نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، نیمسال دوم ۱۳۸۹ ، ص. ۲۰۲-۱۹۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 24, No. 2, Fall- Winter 2010-2011, P. 195-202
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی روش کشت بافت و سیستم انتقال ژن در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

مهدی محب‌الدینی[۱]- مختار جلالی جواران[۲*]- هوشنگ علیزاده[۳]- فریدون مهبودی[۴] - حسین خسروی[۵]

تاریخ دریافت:۸۸/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۷

چکیده

گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) از جمله سبزی‌های برگی متعلق به خانواده چتریان (Asteraceae) می‌باشد. دستکاری ساختار ژنتیکی کاهو نیازمند یک روش پایا و موثر کشت بافت و انتقال ژن می‌باشد. با توجه به اینکه گیاه کاهو یک بیوراکتور بسیار مناسب به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب به ویژه واکسن‌های خوراکی است لذا در قالب این پروژه تحقیقاتی سعی شده است علاوه بر بهینه‌سازی سیستم کشت بافت این گیاه، مکانیسم مناسب انتقال ژن به آن تعیین گردد. ابتدا اثرات سن ریزنمونه کاهو (کوتیلدون‌های ۳ و ۷ روزه ژنوتیپ محلی اهواز) و ۷ ترکیب مختلف از هورمون‌های رشد گیاهی بر روی القا کالوس و شاخه‌زایی مستقیم آزمایش شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. حساسیت کوتیلدون‌های کاهو به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین با کشت کوتیلدون‌ها روی محیط انتخابی دارای غلظت‌های مختلف هیگرومایسین ارزیابی شد. برای انتقال ژن از آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pCAMBIA1304 استفاده شد و روش PCR برای بررسی گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گرفت. بالاترین میزان القا کالوس با استفاده از محیط کشت M1 حاوی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولارBA برای نمونه‌های کوتیلدونی ۷ روزه بدست آمد. همچنین تعداد بالای شاخه‌زایی مستقیم در محیط‌های کشت M1 (حاوی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA) و M7 (حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA) حاصل شد. مقدار ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین بطور کامل از باززایی نمونه‌های غیر تراریخت جلوگیری کرد و بنابراین غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت انتخابگر استفاده شد. شرایط بهینه‌ای برای تراریختگی، از هم‌کشتی ریزنمونه‌های کوتیلدونی با آگروباکتریوم در محیط MS بدون هیچ تنظیم کننده رشدی بدست آمد. آنالیزهای اولیه گیاهان باززایی شده در محیط انتخاب‌گر، در سطح DNA و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن hph صورت پذیرفت و گیاهان تراریخته انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: کاهو، دستورزی ژنتیکی، کشت بافت، شاخه‌زایی مستقیم، ژن انتخابگر hph

مقدمه [۱]

گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) یکی از مهمترین سبزیجات برگی مورد استفاده در دنیا بوده و متعلق به خانواده چتریان (Asteraceae)می‌باشد. این گیاه، یکساله و دارای ۲n=2x=۱۸ کروموزوم است. برگهای کاهو منبع مهمی از ویتامینهای A، C و نیز لاکتوپیسرین می‌باشد. لاکتوپیسرین برای ساخت داروهای خواب‌آور و همچنین به عنوان ماده ضد سرطان استفاده می‌شود (۱۲ و ۱۳). در حدود ۶۶ درصد از مساحت زیر کشت کاهوی دنیا در آسیا قرار دارد که ایران جزو یکی از اصلی‌ترین تولیدکنندگان کاهو در این قاره می‌باشد (۶).

روش‌های اصلاح کلاسیک کاهو که یک گیاه خودگشن است شامل روش‌های اصلاح شجره‌ای، بک کراس و گزینش توده‌ای می‌باشد. اکثر ارقام اصلاح‌شده کاهو که در حال حاضر کشت می‌شوند به طریق اصلاح کلاسیک تولید شده‌اند ولی با توسعه زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک امکان اصلاح کاهو با استفاده از روش‌های نوین فراهم شده است و مطمئناً این تکنیک‌ها در آینده نقش مهمتری را در اصلاح این گیاه ایفا خواهند کرد. اهداف اصلی اصلاح مدرن کاهو در زمینه‌های مقاومت به آفات و بیماری‌ها، بهبود کیفیت و افزایش میزان عملکرد ترسیم شده است. برای استفاده از زیست‌فناوری در اصلاح کاهو نیاز به بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال ژن به کاهو می‌باشد بطوری که بتوان سلول‌های گیاهی را تراریخته کرده و با استفاده از محیط کشت مناسب از سلول‌های تراریخته، گیاه کامل در حداقل

۱،۲و۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
(*- نویسنده مسئول: Email: m_jalali@modares.ac.ir)
۳ - استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تهران
۴- دانشیار انستیتو پاستور ایران

Archive of SID
www.SID.ir

زمان ممکن بدست آورد.

در کاهو با استفاده از کشت بافت ریزنمونه کوتیلدونی، ساقه‌های جدید حاصل می‌شود. اولین شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه کوتیلدونی با کشت آنها بر روی محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش شد (۵). همچنین ژینران و کونر (۱۷) و آمپوما- دوامنا و همکاران (۱) اثر ژنوتیپ کاهو روی شاخه‌زایی مستقیم از کوتیلدون را در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داد که ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین بر روی شاخه‌زایی تاثیر معنی‌داری داشتند. در مطالعه دیگری مشخص شد که درصد کوتیلدونهای تولیدکننده نوساقه و میانگین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه کوتیلدونی با کشت ریزنمونه‌های کوتیلدونی، ۳ تا ۱۴ روز بعد از جوانه‌زنی بذور کاهو، روی محیط کشت حاوی ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۴۴ میکرومولار بنزیل آمینو پورین (BA) در مقایسه با ترکیبات اکسینی و سیتوکینینی مختلف (ترکیب اول: ۲۸/۵۴ میکرومولار IAA، ۳۲ میکرومولار کینتین و ۰/۲۳ میکرومولار زآتین و ترکیب دوم: ۰/۵۷ میکرومولارIAA و ۲/۳۲ میکرومولار کینتین و ترکیب سوم: ۰/۵۷ میکرومولار IAA و ۰/۴۴ میکرومولارBA) دو برابر می‌شود (۷). در تحقیق دیگری، وانجیلدورج و همکاران (۱۶) شاخه‌زایی از ریزنمونه‌های کوتیلدونی کاهو را با استفاده از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش کردند. کاناموتو و همکاران (۸) در آزمایش دیگری میزان بالایی از شاخه‌زایی را با استفاده از محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آوردند.

همچنین مطالعاتی به منظور بررسی امکان انتقال ژن با واسطه‌گری آگروباکتریوم به کاهو انجام شده است. اولین گزارش انتقال ژن به کاهو توسط میشل‌مور و همکاران (۱۰) ارائه شد. این گروه تحقیقاتی ژن nptII (مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسن) را با استفاده از آگروباکتریوم به کاهو منتقل کردند. پس از این تحقیق، ژن گزارشگر gus (β-glucuronidase) توسط تورس و همکاران (۱۵) به کاهو منتقل شد. دیاس و همکاران (۶) نیز با استفاده از آگروباکتریوم ژن اگزالات دکربوکسیلاز را به کاهو منتقل کردند. این ژن باعث ایجاد مقاومت علیه بیماری اسکلروتینیا در گیاه شد. به منظور اصلاح کاهو برای به تاخیر انداختن پیری در اندام هوایی گیاه، ژن ipt به کاهو منتقل شده و پیری برگها در رقم حاصل (Evola) به طور قابل توجهی به تاخیر افتاد (۹). برای اصلاح کاهو به منظور کاهش تجمع نیترات در برگ‌ها، ژن نیترات ردوکتاز از گیاه توتون به کاهو منتقل شده و نیترات کمتری در برگ‌های کاهو تجمع یافت (۳).

هدف از این تحقیق بهینه‌سازی سیستم کشت بافت و روش انتقال ژن (انتخابگر hph) به گیاه کاهو بود. بدین منظور این تحقیق طی دو مرحله انجام شد: اولین مرحله بهینه‌سازی کشت بافت برای کاهوی ایرانی (ژنوتیپ محلی اهواز) بود. برای این منظور اثر دو فاکتور سن ریز نمونه کوتیلدونی و ترکیب غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS بر میزان کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم کاهو بررسی شد. مرحله دوم آزمایش انتقال ژن انتخابگر مقاومت به هیگرومایسین (hph) بواسطه آگروباکتریوم به کاهو بود.

مواد و روش ها

آماده کردن ریزنمونه کوتیلدونی

در این آزمایش از بذرهای رسیده کاهوی محلی اهواز به منظور تهیه ریزنمونه (کوتیلدون) استفاده شد. بذور به صورت سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. برای حذف باقیمانده هیپوکلریت سدیم، بذور ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بعد از خشک کردن بذور بر روی کاغذ صافی استریل، ۲۵ بذر به محیط جوانه‌زنی (محیط $\frac{1}{2}$MS) منتقل شدند. میزان pH محیط جوانه‌زنی بر روی ۵/۹ تنظیم شد. بذور کشت شده بر روی محیط جوانه‌زنی در دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ تا ۷ روز تحت رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

بهینه‌سازی سیستم کشت بافت کاهو

بعد از گذشت ۳ تا ۷ روز از زمان کشت بذور، ریزنمونه‌های کوتیلدونی با دقت از جوانه‌های بذر کاهو جدا شدند. کوتیلدون‌های جدا شده به روی محیط کشت MS (۱۱) حاوی غلظت‌های مختلف NAA و BA منتقل شدند. غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش در جدول (۱) آورده شده است. نمونه‌های کوتیلدونی بر روی محیط‌های هورمون‌دار به گونه‌ای قرار داده شدند که پشت کوتیلدون در تماس با محیط کشت باشد. همه پتری‌دیش‌های حاوی ریزنمونه‌های کوتیلدونی در شرایط دمایی و نوری مشابه شرایط جوانه‌زنی بذر نگهداری شدند.

سویه باکتری و پلاسمید مورد استفاده

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده در این تحقیق سویه LBA4404 بود که دارای ژن مقاومت به استرپتومایسین می‌باشد. پلاسمید مورد استفاده نیز pCAMBIA1304 بود. این پلاسمید حاوی ژن مقاومت به کانامایسین خارج از بخش منتقل شونده به گیاه و ژن انتخابگر مقاومت به هیگرومایسین (hph) در داخل بخش منتقل شونده

Archive of SID

www.SID.ir

مـی‌باشـد. از دو آنتـی‌بیوتیـک استرپتومایسـین و کانامایسـین در محیط‌های کشت باکتری به ترتیب برای جلوگیری از احتمال آلـودگی و حفظ پلاسمید pCAMBIA1304 در باکتری آگروباکتریوم استفاده شد و از آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای انتخاب نوساقه‌های تراریخته (حاوی ژن hph) استفاده شد.

جدول ۱- غلظت هورمونی در محیط‌های کشت برای القا کالوس‌زایی از کوتیلدون کاهوی محلی اهواز و شاخه‌زایی مستقیم ناشی از آن

محیط کشت	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی(برحسب میکرومولار)	
	NAA	BA
M1	۰/۵۴	۰/۴۴
M2	۲/۷	۲/۲
M3	۵/۴	۲/۲
M4	۲/۷	۴/۴
M5	۵/۴	۴/۴
M6	۰/۲۷	۱/۷۶
M7	۰/۱	۰/۴۴

ارزیابی میزان حساسیت کوتیلدون‌ها به آنتی‌بیوتیک

حساسیت ریزنمونه‌های کوتیلدونی به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسـین با کشت این ریزنمونه‌ها بـر روی محـیط کشـت‌هـای حـاوی مقـادیر مختلف هیگرومایسین (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بـا ۳ تکرار بررسی شد.

انتقـال ژن انتخـابگر مقاومـت بـه هیگرومایسـین (hph) بـه سلول‌های ریزنمونه‌های کوتیلدونی کاهو

ریزنمونه‌های کوتیلدونی جداشده از بـذرهای جوانـه‌زده کـاهو بـا آگروباکتریوم تلقیح شدند. به منظور تلقیح نمونه‌ها، ابتدا یک کلـون از باکتری آگروباکتریوم برداشته شده و به محـیط کشـت بـاکتری (LB مایع) دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و استرپتومایسین منتقل شد. پس از رسیدن OD باکتری به ۰/۸ تا ۱، میزان ۲ میلی‌لیتـر از محـیط کشت حاوی باکتری برداشته شده و با استفاده از محیط MS مایع بـه حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ریزنمونه‌های کوتیلـدونی بعـد از ایجاد زخم‌های سطحی بر روی آنها، جهت آلوده‌سـازی بـه مـدت ۱۰ دقیقه در داخل این محیط رقیق شده آگروبـاکتریوم قـرار داده شـدند. چـون در حـین فراینـد انتقـال ژن بایـد کمتـرین تـنش محیطـی بـه کوتیلدون‌ها وارد شود بنابراین در هنگـام تلقـیح بـه قطعـات کوچـک تقسیم نشدند. بعد از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی، کوتیلـدون‌هـا بـه محیط هم‌کشتی منتقل شدند و به مـدت ۷۲ سـاعت در ایـن محـیط نگهداری شدند. محیط کشت MS بدون هورمـون بـه عنـوان محـیط هم‌کشتی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت، نمونه‌ها به محیط کشت‌های حاوی هورمـون‌هـای گیـاهی و آنتـی‌بیوتیـک‌هـای هیگرومایسـین و سفوتاکسـیم منتقـل شـدند. نوسـاقه‌هـای بـاززایی شـده بـه محـیط کشت‌های MS جدید حـاوی آنتـی‌بیوتیـک‌هـای فـوق‌الـذکر و فاقـد هورمون‌های گیاهی، منتقل شدند.

تجزیه‌های آماری

طرح آزمایشی برای تعیین غلظت‌های مناسب هورمون در محـیط کشت و همچنین تعیین مناسب‌ترین سن برای ریزنمونه کوتیلدونی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در هر تکرار آزمایشی ۲۰ نمونه کوتیلدونی قرار داده شـده بودنـد. میـزان کالوس‌های تولید شده و همچنین میزان شاخه‌زایی مسـتقیم بعـد از ۳ هفته برای ریزنمونه‌های کوتیلدونی در تیمارهای مختلف محاسبه شد. با استفاده از جدول تجزیه واریانس معنی‌داری اثرات اصـلی ترکیبـات هورمونی و سن نمونه کوتیلدونی و همچنـین اثـر متقابـل آنهـا مـورد بررسی قرار گرفت. مقایسـه میـانگین‌هـا بـا اسـتفاده از آزمـون چنـد دامنه‌ای والر- دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمـایش بـا استفاده از نرم‌افزارهـای (۱۴) SAS، SPSS16 و Minitab15 انجـام شد.

آغازگرهای استفاده شده و شرایط PCR

برای طراحی آغازگرها از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای تـوالی ژن مقاومت به هیگرومایسین استفاده شد. در طراحی آغـازگر توسـط نـرم افزار Oligoanalyser، عدم تشکیل حلقـه و تشـکیل دو رشـته‌ای از این آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. توالی آغازگرها عبارتند از:

آغازگر پیشرو: 5'- ATGAAAAAGCCTGAACTCACC -3'

آغازگر معکوس: 5'- CTATTTCTTTGCCCTCGGACG -3'

برای تکثیـر ژن hph ابتـدا واسرشـته‌سـازی اولیـه در ۹۴ درجـه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس واسرشته‌سازی، اتصال و طویل شـدن بـه ترتیـب در درجـه حرارتهـای ۹۴، ۴۸ و ۷۲ درجـه سلسیوس هر کدام به مـدت ۱ دقیقـه در ۳۵ سـیکل انجـام شـد و در نهایت طویل شدن نهایی به مـدت ۵ دقیقـه در ۷۲ درجـه سلسـیوس صورت گرفت.

نتایج و بحث

تاثیر سن کوتیلدون و ترکیب هورمونی بر میزان کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی نشـان داد کـه اثـر سـن ریزنمونه، نوع محیط کشت و اثر متقابل آنها معنی‌دار بودند. با توجه به اینکه اثر متقابل بین سن ریزنمونه و نوع محیط کشـت معنـی‌دار بـود (شکل ۱) بنابراین مقایسه میانگین ترکیبات تیماری با استفاده از روش مقایسه میانگین چند دامنه‌ای والر- دانکن انجام شـد. نتـایج مقایسـه میانگین ترکیبات تیماری سن ریزنمونه و نوع محیط کشت در جـدول

Archive of SID

www.SID.ir

۳ نشان داده شده است. با توجه به جدول شماره ۳، محیط کشت M1 حاوی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA برای ریزنمونه‌های کوتیلدونی ۷ روزه بیشترین میزان کالوس‌زایی (۷۳ درصد) را نشان داد. محیط کشت M7 حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA برای نمونه‌های کوتیلدونی ۳ و ۷ روزه از لحاظ میزان کالوس‌زایی در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین، این ۳ ترکیب تیماری از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. حداقل میزان کالوس‌زایی (۱۰ درصد) در ترکیب تیماری محیط کشت M1 و سن کوتیلدون ۳ روزه مشاهده شد. با توجه به نتایج جدول ۳ می‌توان گفت که غلظتهای پایین هورمونهای NAA و BA در سنین مختلف کوتیلدون به استثنا کوتیلدون‌های ۳ روزه در محیط M1، باعث افزایش میزان کالوس‌زایی در نمونه‌های کوتیلدونی شدند. در مقابل، غلظت‌های بالای هورمونی مانع کالوس‌زایی بر روی نمونه‌های کوتیلدونی در هر دو سن کوتیلدون ۳ و ۷ روزه شدند. بر اساس تحقیقات انجام شده توسط ژینران و کونر (۱۷)، کورتیس و همکاران (۲) و آمپوما-دوامنا و همکاران (۱) مشخص شده است که میزان کالوس‌زایی در کاهو وابسته به نوع ژنوتیپ است. بنابراین بدون در نظر گرفتن اثر نوع محیط کشت می‌توان گفت برای این ژنوتیپ محلی میزان کالوس‌زایی در مرحله ۳ روزه رشد کوتیلدون کمتر از مرحله ۷ روزه آن می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان کالوس‌زایی در نمونه‌های کوتیلدون کاهوی محلی اهواز با دو سن مختلف به روش والر- دانکن

نوع محیط کشت	سن ریزنمونه (کوتیلدونی)	
هورمون بر حسب میکرومولار	۳ روزه	۷ روزه
M1(۰/۵۴ NAA و ۰/۴۴ BA)	۱۰^{f}	۷۳^{a}
M2(۲/۷ NAA و ۲/۲ BA)	۲۲^{def}	۳۲^{cde}
M3(۵/۴ NAA و ۲/۲ BA)	۴۰^{c}	۳۷^{cd}
M4(۲/۷ NAA و ۴/۴ BA)	۱۹^{ef}	۲۷^{cde}
M5(۵/۴ NAA و ۴/۴ BA)	۲۳^{def}	۳۶^{cd}
M6(۰/۲۷ NAA و ۱/۷۶ BA)	۳۸^{cd}	۵۶^{b}
M7(۰/۱ NAA و ۰/۴۴ BA)	۶۶^{ab}	۶۲^{ab}

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

بررسی تاثیر سن کوتیلدون و ترکیب هورمونی محیط کشت بر میزان شاخه‌زایی مستقیم

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفت میزان شاخه‌زایی مستقیم، مشخص شد که سن کوتیلدون و نوع محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی شاخه‌زایی مستقیم داشتند. اثر متقابل سن کوتیلدون و نوع محیط کشت برای این صفت معنی‌دار نبود، بنابراین اثرات اصلی با استفاده از روش والر- دانکن مقایسه میانگین شدند. نتایج مقایسه میانگین برای اثرات اصلی در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس جدول شماره ۴ برای اثر اصلی سن ریزنمونه کوتیلدونی، کوتیلدون‌های ۳ روزه در مقایسه با کوتیلدون‌های ۷ روزه بیشترین میزان شاخه‌زایی مستقیم را به خود اختصاص دادند. مقایسه میانگین اثر اصلی نوع محیط کشت برای میزان شاخه‌زایی مستقیم نشان داد که محیط کشت M1 (حاوی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA) و محیط کشت M7 (حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA) بیشترین میزان شاخه‌زایی مستقیم را در مقایسه با سایر محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمایش به خود اختصاص دادند. با توجه به جدول مقایسه میانگین برای صفت میزان شاخه‌زایی مستقیم (جدول ۴) مشخص شد که این صفت نیز همانند صفت میزان کالوس‌زایی، به غلظت‌های پایین NAA و BA پاسخ مناسب‌تری می‌دهد و در مقابل با افزایش غلظت این هورمون‌ها میزان شاخه‌زایی مستقیم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده از تحقیق هانتر و بوریت (۷) بود که بیشترین میزان نوساقه را با استفاده از ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA بدست آوردند. همچنین یافته‌های تحقیقی که توسط کاناموتو و همکاران (۸) انجام شد نیز مشابه نتایج این آزمایش بود. این محققین درصد بالایی از شاخه‌زایی را در نمونه‌های برگی کاهو با استفاده از غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آوردند.

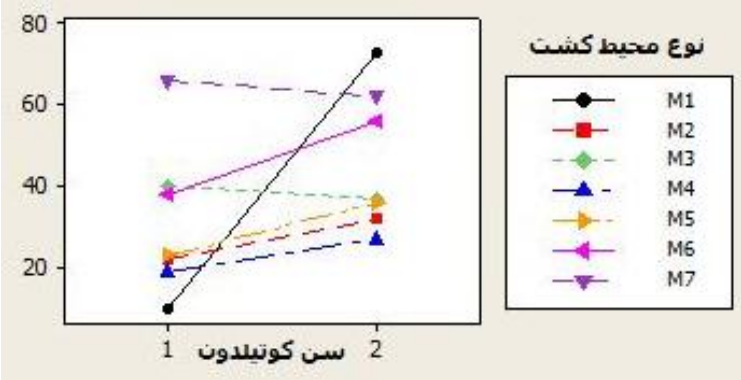
با توجه به نتایج حاصل از بخش اول آزمایش و با توجه به این نکته که برای مرحله دوم آزمایش حداکثر شاخه‌زایی مستقیم با حداقل کالوس‌زایی مورد نظر بود، بنابراین از ترکیب هورمونی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA و کوتیلدون‌های ۳ روزه کاهو برای تلقیح بوسیله آگروباکتریوم سویه LBA4404 استفاده شد.

تعیین سطح موثر هیگرومایسین بر روی کوتیلدون‌های کاهو به عنوان انتخابگر

به منظور توسعه یک روش سریع و موثر تلقیح کوتیلدون‌های کاهو با آگروباکتریوم، ابتدا اثر مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین بر روی کوتیلدون‌های کاهو به صورت طرح کاملاً تصادفی بررسی شد (داده‌ها آورده نشده‌اند). نتایج آزمایش نشان داد که غلظت هیگرومایسین ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بطور کامل از کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم بر روی کوتیلدون‌های کاهو جلوگیری کرد. با توجه به اینکه مقادیر بالای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم اثر منفی بر روی شاخه‌زایی مستقیم از نمونه‌های برگی دارد بنابراین در محیط کشت‌ها، از غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم استفاده شد. سفوتاکسیم آنتی‌بیوتیکی بود که پس از تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی و بعد از مرحله هم‌کشتی به منظور کنترل آگروباکتریوم به محیط‌های هورمون‌دار اضافه شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نمودار اثر متقابل سن‌کوتیلدون و نوع محیط کشت برای صفت میزان کالوس‌زایی

جدول ٤- مقایسه میانگین به روش والر- دانکن برای شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های کوتیلدونی کاهوی محلی اهواز با دو سن مختلف

نوع محیط کشت و میزان هورمون بر حسب میکرومولار	سن ریزنمونه (کوتیلدونی)		میانگین
	۳ روزه	۷ روزه	
M1(۰/۵۴ NAA و ۰/۴۴ BA)	۶۵	۷۲	۶۸/۶ [a]
M2(۲/۷ NAA و ۲/۲ BA)	۱۵	۷	۱۰/۷ [c]
M3(۵/۴ NAA و ۲/۲ BA)	۱۷	۹	۱۳/۲ [c]
M4(۲/۷ NAA و ۴/۴ BA)	۲۳	۶	۱۴/۳ [c]
M5(۵/۴ NAA و ۴/۴ BA)	۱۷	۹	۱۲/۷ [c]
M6(۰/۲۷ NAA و ۱/۷۶ BA)	۲۹	۲۹	۲۸/۹ [b]
M7(۰/۱ NAA و ۰/۴۴ BA)	۶۵	۶۱	۶۳/۱ [a]
میانگین	۳۳[a]	۲۸[c]	

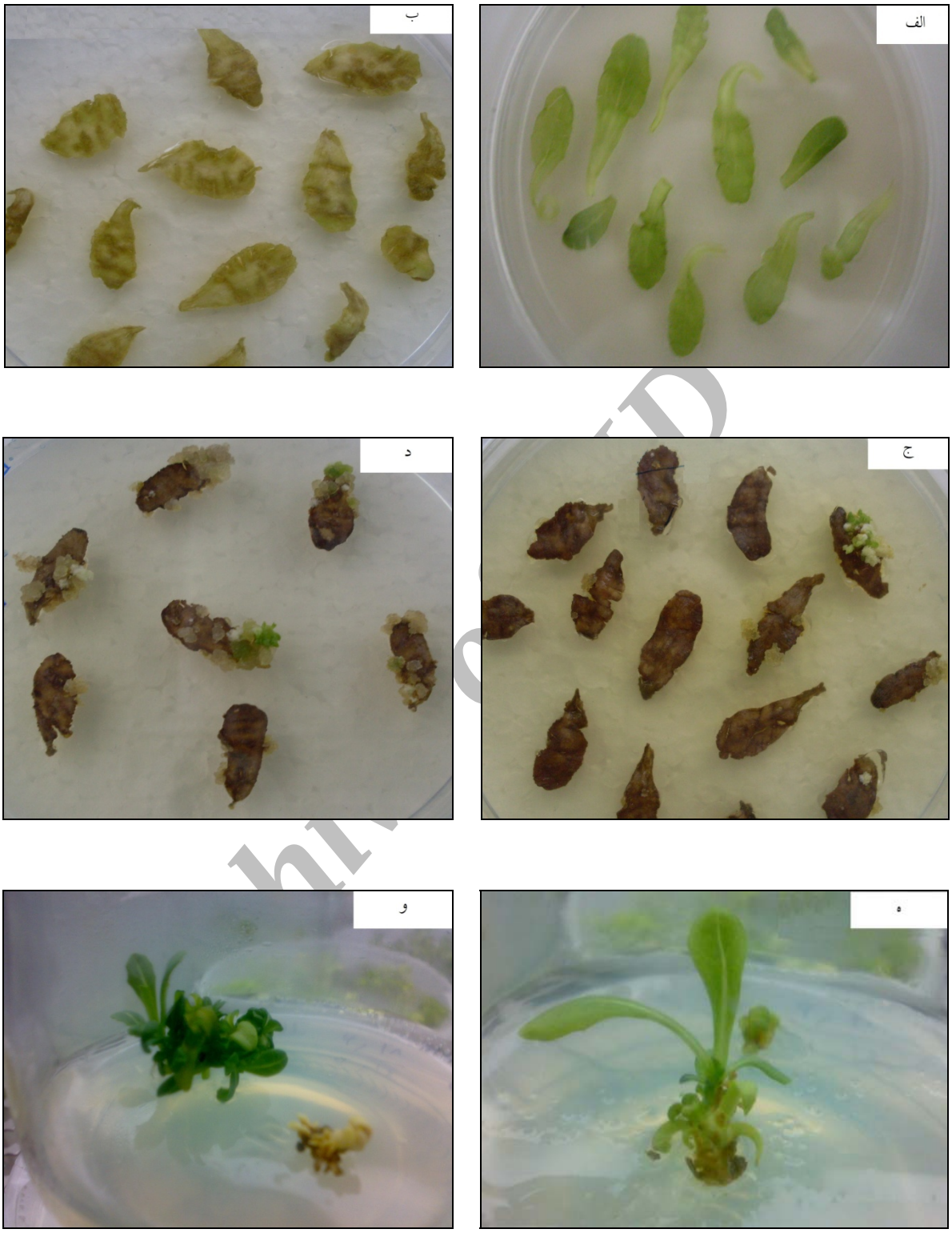
میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

انتقال ژن انتخابگر hph به سلول‌های کاهو با استفاده از آگروباکتریوم

پس از آلوده‌سازی کوتیلدون‌های ۳ روزه کاهو با آگروباکتریوم حاوی ژن انتخابگر(hph)، ابتدا نمونه‌ها به محیط هم‌کشتی بدون هورمون منتقل شدند. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مشخص گردید که نگهداری محیط‌های هم‌کشتی در شرایط تاریکی یا روشنایی به مدت ۳ روز تفاوت چندانی از لحاظ تولید نوساقه‌های تراریخته نداشتند. بعد از ۷۲ ساعت هم‌کشتی، نمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA و آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند. ۳ الی ۴ روز بعد از انتقال نمونه‌ها به محیط‌های هورمون‌دار، نمونه‌های کوتیلدونی متورم و اندازه آنها بزرگتر شد (شکل۲ الف). بعد از ۱۰ روز بخش‌هایی از کوتیلدون که ژن انتخابگر را دریافت نکرده بودند شروع به زرد شدن کردند (شکل۲ ب). ۳ هفته بعد از تلقیح قسمتهای غیر تراریخته کوتیلدون از بین رفته و به رنگ قهوه‌ای در آمدند (شکل۲ ج). مرگ سلولهای کوتیلدونی باعث ترشح ترکیبات فنولیک به محیط رشد شده و محیط کشت‌ها زرد رنگ می‌شدند. برای جلوگیری از ترشح ترکیبات فنولیک، پلی‌وینیل پیرولیدون به محیط کشت اضافه شد. بعد از ۵ هفته نوساقه‌های تراریخته مقاوم (به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین) و همچنین کالوس‌های مقاوم بر روی کوتیلدون‌ها ظاهر شدند (شکل۲ د). زمانی که اندازه این نوساقه‌ها به حدود ۵ میلی‌متر رسید به محیط‌های جدید حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. بعد از ۸ هفته از تلقیح اولیه، گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین بدست آمدند (شکل۲ ه، و).

Archive of SID

www.SID.ir



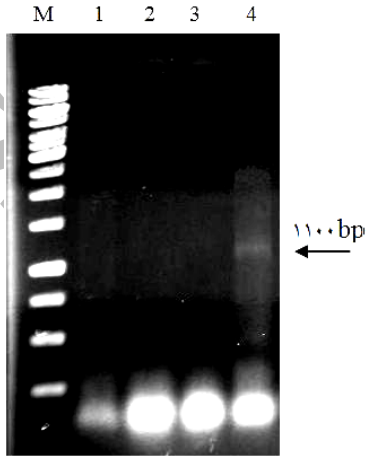
شکل ۲- مراحل کشت بافت ریزنمونه‌های کوتیلدونی بعد از تلقیح با آگروباکتریوم

الف) ریزنمونه‌های کوتیلدونی متورم ب) زرد شدن کوتیلدون‌هایی که ژن انتخابگر hph را دریافت نکرده‌اند ج) قهوه‌ای شدن قسمت‌های غیر تراریخته کوتیلدون د) نوساقه‌ها و کالوس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین ه، و) گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته

برای تایید حضور و درج T-DNA حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین (hph) در ژنوم کاهو، بررسی PCR بر روی گیاهان مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین انجام شد. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مقاومت به هیگرومایسین، قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۱۰۰ bp تکثیر شد (شکل ۳). با توجه به نتایج مشاهده شده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، می‌توان گفت DNA ی ژنومی گیاه T0 حداقل یک کپی از T-DNA حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین را دارا است.



شکل ۳- تایید حضور ژن مقاومت به هیگرومایسین M- مارکر ۱Kb، چاهک۱- کنترل منفی(گیاه غیر تراریخت)، چاهک ۲تا٤- گیاه T1 تا T3

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که برای کاهو (ژنوتیپ محلی اهواز) کالوس‌زایی تحت تاثیر اثر متقابل سن کوتیلدون و نوع ترکیب هورمونی محیط کشت می‌باشد. ولی ژنوتیپ مورد استفاده در این آزمایش برای صفت شاخه‌زایی مستقیم تحت تاثیر اثر متقابل نبود. اثر سن کوتیلدون و نوع محیط کشت به صورت جداگانه بر روی صفت شاخه‌زایی موثر بودند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین مشخص شد که محیط کشت‌های با غلظت‌های کم NAA و BA (کمتر از یک میکرومولار) باعث افزایش کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم در نمونه‌های کوتیلدونی می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل از کشت بافت می‌توان پیشنهاد کرد که تیمارهای اعمال شده در این تحقیق بر روی ژنوتیپ‌های محلی دیگر در کشور اعمال شود و بهترین ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده به کشت بافت تعیین شوند و در برنامه‌های اصلاح مولکولی این گیاه استفاده شوند. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که هیگرومایسین با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر برای انتخاب گیاهان تراریخته در این ژنوتیپ مناسب بود. در این تحقیق بعد از ۸ هفته از تلقیح اولیه، گیاهان مقاوم به هیگرومایسین بر روی محیط کشت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک بدست آمدند. برای تایید حضور قطعه ژن مقاومت به هیگرومایسین در ژنوم گیاه، PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان تراریخته احتمالی انجام شد. بررسی گیاهان تراریخته در سطح DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکنیک PCR نشان داد که ژن هدف hph به ژنوم گیاه کاهو پیوند خورده است. پیشنهاد می‌شود از سویه‌های دیگر آگروباکتریوم نیز برای انتقال ژن استفاده شود تا بهترین سویه برای انتقال ژن به این گیاه انتخاب شود.

سپاسگذاری

از دانشگاه تربیت مدرس به ویژه آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و از آقای دکتر حمید رجبی معماری استادیار دانشگاه شهید چمران اهواز و کلیه افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., and Fautrier A.G. 1997. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro. Scientia Horticulturae, 71: 137–145.
2- Curtis I.S., Power J.B., Blackhall N.W., de Laat A.M.M., and Davey M.R. 1994. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Experimental Botany, 45: 1441–1449.
3- Curtis I.S., Power J.B., De Laat A.M.M., Caboche M., and Davey M.R. 1999. Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. Plant Cell Report, 18: 889–896.
4- Dias B.B.A., Cunha W.G., Morais L.S., Vianna G.R., Rech E.L., de Capdeville G., and Aragão F.J.L. 2006. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina sp.* in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology, 55: 187–193.
5- Doerschug M.R., and Miller C.O. 1967. Chemical control of adventitious organ formation in Lactuca sativa explants. American Journal of Botany, 54: 410–413.
6- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), (2007). http://faostat.fao.org.

Archive of SID

www.SID.ir

7- Hunter D.C., and Burritt D.J. 2002. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa L.*). Scientia Horticulturae, 95: 269–276.
8- Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., Yokota A., and Tomizawa K.I. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. Transgenic Research, 15:205–217.
9- McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J.R.M., Stoopen G.M., Davelaar E., van Rhijn J.H.A., Power J.B., and Davey M.R. 2001. Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. Plant Physiology, 127: 505–516.
10- Michelmore R., Marsh E., Seely S., and Landry B. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Report 6: 439-442.
11- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.
12- Resh H.M. 2001. Hydroponic Food Production. Woodbridge Press Publishing Company, P.O. Box 209, Santa Barbara, CA, 93160. ISBN 0-88007-222-9.
13- Ryder E.J. 2002. The new salad crop revolution. In J. Janick & A. Whipkey (Ed.), Trends in new crops and new uses. (pp. 408–412). ASHS Press, Alexandria, VA.
14- SAS. 2001. SAS/STAT User's Guide (8.02) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
15- Torres A.C., Cantliffe D.J., Laughner B., Bieniek M., Nagata R., Ashraf M., and Ferl R.J. 1993. Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell Tissue Organ Cultture, 34: 279–285.
16- Vanjildorj E., Bae T.W., Riu K.Z., Kim S.Y., and Lee H.Y. 2005. Overexpression of *Arabidopsis* ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 41–50.
17- Xinrun Z., and Conner A.J. 1992. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. Journal of Genetic and Breeding, 46: 287–290.

Archive of SID

www.SID.ir