Archive of SID

بررسی تأثیر هورمون و کانامایسین روی کالوس‌های گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum*)

Effects of Hormon and Kanamycin on Calli of *Papaver somniferum* L. Medicinal Plant

زیبا نظری[۱]، احمد اسماعیلی[۲*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۳] و علیرضا زبرجدی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۷

چکیده

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که به‌واسطه بیوسنتز و ذخیره آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولی دارای اهمیت خاص می‌باشد. به‌منظور بهره‌برداری‌های زیست‌فناروانه از این گیاه بایستی بهینه‌سازی‌های لازم مثل کشت بافت و تراریختی ژنتیکی صورت گیرد. از میان عوامل مؤثر در تراریختی عامل گزینشگر و برهمکنش آن با سایر عوامل از اهمیت خاصی برخوردار است. به‌منظور بررسی تحمل کالوس‌های این گیاه نسبت به گزینشگر کانامایسین، در مرحله کالوس‌زایی سه آزمایش مجزا روی سه نوع ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه طراحی شد. آزمایش‌های مربوط به کالوس‌زایی به‌صورت فاکتوریل با عامل‌های محیط‌کشت پایه در دو سطح B5 و MS و تنظیم‌کننده‌های رشد در دو سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با هشت تکرار انجام شد. نتایج مقایسه میانگین، بالاترین درصد کالوس‌زایی را در محیط‌کشت B5 نشان داد. در مرحله جنین‌زایی نیز دو آزمایش فاکتوریل (با سه عامل محیط پایه، هورمون و کانامایسین) با هشت تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج بیشترین جنین‌زایی و باززایی جنین‌ها را از کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط‌کشت B5 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D و در سطح ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسن را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: شقایق، آگروباکتریوم، جنین‌زایی سوماتیکی، ریزنمونه

۱. دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان، خرم آباد
۲ و ۳. دانشیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان، خرم آباد
۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه
*: نویسنده مسوول Email: ahmad_ismaili@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از خانواده شقایق است. اهمیت شقایق به‌واسطه بیوسنتز و ذخیره دسته‌ای از آلکالوئیدهای با ارزش دارویی، بنزوفنانتریدین از زیرگروه آلکالوئیدهای حقیقی بنزیل ایزوکوئینولین (Banzylizoquinolin) می‌باشد. از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین و مشتقات حاصل از آن، برای ساخت مسکن‌ها، داروهای شل کننده ماهیچه، آرام‌بخش‌ها، روان‌گردان ها، بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها و پیش ماده برای سنتز مسکن‌های نیمه سنتزی در صنعت داروسازی استفاده می‌شود. شقایق، تنها منبع تجاری تولید مسکن مورفین، ضدسرفه و ضددرد کدئین بوده و قادر به بیوسنتز ماده حدواسط تبائین، ضدسرفه نوسکاپین، گشادکننده رگ و شل‌کننده عضلات پاپاورین و ضدباکتری سنگوئی‌نارین می‌باشد *تتنی*، *اسکملر* و *وینک*، *فاچینی* و *دی لوکا* (Tetenyi, 1997; Schmeller and Wink, 1998; Facchini and De-Luca, 2008). با استفاده از روش‌های مرسوم به‌نژادی گیاهان، میزان محتوای آلکالوئیدهای شقایق تا دو برابر افزایش یافته ولی با این حال بهبود و اصلاح سریع محتوای آلکالوئیدی در این گیاه با روش اصلاح سنتی تقریباً محدود است؛ از این‌رو و به‌منظور استفاده از روش‌های بالقوه و پیشرفته کشت بافت و دستورزی ژنتیکی در این گیاه، به روش بهینه شده انتقال ژن و باززایی گیاه تراریخت با بازدهی بالا نیاز است.

به جنین‌هایی که از بافت‌ها یا سلول‌های غیرجنسی به‌وجود می‌آید، جنین‌زایی سوماتیکی می‌گویند به‌طوری‌که باززایی بیشتر ژنوتیپ‌های شقایق از طریق جنین‌زایی سوماتیکی، گزارش شده است. تاکنون و با توجه به اهمیت گیاه شقایق، مطالعات پایه‌ای فراوانی روی بهینه‌سازی کشت بافت آن صورت گرفته است که بیشتر این مطالعات به بررسی مراحل فیزیولوژیکی، تشکیل و نمو جنین‌های سوماتیکی در مراحل مختلف کشت بافت و باززایی، بررسی متابولیسم و تولید آلکالوئیدها در شرایط درون‌شیشه‌ای، نقش عوامل مختلف از جمله نوع محیط‌کشت پایه، غلظت‌های مختلف انواع هورمون‌ها و مواد تنظیم‌کننده رشد، دما و غیره در میزان باززایی پرداخته‌اند و محققین مختلف باززایی شقایق را از بافت‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف گزارش داده‌اند *آیکوتا* و همکاران؛ *نسلر*؛ *ایلاهی* و *جابین*؛ *اُوکا* و همکاران؛ *یوشیماتسو* و *شیمومورا*؛ *بلنی* و همکاران؛ *کاسمی* و *جاکوئین* (Ikuta *et al*., 1974; Nesslle, 1982; Ilahi and Jabeen, 1987; Ovecka *et al*., 1997; Yoshimatsu and Shimomoura, 1992; Belny *et al*., 1997; Kassemi and Jacquin, 2001).

علی‌رغم این که تراریختی ژنتیکی شقایق تلاش و فرصت مناسبی برای بهبود محتوای آلکالوئیدی است ولی تاکنون، مطالعات معدودی بروی بهینه‌سازی تراریختی ژنتیکی و باززایی شقایق تراریخت صورت گرفته است. گزارش‌های اولیه مربوط به تولید شقایق تراریخت به‌وسیله دو روش بمباران ذره‌ای و استفاده از *آگروباکتریوم تومفشینس* می‌باشد *نسلر* (Nessler, 1998). در آزمایشی انتقال ژن به ریزنمونه‌های کوتیلدونی ژنوتیپی از گیاه شقایق به نام ماریان که دارای مقادیر مورفین کمی بود صورت گرفت و گیاهچه‌های تراریخت از طریق باززایی ساقه تولید شدند، ولی کارآیی این روش بسیار پایین بود *پارک* و *فاچینی* (Park and Facchini, 2000). بیشترین بازدهی باززایی شقایق تراریخت در روش معمول مبتنی بر تلقیح ریزنمونه‌های محور زیر لپه یا هیپوکوتیل با آگروباکتریوم بوده است که به‌دنبال آن کالوس‌های جنین‌زا مقاوم به آنتی‌بیوتیک شکل گرفتند. در این آزمایش گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن با موفقیت به خاک منتقل شده و مورد تجزیه قرار گرفتند. این روش به‌عنوان روش بهینه شده گزارش شده است و در اکثر مطالعات مهندسی متابولیت و انتقال ژنتیکی پایدار به‌منظور دستورزی ژنتیکی مسیر متابولیکی شقایق مورد استفاده قرار گرفته است چیتی و همکاران، *وانگ* (Chitty *et al*., 2003; Wang, 2006). محققین به‌دنبال روش مؤثر و قابل اطمینان برای تراریختی ژنتیکی و باززایی برخی از ژنوتیپ‌های شقایق بوده‌اند که نسبت به روش معمول بازدهی تراریختی ژنتیکی پایینی داشتند. بدین‌منظور مطالعه‌ای مبتنی بر روش سیستماتیک انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به کالوس و استفاده از مواد ارگانیک مانند $MgCl_2$ و ATP در محیط تلقیح را انجام دادند. در این روش نیز باززایی گیاهان تراریخته از طریق جنین‌زایی سوماتیکی صورت گرفته و گیاه تراریخت با موفقیت مورد تجزیه قرار گرفت *فاچینی* و همکاران (Facchini *et al*., 2008).

در این پژوهش به بررسی بهینه‌سازی بیشتر کشت بافت و انتقال ژن به کالوس‌های حاصل از ژنوتیپ های این گیاه به‌عنوان یک روش متفاوت پرداخته شد تا عکس‌العمل این نمونه‌ها به کشت بافت و انتقال ژن مبتنی بر این روش مشخص شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور گیاه شقایق (*P. Somniferum*) پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰-۳۰ ثانیه و هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و چندین بار با آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر استریل شستشو و در محیط‌کشت B5 (با pH بین ۵/۵ تا ۵/۸) حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت گردیدند. به‌منظور رفع نیاز سرمایی بذور، شیشه‌های حاوی بذور کشت شده به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت به‌منظور تسهیل در جوانه‌زنی بذور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بذور در اتاق رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تحریک کالوس‌زایی: جهت کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه‌های ۷ یا ۸ روزه شقایق استفاده شد. قطعات کوتیلدون به‌صورت سالم و قطعات ریشه و هیپوکوتیل به طول ۵-۳ میلی‌متر تهیه و به‌مدت ۶-۴ هفته روی محیط‌کشت کالوس‌زایی قرار داده شدند. برای تهیه محیط‌کشت القاء کالوس برای هر ترکیب تیماری هر محیط‌کشت (محیط‌کشت پایه MS یا B5) به‌صورت جداگانه تهیه، سپس ترکیب‌های هورمونی اضافه گردید. به‌منظور بهینه سازی کالوس‌زایی سه آزمایش فاکتوریل مجزا روی سه ریزنمونه (کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه) با ۸ تکرار (هر پتری‌دیش با ۱۰ ریز نمونه به عنوان یک تکرار) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی طراحی و اجرا شد. عامل‌های مورد مطالعه در این آزمایش‌ها شامل دو عامل محیط‌کشت پایه (در دو سطح B5 و MS) و عامل تنظیم‌کننده‌ای رشد (در دو سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D+۰/۵ میل‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) بود.

تراریختی کالوس‌ها و تحریک جنین‌زایی: برای تراریختی ژنتیکی کالوس‌ها، از باکتری *A. tumefaciens* (سویه GV3101) حاوی پلاسمید pBI121 دارای ژن نشانگر مقاومت به کانامایسین (nptII) استفاده شد. به‌منظور تلقیح کالوس‌ها، تک کلنی باکتری *A. tumefaciens* در ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های گزینشگر ریفامپسین (۳۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌صورت شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰۰ rpm کشت داده شد. سپس باکتری کشت شده در دمای ۴ درجه و ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب باکتری در محیط تلقیح (۵۰ میکرومولار $MgCl_2$ + ۵۰ میکرو مولار ATP+ 1% Glucose + B5) سوسپانسیون شد به‌نحوی‌که OD محیط در طول موج ۶۰۰ نانو متر برابر ۰/۲۵ بود. کالوس‌های شکل گرفته به‌مدت ۲-۱ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شد، سپس به‌مدت ۱۸-۱۶ ساعت در محیط هم‌کشتی مایع (محیط‌کشت پایه القاء کالوس فاقد آنتی‌بیوتیک) در دمای محیط و ۷۵ rpm هم‌کشت شدند. کالوس‌های هم‌کشت شده در محیط‌کشت القاء کالوس فاقد آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد و پس از خشک شدن، جهت حذف آگروباکتریوم کالوس‌ها به‌مدت یک هفته روی محیط‌کشت کالوس‌زایی حاوی سفوتوکسیم در شرایط تاریکی نگهداری شدند. جهت بررسی و بهینه‌سازی گزینش کالوس‌های تراریخت و تحریک (القاء) جنین‌زایی سوماتیکی، آزمایش فاکتوریل با هشت تکرار (هر پتری‌دیش با ۱۰ ریزنمونه به‌عنوان یک تکرار) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی صورت گرفت. عامل‌های مورد مطالعه شامل محیط‌کشت پایه (MS و B5)، تنظیم‌کننده‌های رشد (در دو سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D+۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (در دو سطح ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و ۴۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. کالوس‌های حاصل از تلقیح در این مرحله از آزمایش ۳ تا ۴ بار واکشت شدند و دوره‌ی زمانی هر واکشت حدود چهار هفته بود. در نهایت کالوس‌های تحریک یافته برای جنین‌زایی به محیط کشت پایه فاقد هورمون (ولی حاوی آنتی‌بیوتیک) منتقل شدند تا جنین‌ها توسعه یافته و باززایی صورت گیرد. جهت کنترل تأثیر آنتی‌بیوتیک و اطمینان از کارآیی آن از تیمار شاهد (کالوس‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم بدون ناقل ژن مقاومت به کانامایسین) استفاده شد به‌طوری‌که در همان محیط کشت هورمونی مشابه حاوی حداقل مقدار آنتی‌بیوتیک واکشت شدند.

داده‌های مرحله کالوس‌زایی برای محاسبه درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا در پایان دوره القاء کالوس و داده‌های مرحله جنین‌زایی در پایان واکشت سوم یادداشت‌برداری گردید. محاسبه درصد کالوس‌زایی به‌صورت درصد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید نموده‌اند و محاسبه درصد جنین‌زایی نیز به صورت تعداد کالوس‌های جنین‌زا به تعداد کالوس‌های تیمار شده صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C صورت گرفت.

تأیید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته با استفاده از PCR: استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تعدادی از گیاهان تراریخته احتمالی به روش CTAB انجام گرفت (Doyle and Doyle, 1990). به‌منظور تأیید تراریختی گیاهچه‌های باززایی شده واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نشانگر انتخابی nptII شامل آغازگر پیش‌رو: 5’AAGATGGATTGCACGCAGG’3 و آغازگر معکوس: 5’CAGAAGAACTCGTCAAGAAGG’3 صورت گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۵/. میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، یک واحد آنزیم DNA پلیمراز *Taq* و ۱۰ پیکومول از آغازگرهای اختصاصی با استفاده از دستگاه چرخه حرارتی انجام گرفت. چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهینه شده طبق این برنامه اجرا شد: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و به‌دنبال آن ۳۵ چرخه (شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و ۵ دقیقه در دمایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله بسط نهایی. برای این واکنش از نمونه آب (بدون DNA الگو) و DNA گیاه شاهد (غیرتراریخت) به‌عنوان کنترل منفی و از نمونه پلاسمید حاوی ژن nptII به‌عنوان کنترل مثبت، برای تأیید تراریزش گیاه استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌های کالوس‌زایی: به‌طور متوسط بین ۷ تا ۱۲ روز پس از کشت، در ریزنمونه‌های ریشه و هیپوکوتیل آماس مشاهده شد. در پایان هفته چهارم تیمارها به فاز کالوس‌دهی رفتند. یاداشت‌برداری قبل از تلقیح کالوس‌ها با آگروباکتریوم انجام و تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی با دو عامل محیط‌کشت هورمون انجام گرفت. نتایج تجزیه واریانس برای صفت کالوس‌زایی (جدول ۱) نشان داد که در آزمایش اول، کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون فقط در سطح ترکیب هورمونی BA+2,4-D مشاهده شد درحالی‌که در سطح هورمون 2,4- D در دو محیط‌کشت هیچ کالوسی تولید نشد و ریزنمونه‌های این تیمار بعد از ۳ هفته به‌طور کامل از بین رفتند. در این صفت بین محیط‌های کشت پایه B5 و MS اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. درصد کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی BA+2,4-D در محیط‌کشت B5 به میزان ۹۲/۵ و در محیط‌کشت MS زایی ۹۶/۸ درصد بود (جدول ۲).

در آزمایش دوم، کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در هر دو محیط‌کشت پایه و هر دو سطح هورمونی مشاهده شد. میزان کالوس‌زایی در اثر متقابل محیط‌کشت و نوع هورمون در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در این آزمایش در هر چهار ترکیب محیط‌کشت و هورمون کالوس‌زایی خوبی مشاهده شد و کالوس‌زایی محیط‌کشت B5 در هر دو سطح هورمونی اختلاف معنی‌دار نداشت ولی در محیط‌کشت MS اختلاف بین دو سطح هورمونی از لحاظ آماری معنی‌دار شد و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی BA+2,4-D با مقدار ۸۶/۲۵ کالوس‌زایی بهتری را نشان داد (جدول ۲).

در آزمایش سوم اثر متقابل محیط‌کشت در هورمون نیز تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۱). کالوس‌زایی ریشه‌ها در محیط‌کشت B5 در هر دو سطح هورمونی بیشتر از محیط‌کشت MS بود. این در حالی است که در محیط‌کشت MS کالوس‌زایی کم و فقط در سطح هورمونی 2,4-D مشاهده و در سطح هورمونی BA+2,4-D هیچ کالوس‌زایی در مدت ۴ هفته مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس برای صفت درصد کالوس‌زایی گیاه شقایق در آزمایش‌های مجزا

Table 1: Analysis of variance for callus induction percent in *papaver somniferum* plant in different experiments

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		
		کوتیلدون Cotyledons (آزمایش ۱)	هیپوکوتیل Hypocotyl (آزمایش ۲)	ریشه Root (آزمایش ۳)
محیط‌کشت (Medium)	1	38.281 ^{ns}	1875.78**	41328.125**
هورمون (Hormon)	1	71725.178**	957.031**	903.125**
محیط‌کشت× هورمون (Hormon×Medium)	1	38.28 ^{ns}	1875.781**	1953.125**
خطا (Error)	28	35.603	117.746	110.268
کل (Total)	31			

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد

ns: non-significant, * and **: significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین برای صفت درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه شقایق با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن
Table 2: Mean comparisons for percent of callus induction in opium poppy plant in different explants, analysis by Duncan' s multiple range test

محیط‌کشت Medium	هورمون Hormone	ریزنمونه‌ها Explants					
		کوتیلدون Cotyledons		هیپوکوتیل Hypocotyl		ریشه Root	
B5	2,4-D+ BA	92.50	a	86.25	a	87.50	a
B5	2,4-D	0.000	b	90.63	a	82.50	a
MS	2,4-D+ BA	96.88	a	86.25	a	0.000	c
MS	2,4-D	0.000	b	60.00	b	26.25	b

میانگین‌های با حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس روش دانکن است
Means with different letters indicate significant difference based on Duncan's method

اگر از دیدکلی به سه آزمایش انجام شده توجه کنیم دیده می‌شود در بیشتر موارد بالاترین درصد کالوس‌زایی در محیط‌کشت B5 بوده و بالاترین درصد در ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه هیپوکوتیل و به میزان ۹۰/۶۳ درصد مشاهده شد. با این وجود بین دو سطح هورمونی 2,4- D و 2,4-D+BA در محیط‌کشت B5 در آزمایش دوم و سوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج این تحقیق با نتایج آزمایش محققین دیگر مطابقت دارد. *چیتی* و همکاران (2003) کالوس‌زایی مطلوبی در محیط‌کشت B5 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- گزارش داده‌اند، ولی نتایج این آزمایش مغایر با گزارش *فاچینی* و همکاران (2008) است که محیط‌کشت MS را محیط بهتری گزارش کرده‌اند. *فاچینی* و همکاران (2008) ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA را برای کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه گزارش کردند. این محققین در ترکیب هورمونی مذکور کالوس‌زایی مطلوبی ظرف ۶-۴ هفته گزارش دادند درحالی‌که در این تحقیق و در بازه زمانی مربوطه در این ترکیب هیچ کالوسی مشاهده نشد. با توجه به این‌که کالوس‌های به‌دست آمده از این آزمایش برای ادامه تراریختی ژنتیکی (آزمایشات سری دوم) انتخاب شدند ولی چند نمونه از ریزنمونه‌های این تیمار به‌عنوان شاهد نگهداری شده و دو بار در محیط القاء کالوس واکشت شدند؛ مشاهده شد که با گذشت مدت زمان بیشتری (۸-۶ هفته) ریشه‌ها نیز کالوس‌های خوبی تولید کردند. به‌نظر می‌رسد تفاوت در نتایج به‌دست آمده احتمالاً به‌دلیل نقش ژنوتیپ در پاسخ به شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بوده و در این ژنوتیپ می‌بایست ریزنمونه‌های ریشه، مدت زمان طولانی‌تری در محیط‌کشت القاء کالوس نگهداری می‌شدند. در آزمایشات تراریختی ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ جنس *P. somniferum*، اختلاف بین کارآیی تراریختی ژنتیکی در این ژنوتیپ‌ها گزارش شد که در این میان ژنوتیپ ایرانی با ۴۸ درصد دارای بالاترین کارآیی بوده است *چیتی* و همکاران (Chitty *et al*., 2003).

در مجموع نتایج نشان‌دهنده کالوس‌زایی بهتر محیط‌کشت B5 در آزمایش دوم و سوم بود که احتمالاً یکی از دلایل این امر را می‌توان به ترکیبات محیط‌کشت B5 ربط داد. مقادیر یون پتاسیم در نمک پتاسیم نیترات این محیط بالا است و مطالعات نشان داده است که یون پتاسیم موجب القاء تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش میزان کالوس‌زایی می‌گردد *جورج* و همکاران (George *et al*., 2008). از جمله دلایل کالوس‌زایی کمتر محیط‌کشت MS در برخی تیمارها می‌توان به مقادیر بالای نمک این محیط‌کشت اشاره نمود. مطالعات نشان داده است که غلظت بالای نمک در این محیط باعث القاء تولید آنزیم IAA-اکسیداز می‌شود. این آنزیم موجب تخریب هورمون اکسین داخلی IAA (عامل تحریک‌کننده تقسیم سلولی) می‌شود. غیرفعال شدن این آنزیم احتمالاً موجب غیرفعال شدن هورمون اکسین درونی IAA می‌شود. به‌طوری‌که مشخص شده که هورمون IAA در محیط‌کشت MS ناپایدار است *دانلپ* و همکاران (Dunlap *et al*., 1986).

جنین‌زایی سوماتیکی: در ابتدا کالوس‌های تلقیح یافته در محیط‌کشت پایه با ترکیب هورمونی تعیین شده و حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند و پس از این‌که مدت زمان لازم برای القاء جنینی‌زایی در محیط گزینشگر سپری شد، با انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط‌کشت پایه کالوس فاقد تنظیم‌کننده رشد و بعد از یک تا سه دوره کشت در این محیط، جنین‌های بالغ (کروی و سفید رنگ) تشکیل شدند. هنگامی‌که کالوس‌ها به محیط جنین‌زایی منتقل شدند علی‌رغم تکثیر کالوس‌ها بعد از تلقیح و تکثیر در محیط گزینشگر، تعدادی از کالوس‌ها قادر به تولید جنین سوماتیکی. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین آزمایش‌های هیپوکوتیل و ریشه در جدول ۳ و ۴ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: تجزیه واریانس برای صفت درصد کالوس‌های جنین‌زا برای ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه در آزمایش‌های مجزا

Table 3: Analysis of variance of calli embryonic percent for hypocotyl and root explants in opium poppy in different experiments

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		هیپوکوتیل (آزمایش ۱) Hypocotyl (Experiment 1)	ریشه (آزمایش ۲) Root (Experiment 2)
کانامایسین (Kanamycin)	1	30.712*	2244.391*
محیط‌کشت (Medium)	1	228.512**	11422.266**
کانامایسین× محیط‌کشت (Medium×Kanamycine)	1	8.742ns	2244.391*
هورمون (Hormon)	1	49.183**	1396.891*
کانامایسین× هورمون (Hormon×Kanamycine)	1	13.239ns	489.519ns
محیط‌کشت× هورمون (Medium×Hormon)	1	10.086ns	1396.8911*
کانامایسین× محیط‌کشت× هورمون (Kanamycine×Medium×Hormon)	1	1.090ns	489.515ns
خطا (Error)	56	6.065	324.230
کل (Total)	63		

ns عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد

ns: Non-significant, * and **: significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

جدول ۴: مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی سوماتیکی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه با استفاده از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن

Table 4: Mean comparisons percent of somatic embryogenesis in hypocotyl and root explants, analysis by Duncan' s multiple range test

کانامایسین Kanamycine (mg/l)	محیط‌کشت Medium	هورمون Hormone	ریزنمونه‌ها (Explants)			
			هیپوکوتیل Hypocotyl		ریشه Root	
25	B5	2,4-D + BA	45.00	ab	34.75	a
25	B5	2,4-D	68.50	a	42.38	a
25	MS	2,4-D + BA	0.000	d	0.000	b
25	MS	2,4-D	21.00	bc	0.000	b
45	B5	2,4-D + BA	33.12	bc	0.000	b
45	B5	2,4-D	32.50	bc	29.75	a
45	MS	2,4-D + BA	0.000	d	0.000	b
45	MS	2,4-D	15.69	cd	0.000	b

میانگین‌های با حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس روش دانکن است

Means with different letters indicate significant difference based on Duncan's method

برای بررسی تیمار شاهد، تعدادی از کالوس‌ها که با آگروباکتریوم بدون ناقل ژن مقاومت به کانامایسین تلقیح داده شد و روی محیط حاوی حداقل مقدار آنتی‌بیوتیک واکشت شدند. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های شاهد بعد از ۳-۲ بار زیرکشت از بین رفتند و لذا فعالیت و کارآیی کانامایسین محرز گردید.

همچنین آزمایش انتقال ژن به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه کوتیلدون در سطح هورمونی BA + 2,4- D انجام گرفت ولی مدتی بعد از انتقال آن‌ها به محیط گزینشگر، به‌طور کامل از بین رفتند و بر این اساس این آزمایش پیگری نشد و تجزیه واریانسی هم برای آن صورت نگرفت. احتمالاً به‌نظر می‌رسد دلیل رخداد چنین وضعیتی یا به‌دلیل حساسیت بالای

www.SID.ir

Archive of SID

این ریزنمونه است و یا به سطح بالای آنتی‌بیوتیک گزینشگر مورد استفاده برای این ریزنمونه بر می‌گردد.

با توجه به مقایسه میانگین، در آزمایش اول (کالوس‌های با منشا هیپوکوتیل) با این‌که در هر دو محیط‌کشت B5 و MS جنین‌زایی مشاهده شد اما B5 محیط‌کشت بهتری برای جنین‌زایی بود به گونه‌ای‌که بالاترین درصد جنین‌زایی در سطح کانامایسین ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت B5 حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4- D و به میزان ۶۸/۵ درصد مشاهده شد. کالوس‌های حاصل از همین محیط‌کشت و در سطح کانامایسین ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و 2,4- D + BA نیز درصد بالای جنین‌زایی را نشان دادند که از لحاظ آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. در هر دو سطح کانامایسین ۲۵ و ۴۵ میلی‌گرم در لیتر جنین‌زایی مشاهده شد ولی با افزایش غلظت میزان آن کاهش یافت و از لحاظ آماری بین دو سطح کانامایسین اختلاف معنی‌دار دیده شد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، جنین‌زایی در کالوس‌های حاصل از ریشه فقط در محیط‌کشت B5 و در هر دو سطح هورمونی مشاهده شد که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک جنین‌زایی به‌شدت کاهش و فقط در B5 حاوی 2,4- D مشاهده گردید و هیچ جنین‌زایی در محیط MS مشاهده نشد. در هر دو کالوس‌های ریشه و هیپوکوتیل، القاء جنین‌زایی در محیط با هورمون 2,4- D، بالاتر از محیط‌کشت حاوی هورمون 2,4- D + BA بود.

ناقل مورد استفاده برای تراریختی ژنتیکی شقایق حاوی ژن گزینشگر انتخابی nptII بود. این ژن کدکننده آنزیمی است که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود. کانامایسین آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیداز بوده و می‌تواند با زیرواحد 30S ریبوزم در کلروپلاست و میتوکندری ترکیب و در سنتز پروتئین تداخل ایجاد کند. کانامایسین به‌دلیل اختصاصی بودن سوبسترا، کاربرد محدود در درمان بیماری‌های انسان و دام و عدم سمیت آن، رایج‌ترین گزینشگر مورد استفاده در گزینش گیاهان تراریخت می‌باشد *نپ* و همکاران (Nap *et al.*, 1993). تاکنون استفاده از کانامایسین برای گزینش شقایق تراریخت گزارش نشده است. در دو مورد گزارش تراریختی ژنتیکی شقایق به‌ترتیب از غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پاروموماسین و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر علف‌کش فسفینو تریسین (PPT) برای گزینش گیاه تراریخت استفاده شده است چیتی و همکارن، *فاچینی* و همکاران (Chitty *et al.*, 2003; Facchini *et al.*, 2008). با این حال در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک کاناماسین استفاده شد تا واکنش به این آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گیرد.

در تحقیقی که از علف‌کش در محیط گزینش کالوس‌های تراریخته استفاده شده بود، بعد از تولید کالوس‌های جنین‌زا به دلیل اثرات سمی، علف‌کش از محیط حذف شد و جنین‌ها در محیط فاقد هورمون و فاقد عامل گزینشگر شکل گرفتند *فاچینی* و همکاران (Facchini *et al.*, 2008). برای دستیابی به غلظت بهینه دو غلظت متوسط و بالای کانامایسین برای گزینش کالوس‌های تراریخت استفاده شد. به‌طور متوسط بین ۱۵-۱۲ هفته بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط فاقد هورمون، جنین‌زایی در هر دو سطح کانامایسین اتفاق افتاده ولی با افزایش غلظت کانامایسین میزان جنین‌زایی در تیمارهای جنین‌زا کاهش نشان داده و از طرفی مدت زمان رفتن کالوس‌ها به فاز جنین‌زایی افزایش یافت. در محیط B5 در سطح کانامایسین ۴۵ میلی‌گرم در لیتر برخی از جنین‌ها بی‌رنگ شده و از بین رفتند که به‌نظر می‌رسد به‌دلیل سمیت غلظت بالای کانامایسین باشد. مطالعاتی که بروی تاثیر غلظت‌های مختلف کانامایسین طی مراحل باززایی گیاهانی که از طریق جنین‌زایی سوماتیکی باززایی شده بود نشان داد که کانامایسین در غلظت‌های بالا بر بافت ها اثر سمی داشته و سبب کاهش قدرت باززایی می‌شود. در بررسی تأثیر کانامایسین بروی کشت درون شیشه‌ای پنبه مشخص شد که کوتیلدون و هیپوکوتیل و کالوس‌های جنین‌زا به‌شدت به کانامایسین حساس بوده و کانامایسین از رشد کالوس و تکثیر کالوس‌های جنین‌زا جلوگیری می‌نماید. همچنین افزایش غلظت کانامایسین موجب ممانعت آغاز تشکیل جنین و نمو آن‌ها می‌شود *ژانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2005).

نتایج تحقیقات مختلف در شقایق نشان داده است که هورمون برای القاء کالوس و القاء تشکیل جنین‌های سوماتیکی ضروری است ولی باززایی جنین‌های سوماتیکی در نتیجه انتقال به محیط فاقد هورمون صورت می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد که این واکنش در نتیجه طبیعت درون‌زاد سیگنال‌هایی است که احتمالاً این سیگنال‌ها مربوط به مراحل مورفوژنیک توسعه و نمو جنین‌های سوماتیکی هستند *اوکا* و همکاران (Oveka *et al.*, 1997). القاء جنین‌زایی در محیط حاوی هورمون 2,4-D بالا بود. به‌طورکلی نتایج نشان داده است که هورمون اکسینی 2,4- D اثر القاءکننده بر جنین‌زایی سوماتیکی داشته درحالی‌که به‌نظر می‌رسد سیتوکینین‌هایی مانند BA اثر بازدارنده دارند. تحقیقات نشان داده است سطوح مختلف اکسین پیش‌نیازی برای القاء بیان ژن‌های درگیر در جنینی

www.SID.ir

Archive of SID

شدن سلول‌ها می‌باشد. در برخی از گیاهان وجود اکسین برای جنین‌زایی ضروری است ولی در برخی دیگر از گیاهان حذف اکسین موجب تثبیت انتقال اکسین در سلول‌های جنینی شده که در نتیجه ژن‌های دخیل در نمو جنین بیان می‌شوند ییِنگ و همکاران (Ying *et al*., 2009). *جیتی* و همکاران (2003) و *فاچینی* و همکاران (2008) باززایی جنین‌های سوماتیکی را در نتیجه انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط فاقد هورمون گزارش نمودند.

باززایی جنین‌های سوماتیکی: جنین‌های سوماتیکی تشکیل شده بعد از چند واکشت در محیط‌کشت مراحل بلوغ را پشت سر گذاشته و شروع به باززایی کردند. علی‌رغم این که تمایز و باززایی به‌خوبی صورت گرفت ولی در برخی موارد جنین‌های سوماتیکی قهوه‌ای شده و از بین رفتند. نتایج تجزیه واریانس مقایسه میانگین آزمایش‌های باززایی جنین‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه در جدول ۵ و ۶ آمده است.

جدول ۵: تجزیه واریانس درصد باززایی جنین‌ها برای ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه در آزمایش‌های مجزا

Table 5: Analysis of variance for somatic embryos regeneration percent in different experiments

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		هیپوکوتیل (آزمایش ۱) Hypocotyl (experiment 1)	ریشه (آزمایش ۲) Root (experiment 2)
کانامایسین (Kanamycine)	1	23.880*	0.462ns
محیط‌کشت (Medium)	1	50.615*	58.513**
کانامایسین× محیط‌کشت (Medium×Kanamycine)	1	8.365 ns	0.462ns
هورمون (Hormon)	1	0.323 ns	45.613**
کانامایسین× هورمون (Hormon×Kanamycine)	1	22.950*	0.047 ns
محیط‌کشت× هورمون (Medium×Hormom)	1	12.080 ns	45.613**
کانامایسین× محیط‌کشت× هورمون (Kanamycine×Medium×Hormon)	1	7.818 ns	0.047 ns
خطا (Error)	49	201.455	136.102
کل (Total)	63		

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد

ns: Non-significant, * and **: significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

جدول ۶: مقایسه میانگین درصد باززایی جنین‌های سوماتیکی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه با استفاده از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن

Table 6: Mean comparisons percent of regeneration of somatic embryonic in hypocotyl and root explants, analysis by Duncan's multiple range test

کانامایسین Kanamycine (mg/l)	محیط Medium	هورمون Hormone	ریزنمونه‌ها (Explants)			
			هیپوکوتیل Hypocotyl		ریشه Root	
25	B5	2,4-D + BA	21.38	ab	2.50	b
25	B5	2,4-D	27.88	a	31.13	a
25	MS	2,4-D + BA	0.000	c	0.000	b
25	MS	2,4-D	12.50	abc	0.000	b
45	B5	2,4-D + BA	20.25	ab	0.000	b
45	B5	2,4-D	0.000	c	25.75	a
45	MS	2,4-D + BA	0.000	c	0.000	b
45	MS	2,4-D	3.125	bc	0.000	b

میانگین‌های با حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس روش دانکن است

Means with different letters indicate significant difference based on Duncan's Method

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به مقایسه میانگین و نتایج به‌دست آمده مشخص شد که در آزمایش اول، باززایی جنین‌های سوماتیکی بین دو محیط‌کشت B5، MS و دو سطح غلظلت کانامایسین از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد و جنین‌های سوماتیکی در محیط‌کشت B5 بهتر قادر به باززایی بودند به‌گونه‌ای‌که بالاترین درصد باززایی جنین‌ها در سطح کانامایسین ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت B5 حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4- D مشاهده شد. باززایی جنین‌های با منشاء ریشه در هر دو محیط‌کشت (B5 و MS) و دو سطح هورمون از لحاظ آماری با هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

از مجموع نتایج به‌دست آمده این گونه به‌نظر می‌رسد که در مجموع B5 محیط‌کشت بهتری برای کالوس‌زایی و جنین‌زایی است و در هر دو حالت بیشترین کالوس‌زایی و جنین‌زایی در این محیط مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به این‌که در محیط MS حاوی BA+2,4-D، ریزنمونه‌های ریشه مدت طولانی‌تری طول کشید تا به فاز کالوس‌زایی وارد شوند، توصیه می‌شود که در این ترکیب تیماری به نقش عامل زمان توجه و به ریشه‌ها فرصت کافی تولید کالوس داده شود. براساس بررسی منابع صورت گرفته مشخص شد که عامل ریزنمونه منشاء کالوس و هورمون بر درصد جنین‌زایی نقش بسیار مؤثر دارد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در این تحقیق بالاترین درصد جنین‌زایی متعلق به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل بود و درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشتر از دو ریزنمونه دیگر و در کوتیلدون کمتر از دو ریزنمونه دیگر است.

همچنین نتایج نشان داد غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4- D نسبت به ترکیب هورمونی BA + 2,4- D واکنش بهتر و نتایج مطلوب‌تری را با هر دو محیط‌کشت B5 و MS در مراحل کالوس‌زایی و جنین‌زایی در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه نشان داد. به همین دلیل پیشنهای می‌شود که در مطالعات بعدی از این ترکیب تیماری استفاده شود.

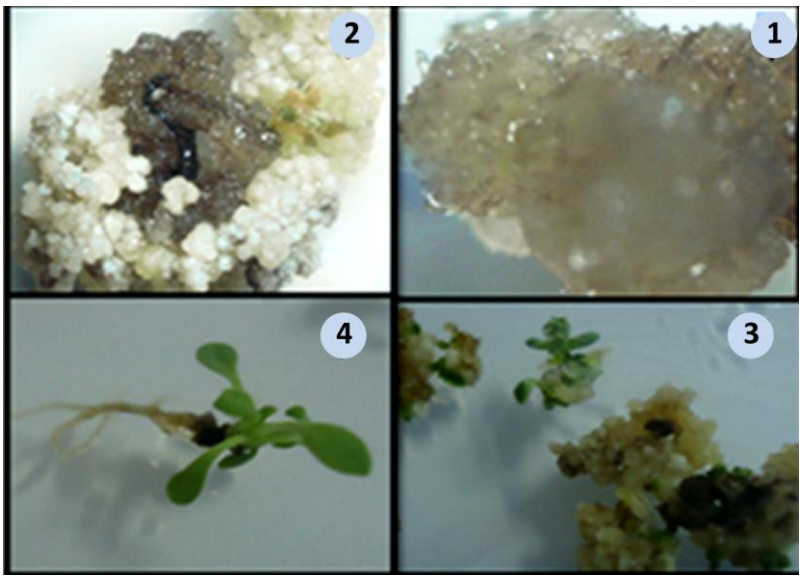
با توجه به نتایج باززایی جنین‌های حاصل از کالوس‌های با منشاء ریشه، به‌نظر می‌رسد که این جنین‌ها از پتانسیل بهتری برای باززایی برخوردار است و این جنین‌ها از مقاومت بیشتری در برابر غلظت‌های بالای عامل گزینشگر برخوردار هستند. این نکته از این جنبه می‌تواند حائز اهمیت باشد که می‌توان از غلظت‌های بالای عامل غربال‌گری استفاده نمود و این امر می‌تواند به گزینش بهتر گیاه تراریخت کمک کند. از این‌رو پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر روی ریزنمونه ریشه صورت بگیرد.

همچنین به‌دلیل حساسیت بافت‌های شقایق به گزینشکر استفاده شده نیز پیشنهاد می‌شود که در ابتدا کالوس‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم در محیط القاء کالوس با غلظت‌های متوسط آنتی‌بیوتیک انجام گیرد، سپس در مراحل القاء جنین‌های سوماتیکی به محیط کشت با غلظت‌های پایین‌تر کانامایسین منتقل شوند. نتایج تحقیق نشان داد که بهترین تیمار، ترکیب B5 در سطح هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در سطح ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین بود.

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته: پس از استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تائید حضور ژن نشانگر انتخابی nptII در تعدادی از گیاهان باززایی شده، دیده شد که قطعه‌ای به اندازه موردنظر (۷۸۵ جفت باز) تکثیر شده است (شکل ۲). البته دیده می‌شود که برخی از گیاهانی که فرض می‌شد تراریخت باشند و به مرحله ریشه‌دار شدن وارد شده بودند براساس آزمون مولکولی مورد تأیید تراریختگی قرار نگرفتند. این موضوع در آزمایش‌های تراریختگی امری طبیعی است زیرا معمولاً در برنامه‌های انتقال ژن اگر غلظت آنتی‌بیوتیک خیلی بالاتر از حد آستانه در نظر گرفته شود باعث اثر سمیت شدید بر ریزنمونه‌های در حال باززایی شده و سبب می‌شود حتی سلول‌هایی که ژن دریافت کرده‌اند نتوانند به گیاه تراریخت باززایی شوند. بر این اساس معمولاً سعی می‌شود که غلظت گزینشگر در حدود متوسط تحمل گیاه در نظر گرفته شود که در نتیجه برخی سلول‌های غیرتراریخت نیز ممکن است از مراحل گزینش عبور کرده و وارد فاز ریشه‌دار شدن بشوند. در مجموع در مورد این آزمایش می‌توان براساس نتایج مولکولی به‌دست آمده پیشنهاد کرد که برای کارهای آینده روی این گیاه سطح غلظت آنتی‌بیوتیک جهت تراریختگی را کمی بالاتر در نظر گرفت.

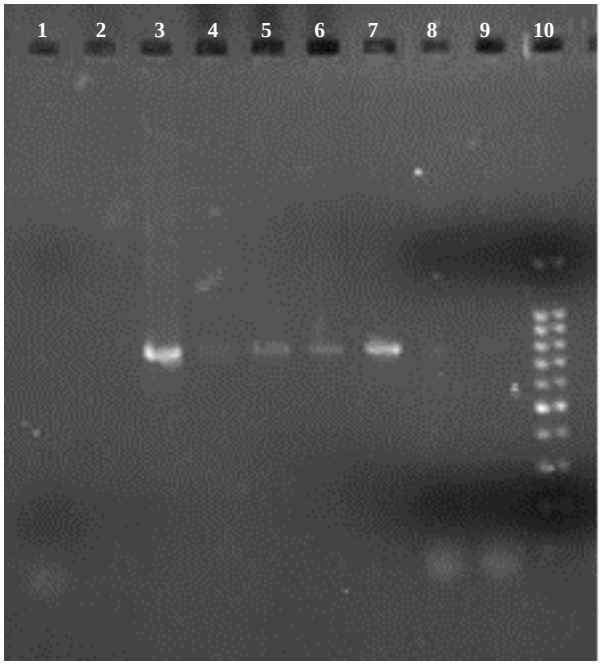
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: مراحل باززایی گیاه شقایق (*P. somniferum*):۱- فاز کالوس، ۲- جنین‌های سوماتیکی در محیط باززایی، ۳- باززایی جنین‌ها و ۴- باززایی گیاهچه شقایق در محیط گزینشگر

Fig. 1: stages of *P. somniferum* regeneration: 1- callus phase, 2- somatic embryonic in regeneration medium, 3- regeneration of embryonic and 4- plantlet regeneration opium poppy in selection medium



شکل ۲: بررسی تراریختی گیاهچه‌های باززایی شده با استفاده از PCR ۱- کنترل منفی آب (بدون الگوی DNA)، ۲- گیاه شاهد (غیرتراریخت)، ۳- پلاسمد حاوی ژن nptII (کنترل مثبت)، ۵، ۶ و ۷- نمونه‌های گیاهان تراریخت، ۴، ۸ و ۹- نمونه‌های گیاهان غیرتراریخت و ۱۰- نشانگر اندازه (100bp)

Fig. 2: Result of PCR reaction: 1. Water (non DNA template), 2. Non transgenic plant, 3. Plasmid containing nptII gene, 5.6 and 7. Transgenic regenerated plants, 4. 8 and 9. Non transgenic regenerated plants 10. Ladder (100bp)

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲-۱ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir