

تأثیر پیش تیمار سرما، طول دوره پیش کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح *Agrobacterium tumefaciens* بر فراوانی تراریختی کلزا

Effect of Cold Pretreatment and Period of Preconditioning Inoculation on Transformation Frequency in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

دانیال کهریزی^{۱*}، علیرضا زبرجدی^۱ و علی هاتف سلمانیان^۲

چکیده

به کارگیری مهندسی ژنتیک در کلزا منجر به تولید واریته‌هایی شده که از نظر صفات با ارزش زراعی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. بیش‌ترین انتقال ژن به کلزا از طریق آگروباکتریوم انجام شده است. جهت انتقال ژن موفق با این روش، پارامترهای مختلفی باید بهینه سازی شود. در این پژوهش عوامل پیش تیمار سرما با قرار دادن گیاهچه‌های ۵ روزه در دمای ۴°C در دو سطح (شاهد و ۱۲ ساعت)، مدت زمان پیش کشت کوتیلدون در ۳ سطح (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول آگروباکتریوم در ۴ سطح (۲، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه) بر فراوانی تراریختی کلزا از طریق انتقال ژن گزارش گر *gus* بررسی شده است. این عوامل در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از رقم تجاری کلزا PF-7045-91 و سویه باکتری LBA4404 استفاده گردید. حضور و بیان ژن از طریق آزمون‌های PCR و *gus* اثبات شد. نتایج تجزیه آماری نشان داد که بین پیش تیمار سرما و شاهد برای فراوانی تراریختی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید، اما بین سطوح مختلف مدت پیش کشت و مدت زمان تلقیح برای این صفت اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوری که مدت زمان‌های پیش کشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدون اختلاف در بین خود و به ترتیب با متوسط ۲۴/۲۱ و ۲۳/۵۵ درصد و مدت زمان‌های تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه، بدون اختلاف در بین خود و به ترتیب با متوسط ۲۱/۵۲، ۳۰/۸۵ و ۲۱/۰۸ درصد دارای بیش‌ترین فراوانی تراریختی بودند. هم‌چنین تجزیه واریانس، اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه را معنی‌دار نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، پیش تیمار سرما، *Agrobacterium tumefaciens*، پیش کشت ریزنمونه

۱. استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران

* نویسنده مسوول

تأثیر پیش تیمار سرما، طول دوره پیش کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح ...

کانامایسین، PCR، RT-PCR، لکه‌گذاری نقطه‌ای و آزمون *gus* تراریخت بودن گیاهچه‌های به دست آمده را تایید کردند (Jonobi 2004).

زبرجدی و همکاران (Zebarjadi et al. 2006) و کهریزی و همکاران (Kahrizi et al. 2007c) که به ترتیب ژن-های β -ketoacyl-CoA synthase و EPSPS را به گیاه *B. napus* انتقال داده بودند، بهترین باززایی گیاهان تراریخت را از طریق آگروباکتریوم سویه LBA4404 و ریزنمونه کوتیلدون گزارش کردند. آن‌ها تراریختی را از طریق PCR، لکه‌گذاری نقطه‌ای و ساترن‌بلات تایید کردند.

تأثیر ژنوتیپ گیاه، ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم تومه فاشینس بر کارایی تراریختی گیاه کلزا در ایران بررسی گردید. گزارش شد که بین ارقام کلزا، ریزنمونه‌ها و سویه‌های آگروباکتریوم تومه‌فاشینس برای فراوانی تراریختی گیاه کلزا اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. مطابق با نتایج این پژوهش، رقم کلزا PF-7045-91 (با متوسط تراریختی ۱۰/۶۴٪)، ریزنمونه کوتیلدون (با متوسط تراریختی ۱۳/۵۳٪) و سویه LBA4404 (با متوسط تراریختی ۸/۷۸٪) برتری معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشته‌اند (Kahrizi et al. 2007a).

در مهندسی ژنتیک کلزا گزارش‌های متعدد دیگری هم وجود دارد. در اکثر این گزارش‌ها به بررسی کارایی دریافت ژن از سوی یک ژنوتیپ یا ریزنمونه خاص از کلزا (Moloney et al, 1989; Fry et al, 1987; Kahrizi et al, 1997; Takasaki et al, 2007) و یا کارایی یک سویه خاص از آگروباکتریوم برای انتقال ژن (Moloney et al, 1989, Kahrizi and Salmanian, 2008, Bhalla and Smith, 1998; Radke et al., 1988; Takasaki et al., 1997; Zebarjadi et al., 2006) پرداخته شده است.

برخی از پژوهش‌گران در پژوهش‌ها انتقال ژن به گیاهان مادری را مدتی تحت شوک سرمایی قرار می‌دهند تا ضمن هم‌زمان سازی چرخه سلولی، فراوانی تراریختی را هم افزایش دهند (مذاکره خصوصی با پژوهش‌گران) ولی هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر تأثیر مثبت شوک سرمایی بر روی فراوانی تراریختی در هیچ گیاهی وجود ندارد. هم‌چنین برای نگهداری مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول آگروباکتریوم هم زمان دقیقی مشخص نگردیده و فقط برخی پژوهش‌گران (Moloney et al. 1989; Takasaki et al. 1997) به "چند لحظه" اشاره شده است. برخی نیز جهت تسریع کار فقط در حد ۲ ثانیه کوتیلدون را در محلول آگروباکتریوم نگه می‌دارند (مذاکره خصوصی با پژوهش‌گران). مسائل گفته شده در

سیستم آگروباکتریوم اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان بود که موانع موجود در مهندسی ژنتیک گیاهی را کاهش داد. غلبه بر موانع دست‌ورزی ژن‌های گیاهی با شناخت خصوصیات و بهره‌برداری از پلاسمیدها به‌واسطه باکتری *Agrobacterium tumefaciens* محقق گردید. این پلاسمیدها امکان انتقال طبیعی ژن، بیان ژن و سیستم‌های گزینش را فراهم می‌آورند. گونه *A. tumefaciens* به‌عنوان موثرترین مهندس ژنتیک گیاهی در طبیعت مطرح شده است. انتقال با واسطه آگروباکتریوم در مقایسه با ناقلین ویروسی موجب انتقال پایدار ژن شده و می‌تواند بخش مشخصی از DNA به نام T-DNA را از پلاسمید ایجاد کننده تومور (Ti) به هسته سلول گیاه، به گونه‌ای پایدار در ژنوم، منتقل کند (De Block et al. 1989).

در رابطه با استفاده از سیستم آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاه کلزا گزارش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال: قطعات ساقه‌ی گیاه کلزای ۵ تا ۶ هفته‌ای را با آگروباکتریوم دارای پلاسمید Ti خلع شده حاوی ژن مقاومت به کانامایسین تلقیح و از آن حدود ۲۰۰ گیاه تراریخت تولید شد (Fry et al. 1987).

هم‌چنین با استفاده از هیپوکوتیل‌های کلزا از طریق آگروباکتریوم سویه EHA101 اقدام به تولید گیاهان تراریخت گردید. تراریختی با بررسی، مقاومت به کانامایسین و ساترن بلات (Southern blot) مورد تایید قرار گرفت. فراوانی تراریختی از ۰/۴ تا ۲/۵٪ گزارش گردید (Radke et al. 1988).

با استفاده از کوتیلدون‌های کلزا از طریق آگروباکتریوم سویه EHA101، تراریختی کلزا بهینه‌سازی شد (Moloney et al. 1989). از هیپوکوتیل‌های کلزا از طریق آگروباکتریوم سویه EHA101، اقدام به تولید گیاهان تراریخت شد. از ناقل دوتایی دارای ژنهای *nptII* و *gus* و ژن مقاومت به هیگرومایسین استفاده گردید. بررسی هیستوشیمیایی *gus*، ساترن‌بلات و بررسی مقاومت به کانامایسین نتایج تراریختی و بیان ژن را تایید نمودند (Takasaki et al. 1997).

جنوبی (۲۰۰۴) شرایط باززایی گیاهچه را برای انتقال کاراثر ژن به دو رقم گیاه *B. napus* از طریق آگروباکتریوم بهبود بخشید و از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل برای باززایی و تراریختی استفاده نمود. فراوانی تراریختی، از طریق مقاومت به کانامایسین، از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱۱/۳٪ و در هیپوکوتیل ۸/۲٪ گزارش شد. با استفاده از مقاومت به

CTAB (Murray and Thompson 1980) انجام گردید. جهت آنالیز گیاهان تراریخت و اثبات حضور ساختار مورد نظر از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی مناسب استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده به شرح ذیل می باشد:

آغازگرهای رفتی (GUSF) و برگشتی (GUSR) با توالی‌های زیر برای تکثیر بخشی از ژن *gus*.
 GUS F:Tm=62 °C, 23 mer 5' -GGT GGT CAG TCC CTT ATG TTA CG -3'
 GUSR:Tm=57 °C, 23 mer 5' -CCG GCA TAG TTA AAG AAA TCA TG -3'

آغازگرهای رفتی (NPTF) و برگشتی (NPTR) با توالی زیر برای تکثیر ژن *nptII*
 NPTF:Tm= 66.4 °C, 26 mer 5' -GTC GCC TAA GGT CAC TAT CAG CTA GC -3'
 NPTR: Tm= 61.1 °C, 24 mer 5' -ATG TTT GAA CGA TCG GGG ATC ATG -3'

برای تراریختی باکتری، روش استاندارد انجماد و ذوب (Freeze and Thaw) و با استفاده از ۲۰ mM CaCl₂ و ازت مایع به کار گرفته شد (Sambrook & Russell 2001). از آنجا که هر کدام از این باکتری‌ها در محیط دارای دو آنتی‌بیوتیک کشت داده شده‌اند، تا حدود زیادی می‌توان به دریافت پلاسمید pBI121 از سوی باکتری مطمئن شد، اما برای حصول اطمینان بیشتر چندین آزمون PCR نیز با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. به منظور اطمینان از بیان ژن انتقالی، سنجش بیوشیمیایی *gus* انجام شد.

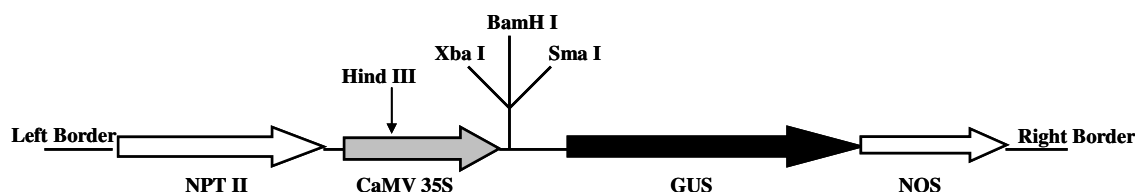
تهیه گیاه و عملیات کشت بافت

قبل از شروع عملیات انتقال ژن، سیستم کشت بافت بهینه‌سازی شد. در این پژوهش از ریزنمونه کوتیلدون استفاده شد. برای این منظور بذور با استفاده از محلول هیپو کلریت سدیم ۱/۵٪ به علاوه چند قطره تریتون (X-100) ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه با تکان دادن، استریل شدند. بذور پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت جامد جوانه‌زنی حاوی نصف نمک‌های محیط MS کشت و در اتاق رشد با زمان نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۵°C نگهداری شدند. کوتیلدون‌های گیاهچه‌های ۵ روزه با حذف جوانه انتهایی، جدا شدند. سپس دمبرگ‌ها در عمق ۲ mm محیط القاء نوساقه با محیط پایه MS با ۴/۵ mg/l BAP، ۳۰ g/l ساکارز، pH ۸ و میزان ۸ g/l آگار کشت شدند.

رابطه با طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه هم صادق است. به طوری که برخی از پیش‌کشت استفاده کرده‌اند (Moloney *et al.* 1989; Kahrizi *et al.* 2007) و برخی مستقیماً کار تلقیح را انجام داده‌اند (Radke *et al.* 1988; Takasaki *et al.* 1997). پس با توجه به این‌که در پژوهش‌های انجام شده تاثیر پیش تیمار سرمایی گیاهچه‌های مادری کلزا، مدت زمان تلقیح ریزنمونه در محلول آگروباکتریوم تومه‌فشینس و طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه بررسی نشده است، در این پژوهش ضمن بررسی اثرات اصلی تیمارها (پیش‌تیمار سرمایی، طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح در آگروباکتریوم تومه‌فشینس) به اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه آن‌ها بر روی انتقال ژن *gus* پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه DH5 α به منظور تهیه سلول‌های مستعد (Competent cells) و نگهداری پلاسمیدها استفاده شد. از باکتری خاکزی *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 جهت انتقال ژن به سلول‌های کلزا استفاده گردید. پلاسمید pBI121 (حامل ژن *gus*) به‌عنوان ناقل برای بیان ژن مورد نظر در سلول‌های گیاهی استفاده شد. شکل ۱ نمایی از بخش‌های مختلف پلاسمید pBI121 و نیز محل کلون کردن چندگانه (Multiple Cloning Site) آن را نشان می‌دهد. سویه آگروباکتریوم LBA4404 در ساختار ژنوم خود دارای ژن مقاوم به استرپتومایسین و می‌باشد که از این آنتی-بیوتیک نیز به عنوان نشان‌گر انتخابی این دو سویه آگروباکتریوم استفاده شد. محیط کشت گیاهی پایه مورد استفاده، محیط MS (Murashige & Skoog 1962) بود. بذور کلزا (*Brassica napus*) رقم تجاری PF-7045-91 (رقم بهاره) مواد گیاهی این پژوهش را شامل می‌شود که از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. چون در تحقیقات قبلی بهترین رقم کلزا (PF-7045-91)، ریزنمونه (کوتیلدون) و سویه آگروباکتریوم (LBA4404) مشخص شده (Kahrizi *et al.* 2007a)، در این پژوهش هم از مواد فوق استفاده گردیده است. به منظور تهیه DNA ژنومی، از برگ‌های جوان و سبز گیاه کلزا استفاده شد. استخراج DNA ژنومی به روش



شکل ۱: پلاسمید pBI121، خصوصیات کلی و محل کلون کردن چندگانه آن (Kahrizi and Salmanian, 2008)
 Fig. 1 T-DNA and multiple cloning site regions in pBI121 plasmid (Kahrizi & Salmanian, 2008)

عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند. به نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده، پلاسمید pBI121 را دریافت نموده‌اند.

پس از شمارش و ثبت اطلاعات مربوط به درصد باززایی گیاه سبز، نوساقه‌های سبز باززایی شده بر روی محیط گزینش‌گر جدا شده و به محیط طویل شدن منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه‌ها، نمونه‌ها به محیط القاء ریشه (MS، ۲ mg/l IBA، ۲۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار به علاوه آنتی‌بیوتیک‌های فوق) انتقال داده شدند.

برای محاسبه فراوانی تراریختی از نسبت تعداد گیاهان تراریخت فرضی (Putative transgenic plant) به کل ریزنمونه‌های به کار رفته، استفاده شد. در بین گیاهان سبز باززایی شده که به نظر تراریخت بودند، آزمون‌های PCR با پرایمرهای تخصصی و سنجش بیوشیمیایی gus انجام شد.

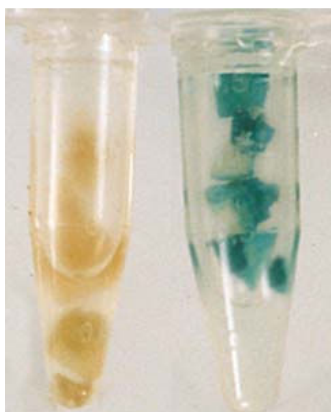
گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با ارتفاع حدود ۱۰ cm، به گلدان‌های کوچک با خاک استریل (ترکیب یکسانی از پیت، ورمی‌کولیت و پرلیت) منتقل شدند. نمونه‌های تراریخت تا زمان استقرار کامل و سازگاری با شرایط گلدانی، با محیط مایع حاوی نصف نمک‌های MS آبیاری شدند. پس از سازگاری تدریجی، به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند. این گیاهچه در گلخانه کنترل شده با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و دمای ۲۵°C در روز و ۱۵°C در شب منتقل شدند و تا زمان بذرگیری در همان شرایط باقی ماندند. در این پژوهش از آزمون‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی برای اثبات انتقال ژن و از سنجش بیوشیمیایی gus (Jefferson et al. 1987) به منظور آنالیز باکتری حاوی پلاسمید و گیاهان تراریخت و اطمینان از بیان ژن انتقالی استفاده گردید.

تیمارها، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای مورد استفاده

جهت رشد بهتر، ریزنمونه‌های کوتیلدون کشت شده به فاصله زمانی هر ۱۰ روز یک‌بار به محیط کشت جدید واگشت شدند. به فاصله حداقل دو هفته پس از کشت کوتیلدون‌ها در محیط MS حاوی BAP، نوساقه‌های متعددی از آنها تشکیل گردید. نوساقه‌ها پس از شمارش، به محیط‌های کشت طویل شدن که فاقد هورمون می‌باشد (شامل محیط پایه MS، ۲۰ g/l ساکارز، ۸ pH و میزان g/l ۷ آگار) منتقل شدند. پس از این‌که طول نوساقه به اندازه مناسب رسید، به محیط ریشه‌زایی نوساقه منتقل شدند. این محیط نیز شامل محیط پایه MS، ۲ mg/l IBA، ۲۰ g/l ساکارز، ۸ pH و میزان ۷ g/l آگار بود.

انتقال ژن به گیاه کلزا به روش اگروباکتريوم

از کشت شبانه اگروباکتريوم حامل پلاسمید مورد نظر (OD₆₅₀=1)، از طریق سانتریفیوژ (۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) رسوب تهیه و در محیط همکشتی (MS مایع، ۳۰ g/l ساکارز و ۵/۲ pH) حل گردید. گیاهچه‌های ۵ روزه قبل از تهیه ریزنمونه از آنها به صورت بدون پیش تیمار سرمایی (شاهد) و پیش تیمار سرمایی در دمای ۴°C به مدت ۱۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند، ابتدا کوتیلدون‌ها به مدت زمان‌های صفر (شاهد)، ۲۴ یا ۴۸ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (MS، BAP ۴/۵ mg/l، ۳۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار) پیش کشت شده و سپس دمبرگ آنها به مدت زمان‌های ۲، ۱۰، ۲۰ یا ۴۰ ثانیه در محیط هم‌کشتی حاوی اگروباکتريوم قرار داده شد. سپس این کوتیلدون‌ها در محیط القای نوساقه کشت داده شدند و به مدت زمان ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفت. پس از شستشوی لازم ریزنمونه‌ها، با آب مقطر استریل، به محیط گزینش‌گر القاء نوساقه (MS، BAP ۴/۵ mg/l، ۳۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار)، که حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم بود، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز یک‌بار به محیط مشابه واگشت شدند. تعدادی از نوساقه‌های تولید شده بر روی محیط گزینش‌گر فوق، سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به علت



شکل ۲: سنجش بیوشیمیایی *gus* جهت اطمینان از بیان این ژن در گیاه کلزا تراریخت (راست) و عدم بیان آن در گیاه شاهد (چپ)
Fig 2: Biochemical *gus* assays. Gene expression and no gene expression in transformed (right) and non-transformed (left) rapeseed respectively

نتایج حاصل از طرح آزمایشی

جدول ۱ نتیجه حاصل از آزمون تجزیه واریانس با حداقل خطا (C.V. = ۱%) برای پیش تیمار سرمایی، مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه-فاشینس و طول دوره پیش-کشت ریزنمونه و اثرات متقابل آن-ها، برای فراوانی باززایی گیاه تراریخت نشان می‌دهد. نتایج این تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین گیاهان شوک سرمایی دیده با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. این نتیجه نشان می‌دهد که پیش تیمار سرمایی با وجود این‌که باعث هم‌زمان سازی چرخه سلولی سلول‌ها می‌شود و باعث بهبود پاسخ در بسیاری از آزمایش‌های کشت بافت گیاهی می‌شود (Kahrizi et al. 2007b)، ولی این هم‌زمان سازی تأثیری بر فراوانی تراریختی ندارد.

تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح مختلف عوامل طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد، ولی بین اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه سطوح مختلف عوامل مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. با توجه به این‌که تا کنون گزارشی در این زمینه ارائه نشده، امکان مطابقت این نتایج وجود ندارد.

مقایسه میانگین‌های سطوح عوامل مورد بررسی، توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین پیش تیمار سرمایی و شاهد برای فراوانی تراریختی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید که با نتایج تجزیه واریانس مطابقت دارد.

عبارتند از: فاکتور اول: پیش تیمار سرمایی گیاهچه‌های ۵ روزه در دمای ۴°C، در دو سطح (شاهد و ۱۲ ساعت). فاکتور دوم: مدت زمان پیش‌کشت کوتیلدون در محیط کشت نوساقه زایی در ۳ سطح (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) که این فاکتور قبل از آلودگی با اگروباکتریوم اعمال شد. فاکتور سوم: مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم در ۴ سطح (۲، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه). متغیر وابسته در این پژوهش فراوانی تراریختی گیاه کلزا از طریق انتقال ژن گزارش‌گر *gus* بود.

کلیه داده‌های به‌دست آمده، با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه آماری شدند. برای تبدیل داده‌ها و نرمال نمودن توزیع آن‌ها از داده زاویه‌ای \sqrt{X} Arcsin استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

آزمون سنجش بیوشیمیایی *gus* جهت اثبات حضور و بیان این ژن در گیاه کلزا

برای اثبات حضور و بیان ژن *gus* در گیاهان تراریخت، از آزمون PCR و سنجش بیوشیمیایی *gus* استفاده شد. نتیجه آزمون سنجش بیوشیمیایی *gus* در باکتری اگروباکتریوم و بافت گیاه به‌صورت مشاهده رنگ آبی (در بافت گیاه تراریخت) و رنگ شفاف یا شیری (در گیاه شاهد) بود (شکل ۲). این آزمون برای ده گیاه تراریخت فرضی مثبت نشان داده شد. نتیجه آزمون PCR در انتهای مقاله آورده شده است.

با بیان ژن *gus* در اگروباکتریوم، می‌توان مطمئن شد که پروموتور CaMV 35S و ترمیناتور nos مشکلی نداشته و از فعالیت خوبی برخوردار است. پلاسمید pBI121 یک ناقل دوگانه، واجد ژن گزارش‌گر *gus* (یا β -گلوکورونیداز) و پروموتور قوی CaMV 35S می‌باشد. هم‌چنین pBI121 واجد دو محل همانندسازی برای *Agrobacterium* و *E. coli* است. بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک ناقل دوگانه نیز عمل کند (Chen et al 2003).

در سنجش بیوشیمیایی *gus* در برگ گیاهان تراریخت، آبی شدن بافت برگ‌ها مشاهده گردید ولی در برگ گیاه شاهد، این واکنش رخ نداد. با این سنجش بیوشیمیایی، می‌توان از روش انتقال ژن (که با میانجی‌گری اگروباکتریوم بوده) اطمینان حاصل نمود.

تاثیر پیش تیمار سرما، طول دوره پیش کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح ...

نمی‌شود و کوتیلدون در همان زمان ۲۴ ساعت میزان مواد فنولیک مورد نیاز جهت تراریختی با آگروباکتریوم را بیوسنتز می‌کند. در برخی گزارش‌ها استوسیرینگون را به محیط کشت اضافه نموده‌اند (جنوبی، ۱۳۸۳)، این در حالی است که طبق نتایج این پژوهش با یک فرصت ۲۴ ساعته به ریزنمونه، نیازی به صرف هزینه برای این مواد نمی‌باشد.

در قسمت مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول آگروباکتریوم مشاهده می‌گردد علت معنی‌دار شدن این عامل، استفاده از سطح ۲ ثانیه می‌باشد که فراوانی تراریختی بسیار پایین‌تری (۰/۴۴۳) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۰/۲۰) دارد. بین سه سطح تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. این نشان دهنده این است که آگروباکتریوم جهت اتصال و هجوم به بافت بریده شده آگروباکتریوم یک حد آستانه حداقل نیاز دارد که ۲ ثانیه برای آن بهینه نمی‌باشد ولی پس از ۱۰ ثانیه این امر اتفاق می‌افتد. با توجه به این که بین سطوح تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، می‌توان نتیجه گرفت که چنانچه از ۱۰ ثانیه استفاده شود به دلایلی هم‌چون هر چه زمان کم‌تر مورد استفاد قرار گیرد، علاوه بر صرفه‌جویی در زمان، امکان آلودگی کشت‌ها به سایر عوامل پاتوژن کاهش می‌یابد.

در بخش مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان پیش کشت در محیط کشت نوساقه زایی، نتایج نشان داد که دلیل اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف این عامل، استفاده از سطح بدون پیش کشت (شاهد) می‌باشد که فراوانی تراریختی بسیار پایین‌تری (۰/۲۷۰) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۰/۲۳) دارد. بین مدت زمان نگهداری ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری برای فراوانی تراریختی وجود ندارد. گرچه این دو مدت زمان، بیشترین تاثیر را بر فراوانی تراریختی دارند. پس بهتر است برای صرفه‌جویی در وقت و انجام کار بیشتر از مدت زمان ۲۴ ساعت استفاده شود.

دلیل پایین بودن فراوانی تراریختی در حالتی که بلافاصله پس از برش کوتیلدون، وارد فرآیند آلودگی و انتقال ژن می‌شود (بدون پیش‌کشت) را می‌توان به صورت ذیل بحث نمود. چنانچه پس از قطع کردن کوتیلدون، مستقیماً توسط آگروباکتریوم آلوده شود، با توجه به این که میزان مواد فنولیک ترشح شده از ریزنمونه به حد لازم نبوده، در نتیجه اثر متقابل قابل قبولی بین مواد و عوامل آگروباکتریوم و مواد فنولیک وجود نخواهد داشت، در نتیجه فراوانی تراریختی بسیار کاهش می‌یابد. وجود بافت زخمی و ترشح مواد فنولیک (به‌ویژه استوسیرینگون) شرط اولیه تراریختی به‌واسطه آگروباکتریوم می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که فرصت بیش از ۲۴ ساعت به کوتیلدون، باعث افزایش تراریختی

جدول ۱: تجزیه واریانس پیش تیمار سرمایی، مدت زمان تلقیح در آگروباکتریوم تومه‌فاشینس و طول دوره پیش کشت ریزنمونه برای فراوانی باززایی گیاه تراریخت

Table 1. Analysis of variance of transformation frequency in different cold pretreatments, *Agrobacterium* inoculation periods and preconditioning in rapeseed

میانگین مربعات Mean of squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییر Source of variation
0.033 ^{ns}	1	پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)
180.200 ^{**}	2	مدت زمان پیش کشت (Preconditioning periods)
188.200 ^{**}	3	مدت زمان تلقیح (Inoculation periods)
0.080 ^{ns}	2	CP × PP
0.072 ^{ns}	3	CP × IP
0.058 ^{ns}	6	IP × PP
0.061 ^{ns}	6	CP × IP × PP
0.028	72	خطای آزمایش Error
%C.V. = 1%	95	پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)

** : دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ (Significant P<0.1) ns : عدم وجود اختلاف معنی‌دار (Non-significant)

جدول ۲: مقایسه میانگین سطوح مختلف عوامل مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس و طول دوره پیش کشت کوتیلدون برای فراوانی تراریختی کلزا

Table2: Mean comparison of different cold pretreatments, *Agrobacterium* inoculation periods and preconditioning on transformation frequency in rapeseed

فراوانی تراریختی (Transformation frequency)	تیمار (Treatment)
پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)	
17.00 a	بدون پیش تیمار (Control)
16.66 a	۱۲ ساعت (12 h)
مدت زمان پیش کشت (Preconditioning period)	
2.70 b	بدون پیش کشت (Control)
24.21 a	۲۴ ساعت (24 h)
23.55 a	۴۸ ساعت (48 h)
مدت زمان تلقیح (Inoculation periods)	
5.76 b	۲ ثانیه (2 s)
20.50 a	۱۰ ثانیه (10 s)
20.63 a	۲۰ ثانیه (20 s)
20.54 a	۴۰ ثانیه (40 s)

حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است.

Means in each column, followed by the different letters are not significantly different at the 1% probability

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت انجام شد. برای اثبات حضور در گیاهان تراریخت، از آزمون PCR استفاده شد. در واکنش PCR، همان‌طور که انتظار می‌رفت، قطعه ۵۲۱ bp مشاهده گردید (شکل ۳).

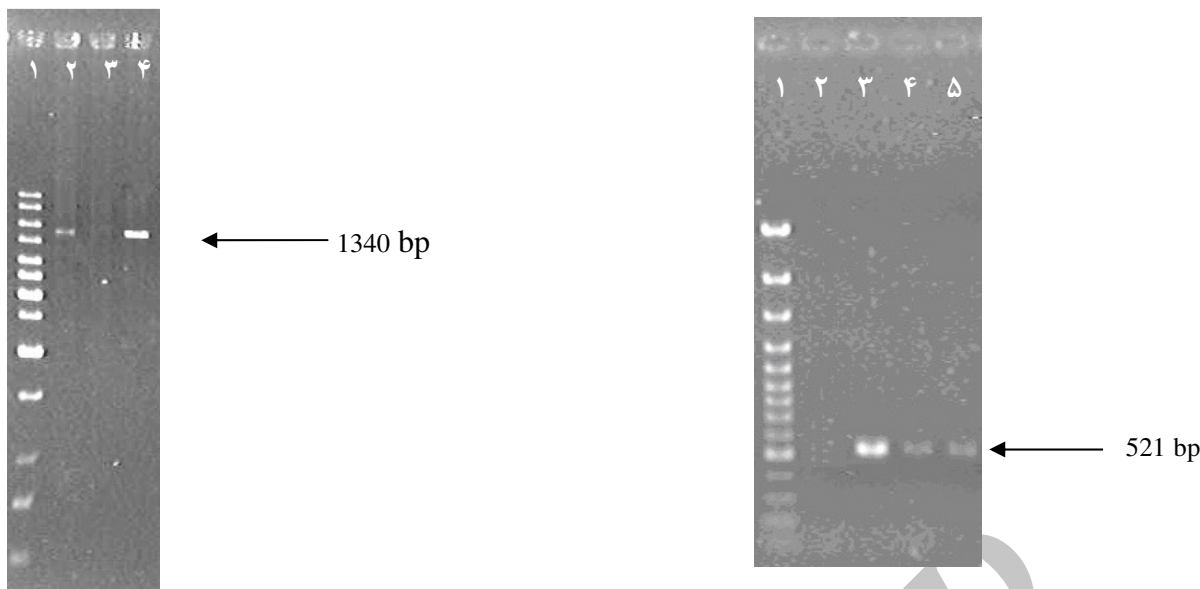
به‌منظور اثبات تراریختی گیاه شاهد با پلاسمید pBI121، علاوه بر حضور ژن *gus*، وجود ژن مقاومت به کانامایسین نیز در گیاه ارزیابی شد. به این منظور با استفاده از PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی (NPTF, NPTR)، حضور این قطعه از پلاسمید pBI121 در گیاه اثبات شد. این آزمون برای ده گیاه تراریخت فرضی مثبت نشان داده شد. نتیجه این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است.

اگر چه حضور و بیان این ژن قبلاً از طریق رشد گیاهچه‌های سبز بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین تا حدودی به اثبات رسیده بود ولی در گزینش گیاهان بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار گیاهچه‌های غیرتراریخت وجود دارد. برای این منظور از آزمون فوق استفاده شد.

با مدت زمان کم‌تر، امکان آسیب‌های وارده به بافت ریزنمونه (به دلیل فشار پنس برای نگهداری آن) کم‌تر شده و در یک مدت محدود، تعداد ریزنمونه بیشتری را می‌توان تلقیح نمود. علاوه بر این موارد، هنگام تلقیح کوتیلدون به محلول اگروباکتریوم باید توجه نمود که فقط انتهای بریده آن آلوده شود، چون که آلوده شدن برگ لپه‌ای شکل، منجر به نکروزه شدن و خشک شدن آن می‌شود. با مدت زمان تلقیح کمتر، آلودگی ریزنمونه به اگروباکتریوم کم‌تر شده و نیازی جهت شستشوی مرتب با محلول سفوتاکسیم نمی‌باشد. چنان‌چه مدت زمان زیادتری در اختیار اگروباکتریوم-ها قرار داده شود، احتمال تراریختی یک سلول توسط چند اگروباکتریوم یا احتمال تراریختی مجدد توسط همان اگروباکتریوم، افزایش یافته و در این صورت تعداد نسخه‌ها انتقالی بیش از یک ژن شده و ممکن است باعث کاهش بیان شود (Bhalla & Smith 1998).

آزمون PCR جهت اثبات حضور ژن در گیاه کلزا

پس از تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار نسل T0 و چندین مرتبه گزینش بر روی محیط‌های کشت حاوی کانامایسین،



شکل ۴: اثبات حضور ژن *nptII* از طریق آزمون PCR
خط ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط ۲: گیاه تراریخت با
pBI121 تنها (۱۳۴۰ bp). خط ۳: شاهد منفی (DNA
گیاه غیر تراریخت). خط ۴: شاهد مثبت (پلاسمید
pBI121)

Fig 4. PCR analysis for *nptII*. Lanes include: 1: 100
bp size marker, 2: PCR product (1340 bp) in
transgenic plant. 3: PCR product in non-transgenic
plant (negative control), and 4: PCR product in
pBI121 (positive control)

شکل ۳: محصول آزمون PCR برای اثبات حضور ژن
gus و پلاسمید pBI121 در گیاه کلزا.

خط ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط ۲: محصول PCR
گیاه غیر تراریخت (کنترل منفی). خط ۳: محصول PCR
از پلاسمید pBI121 (کنترل مثبت)، خطوط ۴ و ۵:
محصول PCR گیاهان تراریخت (۵۲۱ bp)

Fig 3: PCR product for *gus* gene and pBI121 in
repeated. Lanes include: 1: 100 bp size marker, 2:
PCR product in non-transgenic plant (negative
control) and 3: PCR product in pBI121 (positive
control). 4 and 5: PCR product (521 bp) in
transgenic plants.

نکته قابل توجه در تراریختی کلزا، به کار گیری مقادیر
بسیار محدودی از آنتی بیوتیک کانامایسین برای گزینش
گیاهان تراریخت است. تجربیات اولیه نشان می دهد که
محدوده بین ۱۵-۳۰ mg/l، برای این گیاه کافی است. افزایش
این مقدار حتی موجب حذف گیاهان تراریخت نیز می گردد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه های ۵۷-۵۸ متن انگلیسی مراجعه شود.