Archive of SID

مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۳۸۰-۳۶۷)

تراریزش گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) به کمک اگروباکتریوم با استفاده از ژن کیتیناز لوبیا

مسعود تو حید فر[۱]، بهزاد قره یاضی[۱] و مجتبی محمدی[۲]
[۱] کرج –پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی صندوق پستی ۱۸۹۷-۳۱۵۳۵
gtohidfar@yahoo.com
[۲] دانشکده کشاورزی کرج- گروه گیاهپزشکی ۱۱۶۷-۳۱۵۸۷
(دریافت: ۸۱/۲/۳۰ ؛ پذیرش:۸۲/۴/۴)

چکیده

بهینه سازی انتقال ژن کیتیناز (از لوبیا) به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) که باعث مقاومت به بیماری‌های قارچی ورتیسیلیوز و فوزاریوز می‌شود با کمک اگروباکتریوم و پلاسمید pBI121 بررسی شد. به منظور تهیه پلاسمید حاوی ژن کیتیناز(pBI121-BCH)، ابتدا قطعه یک کیلو بازی کیتیناز لوبیا (CHI) درمکان *Eco*RI اپران *lacZ* درناقل همسانه ساز pGEM–7Zf(+) همسانه مجدد شد. ژن کیتیناز(*chti*) الحاق شده متعاقباً با دو آنزیم برشی *Sac*I/*Xba*I هضم و درمکان همولوگ به وکتور باینری pBI121 متصل شد. دراین حالت، تظاهر ژن (*chti*) تحت کنترل مستقیم پیشبرذاتی 35S ویروس موزاییک گل کلم قرار گرفت. جهت ژن *chti* براساس الگوی بدست آمده دراثر هضم دوگانه مورد تأیید واقع شد. قطعات بافت هیپوکوتیل واریته‌های ساحل و کوکر پنبه با سه سویه C58، LBA4404 و EHA101 از *Agrobacterium tumefaciens* تیمار شدند. تمام سویه‌های باکتری دارای پلاسمید Ti و ناقل دوتایی pBI121 حاوی پروموتر CaMV35S و ژن کیتیناز لوبیا بودند. ریزنمونه‌های (محور زیر لپه) تیمار شده با باکتری به مدت ٤٨ ساعت درمحیط کشت کالوس‌زایی هم‌کشت شدند. بیشترین درصدکالوس‌ها (۸۷ درصد) و گیاهان مقاوم به کانامایسین (۶۸ درصد) مربوط به سویه LBA4404 بود. تجلی ژن *gus* در برگ رقم کوکر مؤید انتقال ژن بود. واکنش رنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز و *nptII* را در ژنوم دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: *اگروباکتریوم، پنبه (Gossypium hirsutum L.) باززایی، کیتیناز و تراریزش.*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پژمردگی پنبه یا ورتیسیلیوز (*Verticillium dahliae*) یکی از بیماری‌های مهم در مناطق پنبه خیز کشور ازقبیل استان‌های گلستان، فارس، خراسان، لرستان، آذربایجان، اصفهان و مرکزی می باشد. خسارت زیاد بیماری درمزارع پنبه شهرستان استهبان از استان فارس و مناطق کردکوی و بندرگز از استان گلستان عامل محدود کننده کشت ارقام پرمحصول و حساس به بیماری پژمردگی ورتیسیلیوز می‌باشد. کاهش محصول ناشی از تیپ برگ ریز این بیماری ۳۰-۲۰ درصد و در تیپ غیر برگ ریز، ۵۰-۱۰ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). درایران میزان خسارت تیپ SS4 ، ۲۰-۱۵ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). ضدعفونی خاک با گاز متیل بروماید یا مخلوط متیل بروماید و کلرو پیکرین به میزان زیاد و عمق زیاد و کشیدن ورقه پلاستیکی پلی‌اتیلن روی خاک می‌تواند موجب از بین رفتن عامل بیماری شود ولی هزینه این روش بسیار زیاد بوده و اثرات زیانباری نیز روی ارگانیسم‌های خاک در ناحیه ریزوسفر داشته و آلودگی محیط را نیز به همراه دارد. بنا براین، بهترین روش در کنترل پژمردگی ورتیسیلیوزی پنبه، (همانند آفات و بیماری‌های دیگر) استفاده از رقم متحمل یا مقاوم است. استفاده از روش‌های اصلاح نباتات سنتی تنها در سطح تلاقی‌های درون گونه‌ای کارآمد بوده و در استفاده از سایر منابع ژنتیک ناتوان می باشد. دستکاری‌های ژنتیک بوسیله انتقال ژن در پنبه به منظور ایجاد مقاومت در مقایسه با اغلب گیاهان پیشرفت نسبتاً زیادی داشته و این به خاطر مستعد بودن این گیاه برای دستکاری‌های ژنتیک می‌باشد. درمیان روش‌های انتقال ژن، استفاده از اگروباکتریوم در گیاهان دولپه‌ای مناسب ترین روش است. تاکنون از ریزنمونه محور زیرلپه و مریستم برای تهیه گیاهان تراریخته پنبه از طریق آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شده است (Zapata *et al.*, 1998; Umbeck *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1990; Firoozabadi *et al.*, 1987) . با توجه به اهمییت اقتصادی پنبه، ایجاد ارقام مقاوم به بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

آنزیم کیتیناز، از پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی می‌باشد که پلیمر کیتین را با شکستن پیوندهای بتا– ۱و۴ که می‌تواند بصورت داخلی یا خارجی باشد به اولیگومرهای اِن – استیل‌گلوکوز امین، هیدرولیز می‌کند. کیتین عبارت از یک هموپلیمر خطی از اِن استیل – دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا –۱ و ۴ به هم متصل شده‌اند. کیتین، یکی از اجزای مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌هایی از قبیل آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و دئوترومیست‌ها می‌باشد (Coling *et al.*, 1993). یاماماتو و همکاران (Yamamato *et al.*, 2000) گزارش کردند انگورهای تراریخته حاوی ژن کیتیناز کلاس یک،

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت بالایی به سفیدک سطحی دارند. بروگلی و همکاران (Broglie *et al.*, 1991) توانستند یک ژن اگزوکیتینازی حاصل از باکتری *Serratia marcescens* را وارد ژنوم توتون کنند و بعدها مشاهده نمودند که ژن کیتیناز A ناشی از باکتری فوق توانایی ممانعت از رشد چندین قارچ زراعی از جمله *Rizoctonia solani* را دارد. در همین تحقیق گیاهچه‌های توتون تراریخته در خاک آلوده به *R. solani* کاشته شدند. پس از ۱۵ روز ۸۰ درصد گیاهان حامل ژن کیتیناز باقی مانده ولی از گیاهان شاهد ۳۰-۲۰ درصد زنده ماندند.

طی آزمایش‌هایی که بر روی بادام زمینی تراریخته حاوی ژن کیتیناز تحت کنترل پیشبر CaMV35S انجام شد مشخص گردیده است که رشد قارچ لکه برگی (*Cercospora arachidicola*) درمقایسه با شاهد بطور معنی داری کاهش یافته است (Rohin and Shankara , 2001).

این پژوهش به منظوربهینه سازی انتقال ژن‌های گزارشگر *gus* و کیتیناز (مقاومت به ورتیسیلیوز) به پنبه با استفاده از آگروباکتریوم انجام شد.

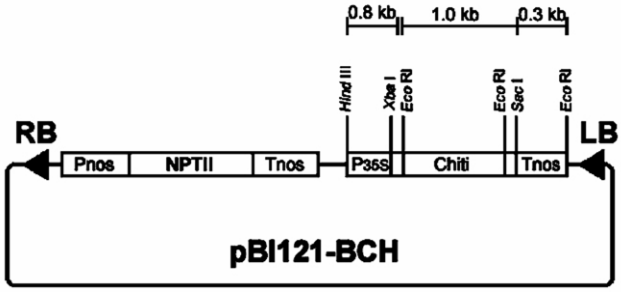
مواد و روش‌ها:

۱- *ساخت پلاسمید* pBI121-BCH

به منظور ساخت پلاسمید حاوی ژن کیتیناز **(pBI121-BCH)** ابتدا پلاسمید حاوی ژن کیتیناز لوبیا (ZENECA MOGEN Lab) با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین وپلاسمید pGEM (-7z) (Cinna Gen p76-07C) حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی سیلین و ژن *lacZ´* با *Eco*RI برش داده شدند. به منظور جلوگیری از عمل خود اتصالی، پلاسمید(-7z)pGEM پس از برش دفسفره شد(Sambrook, 1987). قطعه مربوط به ژن کیتیناز و پلاسمید(-7z)pGEM از روی ژل آگارزجدا شد. سپس قطعه جدا شده به پلاسمید(-7z)pGEM متصل شد. پلاسمیدهای نوترکیب که دارای نشانگر مقاومت به آمپی‌سیلین بودند به باکتری *E.Coli* سویه XLI-Blue (Cinna Gen B76-05C) منتقل شدند. ارزیابی باکتری‌های نوترکیب از طریق غیرفعال شدن ژن *lacZ´* بود. نوترکیب‌ها از طریق عدم توانایی سنتز بتاگالاکتوزیداز شناسایی شدند. جهت ژن در نوترکیب‌ها با استفاده از آنزیم *Sma*1 (در ابتدای ژن و محدوده‌ای در پلاسمید) بررسی شد. با استفاده از آنزیم‌های *Sac*1/*Xba*1 ژن کیتیناز از وکتور (-7z) pGEM جدا و در وکتور pBI121 (شکل۱) قرار گرفت. پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus* باپیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) و ژن *nptII* با پیشبر Nos به عنوان ژنهای نشانگر می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱ - نقشه فیزیکی پلاسمید نو ترکیب pBI121-BCH حاوی ژن کیتیناز

۲- *مرحله انتقال ژن*

برای انتقال ژن، از اگروباکتریوم سویه‌های غیربیماریزای LBA4404 ، EHA101 و C58 استفاده شد. در ابتدا ریز نمونه‌های محور زیرلپه گیاهچه‌های ۷ روزه رقم ساحل و کوکر ۳۱۲ در محلول باکتری با OD600=۰/۷-۰/۸ به مدت ۵ ثانیه غوطه‌ور گردید (Firoozabadi *et al.*, 1987). پس از خشک کردن با استفاده از کاغذ صافی، هم کشتی نمونه‌ها به مدت ۲ روز انجام گرفت سپس ریز نمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی همراه با کانامایسین (۵۰mg/L) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. برای حذف باکتری‌ها از سه نوع آنتی‌بیوتیک [سفوتاکسیم(Cefotaxime)۲۰۰میلی گرم در لیتر، کربنسیلین(Carbenicillin) ۴۰۰میلی گرم در لیترو مخلوط وانکومایسین(Vancomycin) ۵۰ میلی گرم در لیتربا سفوتاکسیم۲۰۰میلی گرم در لیتر] استفاده شد. بعد از ۱۰-۸ هفته کالوس‌ها جهت تحریک و تشکیل جنین‌های سوماتیکی به محیط بدون هورمون همراه با نمک‌های MS، ۱/۹ گرم در لیتر KNO3 و ۰/۷۵ گرم در لیتر $MgCl_2$ همراه با کاناماسین به مدت ۶-۴ هفته منتقل شدند (توحید فرو عبدمیشانی، ۱۳۷۸). برای جوانه دار کردن جنین‌های سوماتیکی از محیط کشت حاوی نمک‌های MS همراه با ویتامین B5، ذغال فعال ۲ گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین همراه با کانامایسین استفاده شد. در نهایت از محیط MS بدون هورمون به منظور باززایی گیاهچه ا ستفاده شد (Zapata *et al*, 1998).

۳- آنالیز تظاهر ژن *gus* و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

آزمایش هیستوشیمیایی *Gus* (Jefferson, 1987) برای برگ گیاه باززا شده در محیط انتخابی انجام گرفت. به منظور اثبات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز درحجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک

www.SID.ir

Archive of SID

واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۲۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (یک میلی مولار)، ۳/۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X انجام گرفت. واکنش در۹۳ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه و۴۰ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در۹۴ درجه، یک دقیقه در۶۲ درجه برای ژن کیتیناز و ۵۵ درجه برای ژن*nptII* و سه دقیقه در۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت) و تکمیل بسط در۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بوسیله دوربین پولاروید عکس برداری گردید.

وجود ژن از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده گردید. ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن کیتیناز و *nptII* با استفاده از برنامه نرم‌ا فزاری Oligo(USA) چهار آغازگر اختصاصی برای دوانتهای ´5 و ´3 طرا حی گردید.

کیتیناز رو به جلو **5´** -´GAGTGGTGTGGATGCTGTTG- **3´**

معکوس **5´** – ACGAACCTCAGCCAATACCG- **3´**

NPTII رو به جلو **5´** - ´GAACAAGATGGATTGCACGC - **3´**

معکوس **5´** - GAAGAACTCGTCAAGAAGGC - **3´**

نتـــایج

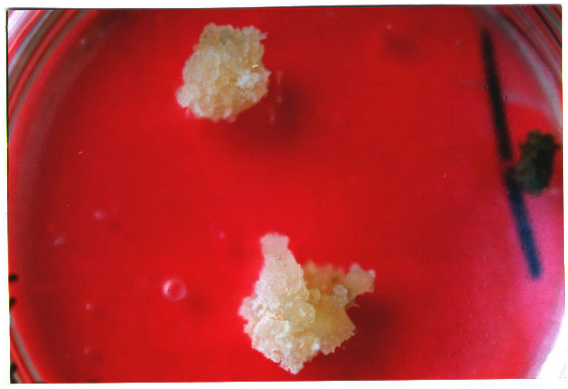
۱- انتخاب کالوس‌های تراریزش شده

برای حذف باکتری‌ها از سه نوع آنتی‌بیوتیک استفاده شد. مشاهدات حاصل نشان داد که آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بهتر می‌تواند رشد باکتری‌ها را کنترل کند. در همین تحقیق مشخص شد که کاربرد سویه۱۰۱ EHA آلودگی شدید نمونه‌ها را به همراه داشت. بطوریکه سبب از بین رفتن ریزنمونه‌ها گردید. شستشوی نمونه‌ها درمحلول آب مقطر استریل حاوی غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم یا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت یک ساعت یا از ترکیب سفوتاکسیم به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و وانکومایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر توانست فعالیت باکتری را کنترل نماید، و باعث حذف واکشت گردید. سویه‌های LBA4404 و C58 آلودگی کمتری در محیط کشت ایجاد نمودند. بدلیل وجود کانامایسین پس از ۸ هفته ریز نمونه‌هایی که غیرتراریخته بودند قهوه‌ای گشته و از بین رفتند و تنها کالوس‌های تراریخته قادر به ادامه حیات بودند(شکل۲). هشت

www.SID.ir

Archive of SID

هفته بعد از آلودگی، کالوس‌های رشد کرده شمارش شدند. بطور متوسط ۲ تا ۴ کالوس مقاوم به کانامایسین از هر ریزنمونه بدست آمد (جدول۱). با توجه به جدول۱ ملاحظه می‌گردد که بیشترین کالوس مقاوم به کانامایسین مربوط به سویه LBA4404 می‌باشد.



شکل۲- ریز نمونه شاهد که در محیط انتخابی کانامایسین دار قهوه ای و نکروز شده است (سمت راست). رشد کالوس رویان زای پنبه در محیط کانامایسین دار(سمت چپ).

جدول۱- فراوانی تراریزش ریز نمونه‌های محور زیر لپه (هیپوکوتیل) پنبه به کمک اگروباکتریوم. چهار هفته بعد از آلودگی، کالوس‌ها جدا و به محیط تازه حاوی کانامایسین منتقل شدند. ۸ هفته بعد از آلودگی، کالوس‌ها برای مقاومت به کانامایسین ارزیابی شدند.

اگروباکتریوم	تعداد ریزنمونه آلوده شده	متوسط تعداد کالوس‌های رشد کرده از هر ریز نمونه در محیط انتخابی	فراوانی تراریزش (٪) مقاوم به کانامایسین (تعداد نمو نه)
LBA44O4	۵۴	۴/۱	۸۷ (۴۶)
C58	۳۹	۲/۹	۷۹(۴۷)
EHA101	۱۸	۰/۵	۵۳(۹)

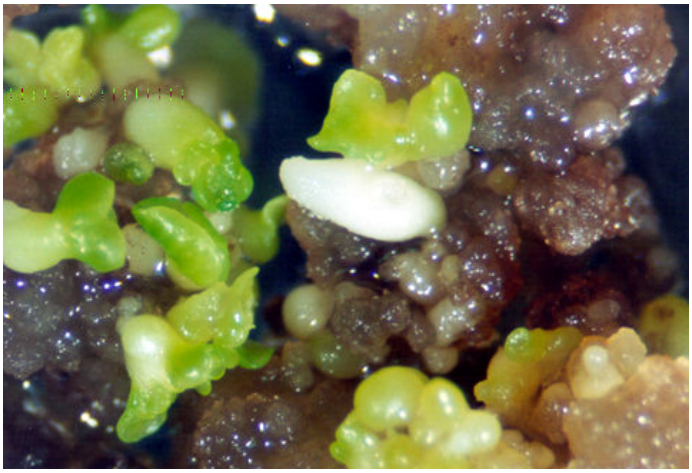
www.SID.ir

Archive of SID

۲- باززایی کالوس‌های انتخاب شده

دراین مرحله کالوس‌های تراریخته احتمالی به محیط کشت انتخابی جنین‌زایی و جوانه‌زنی سوماتیکی انتقال یافتند. کالوس‌های گرانوله، کرم رنگ و شکننده جنین‌های سوماتیکی تولید کردند این جنین‌ها از نظر شکل و اندازه با هم فرق داشتند با وجود اینکه اندازه کالوس‌های منتقل شده به محیط باززایی کوچک بود، اما از یک قطعه کالوس رقم کوکرچندین جنین سوماتیکی که حاوی دو برگ بودند حاصل می‌شد (شکل۳) که این امر به دلیل قدرت خوب باززایی رقم کوکر ۳۱۲ و کیفیت خوب کالوس‌های انتخاب شده بود. در رقم ساحل جنین‌زایی سوماتیکی مشاهده نشد، لذا باززایی هم در آن صورت نگرفت.

جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی در رقم کوکر با تشکیل ریشه های به طول دو میلی‌متر یا شاخه‌های بیش از سه میلی‌متر آغاز شد. طویل شدن برگچه‌ها یا قبل از آغاز ریشه‌دهی یا همراه با ریشه‌دهی بود.

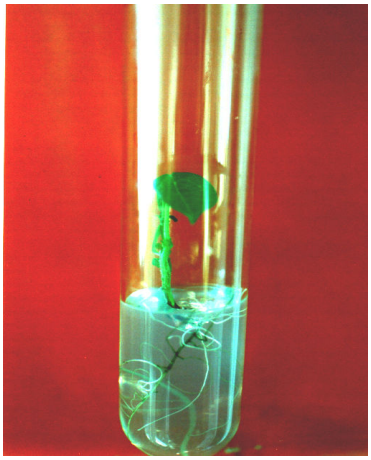


شکل۳- جنین‌های سوماتیکی حاصل از رویش کالوس‌های جنین زا درمحیط انتخابی

www.SID.ir

Archive of SID

جنین‌های سوماتیکی پس از جوانه زنی به محیط باززایی منتقل شدند. به دلیل وجود کانامایسین در محیط باززایی رشد گیاهچه‌ها به کندی صورت می گرفت. پس از اینکه گیاهچه‌ها به خوبی رشد کردند به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند در این محیط رشد ریشه‌ها به کندی صورت می‌گرفت و به مرور قهوه‌ای می‌شدند که با کشت مجدد به حالت طبیعی برمی-گشتند (شکل۴).



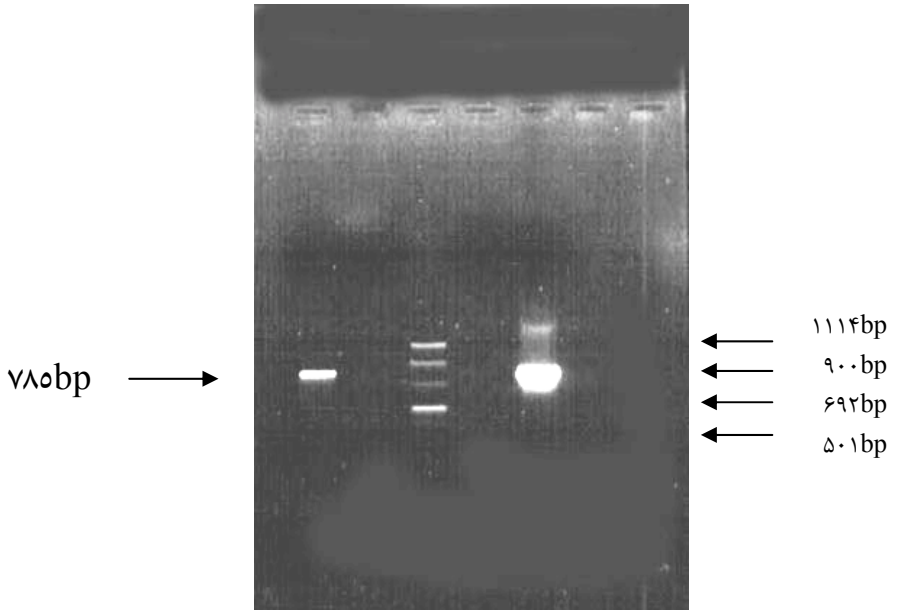
شکل۴-- پنبه تراریزش شده با ژن کیتیناز

تعدادی از گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *nptII* بررسی شدند. این ژن سبب مقاومت گیاه در برابر کانامایسین می‌شود. وجود این ماده در محیط کشت سبب می‌شود که بتوان در مراحل اولیه رشد گیاهانی را انتخاب نمود که نسبت به کانامایسین از خود مقاومت نشان می‌دهند و قادر به رشد هستند. علاوه بر این وجود این ماده یک محیط انتخابی جهت رشد گیاهان تراریخته احتمالی ایجاد می‌نماید. شکل۵ آنالیز پی‌سی‌آر گیاه رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن *nptII* همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. عدم وجود بند در شاهد بدون دی. ان. آ نشان از این دارد که هیچ آلودگی در کار نبوده است. وجود بند ۷۸۵ جفت بازی مربوط به ژن *nptII* نشا ن دهنده این مطلب است که گیا هان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *nptII* را دارا هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

۱ ۲ ۳ ٤ ٥



شکل۵-- آنالیز PCR برای پنبه‌های تراریخته به منظور تشخیص ژن *nptII* با آغازگرهای اختصاصی

۱- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه‌های تراریخته

۲- محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA(کنترل منفی)

۳- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (نشانگرVIII=1114bp, 900bp, 692bp, 501bp،.....)

۴- محصول PCR برای DNAژنومی پنبه فاقد ژن *nptII*

۵-محصول PCR برای DNA پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII* (کنترل مثبت).

در این پژوهش کارایی سویه‌های EHA105, LBA4404 و C58حاوی وکتور دوگانه‌ی pBI121 بمنظور استفاده در تراریزش پنبه مورد مقایسه قرارگرفتند. میزان تراریزش از طریق درصد جنین‌ها یا گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین و بر اساس رشدکالوس برگ‌ها در محیط انتخابی حاوی کانامایسین محاسبه شدند. جدول۲ نتایج حاصل از این مطالعه را نشان می‌دهد. همانگونه که درجدول۲ ملاحظه می‌گردد. با توجه به تعداد محدود نمونه استفاده شده در این آزمایش درصد گیاهان مقاوم به کانامایسین درسویه LBA4404 نسبت به بقیه سویه‌ها بیشتر بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- فراوانی تراریزش جنین‌ها یا گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس‌های مقاوم به کانامیسین

آگروباکتریوم	تعداد جنین‌ها (گیاهچه ها) آزمایش شدند	فراوانی تراریزش [a](٪) مقاوم به کانامایسین
LBA44O4	۱۱	۶۸
C58	۹	۲۱/۲
EHA101	۵	۲۰

a - فراوانی تراریزش از طریق درصد جنین‌ها یا گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین که بر اساس رشد کالوس برگ در محیط انتخابی کانامایسین دار محاسبه شدند.

۳- رنگ آمیزی بافت برای ارزیابی ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته احتمالی

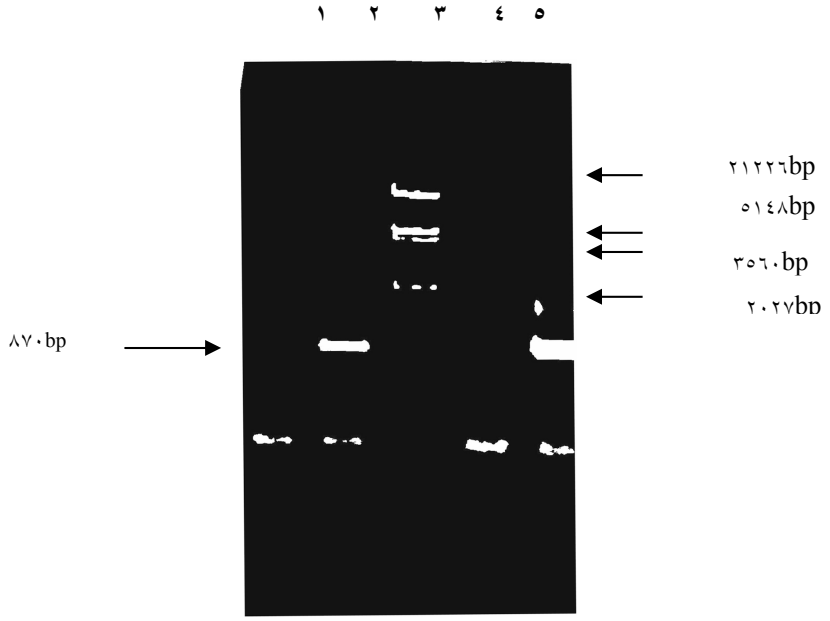
پس از بهینه‌سازی سیستم کشت بافت ارقام ذکر شده و انتخاب بهترین رقم جهت تراریزش و قبل از اینکه تراریزش انجام شود لازم بود که با استفاده از یک ژن گزارش‌گر مانند بتاگلوکورونیداز، روش انتقال ژن برای رقم انتخاب شده، بهینه شود. به همین دلیل تعدادی از گیا هچه‌ها که باززایی شدند و حاوی برگ بودند با تست هیستو شیمیایی GUS آزمایش شدند (شکل۶). نتیجه نشان داد که جنین‌های هم‌کشتی شده با سویه LBA4404 تراریخته است و بقیه تراریخته نشده‌اند. مقاومت اینگونه جنین‌ها شاید بخاطر سم زدایی کانامایسین توسط جنین‌های تراریخته محیط بوده که اجازه داده تا جنین‌های غیرتراریخته رشد نمایند.

شکل۶- رنگ آمیزی برگ پنبه رقم کوکر برای ارزیابی تظاهر ژن بتا گلوکیورونیداز، برگ تراریخته با ژن *gus* (سمت راست)، گیاه شاهد (سمت چپ)

www.SID.ir

Archive of SID

تعدادی از جنین‌های جوانه زده در محیط انتخابی شاخه تولید کردند. ولی بقیه بتدریج از بین رفتند. شکل۷ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته ا حتمالی رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن کیتیناز همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. عدم وجود بند درشاهد بدون دی. ان. آ حاکی از این است که هیچ آلودگی در کار نبوده است. وجود بند ۸۷۰ جفت بازی مربوط به ژن کیتیناز نشا ن دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز را دارا می‌باشند.



شکل۷ - نتایج PCR برای پنبه های تراریخته به منظور تشخیص ژن کیتینازبا آغاز گرهای اختصاصی

۱-محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۱۵

۲-محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۲۶

۳- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه فاقد ژن کیتیناز

۴- نشانگر مولکولی تعین اندازه DNA (Marker III)

۵-محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA (کنترل منفی)

۶-محصول PCR برای DNA پلاسمید pCH18 حاوی ژن کیتیناز(کنترل مثبت)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

انتقال ژن به پنبه از طریق *A. tumefaciens* به نوع ژنوتیپ گیاه پنبه بستگی دارد. لذا روش‌های انتقال ژن تنها برای برخی از ژنو تیپ‌ها (کوکر) موفقیت‌آمیز بوده است (Firoozabadi *at al.*, 1987; Perlak *at al.*, 1991; Rajasekaran *at al.*, 1996). به عنوان مثال در مطالعه‌ایکه بر روی ارقام پنبه در ایلات متحده صورت گرفت تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی در رقم کوکر سریعتر و با فراوانی بالایی گزارش گردید (Firoozabadi *et al.,* 1987). گزارش‌های مشابهی درمورد اثر ژنوتیپ در تولید کالوس‌های جنین زا و باززایی توسط محققین گزارش گردید(Norma *et al.,* 1987; Nick *et al.,* 1990) درمطالعه‌ای بر روی پنبه‌های هندی و نتاج آنها مشخص شدکه ارقام کوکر بالاترین درصد باز زایی را دارند(Khmar *et al.,* 1998) ایجاد سیستم انتقال ژن مریستم بواسطه اگروباکتریوم درسال‌های اخیر امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ فراهم کرده است (Zapata *et al.*, 1998). دراین آزمایش مشخص شد که نوع آنتی‌بیوتیک جهت حذف باکتری مهم می‌باشد. استفاده ازکربنسیلین به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم درلیتر قادر به‌حذف باکتری‌ها نبود، بطوریکه باکتری‌ها به مرور باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها و کالوس‌های تراریخته احتمالی می‌شدند. درصورتی که سفوتاکسیم به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم درلیتر یا مخلوط سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر با وانکومایسین ۵۰ میلی‌گرم درلیتراستفاده گردد باکتریها بتدریج از بین می‌روند.

انتخاب مناسب سویه‌ی اگروباکتریوم در تراریزش گیاه، نقش مهمی ایفا می‌کند، بطوریکه وکتور دوگانه‌ی pBI121 با سویه یLBA4404 در مقایسه با سویه یEHA105 در تراریزش گیاهان دولپه، مناسب‌تر گزارش شده است (Donaldson and Simmonds, 2000). مقایسه‌ی سویه‌های EHA105 و LBA4404 در تراریزش چهار ژنوتیپ پنبه نشان داد که بیشترین تراریزش مربوط به سویه‌یLBA4404 بوده است (Sunilkuman & Rathore, 2001). درمطالعه‌ی دیگرتوسط فیروز آبادی و همکاران (Firoozabadi *et al.*, 1987) و اومبک و همکاران (Umbeck *et al.*, 1987) در تراریزش پنبه از سویه LBA4404 استفاده شده است.

تعدادی از جنین‌های سوماتیکی در محیط دارای کانامایسین سبز باقی ماندند ولی تعداد کمی از آنها تراریخته بودند. این امر نشان می‌دهد که تراریزش پایدار تنها در تعدادکمی از گیاهچه‌ها صورت گرفته است. تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاهچه مرحله نهایی این آزمایش بود. مشاهدات نشان داد که جنین‌های تولید شده پس از قرارگرفتن در محیط بدون هورمون تولید ساقه و ریشه کردند. در رقم ساحل هیچ گونه باززایی مشاهده نشد، که نشان می‌دهد باززایی در پنبه وابستگی شدیدی به ژنوتیپ دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

از آنجا که تراریزش در برخی از جنین‌های جوانه زده صورت گرفت می‌توان امیدوار بود که با همین روش و یا روش‌های دیگر جنین‌های سوماتیکی و نیز استفاده از سویه‌های دیگر اگروباکتریوم که بافت پنبه نسبت به آ نها مستعدتر باشد بتوان رویان‌های تراریخته و در نهایت گیاه پنبه تراریخته بدست آورد.

بطورکلی، اصلاح پنبه با استفاده از کشت بافت جهت دستکاری ژنتیکی، به سهولت باززایی بستگی دارد و سهولت باززایی تحت تاثیر ژنوتیپ می‌باشد، واغلب ژنوتیپ‌ها ی مهم ایران دارای پتانسیل باززایی پائینی هستند، لذا استراتژی بلند مدت باید در جهت انتقال صفت جنین‌زایی سوماتیکی به ارقام زراعی باشد. بنابراین افزایش ژنتیکی پتانسیل باززایی ارقام پنبه ایرانی همراه با بهینه کردن روش‌های انتقال ژن جهت استفاده معمول این روش در اصلاح پنبه ضروری بوده و پیشنهاد می‌گردد که در اولویت‌های تحقیقاتی آینده این گیاه قرار بگیرد. از آنجائیکه اغلب ژنوتیپ‌های زراعی پنبه پتانسیل باززایی پائینی دارند و دستکاری‌های ژنتیکی درآنها مشکل می باشد، بهینه سازی باززایی از طریق کشت مریستم که وابسته به ژنوتیپ نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد مناسب به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه تحقیقات پنبه کشور بخاطر در اختیار گذاردن بذور مورد نیاز و جناب آقای دکتر ملبوبی از مرکز ملی مهندسی ژنتیک بخا طر در اختیار گذاردن پلاسمید سپاسگزاری می‌گردد.

References

Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Robert, C., Biddle, P., Knolton, S., Mauvais, C.J., and Broglie, R. (1991) *Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia Solani*. Science. **254,** 1194-1197.

Colling, D.B., Kra, K.M., Kragh., K.M., Mikkelsen, J.D., Nilson, K.K., Rasmussen, UR., and Vad, K. (1993) *Plant chitinase*. The Plant Journal, **3,** 31-40.

Donaldson , P.A., and Simmonds, D.H. (2000) *Susceptibility to Agrobacbacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short-season soybean*. Plant Cell Rep, **19,** 478-484.

Firoozabadi, E., Debeer, D., Melo, D., Halk, E., and Murray, E. (1987) *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum) by Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plant*. Molecular Biology, **10,** 105-116.

Jefferson, RA. (1987) *Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system*. Plant Mol Biol Rep, **5,** 387-405.

www.SID.ir

Archive of SID

Khumar, S., Sharma, P., and Penter, D. (1998) *A genetic approach to in vitro regeneration of non-regeneration cotton (Gossypium hirsutum L.) cultivars*. Plant Cell Rep, **18,** 59-63.

Nick . J., Gawel, L., and Carol,. O., Robacker, J. (1990) *Somatic embryogenesis in two Gossypium hirsutum genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, **23,** 201-204.

Norma. L., Trolinder, H., and Xhixian, U. (1987) *Genotype specificity of somatic embryogensis respone in cotton*. Plant Cell Rep, **8,** 133-136.

Perlak, F.j., Deaton, R.W., and Fischhoff, D.A. (1990) *Insect-resistant cotton plants*. Bio/ Tecnology, **8,** 939-943.

Rajasekaran, K., Grula, J. W., Hundspeth, R. L., Pofelis, S. and Anderson, DM. (1996) *Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase*. Molecular Breeding, **2,** 307–319.

Rohini, V.K., and Sankara, K. (2001) *Transformation of peanut (Arachis hypogaea L.) with tobacco chitinase gene: variable response of tranformants to leaf spot disease*. Plant Science, **160,** 889-898.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a Laboratory manual*, 2nd end. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sunilkumar, G., and Rathore, K. (2001) *Transgenic cotton: factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration*. Molecular Breeding, **8,** 37-52.

Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K., and Swain, K. (1987) *Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum)*. Plant Bio/Tecnology, **5,** 263-265.

Zapata, C., Park., S.H., El-Zik, K, M., and Smith, R. H. (1998) *Transformation of a Texas cotton cultivar by using Agrobacterium and the shoot apex*. Theor Appl.Genet, **98,** 252-256.

Yammamoto, T., Iketani, H., and Leki, H. (2000) *Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal patogens*. Plant Cell Rep, **19,** 629-644.

توحید فر، م.، و عبد میشانی. س. (۱۳۷۸) *بررسی اثرات ژنوتیپ و محیط کشت برکال‌زایی و باززایی پنبه‌های زراعی*. نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. دانشگاه تربیت مدرس ۵-۳ اسفند، ۱۱۳۰-۱۱۲۴ .

حمدا... زاده، ا.(۱۳۷۲) ویژه گیهای نژاد برگ ریز و غیر برگ ریز عا مل بیماری پژ مردگی پنبه شمال . بیماری گیاهی ایران. **۲**، ۱۳۱-۱۲۵.

www.SID.ir