باززایی شاخه القا شده با تدیازورون و تراریختی ژنی با آگروباکتریوم[۱] در گیاه کلزا (برسیکانلپوس ال.)[۲]

پریسا جنوبی: دانشگاه تربیت معلم
امیرموسوی: مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
احمد مجد: دانشگاه تربیت معلم
علی هاتف سلمانیان: مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
مختارجلالی جواران: دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
جهانفردانشیان: بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

چکیده

تولید گیاهان تراریخت کلزا با استفاده از میانجی آگروباکتریوم نیاز به بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت و تراریختی دارد. برای این منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین(BA)(۱/۵، ۳ و ٤/٥ میلی‌گرم بر لیتر) و تدیازورون (TDZ) (۰ ، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) با سنین مختلف جداکشت‌های محور زیر لپه(۷، ۱٤ و ۲۱ روزه) مورد بررسی قرار گرفتند. تفاوت معنی‌داری در اثر متقابل هورمون‌های BA و TDZ دیده شد، به نحوی که بیشترین درصد شاخه‌زایی (% ۱۷٤) از کاربرد ٤/٥ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ حاصل شد. سن جدا کشت نیز تأثیر معنی‌داری بر در صد شاخه‌زایی داشت. جداکشت‌های ۲۱روزه توانایی تولید بیشترین درصد شاخه‌زایی را داشتند. شاخه‌های تولید شده پس از انتقال به محیط ریشه‌زایی دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید تولید ریشه کردند. با دست‌یابی به بهترین تیمار هورمونی و سن جدا کشت اقدام به انجام تراریختی توسط میانجی آگروباکتریوم شد. آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان تراریخت نشده در محیط انتخاب، حاوی کانامایسین با از دست دادن ساختار کلروفیلی به رنگ سفید یا ارغوانی درآمدند و حذف گردیدند، در حالی‌که گیاهان تراریخت شده با دریافت ژن *NPTII* و ایجاد مقاومت در مقابل کانامایسین و حفظ کلروفیل در محیط انتخاب، به رنگ سبز باقی ماندند و ریشه کردند. گیاهان ریشه‌دار به خاک منتقل شدند و تولید گل و دانه کردند. از گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین آزمون GUS انجام شد. ظهور رنگ آبی در حضور سوبسترای X-Gluc نشانگر بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت بود. از برگ‌های سبز گیاهان مقاوم به کانامایسینDNA ژنومی استخراج شد و پس ازPCR ظهور باند pb ٥۲۰ بیانگر حضور ژن *GUS* دراین گیاهان بود. بنا براین با استفاده از این روش می‌توان اقدام به انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کرد.

۱- *Agrobacterium* ۲- *Brassica napus L.*

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلزا از نظر تولید روغن گیاه زراعی مهم و با ارزشی است که با تولید ۱٤ % روغن جهان پس از سویا مقام دوم را از نظر تولید روغن دارد. تلاش‌های به زراعی و به نژادی به افزایش کمّیت و کیفیت محصول و ویژگی‌های زراعی آن منجر شده است، اما روش‌های مرسوم جوابگوی نیاز جمعیت روبه افزایش بشرنیست. بنا براین ضرورت توجه به روش‌های مهندسی ژنتیک و انتقال ژن رویکردهای جدیدی را در این زمینه اقتضا می‌کند. از کاربردهای مهم انتقال ژن، می‌توان به تولید ارقام مقاوم به بیماری‌ها، حشرات، علف کش‌ها و تولید ارقام مناسب از نظر بهبود کیفیت روغن و پروتئین اشاره کرد. انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم یکی از کاراترین روش‌های انتقال ژن به گیاه است. پیش از این جدا کشت‌های مختلف توسط محققان متعدد مورد استفاده قرار گرفته است.« بارفیلد و پوا(۱۹۹۱)، رادکی و همکاران(۱۹۹۲)، شرودر و همکاران(۱۹۹۶) و تاکاساکی و همکاران(۱۹۹۷)» ازجدا کشت محور زیرلپه جهت انتقال ژن با میانجی‌گری آگروباکتریوم استفاده کرده‌اند [۱]،[۲]،[۳]. به منظور انتقال ژن به گیاه کلزا لازم بود تا ابتدا روش کشت بافت آن در شرایط *In vitro* بهینه‌سازی شود. از این رو ابتدا به تعیین بهترین سن جدا کشت و ترکیب هورمون‌های بنزیل‌آدنین و تدیازورون مبادرت گردید. وجود هورمون‌های سیتوکینینی درمحیط شاخه‌زایی بر میزان شاخه‌زایی مؤثر است. تدیازورون که در گذشته به عنوان عامل برگ ریز در مزارع پنبه استفاده می‌شد[٥]، برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط « موک و همکاران» به عنوان یک ترکیب شبه ستوکینینی در لوبیا به کار رفت. پس از آن « توماس و کاترمن (۱۹۸٦)» ازTDZ برای القای تولید کالوس در سویا استفاده کردند[۷]. در گزارش‌های دیگر توانایی TDZ برای تحریک تکثیر شاخه‌های جانبی آشکار گردید و مشخص شد که TDZ همانند BA و یا فعال‌تر از آن برای تحریک شاخه‌زایی عمل می‌کند[۸]. از آن پس TDZ به عنوان یک ترکیب شبه سیتوکنینی در فرآیند شاخه‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق نیز برای دست‌یابی به بالاترین میزان شاخه‌زایی در گیاه کلزا از جداکشت‌های محور زیر لپه در سنین متفاوت و در محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف TDZ و BA استفاده شد تا بهترین شرایط کشت و سن جدا کشت برای رسیدن به بالاترین میزان شاخه‌زایی مشخص گردد. از این شرایط، در عمل تراریختی توسط آگروباکتریوم و انتقال ژن‌های گزارش‌گر استفاده شد. در صورت بهینه‌سازی روش تراریختی می‌توان با انتقال ژن‌های مفید گیاهانی با قابلیت‌های جدید و مقاوم در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

دانـــه‌هـای کلـزا رقم پانیـزه SLM 460 ، با هیپـوکلـریت سدیـم% ۱/٥ و تـریتـون ۱۰۰-X %۰/۰۱ به مدت

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰ دقیقه سترون شدند و ۵ بار با آب مقطر سترون شده، شستشو داده شدند. این دانه‌ها در محیط کشت جوانه‌زنی شامل نیمی از نمک‌های محیط MS [۹] فاقد ویتامین و هورمون کشت شدند. از محور زیر لپه دانه رست‌ها با سنین متفاوت(۷، ۱٤ و ۲۱ روزه) ، قطعات۷ـ۵ میلی‌متر جدا شدند و در محیط القای کالوس دارای محیط کشتB5 [۱۰] همراه با ۱ میلی‌گرم از «۲و٤ دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-D)»، ۷ گرم برلیتر آگار و pH:۵/۸ کشت گردیدند. در هر ظرف پتری ۱۰ سانتی‌متری ۲۰ قطعه جدا کشت قرار گرفت. پس از۷ روز، جداکشت‌ها به محیط القای شاخه شامل محیط پایه B5 و نسبت‌های مختلف هورمون‌های بنزیل آدنین(BA) با غلظت‌های ۱/۵، ۳ و٤/۵ میلی‌گرم بر لیتر و تدیازورون (TDZ) با غلظت‌های ۰، ۰/۱۵، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر و۷ گرم بر لیتر آگار و pH:۵/۸ منتقل شدند و هر دو هفته به محیط تازه مشابه واکشت گردیدند. پس از٦ هفته شاخه‌های نوپدید از کالوس‌ها جدا شدند و به محیط طویل شدن شاخه که محیط کشت B5 فاقد هورمون بود منتقل گردیدند و پس از دو هفته به محیط القای ریشه که محیط کشتB5 همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیترهورمون ایندول بوتیریک اسید(IBA)، ٦ گرم بر لیتر آگار و۱۰گرم بر لیتر ساکاروز و pH: ۵/۸ واکشت شدند. شرایط نوری برای همه کشت‌ها ۱٦ ساعت روشنایی ($\mu molm^{-2}s^{-1}$ ۴۰-۴۰) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بود.

پس از تشکیل و توسعه ریشه، گیاهک‌های ریشه دار به گلدان‌های دارای ورمیکولیت انتقال یافتند و پس از سازگاری با محیط رطوبتی جدید به گلدان‌های حاوی ورمیکولیت و خاک و سپس به خاک منتقل شدند. به منظور بهاره سازی، گیاهان به مدت ٤۵ روز در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس به دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شده و تولید گل و دانه نمودند.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

برای بررسی اثر سن جدا کشت، هورمون بنزیل آدنین و تدیازورون بر شاخه زایی جداکشت‌های محور زیر لپه گیاه کلزا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه نوبت تکرار اجرا شد. عامل سن جداکشت در سه سطح۷، ۱٤ و ۲۱ روز، هورمون بنزیل آدین در سه سطح شامل غلظت‌های ۱/۵ ، ۳ و ٤/۵ میلی گرم در لیتر و تدیازورون در سه سطح شامل غلظت‌های ۰ ، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی گرم در لیتر درنظر گرفته شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزارMSTATC تجریه آماری شدند. نتایج به دست آمده از فراوانی شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه قبل از تجزیه واریانس به ترتیب به صورت لگاریتمی و جذری درآمدند. میانگین‌های صفات مورد بررسی با آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq$ ۰/۰۵ مقایسه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

سویه باکتری و آغشتگی جداکشت‌ها با آگروباکتریوم

آگروباکتریم تومفاسین[1] سویهLBA4404 [۱۱] دارای ناقل دوگانه(Clontech) pBI121 مورد استفاده قرار گرفت. این ناقل دارای ژن‌های مقاومت به کانامایسین *(NPTII)* و β - گلوکورونیداز *(GUS)* همراه با پروموتر CaMV35S است. کشت شبانه باکتری در محیط کشت مایع LB درحضور ۵۰ میلی گرم درلیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین صورت پذیرفت. از سوسپانسیون سلولی با ۱/۰ = OD_{600} (۱/۲ × ۱۰ ^{9} cells / ml) رقت 1:10 تهیه شد. پس از سانتریفیوژ درrpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، محیط کشت LB حذف گردید و سلول‌ها در محیط آغشتگی باکتری شامل نمک‌های MS با % ۵ گلوکز و ۵/۲ : pH به صورت سوسپانسیون در آمدند.

جداکشت‌های محور زیرلپه به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون سلول باکتری آغشته شدند و پس از خشک شدن به محیط هم کشتی حاوی نمک‌های MS، ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۱/۳میلی‌گرم بر لیتر تیامین - HCl، ۲۰۰میلی‌گرم بر لیتر KH_2PO_4 ، ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D، % ۳ ساکارز، % ۰/٦ آگار و pH: ۵/۲ به مدت ٤٨ ساعت در تاریکی منتقل شدند. پس از هم کشتی جداکشت‌ها باآگروباکتریوم، قطعات جداکشت به محیط القای کالوس غنی شده با ۲۰۰میلی‌گرم بر لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند.

پس از ۷ روز کالوس‌های سبز به مطلوب‌ترین محیط القای شاخه حاوی ۲۰۰میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۱۰میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین واکشت گردیدند. هر دو هفته جداکشت‌ها به میحط تازه مشابه منتقل شدند. شاخه‌های سبز نوپدید از کالوس‌ها جدا شده و به محیط طویل شدن شاخه حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۱۰میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین انتقال یافتند. پس از ۷ روز شاخه‌ها به محیط القای ریشه غنی شد با ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم واکشت گردیدند. گیاهچه‌های ریشه دار به منظور تشکیل گل و دانه به خاک انتقال یافتند.

آزمون بافت شیمیائی GUS

بررسی بیان ژن *GUS* و تولید آنزیم β - گلوکورونیداز که با تجزیه سوبسترای X-Gluc منجربه تولید رنگ آبی می‌شود در محلول بافری شامل : بافر فسفات mM ۵۰ با ۷/۰ : pH ، ۵- برمو- ٤ - کلرو - ۳- ایندول - β - D گلوکرونید(X-Gluc) ۱میلی‌مول،EDATA ۱ میلی‌مول، تریتون X-100 % ۰/۰۰۱ و β - مرکاپتواتانل ۱۰میل‌مول انجام پذیرفت. قطعات برگ و دمبرگ گیاهان تراریخت در محلول بافری فوق، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب تیمار شدند. برای مشاهده رنگ آبی در بافت‌های گیاهی، کلروفیل زدای توسط اتانل % ۹٦ انجام شد. برش‌های میکروسکوپی ازبرگ و دمبرگ مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت.

۱- *Agrobacterium tumefaciens*

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج DNA ژنومی و PCR

از برگ‌های سبز گیاهان مقاوم به کانامایسین توسط روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم برماید)[۱۲] DNA ژنومی استخراج شد. برای تکثیر قطعه bp ۵۰۰ از ژن *GUS* پرایمرهای زیر طراحی گردید:

5′-CCGGCATAGTTAAAGAAATCAT-3′

5′-TGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3′

واکنش PCR در حجم ۲۰میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، $MgCl_2$ ۳میلی‌مول، dNTP ۲۵۰ میکرومول ، هر یک از جفت پرایمرها ۰/۲۵میکرومول، بافر PCR ۱x و unit ۰/۵ از آنزیم تک پولی‌مراز[۱] (Cinagene) انجام پذیرفت. شرایط PCR شامل $94^{\circ}C$ به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ سیکل($94^{\circ}C$ یک دقیقه، $58^{\circ}C$ یک دقیقه، $72^{\circ}C$ یک دقیقه) و دمای طویل شدن نهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه پرکین المر[۲] ۹۶۰۰ بود. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ % سوار شد و با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید در حضور اشعه UV قابل مشاهده بود.

نتایج

باززایی شاخه از جداکشت‌های محور زیرلپه

به منظور دست‌یابی به بهترین شرایط شاخه‌زایی، در ابتدا سنین مختلف جداکشت‌های محور زیرلپه و غلظت‌های هورمون‌های شاخه زایی مورد بررسی قرار گرفتند تا پس از بهینه‌سازی شرایط کشت، عمل تراریختی گیاه در آن شرایط صورت پذیرد. پس از انتقال جداکشت‌ها به محیط دارای 2,4-D، کالوس‌زایی در کلیه جداکشت‌ها انجام شد (شکل- 1A). دوهفته پس از انتقال به محیط شاخه‌زایی، شاخه‌های نوپدید بر روی کالوس‌ها ظاهر گردیدند. شاخه‌های سالم و طبیعی از کالوس‌ها جدا شده و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند.

اثر سن جداکشت و غلظت هورمون‌های بنزیل آدنین و تدیازورون بر روی صفاتی از قبیل درصد فراوانی شاخه‌های باززایی شده به تعداد کل جداکشت‌ها(RF)[۳] و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه درمحیط ریشه‌زایی به کل شاخه‌های باززایی شده (RS)[٤] مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان دادند که اختلاف بسیارمعنی داری در سنین مختلف جداکشت از نظر RF و RS وجود داشت.در مقایسه میانگین با آزمون دانکن، بیشترین درصد شاخه‌زایی (۱۲٦/۹%) از جداکشت‌های ۱٤ روزه به دست آمد که با جداکشت‌های ۲۱ روزه در یک گروه آماری قرارگرفتند. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۷%) نیز از جداکشت‌های ۲۱ روزه حاصل شد (جدول-۱). حضور هورمون‌های سیتوکینینی از جمله بنزیل آدنین برای شاخه‌زایی در محیط کشت ضروری

۱-Taq polymerase ۲- Perkin Elmer ۳- Regeneration Frequency ٤-Rooting Shoot Percent

Archive of SID

www.SID.ir

بوده و در غیاب این هورمون‌ها شاخه زایی مشاهده نشد. تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت بسیار معنی‌داری در RF و RS با کاربرد هورمون BA نشان داد. بیشترین درصد شاخه زایی (۱٤٤/٦%) و ریشه زایی (۱۷/۳%) از کاربرد غلظت۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به دست آمد(جدول-۱). به کارگیری هورمون TDZ نیز تفاوت بسیار معنی داری در RF وRS بوجود آورد، به نحوی که بالاترین درصد شاخه زایی (۱٥۰/٤%) و ریشه‌زایی(۱٦/۷%) از کاربرد غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون حاصل شد (جدول۱).

اثر متقابل سن جداکشت و هورمونBA تفاوت بسیار معنی‌داری($P \leq 0.01$) در RF و RS نشان داد. بیشترین فراوانی شاخه‌زایی(۱٥٦/٦%) از کاربرد۳ میلی‌گرم برلیترBA و جداکشت‌های۱٤ روزه به دست آمد و بالاترین درصد ریشه‌زایی(% ۲۲/٤) از تیمار ۱/٥ میلی‌گرم بر لیترBA و جداکشت‌های ۲۱ روزه حاصل شد(جدول۲).

جدول۱: اثر سن جدا کشت،BA و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

سن جدا کشت (روز)	BA ($mg\ l^{-1}$)	TDZ ($mg\ l^{-1}$)	شاخه های باززایی شده (%)		شاخه های تشکیل دهنده ریشه (%)	
۷			b	۱۰٥/۹	۱٤/۲	a
۱۴			a	۱۲٦/۹	۱۳/۹	a
۲۱			a	۱۲٤/٦	17	a
	۱/٥		b	۷۰/٦	۱٦/٤	ab
	۳		a	۱٤٤/٦	۱۷/۳	a
	٤/٥		a	۱٤۲/۲	۱۱/٤	b
		۰	c	۸۸/۹	۱٥	a
		۰/۱٥	b	۱۱۸/۱	۱۳/٤	a
		۰/۳	a	۱٥۰/٤	۱٦/۷	a

مقادیر ارایه شده براساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰٥$ است.

جدول۲: اثر متقابل سن جدا کشت و BA بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

سن جدا کشت (روز)	BA ($mg\ l^{-1}$)	شاخه های باززایی شده (%)		شاخه های تشکیل دهنده ریشه (%)	
۷	۱/٥	e	٤۷/۲	۱۳/۱	Ab
	۳/۰	bc	۱۰۸/۳	۱۸/۳	Ab
	٤/٥	a	۱٦۲/۲	۱۱/۱	B
۱۴	۱/٥	cd	۸۳/۹	۱۳/٥	Ab
	۳/۰	a	۱٦٥/٦	۱٥/٦	Ab
	٤/٥	ab	۱۳۱/۱	۱۲/٥	Ab
۲۱	۱/٥	d	۸۰/٦	۲۲/٤	A
	۳/۰	a	۱٦۰	۱۸	Ab
	٤/٥	Ab	۱۳۳/۳	۱۰/٥	B

مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰٥$ است.

Archive of SID

www.SID.ir

اثرمتقابل سن جداکشت و هورمون TDZ اختلاف معنی داری را در RF و RS ایجاد نکرد، هرچند بیشترین غلظت TDZ بالاترین درصد شاخه زایی را در کلیه سنین جداکشت نتیجه داد.

فراوان‌ترین درصد ریشه‌زایی(۱۹/۲%) نیزاز کاربرد ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و جداکشت‌های ۲۱ روزه به دست آمد که در آزمون دانکن در یک گروه آماری با دیگر تیمارها قرار داشت (جدول ۳).

اختلاف معنی‌داری از به کارگیری همزمان دو هورمون BA وTDZ در درصد شاخه‌زایی مشاهده شد، به نحوی که فراوان‌ترین درصد شاخه‌زایی(۱۷٤/۰%) ازکاربرد ٤/٥ میلی‌گرم برلیتر BA و۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به دست آمد.افزایش غلظتTDZ درکلیه سطوحBA منجربه افزایش شاخه‌زایی شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی(% ۱۸/۷) از تیمار ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیترTDZ حاصل گردید که با دیگر تیمارها در آزمون دانکن دریک گروه آماری قرار گرفتند(جدول ٤).

جدول۳: اثرمتقابل سن جدا کشت و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

سن جدا کشت (روز)	TDZ ($mg\ l^{-1}$)	شاخه های باززایی شده (%)		شاخه های تشکیل دهنده ریشه (%)	
۷	۰	۸۷/۲	c	۱۷	a
	۰/۱٥	۹۹/٤	bc	۱۱/۸	a
	۰/۳	۱۳۱/۱	ab	۱۳/۷	a
۱۴	۰	۹٤/٤	bc	۱٤/۳	a
	۰/۱٥	۱۲۱/۷	ab	۱۰/۲	a
	۰/۳	۱٦٤/٤	a	۱۷/۱	a
۲۱	۰	۸٥	c	۱۳/٦	a
	۰/۱٥	۱۳۳/۳	ab	۱۸/۱	a
	۰/۳	۱٥٥/٦	ab	۱۹/۲	a

Archive of SID

www.SID.ir

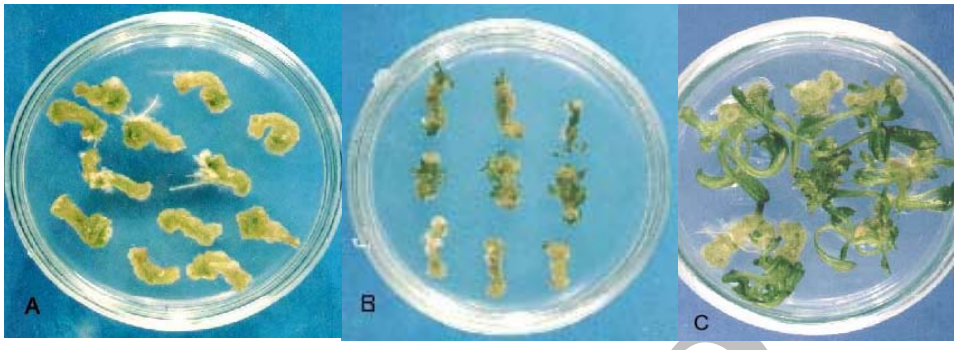
جدول ٤: اثر متقابل BA و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

BA ($mg\ l^{-1}$)	TDZ ($mg\ l^{-1}$)	شاخه های باززایی شده (%)		شاخه های تشکیل دهنده ریشه (%)	
۱/۵	۰	e	٤۱/۱	a	۱۷/۱
	۰/۱۵	d	٦٦/۱	a	۱۳/٦
	۳	c	۱۰٤/٤	a	۱۸/٤
۳	۰	bc	۱۱۷/۸	a	۱۸/۵
	۰/۱۵	abc	۱٤۳/۳	a	۱٤/۷
	۳	a	۱۷۲/۸	a	۱۸/۷
۴/۵	۰	bc	۱۰۷/۸	a	۹/۲
	۰/۱۵	ab	۱٤۵	a	۱۱/۹
	۳	a	۱۷۳/۹	a	۱۳

مقادیر ارایه شده براساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ است.

نتایج به دست آمده از آزمایش حاکی از آن است که سنین پائین جداکشت (۷ روزه) در غلظت‌های اندک هورمونی ($mg\ l^{-1}$ ۱/۵ BA و بدون TDZ) کمترین درصد شاخه زایی(% ٤۱/۱۱) را سبب می‌شدند و اغلب شاخه‌های تولید شده نیز دارای ریخت غیرطبیعی و فاقد برگ‌های گسترده‌اند(شکل 1B) و در محیط ریشه‌زایی قادر به تولید ریشه نبودند، در حالی که سنین بالای جداکشت (۲۱روزه) در تیمارهای سنگین هورمونی(٤/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ) بیش‌ترین درصد شاخه‌زایی(% ۱۷٤) را موجب شدند. شاخه‌های حاصل از نظر ریخت‌شناسی طبیعی بوده و برگ‌های گسترده و سبز بود تولید کردند(شکل 1C). این شاخه‌ها در محیط ریشه زایی قادر به تولید ریشه انبوه بوده و پس از بهاره شدن تولید گل و دانه‌های سالم کردند. از این تیمار هورمونی و سن جداکشت جهت عمل تراریختی نمونه‌ها با آگروباکتریوم استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱-

A- تشکیل کالوس دو هفته پس از انتقال به محیط کالوس زایی دارای 2,4-D

B– شاخه‌های حاصل از جداکشت‌های ۷ روزه در محیط شاخه زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدون TDZ با برگ‌های کوچک و توسعه نیافته

C- شاخه‌های تولید شده از جداکشت‌های ۲۱ روزه در محیط شاخه زایی حاوی ٤/٥ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ با برگ‌های طبیعی و گسترده

تراریختی و انتخاب در محیط دارای کانامایسین

آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان عامل انتخاب‌گر درمحیط کشت تراریختی به کار می‌رود. جداکشت‌های تراریخت نشده در میحط کالوس‌زایی و شاخه‌زایی دارای آنتی بیوتیک کانامایسین قادر به تشکیل کالوس سبز و شاخه سبز نیستند و به علت حضور کانامایسین ساختار کلروفیلی خود را از دست می‌دهند و به رنگ سفید یا ارغوانی درمی‌آیند. وجود ژن *NPT II* در بخش T-DNA ناقل pBI121 که به ژنوم گیاهان تراریخت شده منتقل شده بود، باعث ساخته شدن آنزیم نئومایسین فسفوترانسفراز وایجاد مقاومت در برابر کانامایسن و حفظ ساختار کلروپلاستی شده و جداکشت‌های دریافت کننده این ژن درمحیط کالوس‌زایی و شاخه‌زایی با تشکیل کالوس‌های سبزرنگ و شاخه های سبز توان بقاء در حضور کانامایسین را داشتند و در محیط ریشه زایی قادر به تولید ریشه بودند. از ۷٥ جداکشت محور زیرلپه بکار گرفته شده ٦ گیاه مقاوم به کانامایسین حاصل شد که همگی تولید گل و دانه کردند(شکل ۲).

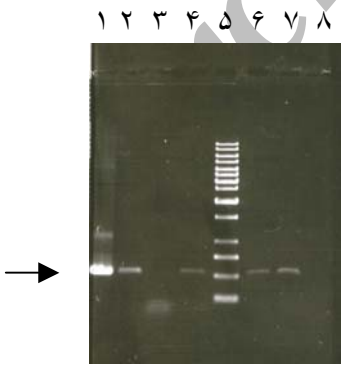
ارزیابی ژن *GUS* از طریق آزمون شیمیایی وPCR

تأیید انتقال ژن *GUS* به ژنوم گیاه با کمک PCR انجام شد. برای این منظور از برگ‌های سبز گیاهان مقاوم به کانامایسین DNA ژنومی استخراج شد و در حضور پرایمرهای اختصاصی ژن *GUS* ، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. ظهور باند ٥۲۰ Pb بیان‌گر وجود این ژن در ژنوم گیاهان تراریخت شده بود (شکل ۳).

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۲- انتخاب گیاهان تراریخت شده در محیط کشت حاوی عامل انتخابی کانامایسین. گیاه تراریخت نشده در محیط انتخاب، به رنگ سفید درآمده و گیاه تراریخت شده دارای ژن *NPT II* سبز باقی مانده است.

بیان ژن *GUS* منجربه تولید آنزیم β - گلوکرونیداز می‌شود که به صورت طبیعی در گیاه وجود ندارد. این آنزیم قادر است ترکیب X-Gluc را بشکند و تولید رنگ آبی کند. به منظور بررسی بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت شده، قطعات برگی و دمبرگی از گیاهان مقاوم به کانامایسین تهیه شد و در بافر حاوی X-Gluc در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ظهور رنگ آبی در آن‌ها نشان‌گر بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت شده بود (شکل ۴). بیش از ۷۰ % از گیاهان مقاوم به کانامایسین بیان ژن *GUS* را نشان دادند.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز قطعه ۵۲۰ bp محصول PCR ژن *GUS* چاهک ۱) کنترل مثبت؛ چاهک‌های ۲، ٤، ٦ و ۷) گیاهان تراریخت؛ چاهک ۳) گیاه تراریخت نشده چاهک ۸) کنترل منفی؛ چاهک ۵) نشانگر مولکولی ۱ Kb

Archive of SID

www.SID.ir

شکل۴- بررسی آزمون GUS در گیاهان تراریخت شده در حضور سوبسترای X-Gluc
ظهور رنگ آبی نشانگر بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت (چپ)
در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت (راست) است

بحث

پژوهش انجام شده روش بهبود یافته‌ای را برای باززایی شاخه با استفاده از هورمون‌های بنزیل آدنین و تدیازورون و بهترین سن جداکشت‌های محور زیرلپه ارائه می‌کند. براساس نتایج به دست آمده می‌توان برای دست‌یابی به بالاترین درصد شاخه‌زایی از جداکشت‌های محور زیرلپه دانه رست‌های ۲۱ روزه در حضور غلظتهای ٤/٥ میلی‌گرم برلیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بهره جست.« کریستی و همکاران (۱۹۹۹)» نیز از جداکشت‌های محور زیرلپه (*B. napus*) با به کارگیری ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر TDZ به بیشترین درصد باززایی شاخه دست یافتند.« دی بلاک و همکاران(۱۹۸۹)» از جداکشت‌های محور زیرلپه دانه رست‌های ۱۲ تا ١٤ روزه (*B. napus*) درمحیط شاخه‌زایی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و $1\ mgl^{-1}$ BA و $0/01\ mgl^{-1}$ GA_3 گیاهان باززایی شده تولید کردند. « چنگ و همکاران (۲۰۰۱)» از جداکشت‌های محور زیرلپه گیاهان سه روزه (*B. oleracea*) دارای رشد سریع با به کارگیری $4/5\ mgl^{-1}$ BA بیش از ۹۰% باززایی و با کاربرد ۰/٥ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به ٩٤ % باززایی شاخه دست یافتند. این گزارش‌ها با نتایج تحقیقات حاضر که به نقش مؤثر BA و TDZ در باززایی شاخه تأکید دارد، همسویی دارد.

تدیازورون یکی از چند اوره جانشین شونده درترکیباتی چون N′ – N دی فنیل اوره است. با وجود اینکه فعالیت بیوشیمیایی فنیل اوره ها بطور کامل شناخته نشده است، ولی اعتقاد بر آن است که درتنظیم سیتوکینین‌های پورینی فعالند و یا عملکرد مستقیمی مانند سیتوکنین‌ها دارند، یا در همکاری با سیتوکینین‌ها عمل می‌کنند[٦].

Archive of SID
www.SID.ir

« نیلسن و همکاران (۱۹۹۵)» با ذکر این موضوع که اثر همکاری BA وTDZ تاکنون گزارش نشده است، با به کارگیری TDZ در اولین محیط کشت و کاربرد BA در واکشت‌های بعدی به همکاری اثر این دو هورمون اشاره داشتند و مدلی را براساس آنالوگی با سیستم هورمونی جانوارن برای فعالیت سیتوکینین‌ها در سلول گیاهی پیشنهاد کردند. براساس این مدل، هر دو سیتوکینین BA وTDZ می‌توانند به گیرنده پروتئین متصل شونده به سیتوکینین‌ها[۱](CBP) اتصال یابند.CBP دوجایگاه اتصال مختلف داردیک جایگاه به طورطبیعی با سیتوکینین‌های تیپ آدنین متصل می شود، در حالی که دیگری توانایی اتصال با سیتوکینین‌های تیپ فنیل اوره را دارد و اتصال TDZ به جایگاه فنیل اوره CBP باعث افزایش اتصال BA به جایگاه آدنینی می‌شود و باعث بهبود اثر BA می‌گردد. پیشنهاد دو جایگاه اتصال بر روی یک گیرنده می‌تواند بازگو کننده این نکته باشد که اثر سیتوکینین TDZ در گونه‌های متفاوت بسیار متغیرتر از اثرات سیتوکینین‌های آدنینی است. در مطالعه کنونی نیز حضور TDZ همراه باBA باعث افزایش باززایی شاخه شد. « کین یاند و همکاران (۱۹۹٤)» نیز حضور مداوم TDZ حتی درمقداراندک(۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) را برای القای شاخه‌زایی و تشکل تعداد بیش‌تر شاخه در گیاه بادام زمینی[۲] ضروری دانستند که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی دارد.

سیتوکینین‌ها در سلول از طریق مکانیسم شکست اکسیداتیو زنجیره -N٦ توسط سیتوکینین اکسیدازها غیرفعال می‌شوند، TDZ به عنوان مهارکننده غیررقابتی سیتوکینین اکسیداز می‌تواند موجب افزایش سیتوکینین درونزا شود و باززایی شاخه را به طریق(*de novo*) القا کند[۵]،[۷]. TDZ اثر شبه سیتوکینین شناخته نشده‌ای را در گیاه القا می‌کند. بدین معنی که ریبونوکلئوتید سیتوکینین را به شکل بسیار فعال زیستی ریبونوکلئوزید در بافت کالوس لوبیا القا می‌کند[۱۸]. « برتاگن و همکاران (۱۹۹٤)» دو فرضیه برای نحوه عمل TDZ بیان کردند. نخست آن که TDZ می‌تواند به طور مستقیم باعث تحریک رشد شود که ناشی از فعالیت زیستی آن در یک مسیر مشابه سیتوکنین‌های جانشین شده N٦ است، و یا ممکن است باعث القای سنتز یا تجمع سیتوکینین‌های آندوژن شود. اختلاف میان ارقام و گونه‌ها از نظر میزان هورمون به کار رفته وجود دارد. زیرا سلول‌ها در گیاهان مشابه نیز می‌توانند سطوح مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی آندوژن داشته باشند. علاوه براین تنوع و کارآیی گیرنده‌ها یا حساسیت سلولی به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی متفاوت است[۲۰]. به نظر می‌رسد با افزایش سن جداکشت‌ها در پژوهش کنونی، سطح هورمون آندوژن دچار تغییر شده و پاسخ سنین مختلف به هورمون‌های سیتوکینینی اگزوژن نیز متفاوت باشد.

بـر اساس تحقیق انجام شده و دستیـابی بـه بهترین سن جداکشت و غلظت هورمـون‌های BA وTDZ، از جداکشت محور زیرلپه در شرایط بهینه عمل تراریختی توسط آگروباکتریوم انجام شد. انتقال ژن‌های *NPTII* با

۱-Cytokinin Binding Protein ۲- *Arachis hypogea*

Archive of SID

www.SID.ir

غربالگری در محیط حاوی کانامایسین و *GUS*، با ظهور رنگ آبی درحضور سوبسترای X-Gluc و مشاهده باند pb ۵۲۰ درPCR به تأیید رسیدند . فراوانی تراریختی در این تحقیق % ۷ بود که با گزارش‌های« شرودر و همکاران در۱۹۹٤» که به % ۱۰ کارایی تراریختی درکلزا دست یافتند،« رادکی وهمکاران(۱۹۹۲) و تاکاساکی و همکاران (۱۹۹۷)» که با استفاده از جداکشت‌های محور زیرلپه به فراوانی‌های% ۲/۲ و% ۵ رسیدند قابل مقایسه است. با توجه به روش ارائه شده و فراوانی تراریختی حاصل می‌توان از این فن برای انتقال ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به تنش‌های زیستی وغیرزیستی به گیاه کلزا استفاده کرد. انتقال ژن مقاومت به علف‌کش با این روش درحال انجام گرفتن است.

References

1. D.G. Bar fild and E.C. Pua, Plant Cell Rep, Vol.10(1991) 308-314.
2. S.E. Radke, J. C. Turner and D. Facciotti, Plant Cell Rep, Vol.11(1992) 499-505.
3. M. Schroder, C. Dixelius, L. Rahlen and K. Glimelius, Physiol. Plant, Vol.92(1994) 37-46.
4. T. Takasaki, K. Hatakeyama, K. Ojima, M. Watanabe, K. Toriyama and K. Hinata Breeding Sci, Vol. 47(1997) 127-134.
5. S. Eapen, S. Tivarekar and L. George, Plant Cell Tiss. and Org. Cult., Vol.53(1998) 217-220.
6. M.C. Mok, D.W.S. Mok, D.G. Armestrong, K. Shuda, Y. Isoyai and T. Okamoto, Phyto-chemistry,Vol. 21(1982) 1509- 1511.
7. J.C. Thomas and F.R. Katterman, Plant Physiol, Vol.81(1986) 681-683.
8. H.R. Kern and M.M. Meyer, Hort. Sci, Vol. 21(1986) 1209-1210.
9. T. Murashige and F. Skoog, Physiol. Plant, Vol. 15(1962) 473- 497.
10. O.L. Gamborg, R.A. Miller and K. Ojima, Exp. Cell. Res., Vol. 50(1968) 151-158.
11. A.Hoekema, P.R.Hirsch, P.J.J. Hooykaas and R.A. Schiliperoot,Nature, Vol. 303(1983) 179-180
12. M.G. Murray and W.F. Thampson, Nucl. Acids. Res., Vol8(1980) 4321-4325.
13. M.C. Christey, R.H. Braun, F.O. Kenel and E. Podivinsky, Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canbra Australia(26-29 September 1999).
14. M. De Block, D. De Brouwer and P. Tenning, Plant Physiol,Vol. 91(1989) 694-701.

Archive of SID

www.SID.ir

15. P.K.Cheng, P. Lakshmanan and S. Swarup, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, Vol. 37(2001) 592-598.

16. J.M. Nielsen, J. Hansen and K. Brandt, Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., Vol. 41(1995) 165- 170.

17. M. Kanyand, A.P. Dessai and C.S. Prakash, Plant Cell Rep, Vol. 14(1994) 1-5.

18. S.C. Capelle, D.W.S. Mok, S.C. Kirchner and M.C. Mok, Plant Phisiol, Vol.73(1983) 796-802.

19. B. Bretagne, M. C. Chupeau, Y. Chupeau and G. Fouillox, Plant Cell Rep., Vol. 14(1994) 120-124.

20. S.C. Minocha, In J.M. Bonga and D.J. Durzan(eds) Cell and tissue culture in forestry, Vol.1(1987) 125-141.

Archive of SID

www.SID.ir