نشریه زراعت
شماره ۹۴، بهار ۱۳۹۱
(پژوهش و سازندگی)

مطالعه قابلیت انتقال ژن به ارقام تجاری کلزا در ایران

• **محسن مشایخی**
پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
• **علی محمد شکیب** (نویسنده مسئول)
پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
• **مختار جلالی جواران**
دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
• **سعید سهیلی وند**
پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
• **امیر موسوی**
پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۳۶۵۹۰۵۱
Email: a-shakib@abri.ac.ir

چکیده

در این تحقیق قابلیت انتقال ژن به ۸ رقم تجاری کلزا شامل:Licord SLM۰۴۶ ، RGS۰۰۳، Sarigol، Okapi، Zarfam Modena و Opera که با شرایط آب و هوایی مختلف ایران سازگارند با استفاده از ریزنمونه های لپه و محور زیر لپه بررسی شد. قطعات جدا کشت محور زیر لپه و لپه پس از تلقیح با اگروباکتریوم به ترتیب روی محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر D-۲,۴ و ۴/۵ میلی گرم در لیتر BAP هم کشت شدند. جهت تایید انتقال ژن، گیاهان بدست آمده با PCR و آزمون هیستوشیمیایی GUS مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که طیف وسیعی از ارقام با استفاده از ریزنمونه محور زیر لپه تراریخت می شوند در حالیکه این قابلیت با استفاده از ریزنمونه لپه تنها در تعدادی از ارقام وجود داشت. در بین گیاهان تراریخته با استفاده از ریزنمونه های محور زیر لپه رقم Licord بیشترین (۱۵/۲۶٪) و رقم Sarigol کمترین (۰/۲٪) میزان تراریختی را داشتند. در بین گیاهان تراریخته با استفاده از ریزنمونه های لپه ژنوتیپ SLM۰۴۶ با ۴/۷ درصد بیشترین فراوانی تراریختی را به خود اختصاص داده بود.

کلمات کلیدی: کلزا، انتقال ژن، اگروباکتریوم، لپه، محور زیر لپه، آزمون GUS

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 94 pp: 32-40

Study of gene transformability on commercial oilseed rape varieties in Iran

By: Mohsen Mashayekhi, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Ali Mohammad Shakib, (Corresponding Author; Tel: +989183659031) Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Mokhtar Jalali Javaran, Tarbiat Modares University, Faculty of Agriculture, Jalal Ale Ahmad Highway, Saeed Soheilivand, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Amir Mousavi, Genetic Engineering and Biotechnology

Canola (*Brassica napus* L.) is one of oil crops being cultivated in many areas of Iran. Its molecular breeding and production of varieties with new characteristics using genetic engineering needs the establishment of efficient transformation methods in commercial varieties. In this research transformation potential of 8 commercial cultivars; Licord, SLM046, RGS003, Zarfam, Okapi, Sarigol, Modena and Opera adapted to different regions of Iran was studied using cotyledon and hypocotyl explants. Agrobacterium tumifaciens, strain AGL0 containing the plasmid pCAMBIA3301 was used for transformation. Cotyledon and hypocotyl explants after inoculation with Agrobacterium were co-cultivated on MS medium containing 1 mg/l 2,4-D and 4.5 mg/l BAP, respectively. Cotyledonary explants after co-cultivation were transferred on selection MS medium, containing 4.5 mg/l BAP and 3 mg/l phosphinothricin. Hypocotyl explants were transferred on selection MS medium containing 4 mg/l BAP, 2 mg/l Zeatin and 5 mg/l phosphinotricin. The regenerated plants were analyzed by PCR and histochemical GUS assay for gene transformation. The results showed that most of genotyes had gene transformation potential regenerated from hypocotyl segments, while this potential was limited to some cultivars using cotyledon explants. Among transgenic plants, using hypocotyls, Licord cultivar.had the most transformation rate (15.26 %) and Sarigol the least (0.2 %). Also among regenerated plant's from cotyledon, SLM046 cultivar had the most transformation frequency (4.7 %) and Modena, Opera and Zarfam cultivars did not respond to transformation.

Key words: *Brassica napus*, Gene transformation, Agrobacterium, Hypocotyl, cotyledon, GUS assay.

Archive of SID

مقدمه

کلزا[1] یکی از گیاهان روغنی مهم است که پس از سویا و نخل روغنی[2] رتبه سوم و در بین گیاهان مهم اقتصادی رتبه پنجم را پس از برنج، گندم، ذرت و پنبه به خود اختصاص داده است (۴). روغن کلزا کمترین میزان اسید چرب اشباع را دارد که از نظر سلامتی بسیار مورد توجه است. اصلاح ارقام و توسعه کشت کلزا در ایران از جمله سیاست های دولت است. علاوه بر روش های سنتی در اصلاح کلزا، تکنیک های مهندسی ژنتیک این امکان را فراهم ساخته تا ارقام کلزا با خصوصیات جدید تولید گردد. گزارشات متعددی در خصوص انتقال ژن به کلزا به منظور تولید گیاهانی با صفات جدید نظیر تغییر در ترکیبات روغن، تحمل در برابر علفکش ها، اصلاح ترکیب پروتئینی و مقاومت به حشرات وجود دارد (۴).

کشت بافت و کارایی گزینش گیاهان تراریخته دو جزء اساسی در اصلاح ملکولی می باشند (۴). میزان انتقال ژن به ارقام کلزا و باززایی از آنها بسیار متغیر است و به شدت به ژنوتیپ وابسته است (۵، ۷، ۱۴، ۱۵، ۲۴). تکنیک های متعددی نظیر بمباران ذره ای[3]، الکتروپوریشن[4] و استفاده از اگروباکتریوم[5] جهت انتقال ژن به کلزا ارائه شده است (۵) اما از روش اگروباکتریوم که روشی آسان و موثر است بیشتر استفاده می شود. قدرت تهاجم اگروباکتریوم با استفاده از استوسیرینگون[6] که یک ترکیب فنولیک است افزایش یافته و امروزه به عنوان یک روش عمومی در انتقال ژن بکار می رود. از ریز نمونه های گوناگونی نظیر میانگره های ساقه (۹)، قطعات ساقه (۲۵)، لپه (۱۰، ۱۹، ۲۳، ۳۱)، قطعات محور زیر لپه (۲۷، ۳۳، ۳۷)، قطعات برگ (۷، ۲۷)، قطعات ساقه گلدهنده[7] (۸)، لایه های نازک سلول های اپیدرمی و زیر اپیدرمی (۱۶)، ریشه (۳۲) و پروتوپلاست (۱۱) برای انتقال ژن به کلزا استفاده شده است. باززایی گیاه از ریزنمونه ریشه به مدت زمان بیشتری نیاز دارد در نتیجه به طور بالقوه امکان افزایش جهش های سوماتیکی وجود دارد. بنابراین لپه و محور زیر لپه ریزنمونه های مناسبتری جهت استفاده در آزمایشات کشت بافت و انتقال ژن می باشند (۳۹). همانطور که قبلاً گفته شد باززایی در کلزا بستگی زیادی به ژنوتیپ دارد، در یک مطالعه با استفاده از ۱۰۰ رقم میزان باززایی از صفر تا ۹۱ درصد گزارش شد (۲۳). انتقال ژن توسط اگروباکتریوم نیازمند باززایی بالا در گیاه است (۱۷، ۲۸، ۳۹). در بیشتر دستوالعمل‌های انتقال ژن به کلزا که تاکنون گزارش شده از رقم Westar استفاده شده است که برای بیشتر واریته های بهاره و زمستانه قابل تکرار نیستند (۱۴). هر چند که این رقم نسبت به بیماری ساق سیاه[8] حساس است و از لحاظ خصوصیات دیگر زراعی نیز دارای

www.SID.ir

کمبودهایی می باشد (۵). گزارشات محدودی در رابطه با تولید کلزای تراریخته در ارقام زمستانه وجود دارد (۳، ۵، ۶، ۳۳).

بیشتر تحقیقاتی که تاکنون در ایران بر روی باززایی و انتقال ژن به کلزا صورت گرفته بر روی ارقامی است که کاربرد آزمایشگاهی داشته و با شرایط آب و هوایی ایران کمتر سازگاری دارند و عملا نمی توانند در شرایط مزرعه ای کشت شوند. در مطالعات انتقال ژن این نکته بسیار حائز اهمیت است که از ارقام و ریزنمونه هایی استفاده شود که قابلیت انتقال ژن به آنها بالا باشد تا بدین وسیله هزینه و مدت زمان لازم کاهش یابد. در این تحقیق قابلیت انتقال ژن به ۸ رقم تجاری کلزا که هم اکنون در سطح وسیع در ایران کشت می شوند با استفاده از ریزنمونه های لپه و محور زیر لپه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

از پلاسمید pCAMBIA ۳۳۰۱ حامل ژن گزارشگر uidA تحت پروموتور CaMV۳۵S و ژن گزینشگر مقاومت به فسفینوتریسین و Agrobacterium tumefaciens سویه AGL۰ استفاده شد. مواد گیاهی شامل ارقام Zarfam, ,RGS۰۰۳ ,Licord, SLM۰۴۶ Okapi, Sarigol , Modena و Opera بود که در ایران کشت می شوند. تمامی این ارقام بجز رقم های RGS۰۰۳ و Sarigol زمستانه می باشند. بذور، ابتدا به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد سپس در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد بعلاوه ۰/۱ درصد Tween۲۰، به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و در آخر با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند. جهت جوانه زنی، بذور روی محیط MS (۲۰) دارای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار درون ظروف شیشه ای درب دار ۱۰ × ۱۵ سانتیمتر کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۶۰-۴۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه قرار گرفتند. از این گیاهان دو بافت مختلف محور زیر لپه و لپه جدا و برای تلقیح با اگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت:

الف- استفاده از ریز نمونه محور زیر لپه

قطعات محور زیر لپه در اندازه های ۱۰-۸ میلیمتری از گیاهچه های ۶ روزه جدا شده و به مدت ۷۲ ساعت در محیط پیش تیمار متشکل از محیط MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر هورمون D-۴-۲، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار قرار گرفتند. تعداد ۲۰-۱۵ ریزنمونه در هر پتری دیش به قطر ۹ سانتیمتر حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط فوق الذکر کشت شد. قطعات محور زیر لپه پیش تیمار شده با محلول اگروباکتریوم تلقیح شدند. اگروباکتریوم به مدت یک شب در محیط LB مایع دارای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر Rifampicin و ۵۰ میلی گرم در لیتر Kanamycin رشد داده شد تا به $OD_{۶۰۰}$=۰/۸ برسد. سپس آن را سانتریفیوژ کرده و رسوب حاصل در محلول MS مایع نصف غلظت با pH = ۵/۲ حل کرده و به آن ۰/۰۵ میلی مولار استوسیرینگون و ۱ میلی گرم در لیتر D-۴-۲ اضافه شد. قطعات محور زیر لپه به مدت ۵ دقیقه تلقیح و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل به محیط هم کشتی مشابه محیط پیش تیمار منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس آنها به محیط القای کالوس زایی که مشابه محیط پیش تیمار به علاوه ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین و ۳ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین بودند منتقل شدند. پس از گذشت ۱۴-۱۰ روز آنها به محیط اندام زایی شامل محیط MS به علاوه ۴ میلی گرم در لیتر BAP، ۲ میلی گرم در لیتر Zeatin، ۵ میلی گرم در لیتر نیترات نقره، ۵ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین، ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز منتقل شدند. جهت باززایی شاخه، بعد از گذشت ۲ هفته بافت ها به محیط MS حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP، ۲ میلی گرم در لیتر Zeatin، ۸ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار منتقل شدند. بعد از ۲ هفته آنها به محیط MS به اضافه ۰/۰۵ BAP، ۸ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۹ گرم در لیتر آگار جهت توسعه اندام هوایی منتقل شدند. اندام های هوایی بدست آمده برای ریشه دار شدن به محیط MS نصف غلظت به همراه ۵ میلی گرم در لیتر IBA، ۳ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین، ۱۰ گرم در لیتر ساکارز و ۹ گرم در لیتر آگار منتقل شدند.

ب- استفاده از ریزنمونه لپه

برگ های لپه ای به همراه دمبرگشان از گیاهچه های ۴ روزه جدا شده و به مدت ۱۰ ثانیه در سوسپانسیون اگروباکتریوم (محیط تلقیح مشابه آنچه که در مورد ریزنمونه محور زیر لپه گفته شد) قرار داده شدند به نحوی که فقط انتهای بریده شده دمبرگ های لپه ای به محیط تلقیح آغشته شده و به برگ لپه ای سرایت نکند. بافت ها سپس به محیط MS حاوی ۴/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP که فاقد آنتی بیوتیک و گزینشگر گیاهی بوده منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از مرحله هم کشتی، ریزنمونه ها به محیط القاء شاخه دهی حاوی ۴/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP، ۳ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین منتقل شدند و هر دو هفته یکبار به محیط تازه واکشت شدند. در هر پتری دیش ۱۰ عدد ریزنمونه قرار داشت. پس از ۴ تا ۶ هفته شاخه های سبز مقاوم به فسفینوتریسین از ریزنمونه های لپه ای جدا و به محیط رشد شاخه که دارای ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP، ۳ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین و ۹ گرم در لیتر آگار بود منتقل شدند. پس از ۱۴ روز شاخه های سبز طویل شده به محیط ریشه زایی شامل محیط MS نصف غلظت دارای ۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA، ۳ میلی گرم در لیتر فسفینوتریسین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین، ۱۰ گرم در لیتر ساکارز و ۹ گرم در لیتر آگار واکشت شدند.تمام محیط های کشت دارای pH = ۵/۸ بوده و کشت ها تحت شرایط دمایی۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهچه های تراریخت که در محیط ریشه زایی قادر به تشکیل ریشه بودند به خاک سترون شامل ترکیبی از پیت ماس، خاک مزرعه و پرلیت به نسبت مساوی

Archive of SID

منتقل شـدند و سـپس بر روی آنها یک پوشش شـفاف پلاستیکی برای مدت ۳ روز قرار گرفت. پس از گذشت ۳ روز پوشش پلاستیکی به تدریج برداشـته شـد تا گیاهچه ها به شرایط اتاقک رشـد عادت کنند. تمامی کشـت ها در شـرایط دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ سـاعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شـدت نور ۵۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه قرار گرفتند. ارقام زمستانه به منظور بهاره سازی به مدت ۸ هفته در مرحله چند برگی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در طـی این مدت آبیاری گلدان ها با محلول هوگلند انجام پذیرفت. پس از طی دوره سـرما دهی گیاهچه ها به گلدان های بزرگتری منتقل شده و در گلخانه ای با دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ سـاعت تاریکی نگهداری شدند. ارقام بهاره مستقیماً پس از مقاوم سازی به گلخانه منتقل شدند.

آزمون هیستوشیمیایی GUS

جهت مشـاهده فعالیـت بتا-گلوکورونیداز[9] درگیاهـان تراریخته آزمون هیستوشـیمیایی GUS طبـق روش Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) با کمی تغییر انجام شـد (۱۲). برای این کار بافت برگ از گیاهان تراریخته فرضـی جـدا و در محلول رنـگ آمیزی حـاوی x-gluc [10] به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس به مدت ۲۴ سـاعت در اتانول ۹۶ درصد جهت از بین بردن رنگ سـبز کلروفیل قرار گرفتند. محلول رنگ آمیزی GUS شامل: ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر x-gluc ، ۱۰۰ میلـی گرم در لیتر کلرامفنیـکل، یک میلی لیتر در لیتر Triton X-۱۰۰، ۲۰۰ میلی لیتر در لیتر متانول بود که با بافر فسـفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) به حجم یک لیتر رسانده شد.

آزمون PCR

دی ان آی ژنومی از برگ های جوان گیاه با اسـتفاده از روش CTAB، اسـتخراج شـد (۲۱). جهت تایید الحـاق ژن به ژنوم گیاهـان تراریخته مفروض با اسـتفاده از آزمون PCR از آغازگر های اختصاصی ژن gus و ژن bar استفاده شد. آغازگر های اختصاصی ژن gus شامل:

GF: ۵′- CCGTTTGTGTGAACAACG- ۳′

و

GR: ۵′-GCACAGCACATCAAAGAG -۳′

و آغازگرهای ژن مقاومت به فسفینوتریسین شامل:

PF: ۵′-ATCTCGGTGACGGGCAGGAC- ۳′

و

PR: ۵′- CGCAGGACCCGCAGGAGTG -۳′

بودنـد. با اسـتفاده از این آغازگرها در واکنـش PCR یک قطعه ۱۰۰۱ نوکلئوتیـدی از ژن gus و قطعـه ای ۴۲۰ نوکلئوتیدی از ژن مقاومت به فسفینوتریسـین (PPT) مورد انتظار اسـت. واکنش PCR شامل ۱۰۰ نانـو گـرم DNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلـی مولار، ۲ میکرو لیتـر ۱۰X PCR Buffer، یک واحـد Taq DNA Polymerase، ۰/۵ میکرو لیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، یک میکرو لیتر آغازگر پیشرو، یک میکرو لیتر آغازگر پسرو، اضافه کردن آب مقطر دوبار تقطیر تا رسیدن بـه حجم ۲۰ میکرو لیتر بود. تکثیر با شـرایط دمایی شـامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،۵۸ درجه سـانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سـانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۴۰ چرخه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

نتایج

واکنـش کالـوس زایـی از دو انتهـای بریده شـده قطعـات محور زیر لپه کشـت شـده بر روی محیط القـای کالوس با درصـد بالایی در ریزنمونه ها صورت گرفت. در ادامه رشـد، کالـوس های غیرتراریخته به تدریج نکروزه شدند. پس از گذشت ۵-۴ هفته که از تلقیح ریزنمونه های لپه با اگروباکتریوم گذشت تعدادی از ریزنمونه های لپه ای بجز رقم های Opera، Zarfam و Modena در محیط انتخابی شروع به شاخه زایی کردند (شکل ۳).

نمونه های برگ گیاهان تراریخت شـده با ژن gus پس از قرار گرفتن در محلول رنگ آمیزی به رنگ آبی در آمدند (شـکل ۵). شاخه های باززایی شـده طی ۴-۳ هفته پس از انتقال به محیط ریشه زایی ریشه دار شدند. برای تشـکیل ریشـه ۵ میلی گـرم در لیتر هورمـون IBA موثر بود. در غلظت های کمتر از ۴ میلی گرم در لیتر ریشه زایی به خوبی صورت نگرفت. گیاهچه های ریشه دار شده به گلدان منتقل شدند. ارقام پاییزه برای القاء گلدهی تحت تیمار سرما قرار گرفتند و پس از این مدت به گلخانه منتقل شـدند. جهت اطمینان بیشتر، علاوه بر آزمون هیستوشیمیایی GUS، با اسـتفاده از آغازگرهای ژن های gus وbar حضور این ژن ها در گیاهان تراریخت اثبات گردید (شکل های ۱ و ۲).

در بیـن گیاهان تراریخته با اسـتفاده از ریزنمونه های محور زیر لپه رقم Licord بیشـترین (۱۵/۲۶٪) و رقم Sarigol کمترین (۰/۲٪) درصد تراریختی را داشـتند. در حالـی که بین گیاهان تراریخته با اسـتفاده از ریزنمونـه های لپـه ژنوتیپ SLM۰۴۶ با ۴/۷ درصد بیشـترین فراوانی تراریختی را به خود اختصاص داده بود (جدول ۱).

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۱) در بین ۸ ژنوتیپ مورد استفاده در ایـن تحقیـق ریزنمونه محور زیرلپه بیشـترین تعداد شـاخه زایی را داشـتند، بجز ژنوتیپ هـایSarigol و RGS۰۰۳ کـه ریزنمونه های لپه ای شـاخه های تراریخت بیشـتری از ریزنمونه های محور زیرلپه آن رقم ها تولید کردند.

نتایج این تحقیق نشـان مـی دهد که انتقال ژن به کلـزا علاوه بر اینکه به شدت وابسـته به ژنوتیپ است تحت تاثیر نوع ریزنمونه مورد استفاده قرار دارد و ریزنمونه در ژنوتیپ های مختلف پاسـخ های متفاوتی نسبت به انتقال ژن از خود نشـان می دهند کـه این نتیجه با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد (۴۰). نتایج این آزمایش نشان داد که در اکثر ارقام مورد اسـتفاده ریزنمونه محور زیر لپه نسبت به ریزنمونه لپه به انتقال ژن بهتر جواب می دهد.

دو روش مختلف باززایی از ریزنمونه های محور زیر لپه وجود دارد. اولین آن با شـاخه زایی به طور مسـتقیم از بافت های زیر اپیدرمی محور زیر لپـه صورت می گیـرد. Narasimhulu و Chopra (۱۹۸۸) مشـابه این حالت را در ریزنمونه های نابالغ لپه کلزا مشـاهده کرد (۲۲). دومین

Archive of SID

سیستم پرآوری شاخه از کالوس هایی است که در مرحله القاء کالوس از دو انتهای بریده شده ریزنمونه ها در طی دو هفته اول به وجود آمده اند (۲۶ ، ۳۵).

پیش کشت ریزنمونه های محور زیرلپه قبل از تلقیح با اگروباکتریوم در محیطی که حاوی اکسین است روش مناسبی، جهت القای سلول ها به سمت تفرق است. این تیمار باعث جوان شدن ریزنمونه ها شده، سلول های جوان نسبت به سلول های پیر برای آلوده شدن توسط اگروباکتریوم مستعدتر می باشند (۲ ، ۲۹). گمان می رود که به وجود آمدن تعداد زیادی سلول جوان در مرحله پیش تیمار و کالوس زایی باعث بالا رفتن فراوانی تراریختی در ریزنمونه های محور زیرلپه شده است.

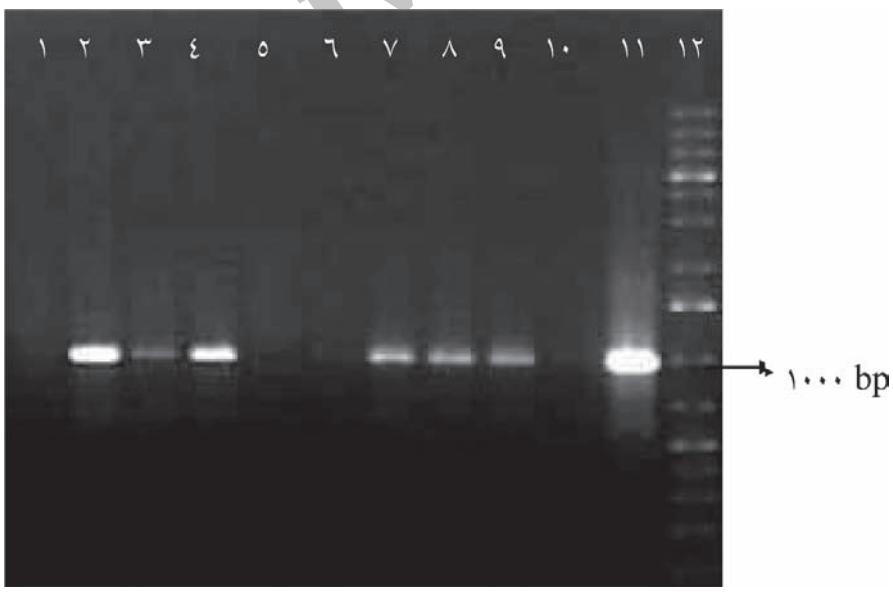
Jonoubi و همکاران (۲۰۰۵) میزان انتقال ژن به ریزنمونه محور زیر لپه رقم PF ۹۱/۷۰۴۵ را ۱۱/۸٪ گزارش کردند (۱۳). Zebarjadi و همکاران (۲۰۰۶) از ریزنمونه لپه ارقام PF و Maplus جهت انتقال ژن استفاده نمودند (۳۸). Barfield و Pua (۱۹۹۱)، Schroder و همکاران (۱۹۹۴)، Takasaki و همکاران (۱۹۹۷) به ترتیب ۵ ، ۱۰ و ۵ درصد گیاه تراریخت بدست آوردند (۱، ۳۰ ، ۳۴). Cardoza و Stewart (۲۰۰۴) بازده انتقال ژن به ریزنمونه های محور زیر لپه را ۲۵-۱۷ درصد گزارش کردند (۵). Stewart و همکاران (۱۹۹۶) بازده انتقال ژن به قطعات محور زیر لپه رقم های Oscar، UGA۱۸۸-۲۰B و Westar را به ترتیب ۷ ، ۰/۸ و۱/۳ درصد گزارش کردند (۳۳). Zhang وهمکاران (۲۰۰۵) با استفاده از قطعات محور زیر لپه و ارقام Westar، Oscar ، RI۲۵، RK۷ و Rainbow به ترتیب ۳/ ۲۸ ،۵/۳، ۲۱/۹، ۵۰/۱ و ۳۲/۸ درصد گیاه تراریخته تولید کردند (۴۰). Moghaieb و همکاران (۲۰۰۶) در ارقام Sarow-۴، Semu-۲۴۹ به ترتیب ۹/۵ و ۱/۵ درصد گیاه باززایی شده بعد از تلقیح با آگروباکتریوم بدست آوردند (۱۸). Wang و همکاران (۲۰۰۵) بازده انتقال ژن را به رقم Maplus را ۲۵ ٪ گزارش کرده اند (۳۶).

با این وجود بازده انتقال ژن که توسط محققان مختلف ارائه شده را بدلیل اثر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه مورد استفاده، نمی توان با هم مقایسه کرد، مگر اینکه در آنها از ریزنمونه و ژنوتیپ های یکسان استفاده شده باشد.

محور زیر لپه مطلوب ترین ریزنمونه برای کشت بافت است زیرا قابلییت باززایی خوبی دارد و همچنین سهولت جداسازی آنها نسبت به ریزنمونه های لپه یشتر است و دیگر اینکه تعداد زیادی از آنها را می توان به طور هم زمان در محیط هم کشتی قرار داد (۴).

در آزمایشی که جهت مقایسه میزان باززایی ارقام مورد استفاده انجام شد، رقم Okapi بیشترین میزان باززایی را داشت، ولیکن همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود درصد انتقال ژن به آن در حد پایینی است. میزان انتقال ژن به یک ژنوتیب نتیجه برآیند میزان باززایی آن ژنوتیپ و چگونگی پاسخ آن ژنوتیپ نسبت به انتقال ژن می باشد، در نتیجه درصد باززایی بالای یک ژنوتیپ نمی تواند به تنهایی دلیل انتخاب آن جهت مطالعات انتقال ژن باشد.

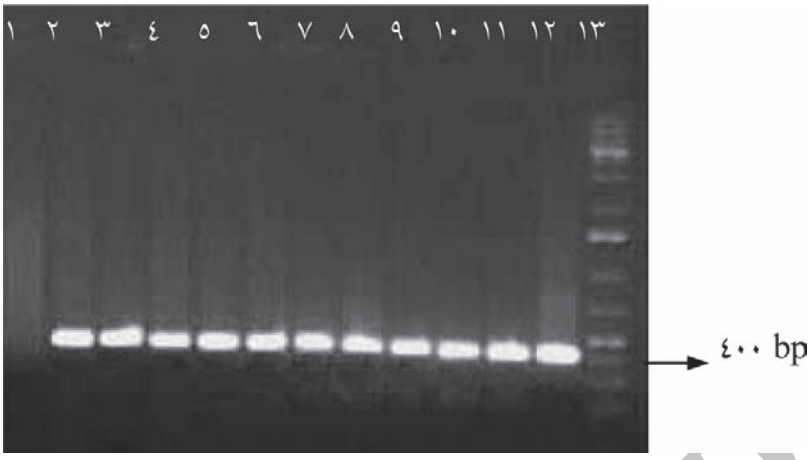
بین ارقام و نوع ریزنمونه در قابلیت انتقال ژن به آنها تفاوت وجود داشت، ریزنمونه محور زیرلپه رقم Licord واکنش خوبی نشان داد که می تواند جهت مطالعات انتقال ژن به ارقام تجاری ایران مد نظر قرار گیرد. استفاده از محور زیرلپه ارقام Modena، SLM۰۴۶ و Zarfam جهت انتقال ژن در مرتبه بعدی قابل توصیه می باشند. گزارشات محققان و نتایج این تحقیق اهمیت ژنوتیپ و نوع ریز نمونه را برای دست یابی به نرخ بالای انتقال ژن در کلزا مورد تاکید قرار می دهد.



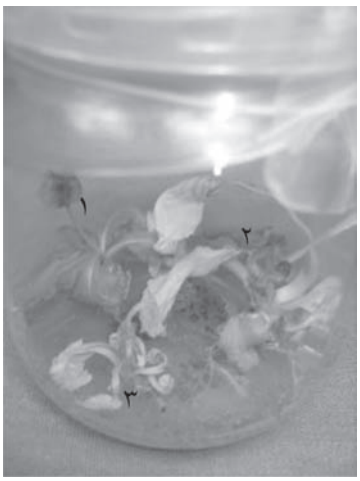
شکل۱- نتیجه آزمون PCR تعدادی از گیاهان تراریخت مفروض با استفاده از آغاز گرهای ژن gus .

۱- گیاه غیر تراریخت (شاهد منفی)؛ ۲، ۳، ۴ ، ۷، ۸ و ۹ گیاهان تراریخت با ژن gus ؛ ۱۱- پلاسمید (شاهد مثبت)، ۱۲- kb DNA Ladder plus

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۲- نتیجه آزمون PCR تعدادی از گیاهان تراریخت مفروض با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به فسفینوتریسین. ۱- گیاه غیرتراریخت (شاهد منفی)؛ ۲ الی ۱۲ گیاهان تراریخت حامل ژن مقاومت به PPT؛ ۱۳- kb DNA Ladder plus



شکل۳- باززایی از ریزنمونه محور زیر لپه بر روی محیط انتخابی دارای فسفینوتریسین.
۱ - تراریخت، ۲ و ۳ - غیرتراریخت

شکل ۴- گیاه تراریخت در گلدان با گل های طبیعی

شکل ۵- آزمون هیستوشیمیایی GUS
۱- گیاه تراریخت
۲- گیاه غیرتراریخت (شاهد)

Archive of SID

جدول ۱- فراوانی باززایی گیاهان GUS مثبت حاصل از ریزنمونه های لپه و محور زیر لپه در ارقام مورد استفاده کلزا.

ژنوتیپ	نوع ریزنمونه	تعداد ریزنمونه	مثبت GUS تعداد گیاه باززایی شده	درصد انتقال ژن
Licord	لپه	۱۸۲	۱	۰/۵۴
	محور زیر لپه	۵۱۱	۷۸	۱۵/۲۶
Sarigol	لپه	۱۳۷	۵	۳/۶
	محور زیر لپه	۴۹۴	۱	۰/۲
SLM۰۴۶	لپه	۱۶۷	۸	۴/۷
	محور زیر لپه	۵۰۲	۴۵	۸/۹۶
Zarfam	لپه	۱۴۰	۰	۰
	محور زیر لپه	۴۱۷	۳۴	۸/۱۵
Opera	لپه	۱۲۷	۰	۰
	محور زیر لپه	۴۲۶	۲۹	۶/۸
RGS۰۰۳	لپه	۱۳۲	۴	۳/۰۳
	محور زیر لپه	۴۹۵	۱۱	۲/۲
Okapi	لپه	۱۹۳	۱	۰/۵۱
	محور زیر لپه	۴۷۷	۵	۱/۰۴
Modena	لپه	۱۱۴	۰	۰
	محور زیر لپه	۴۹۷	۵۱	۱۰/۲۶

سپاسگزاری

نگارنـدگان از موسســه تحقیقات بیوتکنولوژی کشــاورزی جهت در اختیار گذاردن کلیه امکانات طرح قدردانی می نمایند. همچنین از بخش تحقیقات دانه های روغنی موسســه تحقیقــات اصلاح و تهیه نهال و بذر بخاطر در اختیار قرار دادن بذور ارقام کلزا کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

پاورقی ها

1- *Brossica napus* L.
2- Oil Palm
3- Microprosetile
4- Electroporation
5- Agrobacterium

www.SID.ir

6- Acetosyringon
7- Peduccle
8- Black leg

منابع مورد استفاده

1- Barfield, D.G. and Pua, E.C. (1991) Gene transfer in plant of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 10:308-314.

2- Binns, A.N. and Thomashow, M. (1988) Cell Biology of Agrobacterium infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology*, 42: 575-606

3- Boulter, M.E., Croy E., Simpson, P, Shield, R., Croy, R.R.D. and Shirsat, A.H. (1990) Transformation of Brassica napus (oilseed rape) using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* a comparison. *Plant Science*, 70: 91-99.

4- Cardoza, V., 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.

5- Cardoza, V., Stewart, C.N.J. (2004) Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40:542-551.

6- Damgaard, O., Hollund Jensen, L. and Rasmussen, O.S. (1997) Agrobacterium tumefaciens- mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Research*, 6: 279-288.

7- Dunwell, J.M. (1981) *In vitro* regeneration from excised leaf discs of Brassica species. *Journal of Experimental Botany*, 32: 789-799.

8- Eapen, S. and George, L. (1997) Plant regeneration from peduncle segments of oil seed Brassica species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 51:229– 232.

9- Fry, J., Barnason, A. and Horsch, R.B. (1987) Transformation of *Brassica napus* with Agrobacterium based vectors. *Plant Cell Reports*, 6:321–325.

10- Hachey, J. E., Sharma, K. K. and Moloney, M. M. (1991) Efficient shoot regeneration of Brassica campestris using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 9:549–554.

11- Hu, Q., Anderson, S. B. and Hansen, L.N. (1999) Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from Brassica napus and related species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 59:189–196.

12- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusion. B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907.

13- Jonoubi, P., Mousavi, A, Majd, A., Salmanian, A.H., Jalali Javaran, M. and Daneshian, J. (2005) Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biologia Plantarum*, 49(2): 175-180.

14- Kazan, K., Curtis, M.D., Goulter, K.C. and Manners, J.M. (1997) Agrobacterium tumefaciens- mediated transformation of double haploid canola (*Brassica napus*) lines. *Australian Journal of plant Physiology*, 24:97-102.

15- Khehra, G.S. and Mathias, R.J. (1992) The interaction of genotype, explants and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany*, 43: 1413-1418.

16- Klimaszewska, K. and Keller, K. (1985) High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 4:183–197.

17- Ledig, F.T. and Sederoff, R.R. (1985) *International Proceedings of the 18th South Forest Tree Improvement Conf*., May 21-25, Long Beach, MS. pp. 4-13.

18- Moghaieb, R. E. M., El-Awady, M. A., El Mergawy, R. G., Yousse, f.S.S., El-Sharkawy, A. M. (2006) A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). *African journal of biotechnology*, vol.5(2):143-148.

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

20- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15:473–497.

21- Murray, M.G, and Thampson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-4325.

22- Narasimhulu, S.B. and Chopra, V.L. (1988) Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Reports*., 7 : 104 - 106.

23- Ono, Y., Takahata, Y. and Kaizuma, N. (1994) Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports, 14:13–17.

24- Poulsen, G.B. (1996) Genetic transformation of Brassica. Plant Breeding, 115:209–225.

25- Pua, E.C., Mehra Palta, A., Nagy, F., Chua, N.H. (1987) Transgenic plants of *Brassica napus* L. *Biotechnology*,5:815–817.

26- Ramazan khan M, Rashid H and Quraishi A (2002) High frequency shoot regeneration from hypocotyls of canola (*Brassica napus* L.) cv.Dunkled. *Plant Tissue Culture*,12(2):131-138.

27- Radke, S.E., Andrews B.M., Moloney, M.M., Crouch, M.L.,

Archive of SID

www.SID.ir

Krid, J.C., Knauf, V.C. (1988) Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor. Appl. Genet*., 75: 685–694.

28- Riemenschiender, D.F., Haissing, B.E. and Bingham, E.T. (1988) *Genetic manipulations of woody plants*. In : J.W. Hanover and D.E. Keathoey (eds.). Plenum Press, New York. pp. 433 - 494.

29- Sangwan, R. S., Bourgeois, Y., Brown, S., Vasseur, G. and Sangwan-Norreel, B.S. (1992) Characterization of competent cells and early events of Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Arabidopsis thaliana. Planta*., 188:439–456.

30- Schroder, M., Dixelius, C., Rahlen, L. and Glimelius, K. (1994) Transformation of *Brassica napus* by using the aadA gene as selectable marker and inheritance studies of the marker genes. *Physiology Plant*, 92:37-46.

31- Sharma, K.K., Bhojwani, S.S. and Thorpe, T.A. (1990) Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Science*, 66:247–253.

32- Sharma, K.K., Thorpe, T.A. (1989) In vitro regeneration of shoot buds and plantlets from seedling root segments of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 18: 129-141.

33- Stewart, C.N.J., Adang, M.J., All, J.A., Raymer, P.L., Ramachandran, S., Parrott, W.A. (1996) Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiology*, 112:115–120.

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

35- Turget, K., Barghchi, M. and Scott, R. (1998) Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding*., 117 : 503 - 504.

36- Wang, Y.P., Sonntag, K., Rudloff, E. and Han, J. (2005) Production of fertile transgenic *Brassica napus* by Agrobacterium-mediated transformation of protoplasts. *Plant Breeding*, 124:1-5.

37- Yang, M.Z., Jia, S.R. and Pua, E.C. (1991) High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24:79–82.

38- Zebarjadi, A., Jalali Javaran, M., Karimzadeh, G., Moeini, A., Mousavi, A. and Salmanian, A.H. (2006) Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4: 79-87.

39- Zhang, Y. and Bhalla, P.L. (2004) *In vitro* shoot regeneration from commercial cultivars of Australian canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 55: 753-756.

40- Zhang, Y., Singh, M. B., Swoboda, I. and Bhalla, P.L. (2005) Agrobacterium-mediated transformation and generation of male sterile lines of Australian canola. *Astralian Journal of Agricultural Research*, 56:353-361.

Archive of SID

www.SID.ir