فن آوری زیستی در کشاورزی / جلد نهم / شماره یک / تابستان ۸۹

تاثیر 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'*، علیرضا زبرجدی' و علی هاتف سلمانیان'

چکیدہ

به کارگیری مهندسی ژنتیک در کلزا منجر به تولید واریته هایی شده که از نظر صفات با ارزش زراعی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت میباشند. بیشترین انتقال ژن به کلزا از طریق اگروباکتریوم 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 گیاهچه های ۵ روزه در دمای 2[°] 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 اگروباکتریوم در ۴ سطح (۲، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه) بر فراوانی تراریختی کلزا از طریق انتقال ژن گزارش گر *sug* 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 آماری نشان داد که بین پیش تیمار سرما و شاهد برای فراوانی تراریختی اختلاف معنیداری مشاهده نگردید، اما بین سطوح مختلف محتلفی 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 ۴۴ و ۴۸ ماری 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 اماری 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 ۴۴ و ۴۸ اماری نشان داد که بین خود و به ترتیب با متوسط ۲۱/۲۱ و ۲۵/۲۱ درصد دارای بیش ترین فراوانی تراریختی بودند. هم چنین تجزیه

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 فنآوری، تهران

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

مقدمه

سیستم اگروباکتریوم 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 خصوصیات و بهرهبرداری از پلاسمیدها بهواسطه باکتری پلاسمیدها امکان انتقال طبیعی ژن، بیان ژن و سیستمهای پلاسمیدها امکان انتقال طبیعی ژن، بیان ژن و سیستمهای گزینش را فراهم میآورند. گونه *Aurefaciens بهعنو*ان موثرترین مهندس ژنتیک گیاهی در طبیعت مطرح شده موثرترین موجب انتقال پایدار ژن شده و میتواند بخش مشخصی از ADA به نام T-DNA به توان 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 اگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاه کلزا گزارشهای متعددی وجود دارد. برای مثال: قطعات ساقهی گیاه کلزای ۵ تا ۶ هفتهای را با اگروباکتریوم دارای پلاسمید Ti خلع سلاح 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 اگروباکتریوم سویه EHA101 اقدام به تولید گیاهان تراریخت گردید. تراریختی با بررسی، مقاومت به کانامایسین و ساترن بلات (Southern blot) مورد تایید قرار گرفت. فراوانی بلات (Southern blot) مورد تایید قرار گرفت. فراوانی تراریختی از ۲/۴ تا ۲/۵٪ گزارش گردید (.Radke *et al*

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

جنوبی (۲۰۰۴) شرایط باززایی گیاهچه را برای انتقال کاراتر ژن به دو رقم گیاه *B. napus* از طریق اگروباکتریوم 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

کانامایسین، PCR، PCR، لکه گذاری نقطهای و آزمون gus تراریخت بودن گیاهچههای به دست آمده را تایید کردند (Jonobi 2004).

زبرجدی و همکاران (Zebarjadi *et al.* 2006) که بهترتیب ژن-کهریزی و همکاران (Kahrizi *et al.* 2007c) که بهترتیب ژن های EPSPS و EPSPS را به گیاه . *B.* فای EPSPS داده بودند، بهترین باززایی گیاهان تراریخت را از طریق اگروباکتریوم سویه LBA4404 و ریزنمونه کوتیلدون گزارش کردند. آنها تراریختی را از طریق PCR، لکه گذاری نقطهای و ساترنبلات تایید کردند.

تاثیر ژنوتیپ گیاه، ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم تومه فاشینس بر کارایی تراریختی گیاه کلزا در ایران بررسی گردید. گزارش شد که بین ارقام کلزا، ریزنمونهها و سویههای اگروباکتریوم تومهفاشینس برای فراوانی تراریختی گیاه کلزا اختلاف بسیار معنیداری وجود دارد. مطابق با نتایج این پژوهش، رقم کلزا PF-7045-91 (با متوسط تراریختی پژوهش، رقم کلزا 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, 197 (2007; Takasaki et al, 1997 اگروباکتریوم برای انتقال ژن (, 2008, Palla and Smith, 1998; Radke et al., 1988; Takasaki et al., 1997; Zebarjadi et (al., 2006)

برخی از پژوهش گران در پژوهش ها 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 پژوهش گران) ولی هیچ-گونه گزارشی مبنی بر تاثیر مثبت شوک سرمایی بر روی فراوانی تراریختی در هیچ گیاهی وجود ندارد. همچنین برای نگهداری مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم نگهداری مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم هم زمان دقیقی مشخص نگردیده و فقط برخی پژوهش گران لحظه" اشاره شده است. برخی نیز جهت تسریع کار فقط در حد ۲ ثانیه کوتیلدون را در محلول اگروباکتریوم نگه میدارند (مذاکره خصوصی با پژوهش گران). مسائل گفته شده در

فن آوری زیستی در کشاورزی/ جلد نهم/ شماره یک/ تابستان ۸۹ رابطه با طول دوره پیشکشت ریزنمونه هم صادق است. به-طوری که برخی از پیش کشت استفاده کردهاند (Moloney et) al. 1989; Kahrizi et al. 2007) و برخي مستقيماً كار تلقيح دادەاند انجام ١, د (Radke et al. 1988; Takasaki et al. 1997). يس با توجه به این که در پژوهشهای انجام شده تاثیر پیش تیمار سرمایی گیاهچههای مادری کلزا، مدت زمان تلقیح ریزنمونه در محلول اگروباکتریوم تومهفاشینس و طول دوره پیشکشت ریزنمونه بررسی نشده است، در این پژوهش ضمن بررسی اثرات اصلى تيمارها (پيشتيمار سرمايي، طول دوره پيش-کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه-فاشینس) به اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه آنها بر روی انتقال ژن *gus* پرداخته می شود.

مواد و روشها

در این پژوهش از باکتری E. coli سویه DH5α 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) آنرا نشان میدهد.

سویه اگروباکتریوم 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 Murashige & Skoog 1962) MS بود.

بذور کلزا (Brassica napus) رقم تجاری PF-7045-91 (رقم بهاره) مواد گیاهی این پزوهش 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 اگروباکتریوم (LBA4404) مشخص شده (کوتیلدون) و سویه اگروباکتریوم (LBA4404) مشخص شده استفاده گردیده است.

بهمنظور تهیه DNAی ژنومی، از برگهای جوان و سبز گیاه کلزا استفاده شد. استخراج DNA ژنومی به روش

Murray and Thampson 1980) CTAB) 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 میباشد: آغازگرهای رفتی (GUSF) و برگشتی (GUSR) با

gus 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 nptII برای تکثیر ژن 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 ۲۰mM CaCl2 و ازت مایع به کار گرفته شد (Sambrook & Russell 2001).

از آنجا که هر کدام از این باکتریها در محیط دارای دو آنتی بیوتیک کشت داده شدهاند، تا حدود زیادی می توان به دریافت پلاسمید pBI121 از سوی باکتری مطمئن شد، اما برای حصول اطمینان بیشتر چندین آزمون PCR نیز با آغاز گرهای اختصاصی انجام گرفت. به منظور اطمینان از بیان ژن انتقالی، سنجش بیوشیمیایی gus انجام شد.

تهيه گياه و عمليات كشت 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 ۱۵/۵٪ به علاوه چند قطره تریتون (۲۰۱۵) ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه با تکان دادن، استریل شدند. بذور پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط MS پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت جامد جوانهزنی حاوی نصف نمکهای محیط SM کشت و در اتاق رشد با زمان نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ کشت و در اتاق رشد با زمان نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ کوتیلدونهای گیاهچههای ۵ روزه با حذف جوانه انتهایی، محیط القاء جدا شدند. سپس دمبرگها در عمق ۲ mm ۲ محیط القاء نوساقه با محیط پایه MS با MS/۵ mg/l BAP ساکارز، PH ۸ و میزان ا/g ۸ آگار کشت شدند.



(Kahrizi and Salmanian, 2008) شكل ١: پلاسميد pBI121، خصوصيات كلى و محل كلون كردن چندگانه آن (Fig. 1 T-DNA and multiple cloning site regions in pBI121 plasmid (Kahrizi & Salmanian, 2008)

جهت رشد بهتر، ریزنمونههای کوتیلدون کشت شده به فاصله زمانی هر ۱۰ روز یکبار به محیط کشت جدید واکشت 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 می-باشد (شامل محیط پایه MS، ا/g ۲۰ ساکارز، ۸ Hq و میزان ا/g (شامل محیط پایه MS، ا/g ۲۰ ساکارز، ۸ Hq و میزان ا/g مناسب رسید، به محیط ریشهزایی نوساقه منتقل شدند. این محیط نیز شامل محیط پایه MS ملا IBA، محیط پایه ۲۰ محیط نیز شامل محیط پایه MS مالا محیط پایه ۲۰ محیط نیز شامل محیط پایه MS، MS محیط نیز شامل محیط پایه MS

انتقال ژن به گیاه کلزا به روش اگروباکتریوم

از كشت شبانه اگروباكتريوم حامل پلاسميد مورد نظر (OD650=1)، از طریق سانتریفیوژ (OD650=1)، از طریق دقیقه) رسوب تهیه و در محیط همکشتی (MS مایع، g/l ۳۰ ساکارز و pH ۵/۲) حل گردید. گیاهچههای ۵ روزه قبل از تهیه ریزنمونه از آنها به صورت بدون پیشتیمار سرمایی (شاهد) و پیشتیمار سرمایی در دمای ۴^oC به مدت ۱۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند.، ابتدا کوتیلدونها به مدت زمانهای صفر (شاهد)، ۲۴ یا ۴۸ ساعت بر روی محیط كشت القاء نوساقه (۶۸ mg/l BAP ساكارز و ۳۰ g/l ۴/۵ mg/l BAP ساكارز 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 اگروباکتریوم 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 شستشوهای لازم ریزنمونهها، با آب مقطر استریل، به محیط گزینش گر القاء نوساقه (۸S ماکارز و ۸/۵ ۸/۵ k/۵ ۳۰ ساکارز و ۸/۱ آگار)، که حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم بود، منتقل شدند. ریزنمونهها هر ۱۰ روز یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. تعدادی از نوساقههای تولید شده بر روی محيط گزينش گر فوق، سبز و زنده باقي ماندند و بقيه بهعلت www.SID.ir

عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند. بهنظر 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 گزینش گر جدا شده و به محیط طویل شدن منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه ها، نمونهها به محیط القاء ریشه (یس از رشد کافی گیاهچه ها، نمونهها به محیط القاء ریشه آلار به علاوه ۸ [گار 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 ۱۰۰ به گلدانهای کوچک با خاک استریل (ترکیب یکسانی از پیت، ورمی کولیت 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 ۲۵^۰۵۲ در روز و ۲۵^۰۵ ای ماندند. در این پژوهش از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی برای اثبات انتقال ژن و از سنجش بیوشیمیایی اختصاصی برای اثبات انتقال ژن و از سنجش بیوشیمیایی پلاسمید و گیاهان تراریخت و اطمینان از بیان ژن انتقالی استفاده گردید.

تیمارها، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری

آزمایش بهصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای مورد استفاده

فن آوری زیستی در کشاورزی / جلد نهم / شماره یک / تابستان ۸۹ عبارتند از: فاکتور اول: پیش تیمار سرمایی گیاهچههای ۵ روزه در دمای ۲۰^۵۴، در دو سطح (شاهد و ۱۲ ساعت). فاکتور دوم: مدت زمان پیش کشت 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 گزارش گر 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 Arcsin \sqrt{X} استفاده گردید. مقایسه میانگینها توسط آزمون چند دامنهای دانکن انجام شد.

نتايج 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 پروموتر CaNV 35S و ترمیناتور nos مشکلی نداشته و از فعالیت خوبی برخوردار است. پلاسمیدpBI121 یک ناقل دوگانه، واجد ژن گزارش گر gus (یا β-گلوکورونیداز) و پروموتر قوی CaNV 35S میباشد. همچنین pBI121 واجد دو محل همانندسازی برای E. coli میاشد دوگانه نیز عمل کند 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 میانجی گری اگروباکتریوم بوده) اطمینان حاصل نمود.



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 nontransformed (left) rapeseed respectively

نتایج حاصل از طرح آزمایشی

جدول ۱ نتیجه حاصل از آزمون تجزیه واریانس با حداقل خطا (۱% = .C.V) 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 این که باعث همزمان سازی چرخه سلولی سلول ها میشود و باعث بهبود پاسخ در بسیاری از آزمایش های کشت بافت گیاهی میشود (Kahrizi *et al.* 2007b)، ولی این همزمان سازی تاثیری بر فراوانی تراریختی ندارد.

تجزیه واریانس نشانداد که بین سطوح مختلف عوامل طول دوره پیش کشت 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 این که 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.

در بخش مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان پیش کشت در محیط کشت نوساقه زایی، نتایج نشان داد که دلیل اختلاف معنی دار بین سطوح مختلف این عامل، استفاده از سطح بدون پیش کشت (شاهد) می باشد که فراوانی تراریختی بسیار پایین تری (۲/۲۰) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۲۳٪) دارد. بین مدت زمان نگهداری ۲۴ و دهم 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 پیش کشت) را میتوان به صورت ذیل بحث نمود. چنانچه پس از قطع کردن کوتیلدون، مستقیماً توسط اگروباکتریوم آلوده شود، با توجه به این که میزان مواد فنولیک ترشح شده از ریزنمونه به حد لازم نبوده، در نتیجه فنولیک وجود نخواهد داشت، در نتیجه فراوانی تراریختی فنولیک وجود نخواهد داشت، در نتیجه فراوانی تراریختی بسیار کاهش مییابد. وجود بافت زخمی و ترشح مواد فنولیک (بهویژه استوسیرینگون) شرط اولیه تراریختی بهواسطه اگروباکتریوم می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که فرصت بیش از ۲۴ ساعت به کوتیلدون، باعث افزایش تراریختی

نمی شود و کوتیلدون در همان زمان ۲۴ ساعت میزان مواد فنولیک مورد نیاز جهت تراریختی با اگروباکتریوم را بیوسنتز می کند. در برخی گزارش ها 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 نمی باشد.

در قسمت مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم مشاهده می-گردد علت معنیدار شدن این عامل، استفاده از سطح ۲ ثانیه میباشد که فراوانی تراریختی بسیار پایینتری (۴/۴٪) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۲۰٪) دارد. بین سه سطح تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه اختلاف معنیداری مشاهده نمی-شود. این نشان دهنده این است که اگروباکتریوم جهت اتصال و هجوم به بافت بریده شده اگروباکتریوم 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 ندارد، می توان 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.

> جدول ۱: تجزیه واریانس پیش تیمار سرمایی، مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومهفاشینس و طول دوره پیش کشت ریزنمونه برای فراوانی باززایی گیاه تراریخت Table 1. Analysis of variance of transformation frequency in different cold pretreatments,

ميانگين مربعات	درجه آزادی	منبع تغيير
Mean of squares	Degree of freedom	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 تلقيح (Inoculation periods)
0.080 ^{ns}	2	$CP \times PP$
0.072 ^{ns}	3	$CP \times IP$
0.058 ^{ns}	6	$IP \times PP$
0.061 ^{ns}	6	$CP \times IP \times PP$
0.028	72	خطای آزمایش Error
%C.V. = 1%	95	پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)

Agrobacterium inoculation periods and preconditioning in rapeseed

**: دارای اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ (Significant P<0.1)، عدم وجود اختلاف معنی دار (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)	تيمار (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	(48 h) ساعت ۴۸		
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 غير مشابه بيانگر وجود اختلاف معنى دار بين آن ها است. Means in each column, followed by the different letters are not significantly different at the 1% probability

> 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، چونکه آلوده شدن برگ لپهای شکل، منجر به نکروزه شدن و خشک شدن آن میشود. با مدت زمان تلقیح کمتر، شدن و خشک شدن آن میشود. با مدت زمان تلقیح کمتر، شدن و خشک شدن آن میشود. با مدت زمان تلقیح کمتر، الودگی ریزنمونه به اگروباکتریوم کمتر شده و نیازی جهت شستشوی مرتب با محلول سفوتاکسیم نمیباشد. چنانچه احتمال تراریختی یک سلول توسط چند اگروباکتریوم یا احتمال تراریختی مجدد توسط همان اگروباکتریوم، افزایش اعته و در این صورت تعداد نسخهها انتقالی بیش از یک ژن شده و ممکن است باعث کاهش بیان شود Minalla & Smith

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، www.SID.ir

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 PCR, 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 گزینش گر امکان فرار گیاهچههای غیرتراریخت وجود دارد. برای این منظور از آزمون فوق استفاده شد. تاثير پيش تيمار سرما، طول دوره پيش كشت ريزنمونه و مدت زمان تلقيح . . .



شکل ۴: اثبات حضور ژن *npt*II از طریق آزمون PCR خط ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط ۲: گیاه تراریخت با DNA تنها (۱۳۴۰ bp). خط ۳: شاهد منفی (NMA گیاه غیر تراریخت). خط۴: شاهد مثبت (پلاسمید pBI121

Fig 4. PCR analysis for *npt*II. 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) 17775

- 521 bp

شکل ۳: محصول آزمون PCR برای اثبات حضور ژن gus و پلاسمید pBI121 در گیاه کلزا. خط۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط۲: محصول PCR گیاه غیر تراریخت (کنترل منفی). خط۳: محصول PCR از پلاسمید pBI121 (کنترل مثبت)، خطوط۴ و ۵: محصول PCR گیاهان تراریخت (۵۲۱ bp)

Fig 3: PCR product for *gus* gene and pBI121 in repeseed. 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 آنتیبیوتیک کانامایسین برای گزینش گیاهان تراریخت است. تجربیات اولیه نشان میدهد که محدوده بین mg/l ۳۰–۱۵، برای این گیاه کافی است. افزایش این مقدار حتی موجب حذف گیاهان تراریخت نیز می گردد.

منابع: جهت ملاحظه منابع به صفحههای ۵۷–۵۸ متن انگلیسی مراجعه شود.