ۱).

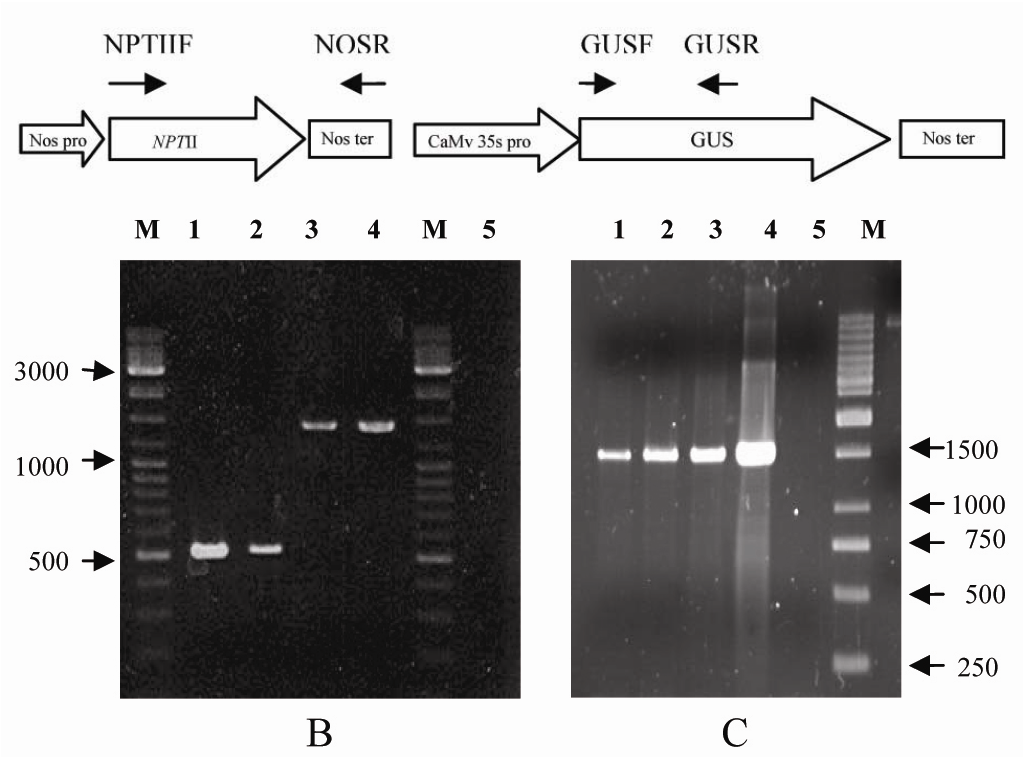
اگرچه حضور و بیان ژن *npt*II در این تحقیق از طریق رشد گیاهچه‌های سبز روی محیط کشت حاوی کانامایسین به اثبات رسیده است، با این حال در گزینش گیاهان روی محیط کشت انتخابی امکان فرار گیاهچه‌های غیرتراریخت وجود دارد. برای این منظور از آزمون فوق استفاده شد. همچنین، بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت از طریق سنجش بیوشیمیایی GUS اثبات گردید. نتیجه آزمون سنجش بیوشیمیایی GUS در گیاه به صورت مشاهده رنگ آبی (در گیاه تراریخت) و رنگ شفاف (در گیاه شاهد) بود (شکل ۲).

جدول ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل مدت زمان پیش‌کشت، مدت زمان هم‌کشت و غلظت‌های متفاوت استوسیرینگون برای فراوانی تراریختی دو رقم کلزا. حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنهاست. مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین ۳ تکرار است.

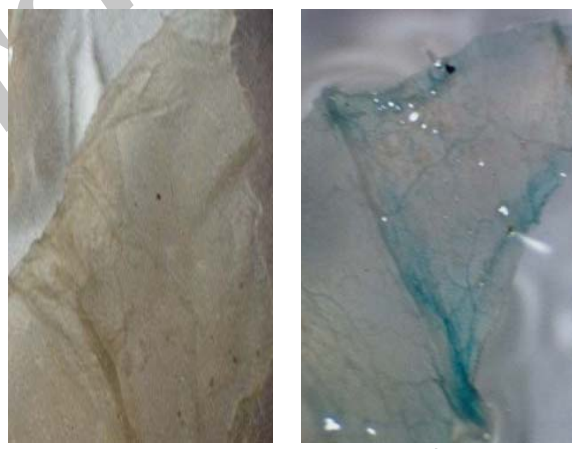
منبع تغییرات	مولاریته (µM)	زمان هم‌کشت (ساعت)	زمان پیش‌کشت (ساعت)	Hyloa 308 (درصد تراریختی)	RGS003 (درصد تراریختی)
استوسیرینگون× هم‌کشت× پیش‌کشت	۰	۴۸	۰	۱۳ a	۳ a
			۴۸	۱۳ a	۱۲ b
			۷۲	۱۰ a	۸ b
		۷۲	۰	۱۰ a	۱۲ b
			۴۸	۱۶/۶ a	۱۲ b
			۷۲	۱۳/۷ a	۱۲ b
	۵۰	۴۸	۰	۱۳ a	۸ b
			۴۸	۱۰ a	۲۰ c
			۷۲	۱۰ a	۳۸ d
		۷۲	۰	۱۳/۳ a	۱۲ b
			۴۸	۲۰ b	۲۳ c
			۷۲	۱۱ a	۸ b
	۱۰۰	۴۸	۰	۱۰/۳ a	۸ b
			۴۸	۳۳ c	۸ b
			۷۲	۱۲/۹ a	۲۰ c
		۷۲	۰	۱۰/۴ a	۱۲ b
			۴۸	۱۶ a	۸ b
			۷۲	۱۰/۴ a	۸ b

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- A) شکل شماتیک کاست حاوی ژن‌های *npt*II و *GUS*. فلش‌ها محل اتصال آغازگرها را نشان می‌دهند؛ B) محصول PCR گیاهان تراریخت رقم RGS003، ۱ و ۲ محصول PCR ژن *GUS* (قطعه ۵۲۱ جفت باز)، ۳ و ۴ محصول PCR ژن *npt*II (قطعه ۱۵۵۰ جفت باز)، ۵ شاهد منفی (گیاه غیرتراریخت)، M: نشانگر مولکولی (ladder mix)؛ C: محصول PCR گیاهان تراریخت رقم Hyola 308، ۱، ۲ و ۳ محصول PCR ژن *npt*II (قطعه ۱۵۵۰ جفت باز)، ۴ شاهد مثبت (استفاده از DNA سازه pBI121)، ۵ شاهد منفی (گیاه غیرتراریخت)، M: نشانگر مولکولی (1 Kb ladder).



شکل ۲- سنجش هیستوشیمیایی GUS در برگ گیاه تراریخت و غیر تراریخت در حضور سوبسترای X-Gluc، ظهور رنگ آبی بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت (A) در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت (B) است.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

گیاهان روغنی دومین منبع تأمین کننده انرژی برای جوامع بشری به شمار می‌آیند، به علت تولید بیشترین روغن خوراکی، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. در میان گیاهان روغنی، کلزا به علت دارا بودن بیشترین درصد اسیدهای چرب خوراکی غیر اشباع، کمترین درصد مواد مضر، بالا بودن مواد مطلوب در بازمانده‌های آن و استفاده از آن در تغذیه دام و طیور، اهمّیت فوق‌العاده‌ای پیدا کرده است.

از آنجا که تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق انتقال ژن ضروری به نظر می‌رسد، بهینه‌سازی عوامل متعددی که در باززایی کلزا تحت شرایط *in vitro* تأثیر می‌گذارند، شامل ژنوتیپ گیاه، ترکیبات محیط کشت، زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشتی اجتناب‌ناپذیر می‌نماید (Raldugina and Sobolkova, 1995; Malishenko *et al*., 2003; Halina *et al*., 2005; Cardoza and Stewart, 2006; Wang *et al*., 2006).

برای مهندسی ژنتیک و انتقال ژن با میانجی‌گری آگروباکتریوم، کشت بافت یکی از اصلی‌ترین و طولانی‌ترین مراحل است، اصولاً انتقال ژن به گیاه بدون کشت بافت امکان‌پذیر نیست.

در کشت بافت کلزا، ریزنمونه‌های کوتیلدونی اغلب بدون گذر از مرحله کالوس، ارگانوژنز (اندام‌زایی) انجام داده، تولید شاخه می‌کنند. این ریزنمونه‌ها در سطح بریده انتهای دمبرگ خود سلول‌های مریستمی دارند که از قدرت باززایی بالایی برخوردار بوده، هدف ایده‌آلی برای آگروباکتریوم هستند. در صورتی که این ریزنمونه‌ها به طرز مناسبی تهیه شوند (به طوری که جوانه انتهایی آنها حذف شده، ولی قاعده دمبرگ‌ها که دارای سلول‌های جوان با قدرت تقسیمی زیاد هستند، باقی بمانند) امکان دستیابی به شاخه‌های تراریخت شده افزایش می‌یابد. در این تحقیق از ریزنمونه‌های کوتیلدونی استفاده گردید.

در بین شش غلظت مختلف BAP مورد استفاده، بهترین غلظت برای باززایی در هر دو رقم Hyola 308 و RGS003، غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. با بالا رفتن غلظت BAP میزان کالوس‌زایی در انتهای دمبرگ ریزنمونه‌های کوتیلدونی افزایش یافت. این میزان در غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر مشاهده می‌شود. Cardoza و Stewart (۲۰۰۶) نیز بهترین غلظت BAP مورد استفاده برای باززایی در گیاه کلزا را ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد که این تفاوت غلظت می‌تواند به دلیل ژنوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه باشد.

در حال حاضر، به منظور بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن از ژن‌های گزارشگر متنوعی استفاده می‌نمایند که از میان آنها ژن بتا گلوکورونیداز (*GUS*) بیشترین کاربرد را دارد (Reda *et al*., 2006). در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن از ژن گزارشگر GUS استفاده شد.

در انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، عوامل زمان پیش‌کشت، زمان هم‌کشت و غلظت استوسیرینگون بسیار تأثیر گذار است (Cardoza and Stewart, 2003). همان طوری که نتایج به دست آمده نشان می‌دهد، بهترین شرایط برای رقم Hyola 308 عبارت است از: زمان پیش‌کشت و هم‌کشت ۴۸ ساعت، همراه با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون. میزان تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدونی تحت این شرایط بسیار بیشتر از سایر شرایط و حدود ۳۳ درصد بوده است. از طرفی برای

Archive of SID

www.SID.ir

رقم RGS003 بیشترین میزان تراریختی با حدود ۳۸ درصد در شرایط ۷۲ ساعت پیش‌کشت، ۴۸ ساعت هم‌کشت و غلظت ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون مشاهده گردید. Cardoza و Stewart (۲۰۰۶)، زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت برای گیاه کلزا را به ترتیب ۷۲ ساعت و ۴۸ ساعت گزارش کرده‌اند. آنها با بهینه‌سازی زمان‌های پیش‌کشت و هم‌کشت، میزان تراریختی از حد پایه ۴ درصد به ۲۵ درصد رساندند. همچنین Zhang و همکاران (۲۰۰۵)، میزان تراریختی را برای ارقام Westar ۳۳/۱ درصد، Oscar ۶۸/۱ درصد، PK7 a ۶۷/۶ درصد، R125 ۷/۷ درصد و Rainbow ۱۱/۹ درصد گزارش کردند. با توجه به این که انتقال ژن در رقم‌های مختلف، متفاوت و وابسته به ژنوتیپ است، می‌توان این اختلاف را توجیه نمود.

استفاده از *A. tumefaciens* به عنوان یک ناقل طبیعی در تراریختی گیاهان روشی مرسوم و کارآمداست که در مورد بسیاری از گیاهان کاربرد دارد. در این تحقیق نیز به منظور انتقال ژن به گیاه کلزا از این ناقل استفاده شد. پلاسمید pBI121 یک ناقل دوگانه، واجد ژن گزارشگر GUS (یا بتا-گلوکورونیداز) و پروموتر قوی CaMV35S قبل از MCS است. همچنین، pBI121 دارای دو محل همانندسازی برای *E. coli* و *A. tumefaciens* است. بنابراین، می‌تواند به عنوان یک شاتل وکتور نیز عمل نماید (Chen *et al*., 2003).

در نهایت با توجه به بهینه‌سازی انجام شده در این تحقیق، در مورد شرایط باززایی و تراریختی دو رقم Hyola 308 و RGS003، می‌توان از این شرایط برای انتقال ژن‌های مورد نظر به این دو رقم استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به علت تأمین بودجه پژوهشی این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Bhalla, P. L. and Singh, M. B. (2008) Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. Nature Protocols 3(2): 181-189.

Cardoza, V. and Stewart, C. N. (2003) Increased *Agrobacterium*- mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Reports 21: 599-604.

Cardoza, V. and Stewart, C. N. (2006) Canola (*Brassica napus*). In: Methods on Molecular Biology (ed. Wang, K.) 343: 257-266. Humana Press, Totowa, USA.

Cervera, M. (2004) Histochemical and fluorometric assays for *uid*A (*GUS*) gene detection. In: Transgenic plants: methods and protocols (ed. PENA, L) 203-213. Humana Press, Totowa, USA.

Chen, D., Kawarasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T. (2003) Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class nb genes. Journal of Bioscience and Bioengineering 95: 594-600.

Dennis, T. T. (2003) Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. Biologia Plantarum 46: 529-533.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Halina, H., Marzena, P. and Grzegorz G. (2005) Morphological and histological

Archive of SID

www.SID.ir

aspects of 2, 4-D effects on rape explants (*Brassica napus* L. cv. *Kana*) cultured *in vitro*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47(1): 219-226.

Hao, Y., Charles, T. C. and Glick, B. R. (2010) ACC deaminase increases the *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation frequency of commercial canola cultivars. FEMS Microbiology Letter 307(2): 185-190.

Kern, H. R. and Meyer, M. M. (1986) Tissue culture propagation of *Acer×Freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. Hort Science 21: 1209-1210.

Malishenko, S. I., Tulkina, L. G., zvereva, S. D. and Raldugina G. N. (2003) Development of transgenic plants of *Brassica campestris*, expressing *gfp* gene. Russian Journal of Plant Physiology 50(2): 309-315.

Moloney, M. M., Walker, J. M. and Sharma, K. K. (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports 8: 238-242.

Radke, S. E., Andrew, B. M., Moloney, M. M., Crouch, M. L., Kridl, J. C. and Knauf, V. C. (1988) Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*: development regulated expression of reintroduced napin gene. Theoretical applied Genetics 75: 685-694.

Raldugina, G. N. and Sobol'kova, G. I. (1995) Factors affecting organogenesis in cotyledon rape explants. Fiziologiya Rastenii (Moscow) 42: 916-923.

Reda, E. A., Moghaieb, M. A., El-Awady, R. G., El-Mergawy, S. S.Y. and El-Sharkawy, A. M. (2006) A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus*). African Journal of Biotechnology 5(2): 143-148.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork.

Singh, R., Srivastava, K., Jaiswal, H. K., Amla, D. V. and Singh, B. D. (2002) High frequency multiple shoot regeneration from decapitated embryo axes of chickpea and establishment of plantlets in the open environment. Biologia Plantarum 45: 503-508.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Ojima, K., Watanabe, M., Toriyama, K. and Hinata, K. (1997) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L. Breeding Science 47: 127-134.

Wang, J. X., Zhao, F. Y. and Xu, P. (2006) Use of aroA-M1 as a selectable marker for Brassica napus transformation. Crop Science 46: 706-711.

Wang, L. J., Ni, D. A., Wang, G. Y., Xia, Z. A. and Xu, Z. K. (1999) Preliminary studies on tissue culture and *Agrobacterium*- mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *Chinensis*. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 32: 93-99.

Zhang, Y., Singh, M. B., Swoboda, I. and Bhalla, P. L (2005) Agrobacterium-mediated transformation and generation of male sterile lines of Australian canola. Australian Journal of Agricultural Research 56: 535-36.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines

Reza Goleyjani Moghaddaam, Mostafa Motallebi *, Mohammad Reza Zamani [1] and Habib Rezanejad

Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

The objective of the study was to develop an efficient method for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated gene transformation into *Brasica napus* cultivars, Hyola308 and RGS003. Different concentrations of benzylaminopurine (BAP) (3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 and 6 mg/L) were evaluated for shoot regeneration of petiol cotyledonary explants. Also, the effect of preconditioning and co-cultivation periods and acetosyringone concentrations were studied on the Gus reporter gene transformation. The experimental design was factorial based on completely randomized design with 3-5 replications. Maximum shoot regeneration was obtained using 3.5 mg/L BAP with 112% for Hyola308 and 120% for RGS003 cultivars. The transformed plants were screened on kanamycin containing medium and the presence and the expression of the reporter gene were confirmed by PCR and Gus assay, respectively. The highest effect on transformation efficiency was observed through 48 h preconditioning and co-cultivation period and 100 µM acetosyringone for Hyola308 (33%), and 38 h preconditioning period, 72 h co-cultivation period and 50 µM acetosyringone for RGS003 (38%).

Key words: Canola, Regeneration, Transformation, *GUS*, BAP

* Corresponding Author: motalebi@nigeb.ac.ir

www.SID.ir