

روش تراریزش سریع با کارایی بالا در یونجه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید برای تظاهر ژن‌های *Sn* و بتا-گلوکوزونیداز (*gus*)

سید محسن حسام زاده حجازی^۱، سیروس عبد میثانی^۲، عبدالهادی حسین زاده^۳،
هوشنگ علیزاده^۴، رضا توکل افشاری^۵ و سرجیو آرچیونی^۶
۱، ۲، ۳، ۴، ۵، دانشجوی سابق دکتری، استاد دانشگاه تهران و استادیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشگاه تهران، کرج، ۶. موسسه تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهان علوفه‌ای - ایتالیا
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۲۲

خلاصه

در این مقاله روشی ساده و مؤثر برای باززایی گیاهان تراریخته یونجه چندساله *Medicago sativa* var. *Medicago truncatula* var. R108-1(c4) ($2n=2x=16$) و Rgsy27 ($2n=4x=32$) و یونجه یکساله (transgenic) ایجاد شده با هر نوع ریزنمونه توسط ژن *Sn* و ژن گزارشگر *gus* شرح داده شده است. با اجرای این روش که بستگی به نوع نژاد آگروباکتریوم و ژنوتیپ‌های مورد استفاده دارد، گیاهان تراریخته (transgenic) ایجاد شده با هر نوع ریزنمونه از برگ در مدت ۱/۵ تا ۲ ماه بدست خواهند آمد، و از نظر سطوح پلوئیدی و باروری نیز هیچگونه تغییری مشاهده نخواهد شد. از عوامل مؤثر و کلیدی که نقش بسزایی در رسیدن به گیاه یونجه تراریخته در مدت زمان کوتاه دارد، می‌توان محیط‌های کشت مناسب مورد استفاده جهت کال‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها، نژاد آگروباکتریوم و ژنوتیپ‌های یونجه مورد استفاده را نام برد. لذا این دستورالعمل مؤثرترین و سریعترین روشی است که برای جنس *Medicago* بدست آمده است. عمل تراریزش ریز نمونه‌ها توسط *Agrobacterium tumefaciens* حامل پلاسمیدهای pBI121.1 (ناقل دوتایی شامل ژن *gus*) و pBI121.Sn صورت گرفته است. ژن *Sn* یک ژن bHLH در گیاه ذرت است که در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها (condensed tannins) نقش تنظیم‌کنندگی دارد. توانایی پرو آنتوسیانیدین‌ها در تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها سبب شده که تاثیر زیادی بر ارگانسیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و در نهایت کاهش خطر نفخ در حیوانات داشته باشند. از ریز نمونه‌های حاصل از لاین‌های Rgsy27 و R108-1(c4) بیش از ۹۰ درصد کالوس‌های پیش‌جین‌زا تولید شد و بیش از ۸۵ درصد جین‌های باززایی شده به گیاه کامل تبدیل شدند. کارایی تراریزش لاین Rgsy 27 با نژادهای *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده ارتباط داشت، در حالیکه در مورد لاین R108-1(c4) این وابستگی وجود نداشت. اثر ژن *Sn* انتقال یافته به گیاه یونجه در برگ‌ها و ریشه‌ها به دو صورت کاهش و افزایش پروآنتوسیانیدین قابل بیان بود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم تومفسینس، باززایی، پروآنتوسیانیدین، ژن *Sn*، ژن *gus*، یونجه

مقدمه

اهمیت خاصی دارد. یونجه را می‌توان به عنوان علوفه سبز برای تغذیه حیوانات بکار برد منتهی گاوهای شیری و گوشتی را نباید تنها با علوفه سبز یونجه تغذیه نمود زیرا سیری، با مصرف بیش

در بین نباتات علوفه‌ای، یونجه بدلیل خوشخوراکی و دارا بودن ذخائر غذایی و تاثیر مهم آن در اصلاح زمین‌های زراعی

بین مقدار تانن و سن گیاه (۲۶، ۴۲، ۲۳) فاقد نتیجه مطلوب بوده است؛ ثانیاً دورگ غیرجنسی بین برگ یونجه و کشت سوسپانسیون *Lotus pedunculatus* نیز به دلیل کم بودن تعداد گیاهان باززایی شده و مقادیر ناچیز و ناپایدار تانن، نیز از نتیجه مطلوبی برخوردار نبوده است، ثالثاً گرچه موتانت‌های طبیعی و یا القاء شده، جهت تظاهر CTها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان مختلف و گونه‌های علفی شامل سورگوم، جو، نخود، آرابیدوسیس، برنج و *Lotus japonicus* اثرات قابل توجهی داشته‌اند (۲۰، ۲۴، ۴۱). ولی تا بحال هیچ موتاسیونی که موثر بر القاء تظاهر CTها در برگ گیاه یونجه یا گونه‌های وابسته باشد، یافت نشده است و با وجود تنوع سوماکلونالی از نظر میزان فلاوان -۳- ال در جوانه‌های برگی یونجه، جداسازی تانن از آنها صورت نگرفته است و این خصیصه نیز در گیاه یونجه پایدار نبوده است (۳۷). لذا استفاده از روش بسیار دقیق، دربارگیری تکنولوژی DNA نو ترکیب، جهت تولید گیاهان حاوی پروآنتوسیانیدین نیاز می‌باشد.

پروآنتوسیانیدین‌ها ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا هستند که با نام "condensed tannins" نیز شناخته می‌شوند، در حقیقت آنها تولیدات ثانویه پلی فنولیک گیاهی بوده که با پروتئین‌ها پیوند یافته و قابلیت هضم پروتئین را کاهش می‌دهند. لذا به عنوان ترکیبات ضد تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شوند. غلظت‌های نسبتاً کم از پروآنتوسیانیدین‌ها کافی است تا ایمنی از نفخ^۲ را در گیاهان علوفه‌ای القاء نماید. در تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته، آستانه بحرانی غلظت پروآنتوسیانیدین‌ها برای پیشگیری از نفخ حدود نیم درصد وزن خشک علوفه تخمین زده شده است (۲۵). این مواد در دیواره سلولی یا در داخل واکوئل‌ها در ساقه‌ها، پوست درختان، برگ‌ها، گل‌ها و بذرها یافت می‌شوند. این ترکیبات در گیاهان خشبی و چوبی بطور چشمگیری وجود دارند اما در برخی از گیاهان علوفه‌ای نیز یافت شده‌اند. به دلیل توانایی پروآنتوسیانیدین‌ها برای تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، آنها می‌توانند تاثیر چشمگیری بر آرگانیسم‌ها داشته باشند. ایجاد نفخ در حیوانات پس از مصرف

از حد پروتئین همراه بوده و باعث نفخ و در نهایت موجب مرگ ناگهانی حیوان می‌شود. عوامل ایجاد نفخ، می‌تواند گیاه، حیوان، فاکتورهای محیطی و میکروبی باشد. از فاکتورهای محیطی می‌توان تغییر دما و قرار گرفتن در سایه و از فاکتورهای زراعی می‌توان بکار بردن کود را نام برد که بر ترکیبات شیمیایی گیاهان تاثیر داشته و در نتیجه موجب گرایش به سمت ایجاد نفخ می‌شود. در بعضی از ژنوتیپ‌ها افزایش میزان روشنایی با افزایش میزان پروآنتوسیانیدین ارتباط مستقیم دارد. عوامل گیاهی مرتبط با ایجاد نفخ می‌تواند پکتین‌ها، ساپونین‌ها، پروتئین‌های قابل حل در آب، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، آنزیم‌ها، فنول‌ها و ساختمان دیواره سلولی باشد. اما تاکنون فقط حضور پروآنتوسیانیدین‌ها یا CTها^۱ (گروهی از فلاونوئیدها)، استحکام دیواره سلولی و میزان تجزیه پروتئین را در ارتباط با عامل ایجاد نفخ مؤثر دانسته‌اند (۳). نقش فلاونوئیدها به عنوان رنگدانه‌های اصلی قرمز، آبی و ارغوانی در گیاهان، باعث شده که سالیان متمادی به این تولیدات ثانویه گیاهی توجه زیادی شود. از اولین وصف در مورد اثرات باز و اسید روی رنگدانه‌های گیاهی توسط روبرت بویل در سال ۱۶۶۴ میلادی تا تشخیص ساختمانی و ژن‌های تنظیم کننده در اواخر قرن بیستم اطلاعات زیادی در مورد ساختمان‌ها، فعالیت شیمیایی و بیوسنتز این ترکیبات جمع‌آوری شده است. فلاونوئیدها نقش کلیدی در سیگنال‌دهی بین گیاهان و میکروبه‌ها، نر باروری تعدادی از گونه‌ها، خواص ضد میکروبی، بازدارنده تغذیه‌ای و حفاظت از نور ماوراء بنفش را به عهده دارند (۴۸). جهت رفع مشکل نفخ در حیوانات بر اثر خوردن علوفه تازه یونجه ضروری است که از طریق مهندسی ژنتیک، کیفیت گیاه یونجه از نظر صفت نفخ زایی بهبود یابد. از آنجائیکه اولاً تلاش در جهت انتقال ژن کنترل کننده بیوسنتز پروآنتوسیانیدین با روش ایجاد دورگ غیر جنسی بین اسپرس و یونجه به دلیل غالب بودن DNA یونجه، نسبت به اسپرس در گیاهان هیبرید و ناپایدار بودن مقادیر ناچیز تانن القاء شده در برگ برخی از گیاهان باززایی شده و همچنین همبستگی منفی

و بطور کلی تظاهر تعدادی از ژنهای ساختمانی تاثیر می گذارند. این تاثیر از طریق فعالیت ژنهای ساختمانی با سنجش آنزیمی یا سنجش mRNA قابل بررسی و تایید می باشد. ژنهای تنظیم کننده در گیاهان ذرت، گل میمون و گل اطلسی و آرابیدوپسیس بطور خلاصه در (جدول ۲) نشان داده شده است. بنابراین بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها نیازمند عمل تعداد زیادی ژن بوده و با عوامل محیطی از قبیل نور، دما، مواد غذایی و استرس ها تحت تاثیر قرار می گیرند. ژنهای تنظیم کننده در گیاه ذرت به دو خانواده تقسیم می شوند. اولین خانواده ژنی به ژنهای خانواده R/B مربوط است. پروتئین هایی که توسط این خانواده رمز می شوند دارای همولوژی در توالی با پروتئینهای پیوند شونده به DNA یافت شده در انکوپروتئین *myc* حیوانی بوده و مؤثر بر تنظیم زمان، توزیع و مقدار رنگدانه های آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین ها در ذرت می باشند. این خانواده شامل یکسری از ژنهای تنظیم کننده لوکوس R (شامل ژنهای S, Lc, Sn) و لوکوس B می باشد (۱۳).

علوفه تازه بعضی از گیاهان مانند یونجه که هم اکنون بوسیله مواد شیمیایی کنترل می شود دارای اثرات سوء بر تولیدات حیوانی می باشد. تحقیقات انجام شده و در حال انجام روی پروآنتوسیانیدین ها یا (CTs) اساساً از نظر نحوه تولید و القا، در گیاه و نقش آنها در بهبود کیفیت علوفه می باشد (۳۴). تقریباً تمام آنزیم های شرکت کننده در مسیر بیوسنتز کلاس های مختلف فلاونوئید، تعیین شده و تعداد زیادی از ژن های موجود در مسیر بیوسنتز کلون شده اند. تعداد زیادی از ژنهای رمز کننده آنزیم های بیوسنتزی آنتوسیانین ها در گیاه ذرت و گل میمون و گل اطلسی و گیاه آرابیدوپسیس شناخته و کلون شده اند. مکانهای ژنی و ژنهای ساختمانی جدا شده از هریک از گیاهان ذکر شده بطور خلاصه در (جدول ۱) نشان داده شده است (۱۷). ژنهای تنظیم کننده ای که تظاهر ژنهای ساختمانی را در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها در تعدادی از گیاهان کنترل می کنند، شناسایی شده اند. این ژنها در شدت و خصوصیات بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها

جدول ۱- ژنهای ساختمانی رمز کننده آنزیم های مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها در گیاهان مختلف

| آرابیدوپسیس | | گل اطلسی | | گل میمون | | ذرت | | آنزیم |
|-------------|-------------|----------|---------------------|----------|-------------------|-------|------------|--------------------------------------|
| کلون | مکان ژنی | کلون | مکان ژنی | کلون | مکان ژنی | کلون* | مکان ژنی | |
| + | <i>tt4</i> | + | م-ن** | + | <i>nivea</i> | + | <i>c2</i> | Chalcone synthase(CHS) |
| | | | | | | + | <i>whp</i> | |
| + | <i>tt5</i> | + | <i>Po</i> | + | م-ن | + | م-ن | Chalcone isomerase(CHI) |
| + | <i>tt6</i> | + | <i>An3</i> | + | <i>incolorata</i> | - | م-ن | Flavanone 3-hydroxylase(F3H) |
| + | <i>tt7</i> | + | *** <i>Ht1/Ht2</i> | - | <i>eosina</i> | - | <i>Pr</i> | Flavanone 3'-hydroxylase(F3'H) |
| | | م-ن | | - | م-ن | - | م-ن | Flavanone 3'5'-hydroxylase(F3'5'H) |
| | | | <i>Hf1</i> | | | | | |
| | | | <i>Hf2</i> | | | | | |
| + | <i>tt3</i> | + | <i>An6</i> | + | <i>pallida</i> | + | <i>A1</i> | Dihydroflavonol reductase (DFR) |
| + | <i>tt19</i> | + | م-ن | + | <i>Candica</i> | + | <i>A2</i> | Anthocyanidin synthase (ANS) |
| | | م-ن | | + | م-ن | + | <i>Bz1</i> | Flavonoid 3-glucosyltransferase(3GT) |
| | | م-ن | | - | م-ن | - | م-ن | Anthocyanin acyltransferase (AAT) |
| | | م-ن | | - | م-ن | - | م-ن | Anthocyanin methyltransferase (AMT) |
| | | م-ن | **** <i>Mf1/Mf2</i> | - | م-ن | - | م-ن | Anthocyanin methyltransferase (AMT) |
| | | م-ن | <i>An13</i> | - | م-ن | + | <i>Bz2</i> | Glutathione S-transferase(GST)***** |

*: +، نشان دهنده کلون شدن cDNA یا ژن است؛ (-)، نشان دهنده عدم کلون شدن ژن است. **: مکان ژنی مشخص نشده است.

***: کلونی که نشان دهنده فعالیت F3'H می باشد تشخیص داده شده ولی ژن مشابه Ht1 یا Ht2 نبوده است.

****: مکان ژنی بایستی تا این زمان تشخیص داده شده باشد *****: شناسایی آنزیم از طریق توالی همولوگ حدس زده شده است.

جدول ۲- ژنهای تنظیم کننده بیوسنتز آنتوسیانین ها و

پروآنتوسیانیدین ها، موجود در گیاهان مختلف

| گیاه | لوکوس | کلون* | ژنهای تنظیم شده** | |
|--------------|--------------|---------------|--|--------------------|
| ذرت | <i>R</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>R(S)</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>R(Sn)</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>R(Lc)</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>B</i> | + | DFR, 3GT | |
| | <i>Cl</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>Pl</i> | + | CHS,DFR,3GT | |
| | <i>Vpl</i> | + | <i>Cl</i> | |
| | گل میمون | <i>Delila</i> | + | F3H, DFR, ANS, 3GT |
| | | <i>Eluta</i> | - | F3H, DFR, ANS, 3GT |
| <i>Rosea</i> | | - | F3H, DFR, ANS, 3GT | |
| گل اطلسی | <i>An1</i> | - | CHS,DFR,ANS,3GT,3RT,AMT,GST,F3'5'H | |
| | <i>An2</i> | + | CHS,DFR,ANS,3GT,3RT,AMT,GST,F3'5'H | |
| | <i>An4</i> | + | CHS,DFR, ANS, 3GT, 3RT,AMT,GST,F3'5'H | |
| | <i>An11</i> | - | CHS, DFR, ANS, 3RT,AMT,GST,F3'5'H | |
| آرابیدوپسیس | <i>ttg1</i> | + | DFR | |
| | <i>ttg2</i> | + | DFR | |
| | <i>tt8</i> | + | DFR | |
| | <i>tt2</i> | + | DFR, CHS, CHI | |
| | <i>tt3</i> | + | DFR, CHS, CHI | |
| | <i>tt4</i> | + | DFR, CHS, CHI | |
| | <i>tt5</i> | + | DFR, CHS, CHI | |
| | <i>ANL2</i> | + | DFR | |

* : +، نشان دهنده کلون شدن cDNA یا ژن است؛ (-)، نشان دهنده عدم کلون شدن ژن است.

** : نام کامل آنزیم را در جدول ۱ ببینید.

جایگاه ژن *Sn* عملاً شبیه جایگاه های ژن *R*¹ و *B* در گیاه ذرت بوده بطوریکه ژن *Sn* بطور متمایز حذف رنگدانه های آنتوسیانین را در بافت خاص نهال معین و سلول های گیاهی کنترل می کند. با توجه به شباهت مولکولی ژن *Sn* و ژن *R*، پروب های DNA ژن *R* برای متمایز کردن چندین آلل *Sn* استفاده شده است. آنالیز نورترن بلات مشخص نموده است که همه آلل های *Sn* رمزگردان یک رونوشت ۲/۵ کیلو بازی است که در بافت خاص سازگار با توزیع آنتوسیانین ها تظاهر می یابند. تظاهر ژن *Sn* وابسته به نور بوده و تنها آلل *Sn:bol3*

1. Red plant color gene

باعث رونویسی mRNA ژن *Sn* در تاریکی می شود و تولید رنگدانه در نهال های رشد یافته در تاریکی را موجب می گردد. بنابراین آلل *Sn:bol3* مستقل از نور بوده و دارای دو وجه تمایز با دیگر آلل های ژن *Sn* است. یکی اینکه، دارای ظرفیتی است که باعث تولید رنگدانه در تاریکی می شود و دیگر اینکه دارای پاسخ بیشتر به نور بر حسب تجمع رنگدانه است که حدوداً شش برابر دیگر آلل ها است (۴۴).

بنا بر این در حالت *Sn:bol3*، نور به عنوان یک افزایش دهنده جهت تظاهر ژن عمل نموده و باعث افزایش مقدار رنگدانه در بافت ها می شود. ارتباط ساختاری بین ژن های *R*، *B*، *LC* و *Sn* در ذرت ممکن است با فرض منشا تکاملی مشترک بهتر توضیح داده شود. این ژن ها می توانند تولیدات تکاملی یک ژن منفرد اجدادی باشند که ضمن دو نسخه شدن از یکدیگر نیز دور شده اند و بدین ترتیب باعث ایجاد یک خانواده متنوع ژنی از طریق رویداد های مکرر و متوالی گردیده اند. آنالیز بخشی از توالی حاصل از ژن *Sn* نشان دهنده تشابه قابل توجه توالی با cDNA ژن *LC* می باشد، هرچند پلی مورفیسم زیادی بین آنها وجود دارد، از جمله منطقه ۱۴۶ جفت بازی در انتهای 5'، که این منطقه قابل رونویسی است ولی ترجمه نمی شود. ژن *Sn* در همه نژادهای گیاه ذرت تظاهر نمی یابد و بطور جغرافیایی محدود به گروه نژادهایی از ذرت در ناحیه Bolivia می باشد. آنالیز ژنتیکی و مولکولی گسترده، در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در گیاه ذرت، بیش از ۲۰ لوکوس در برگیرنده تولید رنگدانه را تشخیص داده است. چهار لوکوس *R*، *B*، *Cl* و *Pl* بطور هماهنگ فعالیت های حداقل سه ژن ساختمانی مسیر بیوسنتز را تنظیم می کنند. ژن های *B* و *R* تنوع آلی گسترده ای در ارتباط با بافت خاص و زمان نمو سنتز آنتوسیانین از خود نشان می دهند. ژن های *Cl* و *Pl* در حقیقت همولوگ یکدیگر بوده و اخیراً ژن *Pl* با استفاده از توالی ژنومی *Cl* به عنوان پروب کلون شده است (۱۱). در بافت های گیاهی با وجود لوکوس *B* یا *R* جهت فعال نمودن مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در حضور نور، وجود ژن *Cl* ضروری نمی باشد (۱۳). تمام آلل های مطالعه شده در مورد ژن *Sn* بر بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۰ ذرت بوده و در حدود دو واحد نقشه تا لوکوس *R* فاصله دارد (۱۲).

محیط های کشت مورد استفاده جهت بازرایی گیاهان تراریخته و غیر تراریخته یونجه عمدتاً محیط کشت تغییر یافته B-5 گامبورگ (۱۴)، محیط کشت MS (۳۰)، محیط کشت بلیدز (BO, BII, Boi2Y) (۱) و محیط کشت شنک و هیلد برانت SH (۳۸) بوده است. با استفاده از این محیط های کشت، و ریز نمونه های حاصل از کوتیلدون و هیپو کوتیل زمان بسیار زیادی جهت بازرایی صرف می شود و فراوانی گیاهان بازرایی شده در مورد بعضی از واریته ها نیز قابل توجه نبوده است (۱۶، ۲۲، ۴۵). در گیاه یونجه انتخاب ژنوتیپ هایی با بازرایی بالا از دیر باز توسط محققین مورد نظر بوده است (۶، ۵، ۴، ۲۸، ۲۹، ۳۱). از آنجائیکه بازرایی این گیاه وابسته به ژنوتیپ گیاه می باشد، این محققین پس از تلاش های فراوان به این نتیجه رسیدند که سه فاکتور در کنترل بازرایی یونجه از طریق جنین زایی سوماتیکی در شرایط آزمایشگاهی که عبارت از، کیفیت ساختاری و کمیت منبع اکسین با منشا خارجی، غلظت هورمون سیتوکینین با منشا خارجی، میزان و طبیعت ازت احیا شده در محیط کشت بازرایی دخالت دارد. در سال ۱۹۹۰ محققین، اغلب کولتیوار های یونجه را از ۹ رقم بومی که در سال های ۱۸۵۰ تا ۱۹۴۷ در آمریکای شمالی بوجود آمده بود می دانستند و ۳ رقم از آنها را بسیار مفید برای بازرایی معرفی کردند (۳۳). ضرورت اولیه و مهم در کاربرد تکنولوژی کشت بافت برای گیاه یونجه، فراهم نمودن ژرم پلاسمی است که واکنش مساعدی نسبت به بازرایی نشان می دهد (۴). با استفاده از بکارگیری نتایج حاصل از کارهای گسترده ای که محققین جهان در سال های متمادی در این راستا انجام داده اند و بکار گیری ژن های جدید (*BAN*، *Sn*، *SPI*، *try*، *LC* و...) که تغییر دهنده مسیر بیوسنتز فلاونوئید ها شناخته شده اند، برای اولین بار اثر بیان آنها در گیاه یونجه مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج بدست آمده طی چند مقاله انتشار خواهد یافت. در این مقاله ضمن معرفی مناسب ترین محیط کشت جهت بازرایی گیاهان تراریخته یونجه توسط ژن های *gus* و *Sn* نسبت به معرفی ژن *Sn* که مؤثر بر القاء پروآنتوسیانیدین ها در شاخ و برگ گیاه یونجه که عموماً بر اساس نتایج تحقیقات به دست آمده (۳، ۸، ۳۲، ۳۵، ۳۹، ۴۰) عاری از این ماده مهم می باشد می پردازد.

تحقیقات انجام شده در مورد گیاه تراریخته *L. corniculatus* حامل ترانس ژن *Sn* نشان می دهد که فنوتیپها از نظر پروآنتوسیانیدین (CT) در مقایسه با گیاه کنترل تغییر یافته اند. با توجه به اینکه این گیاه بطور طبیعی CT در نوک ریشه ها سنتز می کند، هفت گیاه تراریخته، افزایش CT رادر سطح ریشه ها نشان دادند و ۴۰ گیاه تراریخته بطور معجزه آسای سطح CT را در برگ ها کاهش داده بودند و همچنین سطح آنزیم های DFR¹، LAR² بطور قابل توجهی کاهش یافته بود. ولی با کاهش CT سطح آنزیم CHS کاهش نیافته بود. بنابراین ژن *Sn* می تواند اثر متقابلی با ژن های درون زاد *myc* که برای سنتز DFR و LAR لازم است داشته باشد (۴۳). مشکل جدی در تولید گیاه یونجه تراریخته، بازرایی تعداد زیادی گیاه غیرتراریخته است که در طی انتخاب و جدا سازی *in vitro* بدست می آید. یکی از روش های مرسوم در ایجاد گیاه یونجه تراریخته استفاده از ذرات شتاب دار است. مطلوبترین نتایج با کوتیلدون های بالغ بدست آمده است، یعنی زمانی که بمباران ذره بعد از ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت خیساندن کوتیلدون در آب صورت گرفته باشد (۷). بازرایی و تراریزش گیاه یونجه بطور وسیعی با استفاده از کوتیلدون های نابالغ یا جنین های حاصل از کوتیلدون های نابالغ (بعد از گذشت ۲۵ روز از گرده افشانی) بهبود یافته است. ایجاد گیاه یونجه تراریخته، محدود به دو عامل اصلی است که عبارت از، موانع تحمیل شده توسط روش تراریزش و بازرایی ضعیف بافت ها و سلول های کشت شده می باشند. در حال حاضر گیاه یونجه عمدتاً با استفاده از آگروباکتریوم تومفسینس تراریزش می شود و آگروباکتریوم دارای نژادهای مختلفی بوده و تنها بعضی از نژادهای معین باعث آلوده نمودن برخی از ژنوتیپ های یونجه می شوند، ضمناً فقط بعضی از واریته های یونجه دارای بازرایی نسبتاً خوبی می باشند. گیاه یونجه دارای صفات خاصی است، از جمله اینکه این گیاه اتوتتراپلوئید بوده و در اصلاح دارای خود ناسازگاری می باشد و محققین معتقدند که جنین زایی رویشی در این گیاه غیر قابل توارث است و بطور نسبی توسط چند ژن کنترل می شود (۷).

1. Dihydroflavonol 4-reductase
2. Leucoanthocyanidin reductase

مواد و روش‌ها

-

بذور لاین‌های Rgsy27 و R108-1 (c4) در گلدان های محتوی ماسه- خاک برگ به نسبت (۱:۲) در گلخانه ای با ۶۰ درصد رطوبت نسبی و دوره نوری ۱۶ ساعته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۱۵ درجه سانتی گراد در شب و دوره آبیاری متناوب کشت شدند. برای انجام آزمایشات کشت بافت و عمل تراریزش از برگهای نسبتا جوان و سالم متعلق به گیاهان ۴ تا ۶ هفته ای استفاده شد. پس از استریلیزاسیون سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۷ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه و در نهایت ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، برگها به قطعات مربع شکل کوچک (۵×۵ میلیمتر مربع) تقسیم شده و در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع M_1 حاوی نژاد های آگروباکتریوم، قرار گرفتند. قطعات برگي موجود در محیط کشت آلوده به آگروباکتریوم به مدت ۲۰ دقیقه در محیط خلاء با فشار ۶۵۰ Psi و سپس جهت نفوذ آگروباکتریوم ها، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ تا ۳ ساعت قرار گرفتند. بعد از خشک کردن قطعات برگي در شرایط استریل و خارج نمودن محلول باکتریایی، نسبت به انتقال قطعات برگ به محیط کشت جامد M_2 بدون آنتی بیوتیک و محتوی استوسیرینگون (۹/۸ میلی گرم بر لیتر) اقدام شد و به مدت ۳ روز در تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. جهت ایجاد و القاء کالوس پیش جنین زا، بعد از شستشوی قطعات برگي با آب مقطر استریل و خشک نمودن آنها، به محیط کشت جامد M_3 که شامل آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) و آگمنتین (۸۰۰ میلیگرم در لیتر) بود انتقال یافتند. سپس در تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند و هر دو هفته یک بار محیط کشت تعویض شد. جهت جنین زایی، کالوس های ایجاد شده به محیط کشت جامد M_4 که فقط شامل ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین و فاقد هر گونه هورمون بود انتقال داده شدند و در شرایط ۱۲ ساعت روز با میزان روشنایی $130 \mu E/m^2/s$ نگهداری شدند. بعد از ایجاد گیاهچه، جهت ریشه زایی به محیط کشت بدون هورمون M_4 ۱/۲ انتقال

یافتند. پس از ۴ تا ۷ هفته، گیاهان تراریخته بدست آمده به گلخانه ای با شرایط ویژه انتقال داده شدند به نحوی که گیاهان در روز های اول در شرایط کاملا اشباع از آب قرار گرفتند و سپس شرایط رشدی تغییر یافته و به صورت طبیعی در آمد.

کلیه موادشیمیایی مورد استفاده در محیط کشت از شرکت Sigma و کلیه آنزیم های مصرفی از شرکت Fermentas تهیه شد.

M_1 ترکیبی از ۴ محلول I, II, III, IV بود که ابتدا این محلولها بطور جداگانه بصورت استوک تهیه شدند و سپس جهت تهیه یک لیتر محیط کشت M_1 به ترتیب از ۱۵۰ میلی لیتر، ۱ میلی لیتر، ۱ میلی لیتر و ۲۰ میلی لیتر محلول های I, II, III و IV همراه با ۱۰۰ میلی گرم مایو اینوزیتول، ۳۰ گرم ساکارز، ۴ میلی گرم 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم BAP با تنظیم pH برابر ۵/۸ استفاده شد.

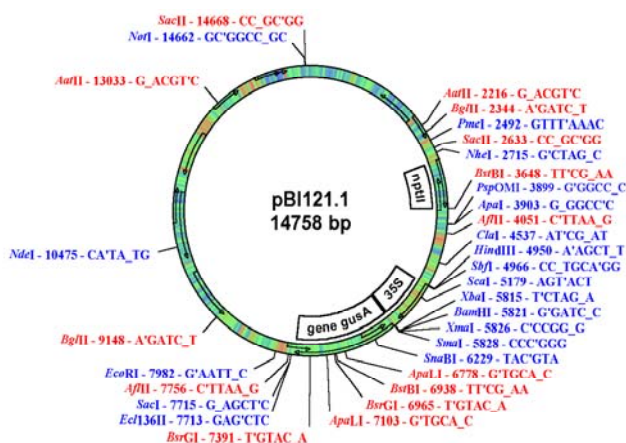
I: ترکیبی از نمک های پر مصرف موجود در محیط کشت N6 (۱۰) شامل ۲ گرم سولفات منیزیم آبدار، ۲۸ گرم نیترات پتاسیم، ۵ گرم سولفات آمونیم، ۲ گرم کلرید کلسیم آبدار، ۴ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات است که به حجم یک لیتر رسید.

II: ترکیبی از نمک های کم مصرف موجود در محیط کشت SH (۱۰) شامل ۱ گرم سولفات منگنز آبدار، ۵۰۰ میلی گرم اسید بوریک، ۱۰۰ میلی گرم سولفات روی آبدار، ۱۰۰ میلی گرم یدور پتاسیم، ۱۰ میلی گرم اکسید مولیبدون دی سدیم آبدار، ۲۰ میلی گرم سولفات مس آبدار و ۱۰ میلی گرم کلرید کبالت آبدار است که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

III: ترکیبی از ویتامین های مورد مصرف موجود در محیط کشت SH (۳۸) شامل ۵۰۰ میلی گرم اسید نیکوتینیک، ۵۰۰ میلی گرم تیامین هیدرو کلراید و ۵۰۰ میلی گرم پیریدوکسین هیدروکلراید است که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

EHA105 نیز استفاده شد. پلاسمید pBIN19 با اندازه ۱۱/۷۷۷ کیلو جفت باز که یک ناقل دوتایی^۳ بوده و مناسب جهت تراریزش گیاهان می باشد، پس از افزودن کاست GUS به آن باعث ایجاد ناقل دوتایی جدیدی به نام pBI121.1 با اندازه ۱۴/۷۵۸ کیلو جفت باز شد.

T-DNA این ناقل دوتایی جدید شامل ژن *nptII*^۴ و ژن *uidA* از *Escherichia coli*، که رمزگردان ژن *gus* است بود. ژن های *nptII* و *uidA* تحت کنترل راه انداز CaMV35S بودند (۱۸) (شکل ۱).



شکل ۱- ناقل دوتایی pBI121.1 با اندازه ۱۴۷۵۸ جفت باز

پلاسمید pRK2013 با اندازه ۴/۸ کیلو جفت باز به عنوان پلاسمید helper مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید pBI121.Sn با اندازه ۱۵/۴۴۰ کیلو جفت باز که با جایگزینی ژن *Sn* به جای ژن *gus* با برش پلاسمید pBI121.1 بوسیله آنزیم های *SmaI* و *EcoRI* و حذف ژن *gus* ایجاد شد. این پلاسمید ها بوسیله تکنیک آمیزش سه والدی (۴۷) به نژادهای آگروباکتریومی EHA105 و LBA4404 منتقل شدند و جهت تشکیل کلونی روی محیط کشت YEP شامل آنتی بیوتیک های ریفامپیسین و کانامایسین قرار گرفته و جهت رشد به مدت ۲ روز در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و جهت صحت کلونی های تشکیل شده از نظر وجود ژن های *Sn* و *gus* ، با

IV : ۷ گرم نمک اتیلن دی آمین تترا استیک

اسید- فریک به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

M₂ از ترکیب مواد محیط کشت M₁

همراه با ۳ گرم فیتازل ، ساخته شد.

M₂₁ همان محیط کشت M₂ است. با این

تفاوت که شامل هورمون 2,4-D به میزان ۲ میلی گرم برلیتر بوده و فاقد هورمون BAP می باشد.

M₂₂ همان محیط کشت M₂ است. با این

تفاوت که شامل هورمون BAP به میزان ۱ میلی گرم برلیتر بوده و فاقد هورمون 2,4-D می باشد.

M₃ از ترکیب مواد محیط کشت M₂

همراه با ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک آگمنتین (ترکیبی از ۱ گرم آموکسی سیلین و ۲۰۰ میلی گرم C lavulanic acid) و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین ساخته شد.

M₄ با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر، یک میلی

لیتر، یک میلی لیتر و ۲۰ میلی لیتر به ترتیب از محلولهای I, II, III, IV, ۱۰۰ میلی گرم مایواینوزیتول^۱، ۲۰ گرم ساکارز و ۷ گرم کالیس آگار^۲ و رساندن حجم به یک لیتر با تنظیم pH برابر ۵/۸ ساخته شد.

جهت رشد نژادهای آگروباکتریوم EHA105 و LBA4404

از محیط کشت YEP همراه با آنتی بیوتیک ریفامپیسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و برای رشد باکتری *E. coli* شامل پلاسمید ها از محیط کشت LB همراه با آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد (۳۶).

A. tumefaciens

در این تحقیق جهت تولید گیاهان تراریخته از دو نژاد *A. tumefaciens* استفاده شد. هرچند نژاد LBA4404 برای تراریزش گیاه توتون بسیار مؤثر بوده است ولی این نژاد برای تراریزش تمام گونه های یونجه کافی و مؤثر نبوده است (۱۵، ۲۲، ۴۶). در این تحقیق علاوه بر نژاد LBA4404 ، از نژاد

3. Binary vector

4. Neomycin phosphotransferase II (*nptII*)

1. Myo-inositol

2. Kalys- agar

- DNA :

استخراج DNA ژنومی گیاه مطابق روش Chang (۴۹) و آنالیز ساترن بلات بر طبق روش Sambrook انجام شد (۳۶). بعد از هضم آنزیمی DNA توسط آنزیم *HindIII* عمل الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام و سپس ژل آگارز به غشاء نایلونی Hybond N+ (Amersham) بر طبق دستورالعمل ذکر شده توسط سازنده غشاء منتقل شد. غشاء متوالیا با کاوشگرهای نشاندار *gus*، *nptII*، *Sn* دورگ گردید. برای تهیه کاوشگر، با استفاده از روش (کلنی-PCR) (۳۶) و استفاده از پرایمرهای مخصوص جهت ژن های *gus*، *Sn*، *nptII* نسبت به تکثیر قسمتی از ژن ها اقدام شد و پس از جدا سازی در ژل آگارز ۱٪ نوارهای ایجاد شده به ترتیب در محل تقریبی ۶۹۹ جفت باز، ۸۳۰ جفت باز و ۷۰۲ جفت باز بریده شد و توسط کیت مخصوص (QIAEX II)، DNA مربوط به کاوشگرها استخراج و خالص شدند. تهیه کاوشگر *gus* با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای *W*: 5'-GGCCAFGCGTATCGTGCTGCG-3' و *REV*: 5'-GGTCGTGCACCATCAGCAGC-3' مطابق با ۷۰۲ جفت باز قطعه PCR حاصل از نوکلئوتید های پایین دست محل شروع ترجمه *gus* انجام شد.

تهیه کاوشگر *nptII* با استفاده از الیگونوکلوئوتید های *FW*: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' و *REV*: 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' مطابق با ۶۹۹ جفت باز قطعه PCR حاصل از نوکلئوتید های پایین دست محل شروع ترجمه *nptII* انجام شد.

تهیه کاوشگر *Sn* با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای *FW*: 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و *REV*: 5'-CTTCTCTCGTCGCTTTTCGCTC-3' مطابق با ۸۳۰ جفت باز قطعه PCR قرار گرفته بین نوکلئوتید های ۸۴۱-۱۶۷۱ از توالی کامل ۲۵۷۲ جفت باز ژن *Sn* انجام شد.

جهت نشان دار نمودن کاوشگرها از کیت Ready-To-Go [DNA labeling Beads(-dCTP)] ساخت شرکت

Amersham استفاده شد.

استفاده از پرایمر های *FW*: 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و *Rev*: 5'-CTTCTCTCGTCGCTTTTCGCTC-3' برای تشخیص ژن *Sn* و پرایمرهای *FW*: 5'-GGCCAGCGTATCGTGCTGCG-3' و *REV*: 5'-GGTCGTGCACCATCAGCAGC-3' برای تشخیص ژن *gus* از روش PCR استفاده شد.

- (GUS) β-Glucuronidase

برای تشخیص هیستولوژیکی فعالیت ژن *gus*، ۱۰۰ میکرون از قسمت های مختلف بافت گیاهی از جمله گره ها، ریشه ها، برگها، ساقه ها و گلپه های حاصل از گیاهان تراریخته که توسط میکروتوم تهیه شدند، پس از تثبیت در پارافرمالدئید ۳٪ و شستشو در ۱۰۰mM سدیم فسفات با pH برابر ۷، در محلول رنگ شامل X-gluc (۲mM) به مدت ۲۰ دقیقه تحت وکیوم قرار گرفته و سپس در طی یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار گرفتند (۱۹).

- *gus Sn*

آنالیز تفرق ژنی^۱ ترانس ژن ها در نتاج گیاهان تراریخته حاصل از لاین های *P1*، *Rgsy27* و *R108-1(c4)* انجام شد و نتاج ۵ گیاه T_0 تراریخته بعد از خودکشتی برای ساختارهای *pBI121.1.Sn* و *pBI121.1* بررسی شد. ۵۰ گیاه T_1 از گیاهان تراریخته با ساختار *pBI121.1* انتخاب شدند و با *Rhizobium meliloti* تلقیح شدند. سنجش آنزیمی فعالیت ژن *gus* بر طبق بند (د) انجام شد.

DMACA-HCL

سلول های شامل CT، بعد از حذف کلروفیل های برگ و رنگ آمیزی با DMACA^۲ قابل مشاهده خواهند شد. با استفاده از روش DMACA-HCL، پروآنتوسیانیدین های قابل حل حتی با مقادیر ناچیز، بطور کمی اندازه گیری شد. روش *butanol-HCl* نیز جهت تشخیص مقادیر کمتر از ۰/۴ میلی گرم بر گرم ماده خشک پروآنتوسیانیدین های غیر قابل حل استفاده شد (۴۹). این معرف در واکنش با پروآنتوسیانیدین ها تحت شرایط اسیدی باعث ایجاد رنگ آبی می شود.

1. Segregation analysis

2. 4-Dimethylamino cinnamaldehyde-HCL

RNA -

برای آنالیز RT-PCR از سطوح رونویسی ژن *Sn*، ژن *DFR* (یکی از ژن های عمومی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها) و ژن خانه دار $EF-1\alpha$ ¹ موجود در گیاهان *M. sativa* و *M. truncatula* RNA کل از بافت برگ گیاهان تراریخته و غیر تراریخته (کنترل)، با استفاده از کیت مخصوص (Nucleo Spin RNA plant) محصول شرکت (Macherey- NAGEL) استخراج شد، و با استفاده از آنزیم Strata Script نسبت به سنتز اولین رشته cDNA اقدام شد. سپس با استفاده از پرایمر های FW: 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و Rev: 5'-CTTCTCTCGTCGCTTTTCGCTC-3' برای ژن *Sn* و پرایمرهای FW: 5'-CTAACATGAAGAAGGTGAAG-3' و Rev: 5'-TGGCATTGTCCGATTAGAAAGG-3' برای ژن *DFR* و پرایمرهای FW: 5'-ATTGTGGTCATTGGCCACGT-3' و Rev: 5'-CCAATCTTGTACACATCCTG-3' برای ژن خانه دار $EF-1\alpha$ ، سطوح رونویسی *Sn* و *DFR* و $EF-1\alpha$ در گیاهان یونجه تراریخته تعیین شدند. جهت کنترل، نسبت به عدم حضور DNA همراه با RNA، نمونه های RNA هم در حضور و هم در عدم حضور Starta Script تهیه شدند و سپس بر طبق دستورالعمل، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل سه مرحله PCR به ترتیب در دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد (۱۰ ثانیه)، ۵۰ درجه سانتی گراد (۲۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۴۵ ثانیه) و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (۱۰ دقیقه) عمل PCR صورت گرفت. جهت نرمالیزه کردن و تایید نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR از ژن خانه دار $EF-1\alpha$ استفاده شد.

-

برگهای ۴ تا ۶ هفته ای حاصل از گیاهان تراریخته رشد یافته در گلخانه، جهت تعیین مقدار DNA هسته به روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACScan و تحت بررسی قرار گرفتند (۲، ۲۱) و سطوح پلوئیدی آنها استنباط شد، در

1. House keeping gene

این راستا از گل اطلسی (*petunia hybrida L.*) به عنوان استاندارد استفاده شده است (۲۷). همچنین شمارش کروموزومی در گیاهان تراریخته و کنترل برای تعیین سطوح پلوئیدی انجام شد.

نتایج

جهت افزایش تبدیل جنین به گیاه کامل در ژنوتیپ R108-1، اقدام به انجام ۴ نسل باززایی متوالی از طریق کشت بافت شد که در نهایت باعث تولید ژنوتیپ R108-1(c4) گردید و عمل تراریزش توسط ژن های *gus* و *Sn* بر روی این ژنوتیپ جدید صورت گرفت. تشکیل کالوسهای پیش جنین را و جنین زایی رویشی لاین R108-1(c4) از ریز نمونه های برگ روی محیط کشت M_2 با مقادیر مختلف هورمونی 2,4-D و BAP روی ۱۰۰ ریز نمونه برای هر آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از محیط کشت M_2 ، حداکثر بعد از ۱۶ روز تشکیل کالوسهای پیش جنین را آغاز شد. نتایج (جدول ۳) نشان می دهد، زمانی که ریز نمونه ها روی محیط کشت M_{21} قرار گرفتند تشکیل جنین های مستقیم و غیر مستقیم از لاین R108-1(c4) صورت نگرفته است. با قرار گرفتن ریز نمونه ها بر محیط کشت M_2 ، ۱۰۰ درصد ریز نمونه ها پس از چهار هفته کالوس های جنینی تشکیل دادند. زمانی که کالوس های تشکیل شده از لاین R108-1(c4) در محیط کشت M_{21} به محیط کشت M_4 انتقال یافتند حدود ۷۰ درصد کالوس ها ایجاد چند جنین (۳-۶) جنین در هر ریز نمونه) و تشکیل گیاهچه هایی در مدت زمان ۳ تا ۴ هفته نمودند (جدول ۴). بنابراین با استفاده از محیط کشت M_{21} ، بعد از ۷ تا ۸ هفته، گیاهچه ها ی تراریخته از لاین R108-1(c4) بدست آمدند. زمانی که کالوس ها ی پیش جنین را حاصل از محیط کشت M_2 به محیط کشت M_4 منتقل شدند، همگی کالوس ها ایجاد جنین نمودند (۱۵-۱۳) جنین در هر ریز نمونه) و ۹۰ درصد این جنین ها به گیاهچه تبدیل شدند. بنابر این استفاده از محیط کشت M_2 باعث ایجاد گیاهچه بیشتر در هر ریز نمونه نسبت به استفاده از محیط کشت M_{21} شده است. برای رسیدن به باززایی با فراوانی بالا، جنین ها از کالوس ها جدا گردید و به

لاین های Rgsy27 و R108-1(c4) مشاهده شد. یکی اینکه در همه گیاهچه های حاصل از لاین Rgsy27، پس از انتقال به محیط کشت M_4 $\frac{1}{2}$ ریشه ایجاد شد (شکل ۲E) و گیاهچه ها بطور نرمال رشد نمودند در حالیکه تشکیل و رشد ریشه در لاین R108-1(c4) پس از انتقال به محیط کشت M_4 $\frac{1}{2}$ غالباً متوقف می شد، مگر اینکه محیط کشت مرتباً تعویض می گردید. دیگر اینکه درصد تشکیل جنین رویشی ثانویه و باززایی در لاین Rgsy27 نسبت به لاین R108-1(c4) بر اساس شمارش گیاهان بسیار بیشتر بود.

بررسی تظاهر ژن *Sn* در لاین های Rgsy27 و R108-1(c4) با هدف مطالعه امکان تنظیم آنتوسیانین ها و پرو آنتوسیانیدین ها در این گیاهان صورت گرفت. این فرایند بر اساس کشت توأم ریز نمونه ها با نژادهای مختلف *A.tumefaciens* (EHA105 و LBA4404) که حامل راه انداز 35S و ژن *Sn* از گیاه ذرت و ژن گزارشگر *gus* و نشانگر انتخابی *nptII* بودند صورت گرفت. تعداد قطعه برگ انتخاب شده جهت انجام عمل تراریزش از هر یک از دو لاین ۱۰۰ عدد بود. بر اساس داده های (جدول ۵) بیشترین درصد تعداد گیاهان تراریخته حاصل از دو لاین، دو نژاد باکتریایی و دو ژن مورد استفاده مربوط به لاین Rgsy27 و نژاد آگروباکتریوم EHA105 (۸/۲۵٪، ۲۵٪) بود. کمترین درصد نیز مربوط به لاین Rgsy27 و نژاد آگروباکتریوم LBA4404 (۹/۸٪، ۸/۵٪) بود. بنابراین کارایی تراریزش لاین Rgsy27 بستگی به نژاد مورد استفاده از آگروباکتریوم تومفسینس دارد، در حالیکه در مورد لاین R108-1(c4) این بستگی وجود ندارد. استفاده از روش مورد استفاده در تراریخت نمودن گیاهان و محیط های کشت مورد استفاده موجب القاء و تبدیل ۱۰۰ - ۹۰ درصد جنین ها به گیاه کامل شد (جدول ۴). از لاین R108-1(c4) ۱۰۰ درصد گیاهان تراریخته بارور بودند که بطور متوسط ۱۵۰۰ بذر از هر گیاه تراریخته بدست آمد.

از لاین Rgsy27، تنها ۸۵ درصد گیاهان تراریخت باززایی شده، بارور بودند. این نتایج نشان می دهد که مارکر انتخابی کانامایسین می تواند در هر دو گونه گیاهی به نحوه موثری مفید باشد.

محیط کشت M_{22} به مدت یک هفته قبل از انتقال به محیط کشت M_4 انتقال یافتند در این صورت ۳۰ درصد جنین ها چندین جنین ثانویه تشکیل داده (شکل ۲A) و ۲۵ درصد این جنین های ثانویه به گیاهچه تبدیل شدند. با استفاده از محیط کشت M_{21} ، ۵۰ درصد ریز نمونه های حاصل از ژنوتیپ Rgsy27 تشکیل کالوس های پیش جنین را دادند (جدول ۳) و ۵۰ درصد ریز نمونه ها مستقیماً تولید جنین نمودند (جدول ۳) (شکل ۲B، ۲C). تشکیل جنین غیر مستقیم روی این محیط کشت مشاهده نشد. ریز نمونه های واقع در روی محیط کشت M_{22} ، جوانه هایی بطور مستقیم با فراوانی اندک تشکیل دادند (جدول ۳). روی محیط کشت M_2 ، ۱۰۰ درصد ریز نمونه ها تولید کالوس های جنین را در طی ۴ هفته نمودند. زمانی که کالوس های جنین زای حاصل از محیط کشت M_{21} به محیط کشت M_4 منتقل شدند، ابتدا جنین ها و سپس گیاهچه ها بدست آمدند. با استفاده از محیط کشت M_{21} ، تشکیل ۸ جنین بطور متوسط در هر ریز نمونه بطور نرمال مشاهده شد (جدول ۴). زمانی که از محیط کشت M_2 استفاده شد تعداد جنین بطور متوسط در هر ریز نمونه به دو برابر افزایش یافت. بنابر این استفاده از محیط کشت M_2 در تولید جنین های رویشی بسیار مؤثر تر در لاین Rgsy27 نسبت به R108-1(c4) عمل نموده است. زمانی که کالوس های پیش جنین را حاصل از محیط کشت M_2 به محیط کشت M_4 منتقل شدند، آنها نیز طی ۲ تا ۳ هفته تشکیل جنین هایی را دادند که بعداً تبدیل به گیاهچه شدند (شکل ۲D). بطور کلی تعداد جنین های تولید شده از ریز نمونه های واقع در محیط کشت M_2 نسبت به محیط کشت M_{21} بیشتر بود (تقریباً ۲ برابر). لازم به ذکر است چنانچه ریز نمونه ها به محیط کشت M_{22} منتقل شوند و بعد از ۲ هفته به محیط کشت M_4 انتقال یابند، تشکیل مستقیم جنین های ثانویه از جنین های اولیه صورت می گیرد. در این صورت تمام جنین های ثانویه قادر خواهند بود به گیاه کامل تبدیل شوند. بنابراین از طریق یک روش نسبتاً ساده، از ریز نمونه های حاصل از *M.sativa* var. Rgsy27 و *M.truncatula* var. R108-1(c4) در طی ۱/۵ - ۲ ماه گیاهچه ها بدست آمدند. در زمان مشابه، دو تفاوت مهم بین

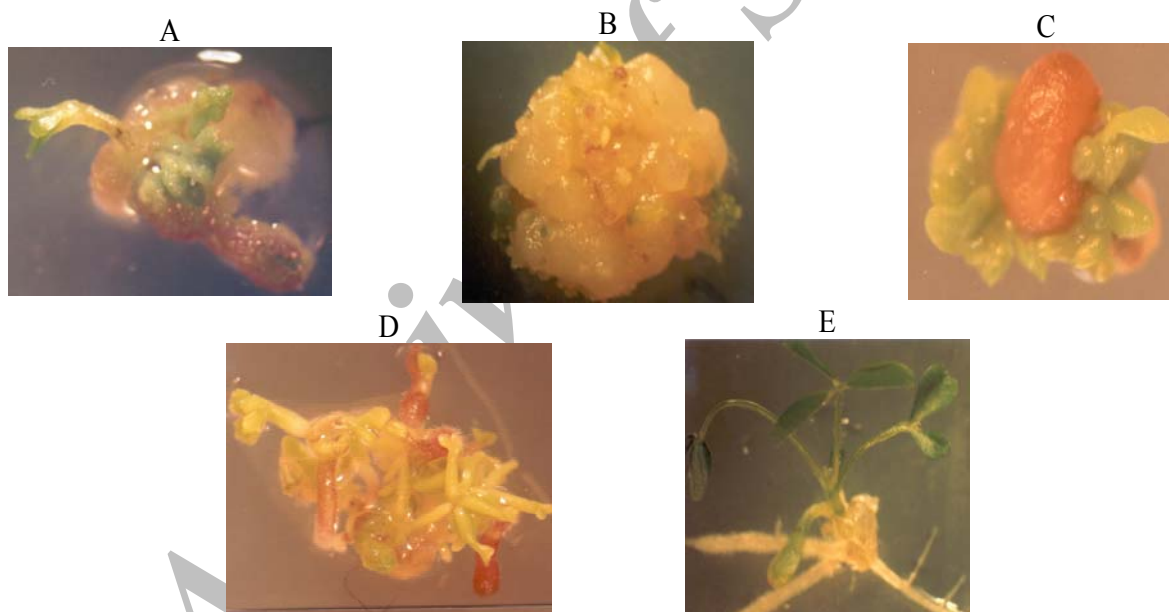
جدول ۳- اثر هورمون ها بر تشکیل کالوس های پیش جنین زا و القاء جنین در دو لاین Rgsy27 و R108-1(c4)

| محیط کشت | | | | | لاین |
|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------|
| M ₂ | M ₂₂ | M ₂₁ | | | |
| کالوس پیش جنین زا | کالوس پیش جنین زا | کالوس پیش جنین غیر مستقیم | کالوس پیش جنین مستقیم | کالوس پیش جنین زا | Rgsy27 |
| ٪۱۰۰ | ۰ | ۰ | ٪۵۰ | ٪۵۰ | |
| ٪۱۰۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ٪۱۰۰ | R108-1(c4) |

جدول ۴- اثر محیط کشت های مختلف روی جنین زایی و باززایی ریز نمونه های تراریخته حاصل از گیاه یونجه

| M ₂ | | M ₂₁ | | * |
|----------------|--------|-----------------|--------|---|
| R108-1(c4) | Rgsy27 | R108-1(c4) | Rgsy27 | |
| % | % | % | % | |
| - | - | - | - | * |
| % | % | % | % | |

* تعداد جنین بر اساس نوع آگروباکتریوم مورد استفاده



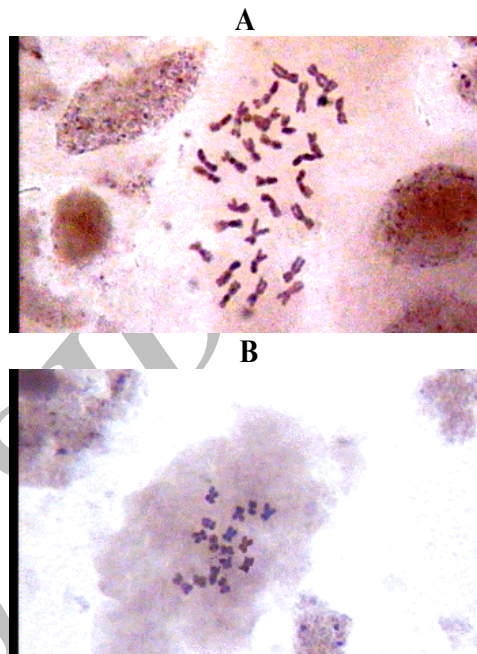
شکل ۲- کال زایی و باززایی در یونجه تراریخته. (A) تشکیل جنین های ثانویه در لاین Rgsy27 (B) تشکیل کالوس پیش جنین زا (نقاط سبز رنگ وشفاف) (C) تولید مستقیم جنین از ریز نمونه ها (D) تولید جنین های قابل باززایی در لاین های تراریخته (E) تولید گیاه کامل تراریخته توسط ژن Sn.

سطح پلوئیدی ۲۰ گیاه تراریخته حاصل از لاین های Rgsy27 و R108-1(c4) توسط دستگاه فلوسیتومتر و شمارش کروموزومی مورد بررسی قرار گرفت. تمام گیاهان تحت بررسی بدون تغییر در سطوح پلوئیدی به ترتیب تتراپلوئید و دیپلوئید باقی ماندند (شکل ۳A، ۳B) و اندازه ژنوم آنها از محدوده ۰/۹۳ تا ۰/۹۷ پیکوگرم برای لاین R108-1(c4) و

جدول ۵- تعداد گیاه تراریخته بدست آمده از دو لاین و دو نژاد باکتریایی و دو ژن Sn و gus با استفاده از محیط کشت M₂

| گیاه | LBA4404 | | EHA105 | |
|------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | p ^{BI121.Sn} | p ^{BI121.1} | p ^{BI121.Sn} | p ^{BI121.1} |
| Rgsy27 | ۹۰ | ۸۵ | ۵۷۵ | ۵۹۴ |
| R108-1(c4) | ۲۶۹ | ۲۸۰ | ۳۱۰ | ۳۲۶ |

۳/۶۹ تا ۳/۶۴ پیکو گرم برای لاین Rsy27 متغییر بود. بنابراین باززایی با روش شرح داده شده در این مقاله هیچ تغییری را در سطوح پلوئیدی گیاهان باززایی شده بوجود نیاورد.



شکل ۳-تعداد کروموزوم های لاین های تراریخته (A) تعداد کروموزوم لاین تراریخته Rgsy27 (2n=2x=32) (B) تعداد کروموزوم لاین تراریخته R108-1(c4) (2n=2x=16).

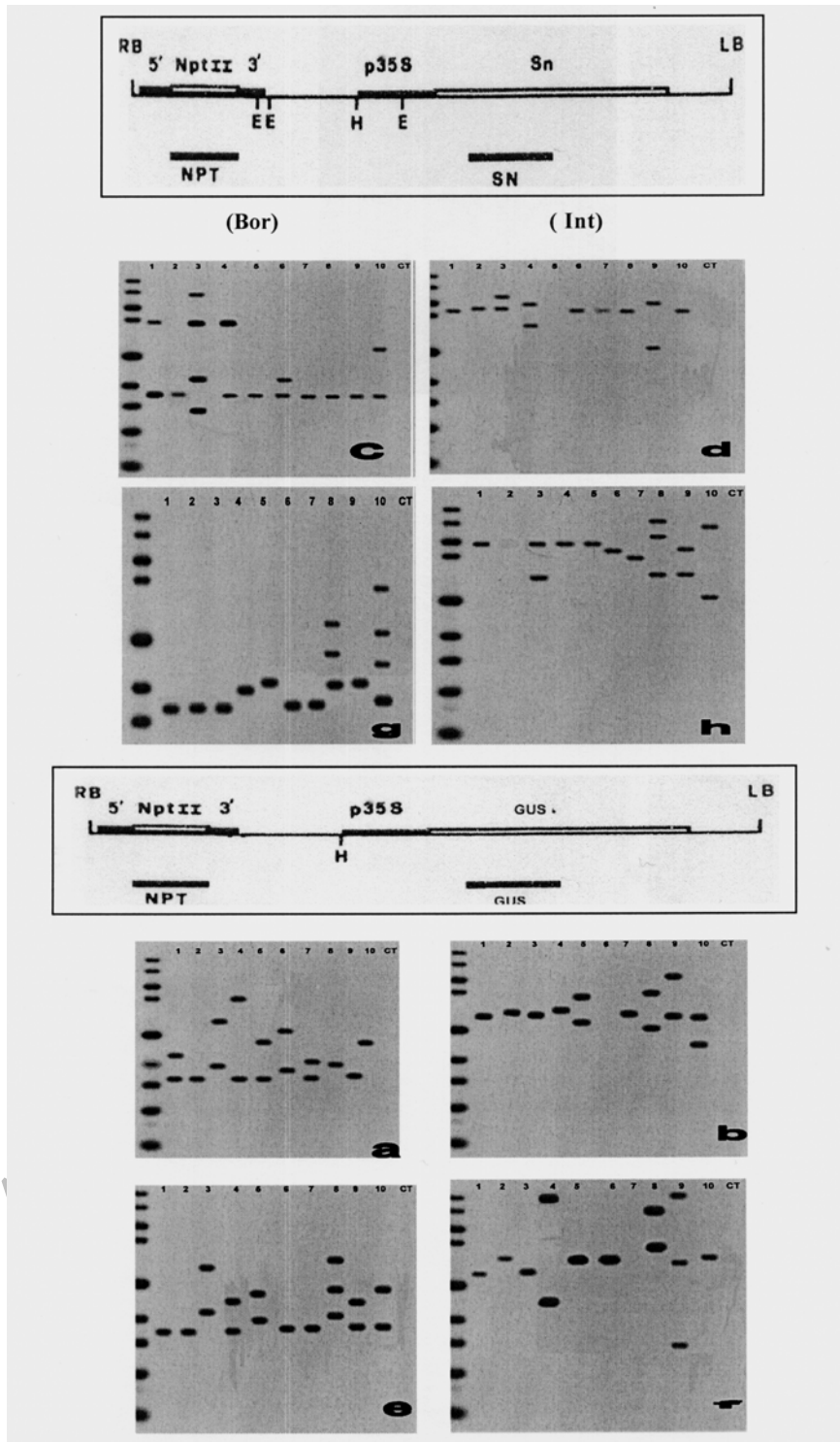
حضور ژن های *Sn* و *gus* بطور جداگانه در ۱۰ گیاه تراریخته همراه با گیاه غیرتراریخته (کنترل) توسط آنالیز ساترن بلات در لاین های R108-1(c4) (شکل ۴a، ۴b، ۴c، ۴d) و Rgsy27 (شکل ۴e، ۴g، ۴d، ۴c) مورد بررسی قرار گرفت. در هر مورد، یک قطعه داخلی (int) و یک قطعه از کناره های (Bor) T-DNA با پروب های خاص هیبرید شدند. اندازه های مورد انتظار از قطعات مخصوص هر ساختار در گیاهان تحت بررسی به درستی تشخیص داده شد، به استثنای مواردی در لاین های تراریخته شده با ساختارهای pBI121.1 و pBI121.Sn که به ترتیب فاقد نواری برای ژن های *gus* و *Sn* بودند. مواردی هم که در هر دو لاین تعداد قطعات *gus* و *Sn* بیش از یک نسخه مشاهده شد. تعداد (Bor) های T-DNA تشخیص داده شده در این گیاهان نشان دهنده تعداد نسخه های T-DNA ادغام شده در ژنوم گیاهی است که از ۱ تا ۴ نسخه متغییر بود.

در لاین تراریخته Rgsy27، حامل ژن *Sn* (شکل ۴d)، قطعات (Bor)، هیبرید با پروب *nptII* مطابق با نسخه های چند گانه

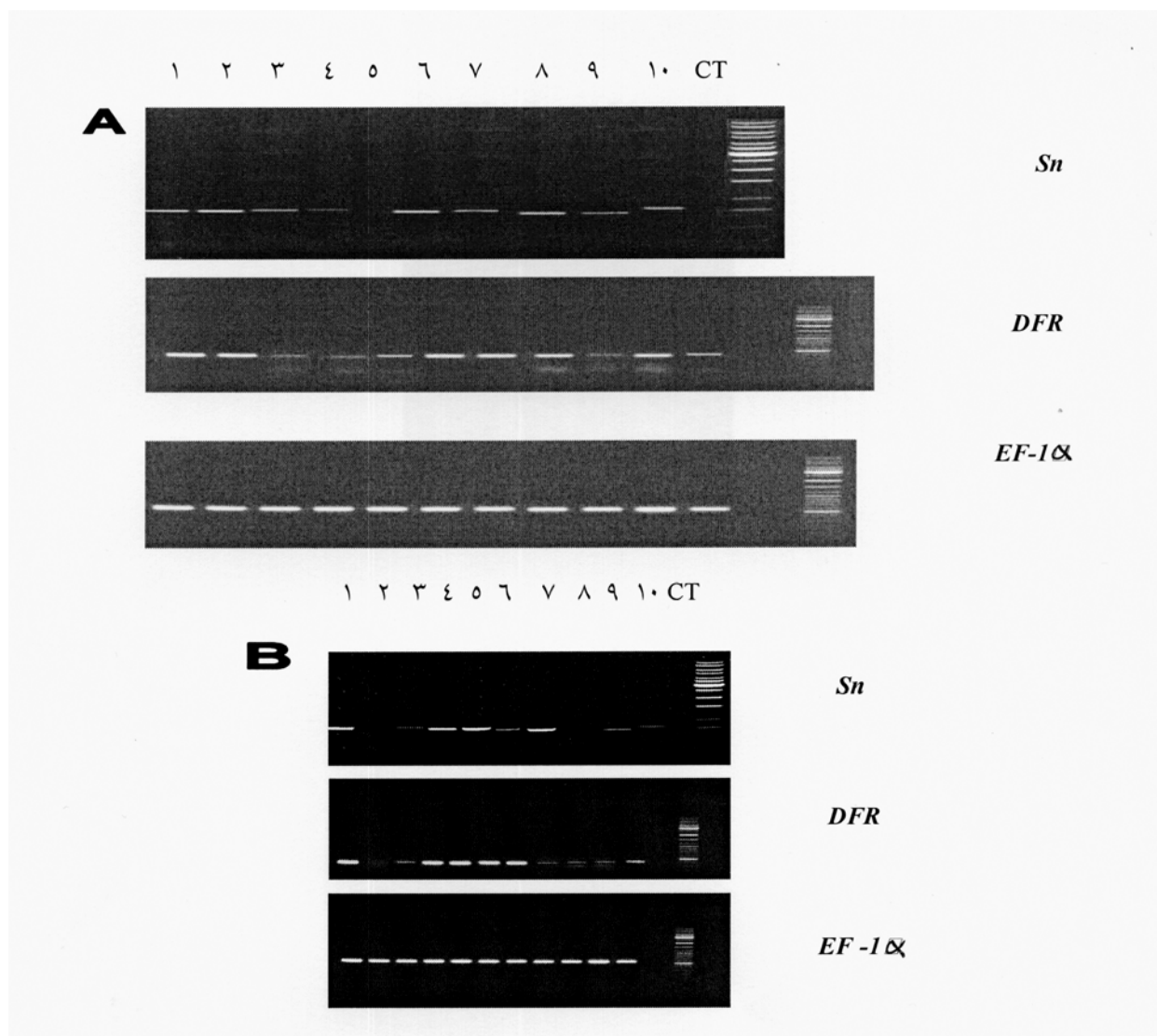
T-DNA الحاق شده به ژنوم گیاهی بود. در این گیاهان قطعات ۲/۳ کیلو جفت بازی (گیاهان شماره ۱، ۲، ۳، ۶، ۷، ۱۰) و ۲/۵ کیلو جفت بازی (گیاهان شماره ۴، ۵، ۸، ۹) هیبرید با پروب *nptII*، احتمالاً قطعات (Bor) را نشان می دهند. با توجه به اینکه بجای استفاده از جنین های حاصل از ریزنمونه های مستقل، از گیاهان تراریخته تحت بررسی بطور تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند لذا گیاهان شماره (۱، ۲، ۳، ۶، ۷، ۱۰) احتمالاً نشان دهنده کلون هایی از کالوس مشابه می باشند. در دیگر موارد، آنالیز ساترن بلات گیاهان تراریخته، مستقل برای هر ساختار، از نظر حضور ترانس ژن های *Sn* و *gus* در (شکل ۴a-۴h) نشان داده شده است. بطور کلی افزایش نوارها در هر مسیر نشانگر تعداد نسخه های ژن انتقال یافته در ژنوم گیاهان تراریخته بود.

نتایج آنالیز RT-PCR نشان دهنده این بود که تظاهر ژن *Sn* در گیاهان تراریخته مطابقت با سطوح افزایش یافته mRNA *DFR*، در مقایسه با لاین های کنترل و فرو نشانده شده (تعداد سلول های تانن دار کم شده) دارد (شکل ۵A، ۵B). گیاهان تراریخته دارای تظاهر بالای ژن *Sn*، باعث افزایش تظاهر *DFR* نسبت به گیاه کنترل شدند و گیاهان تراریخته دارای تظاهر پائین ژن *Sn*، باعث کاهش تظاهر *DFR* نسبت به گیاه کنترل شدند. گیاهان انتخابی از هر دو لاین که در آنالیز ساترن بلات برای ژن *Sn* بیش از یک نوار تشکیل داده بودند، رونویسی ژن *Sn* در آنها کم بود و گیاهانی که در آنالیز ساترن بلات فاقد نوار برای ژن *Sn* بودند، فاقد هرگونه رونویسی از ژن *Sn* بودند. ژن خانه دار *EF-1α* که جهت نرمالیزه کردن و تأیید نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR بکار رفت در تمام گیاهان تراریخته و گیاه کنترل بیان شد.

بافت برگ های جدا شده از گیاهان بالغ برای اثبات وجود CT با استفاده از DMACA رنگ آمیزی شدند و با استفاده از دوربین دو چشمی نوری مدل BH ساخت شرکت الیمپوس با بزرگنمایی ۱۰x مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۴- آنالیز ساترن بلات : ۱۰ میکرو گرم DNA (از لاین های ترا ریخته و کنترل) با آنزیم *HindIII* برش داده شد و با پروب های نشاندار *Sn*، *nptII* و *gus* هیبرید شدند. (E): *EcoRI*، (H): *HindIII*، (Int): internal fragment، (Bor): border fragment، (a). تعداد Bor از T-DNA حامل ژن *gus* در لاین R108-1(c4) تعداد (b) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *gus* در لاین R108-1(c4) تعداد (c) Bor از T-DNA حامل ژن *Sn* در لاین R108-1(c4) تعداد (d) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *Sn* در لاین R108-1(c4) تعداد (e) Bor از T-DNA حامل ژن *gus* در لاین Rgsy27 تعداد (f) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *gus* در لاین Rgsy27 تعداد (g) Bor از T-DNA حامل ژن *Sn* در لاین Rgsy27 تعداد (h) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *Sn* در لاین Rgsy27.



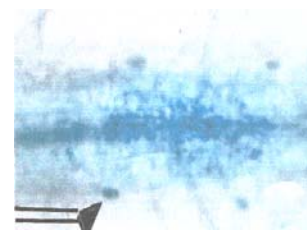
شکل ۵- آنالیز RT-PCR حاصل از لاین های تراریخته و کنترل انتخابی از سطوح رونویسی ژن *Sn*، *DFR* و *EF-1α*. RT-PCR گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته (B)R108-1(C4) گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته Rgsy27 (CT) نشان دهنده گیاه کنترل است.

دلیل قرمز بودن بعد از رنگ آمیزی با DMACA با چشم غیر مسلح قابل مشاهده بودند. اثرات ژن *Sn* بر تجمع آنتوسیانین محدود به رگبرگ میانی، پایین برگ، و دم برگ می باشد، هر چند تجمع پلی مر های پرو آنتوسیانیدین (CT) بطور قابل توجهی در پهنای برگ قابل مشاهده بود. آنالیز لاین های انتخاب شده نشان می دهد که این تغییر فعالیت فنوتیپی مربوط به حالت پایدار سطوح رونوشت ترانس ژن *Sn* وارد شده به گیاه و ورود تنها یک نسخه از ساختار CaMV 35S-*Sn* در این گیاهان است.

در گیاهان تراریخته توسط ژن *Sn* بدون رنگ آمیزی با معرف DMACA تغییرات فنوتیپی ریشه ها از نظر وجود رنگ قرمز نسبت به گیاهان کنترل به وضوح قابل مشاهده می باشد (شکل ۶A، ۶B). مشاهده دقیق لاین های رشد یافته تحت شرایط کنترل شده، فنوتیپ شامل آنتوسیانین در لاین هایی که ژن *Sn* تظاهر یافته بود را تایید می کرد. لاین هایی که سطوح افزایش یافته ای از CT را نشان می دادند، مشخصات و صفات رنگ آنتوسیانین بطور ویژه در برگ های جوان و بافت های ساقه نمود می کرد. سلول های شامل آنتوسیانین به

برگ های گیاهان تراریخته کاهنده تانن و افزایش دهنده تانن هر دو قادر به رونویسی ژن *Sn* بودند. همه گیاهان تراریخته تظاهر ژن *Sn* را در بافت های ریشه دارا بودند (شکل ۶A). درصد پروآنتوسیانیدین موجود در ماده خشک گیاهان تراریخته توسط ژن *Sn* در برگ، ساقه و ریشه که از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۴۳ نانومتر (جدول ۷) بدست آمده است، نشان دهنده اثر ژن *Sn* در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می باشد.

نتایج آزمون χ^2 حاصل از بررسی ۵۰ گیاه T_1 حاصل از خودگشنی ۵ گیاه T_0 تراریخته با ساختارهای $p^{BI121.1}$ و $p^{BI121.Sn}$ نسبت به سنجش فعالیت آنزیمی *gus* و سنجش تظاهر ژن *Sn* (RT-PCR و سنجش هیستوشیمیایی)، نشان داد که ترانس ژن ها غالباً به عنوان صفت مندلی غالب، توارث یافته اند، هرچند برای تعدادی گیاه این امر صادق نبود که احتمالاً منعکس کننده محل های دخول چندگانه ساختار T-DNA در ژنوم گیاه است، همانگونه که نتایج بررسی مولکولی در مورد گیاهان تراریخته نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ۷A - ۷C / جدول ۸، ۹). مقدار χ^2 در سطح احتمال $(\chi^2 = 3/84) \times 0.05$ برای فرض توارث ساده مندلی معنی دار است. همانگونه که در (شکل ۸A) مشاهده می شود وجود CT در برگ گیاه یونجه القاء شده است.



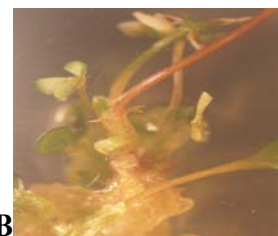
شکل ۷- فعالیت ژن *gus* در قسمت های مختلف گیاه تراریخته یونجه. (A) فعالیت ژن *gus* در ریشه های موئی (B) فعالیت ژن *gus* در اطراف ناحیه گره و گره (C) فعالیت ژن *gus* در برگ اصلی.

جدول ۶- سنجش پروآنتوسیانیدین ها در گیاهان تراریخته و کنترل از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج های ۶۴۳، ۵۵۰ و ۷۲۵ نانومتر

| لاین | میزان جذب ۶۴۳ nm | میزان جذب ۷۲۵ nm | میزان جذب ۵۵۰ nm | میزان جذب ۴۰ دقیقه، ۷۲۵ nm، فنل یرتانی (Y) | X(#TA) μ g | میزان جذب ۲۵ دقیقه، فنل کل (X) | میزان جذب ۲۵ دقیقه | Y(#TA) μ g | % (X-Y) | % Y | % X |
|----------------|------------------|------------------|------------------|--|----------------|--------------------------------|--------------------|----------------|---------|--------|-----|
| Rg(200mg) | ۰/۰۷۱۲ | ۱/۴۹۷۲ | ۰/۹۶۱۵ | ۰/۰۴۶۵ | ۲/۷۱۲۰۰ | ۰/۲۵ | ۰/۸۶۲۰ | ۰/۲۵۹۱ | ۰/۰۴۲ | ۰/۳۰۱۱ | |
| Rg + <i>Sn</i> | (S) ۰/۰۶۴۳ | ۱/۲۸۳۴ | ۰/۳۹۷۸ | ۰/۰۱۷۸ | ۲/۳۰۸۳۰ | ۰/۲۵ | ۰/۳۱۷۸ | ۰/۲۲۰۷ | ۰/۰۳۵۳ | ۰/۲۵۶۰ | |
| Rg + <i>Sn</i> | (A) ۱/۵۸۹۳ | ۲/۸۹۳۹ | ۰/۲۸۹۳ | ۰/۰۵۸۳ | ۵/۳۰۹۹۰ | ۰/۲۵ | ۱/۰۴۱۰ | ۰/۴۷۴۳ | ۰/۱۱۵۶ | ۰/۵۸۹۹ | |

X% = درصد مقدار کل فنل در ماده خشک، Y% = درصد مقدار فنل های غیر تاننی، % (X-Y) = درصد مقدار تانن در ماده خشک، TA = اسید تانیک، S = فرونشاندن پروآنتوسیانیدین و A = افزایش پروآنتوسیانیدین

با اندازه گیری میزان تانن موجود در شاخ و برگ گیاهان تراریخته از طریق اسپکتروفتومتری، در طول موج های ۷۲۵، ۶۴۳ و ۵۵۰ نانومتر گیاهان تراریخته حامل ژن *Sn* به دو گروه تقسیم شدند (جدول ۶، ۷):



شکل ۶- ریشه، ساقه و برگ لاین تراریخته یونجه. (A) تظاهر آنتوسیانین در ریشه گیاه تراریخته توسط ژن *Sn* (B) تظاهر آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین در شاخ و برگ گیاه تراریخته توسط ژن *Sn*

۱- گیاهان تراریخته که ژن *Sn* باعث کاهش مقدار تانن در مقایسه با گیاهان کنترل شده بود (S) (کاهش، از ۲۶/۰ به ۲۲/۰٪).

۲- گیاهان تراریخته که ژن *Sn* باعث افزایش مقدار تانن در مقایسه با گیاهان کنترل شده بود (A) (افزایش از ۲۶/۰ به ۴۷/۰٪).

1. suppressed
2. Addetived

جدول ۷- درصد پرو آنتوسیانیدین در ماده خشک در گیاهان تراریخته توسط ژن *Sn* و گیاه کنترل در طول موج ۶۴۳ نانومتر

| / | / | / | Rg |
|-------|-------|-------|---------|
| / (S) | / (S) | / (S) | Rg + Sn |
| / (A) | / (A) | / (A) | Rg + Sn |

جدول ۸- آنالیز تفرق ژنی ترانس ژن ها در نتاج گیاهان تراریخته لاین Rgsy27.

| گیاه | $p^{BI121.1}$ | | | $p^{BI121.Sn}$ | | |
|------|---------------|---------|------------------|----------------|--------|------------------|
| | gus^+ | gus^- | $\chi^2_{(3:1)}$ | Sn^+ | Sn^- | $\chi^2_{(3:1)}$ |
| ۱ | ۴۳ | ۷ | ۳/۲۳ | ۳۶ | ۱۴ | ۰/۲۴ |
| ۲ | ۳۷ | ۱۳ | ۰/۰۳ | ۲۸ | ۲۲ | ۹/۶ |
| ۳ | ۲۶ | ۲۴ | ۱۴/۱۱ | ۳۲ | ۱۸ | ۳/۲۲ |
| ۴ | ۳۴ | ۱۶ | ۱/۳۰ | ۲۳ | ۲۷ | ۲/۱۶ |
| ۵ | ۲۹ | ۲۱ | ۷/۷۱ | ۳۰ | ۲۰ | ۶ |

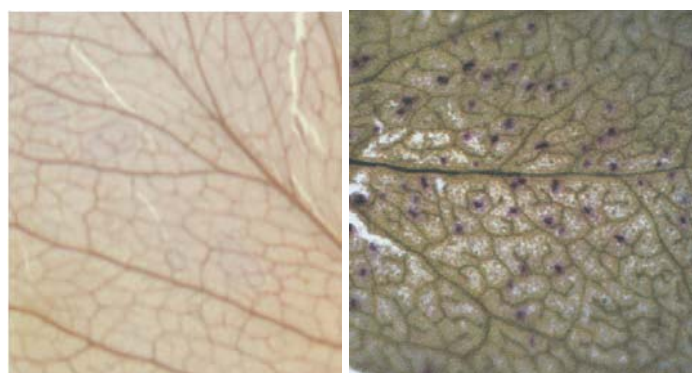
| R108-1(C4) | | | - | | | |
|------------|---------------|---------|------------------|----------------|--------|------------------|
| | $p^{BI121.1}$ | | | $p^{BI121.Sn}$ | | |
| | gus^+ | gus^- | $\chi^2_{(3:1)}$ | Sn^+ | Sn^- | $\chi^2_{(3:1)}$ |
| | / | / | / | / | / | / |
| | / | / | / | / | / | / |
| | / | / | / | / | / | / |
| | / | / | / | / | / | / |

بحث

با توجه به عدم باززایی مطلوب در بیشتر گونه های تتراپلوئید یونجه، فرایند تراریزش از روش باکتری آگروباکتریوم عملاً بی نتیجه می ماند. لذا یافتن گونه یا گونه هایی که از باززایی قابل قبولی برخوردار هستند بسیار ضروری است. بطور کلی عوامل زیر برای اجرای بهتر فرایند تراریزش گیاه یونجه ضروری است:

۱- محیط کشت مناسب جهت باززایی و عدم تاثیر بر تغییر سطوح پلوئیدی.

۲- افزایش قابلیت باززایی لاین ها یا ژنوتیپ ها بوسیله واکشت های متوالی و در نهایت انتخاب ژنوتیپ مناسب جهت عمل تراریزش.



B

A

شکل ۸- تظاهر پرو آنتوسیانیدین در برگ گیاه تراریخته توسط ژن *Sn* (A) تظاهر CT بصورت نقاط بنفش رنگ در برگ گیاه تراریخته (B) برگ گیاه غیر تراریخته، فاقد نقاط بنفش رنگ

برگ، رگبرگ میانی و... بودند، لذا ورود ژن Sn و تظاهر آن می تواند باعث تغییر در بیوسنتز CT باشد. برگ های حاصل از تراریزش های تک نسخه ای باعث ایجاد لاین هایی با افزایش CT و برگ های حاصل از تراریزش های چند نسخه ای باعث ایجاد لاین هایی با کاهش CT بودند. بنابر این استفاده از ژن Sn و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آنتوسیانین از گروه bHLH امکان دسترسی جهت تغییر سطوح CT را در گونه های گیاهی افزایش می دهد. گیاهان تراریخته، ممکن است همچنین منبع قابل ارزشی برای کلونینگ مراحل انتهایی مسیریوسنتز CT و ژن های مسئول در تخصیص سلول هایی که بیوسنتز آنتوسیانین و CT را بعهده دارند، باشند. امکان وجود اثر متقابل منفی ژن Sn و یک *endogene* همولوگ نامشخص با آن، می تواند توصیف کننده رفتار گیاهان تراریخته کاهنده تانن (S) باشد.

نتایج ذکر شده نشان می دهد که محیط های کشت M1، M2، M3 و M4 جهت جنین زایی رویشی در دو گونه دیپلوئید و تترا پلوئید جنس *Medicago* بسیار مناسب است. در تراریزش گیاه یونجه چندین فاکتور از جمله نژاد آگروباکتریوم، گونه مورد استفاده و روش تراریزش از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان تراریخته نشان داد که تقریباً همه گیاهان در سطوح پلوئیدی قبل از عمل تراریزش باقی ماندند، لذا استفاده از محیط های کشت مورد استفاده برای باززایی، نسبت به تغییر سطوح پلوئیدی مؤثر نمی باشند و علت این امر احتمالاً نتیجه تیمار هورمونی در زمان بسیار کوتاه می باشد. همچنین به نظر می رسد لاین های Rgsy27 و R108-1(C4) ژنوتیپ های بسیار مناسب جهت برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی باشند. در آنالیز ساترن بلات مسیر هایی وجود دارند که در آن نواری برای ژن Sn و *gus* در گیاهان تراریخته حضور ندارد ولی در قسمت (Bor) یک یا چند نوار دیده می شود. علت این امر این است که قسمتی از T-DNA به ژنوم گیاه متصل شده است و گیاه تراریخته ایجاد شده است ولی ژن Sn یا ژن *gus* را بیان نمی نماید. همچنین نوار های نابجایی که در تعدادی از گیاهان تراریخته ایجاد شدند احتمالاً بدلیل برش و کوتاه شدگی تعدادی از نسخه های T-DNA در آن گیاهان است. اثر

۳- استفاده از خلاء نسبی همراه با تکان آرام در زمان نفوذ آگروباکتریوم به ریز نمونه ها در مکان استریل.

۴- حضور استوسیرینگون با مقدار مناسب طی دوره کشت توأم.

۵- انتخاب نوع نژاد آگروباکتریوم در اثر متقابل با ژنوتیپ و ترانس ژن مورد استفاده.

سطوح پلوئیدی گیاهان تراریخته نشان داد که تقریباً همه گیاهان در سطوح پلوئیدی قبل از عمل تراریزش باقی ماندند، علت این امر احتمالاً در نتیجه تیمار هورمونی (2,4-D) در زمان بسیار کوتاه می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از لاین های Rgsy27 و R108-1(C4) برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی بسیار مناسب می باشند. لاین های تراریخته ای که حامل دو یا چند نسخه ترانس ژن بودند، نشانه ای از آزمایشات Co-transformation در یونجه می باشند. گیاهان تراریخته ای که شامل چند نسخه از ژن CaMV35S- Sn هستند، تظاهر ژن Sn آنها کاهش یافته، و یا کلاً از بین رفته است. در گیاهان تراریخته ای که ژن Sn تظاهر یافته (با یک نسخه)، میزان تظاهر ژن *DFR* افزایش یافته است و تظاهر ضعیف ژن Sn (افزایش تعداد نسخه های ژن Sn در گیاهان تراریخته)، باعث کاهش در تظاهر ژن *DFR* نسبت به گیاه کنترل شده است. بنابراین بیان ژن Sn در گیاهان تراریخته باعث تاثیر بر دیگر آنزیم های مؤثر در مسیر فلاونوئید می شود همانگونه که سایر محققین در مورد گیاه تراریخته *L. corniculatus* حامل ترانس ژن Sn نشان دادند که فنوتیپها از نظر پروآنتوسیانیدین در مقایسه با گیاه کنترل تغییر یافتند و سطوح آنزیم های *DFR* و *LAR* به طور قابل توجهی تغییر یافته است (۴۳). در مسیرهایی که نواری برای ژن Sn و *gus* حضور ندارد ولی در border ها حضور دارد نشان دهنده این است که قسمتی از T-DNA به ژنوم گیاه متصل شده است. همچنین نوار های نابجایی که در تعدادی از گیاهان تراریخته ایجاد شده احتمالاً بدلیل برش و کوتاه شدگی تعدادی از نسخه های T-DNA در آن گیاهان است. با توجه به اینکه ریشه های گیاهان حامل ژن Sn در لاین ها، نشانگر الگو هایی از وجود رنگ قرمز بودند و بررسی فنوتیپی لاین های حامل ژن Sn ، نشان گر تغییر رنگ در محدوده دم برگ، پایه

ژن *Sn* وابسته به نور است و تنها در صورت بروز آلل *Sn:bol3* در تاریکی نیز رونویسی *Sn* mRNA صورت خواهد گرفت و تولید رنگدانه در بافت ها میسر می شود. تظاهر ژن *Sn* باعث افزایش میزان آنزیم DFR می شود.

ژن *Sn* بر گیاه یونجه به دو صورت، کاهنده تانن و افزایش دهنده تانن پدیدار می شود. برگ های گیاهان تراریخته کاهنده تانن و افزایش دهنده تانن، هر دو قادر به رونویسی ژن *Sn* بودند. همه گیاهان تراریخته، ژن *Sn* را در بافت های ریشه بیان می کنند. تظاهر

REFERENCES

- Bingham, E.T., L.V. Hurley, D.M. Kaatz, & J.W. Saunders. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus in culture. *Crop Sci.* 15: 719-721.
- Blondon, F., D. Marie, S. Brown, & A. Kondorosi. 1994. Genome Size and base Composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37: 264-270.
- Bovy, A. R. de Vos, M. Kemper, E. Schijien, M. Almenar Pertejo, S. Muir, G. Collins, S. Robinson, M. Verhoeyen, S. Hughes, C. Santos-Buelga, & A. van Tunen. 2002. High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC* and *C1*. *The Plant Cell*, 14: 2509-2526.
- Brown, D. C. W. & A. Atanasov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 4: 111-122.
- Brown, D. C. W. 1988. Germplasm determination of in vitro somatic embryogenesis in alfalfa. *Hortscience*. 23: 526-531.
- Brown, D.C.W., P. Nagarajan & P. D. Walton. 1989. Embryogenic in vitro responses in creeping and non creeping rooted selections from *M. sativa*. *J. Genet. & Breed.* 43: 73-76.
- Buising, C.M., D. Tomes, & J. Schmidt. 1998. Methods of regeneration of *Medicago sativa* and expressing foreign DNA in same patent number US005731202A
- Cameron S. J., B. Kolevski, & D.R. Smyth. 2002. Transparent Testa Glabra2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell*, 14: 1359-1375.
- Chang, S., J. Puryear, & J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 113-116.
- Chu, C.C., Proc. Sym. Plant tissue culture. 1978. Science Press, Peking: pages 45-50.
- Cone, K.C. 1989. Molecular and genetic analysis of light requirement for anthocyanin synthesis in maize. In the genetics of Flavonoids, D.E., styles, G.A., Gavazzi, eds (Milan: Edizioni Unicopli), pp. 143-146.
- Devic M., J. Guilleminot, & I. Debeaujon. 1999. The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *The Plant Journal* 19: 387-398.
- Dooner, H.K., & T. P. Robbins. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 25: 173-199.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, & K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell, Res.* 50: 151-158.
- Hellens, R., P. Mullineaux, H. Klee. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Sci.* 5: 446-451.
- Hoffmann, B., T.H., Trinh, J., Leung, A., Kondorosi, & E., Kondorosi. 1997. A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 307-315.

17. Holton, T.A. & C. C. Edwina. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 1071-1083.
18. Jefferson, R.A., T.A. ,Karanagh, & M.W. Bevan. 1987. GUS fusion as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 : 3901-3907.
19. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol.Biol.Rep.* , 5:387-405.
20. Jende-Strid, J. 1993. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas.* 119: 187-204.
21. Johnson, L.B., S. E., Schlarbaum, & D.Z. Skinner. 1984. Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclonal regenerants from nonmutagenized calli, *Crop. Sci.*, 24: 948-952.
22. Kamate, K., I.D. Rodriguez- Llorente, M. Schotle, P. Durand, P. Ratet, E. Kondorosi, A. Kondorosi, & T.H. Trinh. 2000. Transformation of floral organs with GFP in *Medicago Truncatula* .*Plant Cell Rep.*19: 647-653.
23. Koornneef, M., L. W. M. Dellaert, & J. H. van der Veen. 1982a. EMS and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Res.* 93:109-123.
24. Koornneef, M., W. Luiten, P. de Vlaming, and A. W. Schram. 1982b. A gene controlling flavonoid-3'-hydroxylation in *Arabidopsis*. *Arab. Inf. Serv.* 19:113-115.
25. Li, Y. G., G. J. Tanner, & P. G. Larkin. 1996. The DMACA-HCL protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *J. Sci. Food Agric.* 70: 89-101.
26. Li, Y.G., G. J. Tanner, A. C. Delves, P. J. Larkin. 1993. Symetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. and *Onobrychis vicifolia* Scop. *Theor. Appl. Genet.* 87: 455-463.
27. Marescalchi, O. & V. Seali. 1998. Flow-Cytometric analysis of intraspecific genome size variations in acillus atticus (insecta, Phasmatodea). *Genome*, 41 : 629-635.
28. Meijer, E.G.M. & D.C.W. Brown. 1985. Screening of diploid *Medicago sativa* germplasm for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* ,4: 285-288.
29. Mitten, D.H., S.J. Sato, & T. A. Skokut. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Sci.* 24: 943-945.
30. Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497 .
31. Nagarajan, P., J. S. Mc kerize & P. D. Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* Spp. In tissue culture, *Plant Cell Reports*, 5: 77-80.
32. Nakajima, J., T. Yoshikazu, M. Yamazaki, & K. Saito. 2001. Reaction Mechanism from leucoanthocyanidin 3-glucoside , a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *The Journal of Bio. Chemistry*, 276: 25797-25803.
33. Redenbaugh, K. & K. Wapker. 1990. Role of artificial seeds in alfalfa breeding. In: Bhojwani . S.S. *Plant tissue culture: Applications and limitations*. Elsevier.
34. Rob, J. A., T.N. Barry, & W.C. McNabb. 2000. Review paper for Polyphenols and agriculture :beneficial effects of proanthocyanidins in forage. *Agri.Ecosystems and Environment*, 75 : 1-12.
35. Robbins, M.P., F. Paolucci , J. Hughes, V. Turchetti , S. Arcioni, & F. Damiani. 2003. *Sn* , a maize bHLH gene , modulates anthocyanin and condensed tannin pathway in *lotus corniculatus*. *J. of Experimental Botany*, 54: 239-248.

36. Sambrook, J., E. F., Fritsch, & T., Maniatis. 1989. Molecular cloning: alaboratory manual- cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2nd.
37. Scalbert, A.1991.Antimicrobial properties of tannins.Phytochemistry 30: 3875-3883.
38. Schenk, R. U. & A. C. Hildebrant. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.Can. J. Bot. 50:199-204.
39. Somers, D. A., D. A. Samac, & P. M. Olhoft. 2003. Recent Advances in legume Transformation. Plant Physiology , 131: 892-899.
40. Susan Marles, M.A., H. Ray, & M. Y. Gruber. 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistryand molecular regulation. Phytochemistry 64 :367-383.
41. Szymanski, D.B., D.A. Klis , J.C. Larkin , & M.D. Marks. 1998. cot1: A regulator of Arabidopsis trichome initiation. Genetics. Jun;149: 565-77.
42. Tanner, G.J., R. G. Joseph, Y. G. Li, & P. J. Larkin. 1997.Towards bloat safe pastures, Feedmix, university of Cambridge. UK.
43. Tanner GJ, J. M. Watson S. Abrahams, A. R. Ashton, K. T. Francki, & P. J. Larkin. 2002. Novel gene and uses therefore to modify pasture qualities of crops. Australia PCT Application No. WO02066625.
44. Tonelli, C., G. Consonni, & S. F. Dolfini. 1991. Genetic and molecular analysis of *Sn*, a light-inducible, tissue specific regulatory gene in maize. Mol.Gen.Genet. 225: 401-410.
45. Trieu, A.T., & M.J. Harrison. 1996.Rapid transformation of Medicago truncatula: regeneration via shoot organogenesis. Plant Cell Rep. 16: 6-11.
46. Trieu, A.T., S.H., Burleigh, I., V., Kardailsky, & M.J., Hrrison. 2000. Technical advance: Transformation of *Medicago sp.* Via infiltration of seedling of flowering plants with agrobacterium. Plant J., 22: 531-541.
47. Walker Peach, CR, & J. Velten. 1994. Agrobactrium-mediated gene transfer to plant cell:cointegrate and binary vector systems in :Gelvin Sb, Schilperoot RA(eds) plants molecular biology manual.Kluwer , Dordrecht, pp.B1-B19.
48. Winkel-Shirley, B. 2001.Flavonoid biosynthesis.Acolorful model for genetic ,biochemistry,cell biology, and biotechnology. Plant Physiol., 126: 485-493.
49. Yu-Guang, Li, Greg Tanner & phil larkin. 1996. The DMACA- HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. J. Sci. Food Agric., 70: 89-101.