مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحات ۸۹-۷۵

انتقال ژن (*DREB1A*) موثر در تحمل به تنش‌های غیر زنده به گیاه ذرت

Transformation of *Zea mays* using *DREB1A* gene for abiotic stresses tolerance

محمد رضا شمس[۱،۲]، حسن رهنما*[۲]، محمد رضا بی همتا[۳]، منوچهر خدارحمی[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۱۸

چکیده

به منظور انتقال ژن (*DREB1A*) موثر در تحمل به تنش‌های غیر زنده به گیاه ذرت، ابتدا پلاسمید بیانی نوترکیب حاوی ژن *DREB1A* ساخته شد. جهت تهیه سازه مورد نظر قطعه bp۶۵۱ ژن *DREB1A* که در ناقل همسانه سازی pTZ۵۷R کلون گردیده بود، با آنزیم *Eco*RI هضم و سپس در ناقل همسانه سازی pUC۱۸ و در مکان همولوگ الحاق شد. پیشبر *rd29A* با اندازه bp۹۱۰ از گیاه آرابید وپسیس و پایانبر *nos* حاوی قطعه bp ۲۶۰ از ناقل بیانی pBI۱۲۱ با PCR و پرایمرهای اختصاصی تکثیر و هر دو محصول PCR به ترتیب با جفت آنزیم‌های *Xba*I ,*Hin*dIII و *Pst*I *Eco*RI هضم و در pUC۱۸–DREB کلون شدند. کاست ژنی با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI هضم و در ناقل بیانی pCAMBIA۳۳۰۰ (که پلاسمید هدف می‌باشد) در مکان همولوگ قرار گرفت. جهت انجام تحقیق لاین های A۱۸۸، S۶۱ و B۷۳ ذرت داخل گلدان کشت شدند. بلال‌ها ده الی چهارده روز پس از گرده افشانی برداشت شدند. پس از ضد عفونی بلال ها، جنین نارس استخراج گردید و چهار روز بر روی محیط پیش تیمار (N۶P) قرار داده شدند. ۳ ساعت قبل از بمباران جنین‌ها به محیط اسمزی (N۶Y) انتقال داده شد. ژن *DREB1A* با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی به سلول‌های بافت هدف شلیک شد. سپس جنین‌ها یک هفته در محیط استراحت (N۶Rest) و بعد به محیط انتخابی حاوی علف کش PPT (N۶ppt) منتقل گردیدند. کالوس‌های مقاوم به محیط باززایی منتقل شده و گیاهچه‌های حاصل به محیط ریشه زایی. انتقال یافتند. در نهایت استخراج DNA ژنومی از گیاهان حاصل صورت گرفت. تراریختی گیاه ذرت و حضور ژن *bar* (مقاوم به علف کش) و ژن *DREB1A* (مقاوم به تنش‌های غیر زنده) با انجام PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* و *DREB1A* تایید شد.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، تنش‌های غیر زنده، جنین نارس، ذرت، ریز پرتابه، ژن *DREB1A*

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه اصلاح نباتات، کرج، ایران
۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی. کرج، ایران
۳- دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تنش‌های غیر زیستی مانند شوری، خشکی و سرما به شدت محصول دهی گیاهان زراعی را کاهش می‌دهند (Sreenivasulu *et al*., 2007 ; Mahajan and Tuteja, 2005). خشکی و شوری در بسیاری از مناطق جهان وجود دارد و پیش بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ بیش از ۵۰ درصد زمین‌های قابل کشت با مشکل شوری مواجه شوند (Langridge *et al*., 2006). اثرات شوری در مناطق خشک و نیمه خشک که ۲۵ درصد زمینهای تحت آبیاری در این مناطق قرار دارند بسیار برجسته می‌باشد (Bray *et al*., 2000). اگر چه در گیاهان عالی راهکارهای چند گانه و مرتبط با هم تکامل یافته تا آنها را قادر به زنده ماندن تحت تنش نماید، این راهکارها در اکثر گیاهان زراعی به خوبی توسعه نیافته است. ذرت مانند بسیاری از محصولات کشاورزی حساسیت فراوانی به خشکی دارد. این حساسیت به ویژه در مرحله گل دهی و مرحله پر کردن بذر بسیار زیاد است. از طرف دیگر این گیاه از جمله گیاهانی است که به تنش شوری حساس است به طوری که آستانه تحمل این گیاه به شوری حدود EC=۲/۵ است. با افزایش شوری خاک میزان محصول کاهش چشمگیری پیدا می کند. از طرف دیگر حساسیت این گیاه به سرما زدگی زودرس (خصوصاً در مورد ذرت علوفه ای) در فصل پائیز اهمیت تولید ارقام مقاوم به سرما را بیش از پیش نشان می‌دهد. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت و محدودیت زمینهای کشاورزی و منابع آبی و همچنین طرح خودکفائی ذرت در کشور، ایجاد ارقام مقاوم به خشکی و شوری از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از راههای افزایش تولید در محیط‌های تنشی اصلاح گیاهان به منظور افزایش تحمل به تنش است با این وجود موفقیت در اصلاح تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی به دلایل زیر همواره با مشکل روبرو بوده است: ۱- تحمل به تنش‌های غیر زیستی توسط ژن‌های متعددی کنترل می‌شود و انتخاب هم زمان آنها در روشهای سنتی اصلاح نباتات مشکل است (Flowers *et al*., 2000). ۲- زحمت زیادی لازم است تا ژن‌های نامناسب و ناخواسته‌ای که در طی اصلاح وارد شده‌اند حذف شوند. ۳- روشهای اصلاحی کارا و مؤثری به ویژه در شرایط مزرعه‌ای وجود ندارد (Ribaut *et al* ,.1997). به همین لحاظ استفاده از فناوریهای نوین مانند مهندسی ژنتیک می‌تواند به این امر کمک فراوانی نماید. بر خلاف روشهای سنتی اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک روشی سریع تر و دقیق تر برای دست‌یابی به گیاهان متحمل تر به تنش‌ها می‌باشد. به علاوه، با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک می‌توان ژن‌های مختلف را سر هم نموده و به طور هم زمان به گیاه منتقل نمود. تنش‌های غیر زیستی منجر به یک سری از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی و مولکولی می‌شوند که تأثیر سوئی بر رشد و تولید گیاه دارد (Wang *et al*., 2001). خشکی، شوری، دمای حد و تنش اکسیداتیو اغلب در ارتباط با هم بوده و باعث آسیب‌های سلولی مشابهی می‌شوند. برای مثال، خشکی و یا شوری قبل از هر چیزی به صورت تنش اسمزی خود را نشان می‌دهد که منجر به تخریب تعادل و انتشار یون در سلولها می‌گردد. تنش اکسیداتیو هم که معمولاً به دنبال تنش‌های خشکی، شوری و دمائی اتفاق می‌افتد باعث واسرشتی پروتئین‌های ساختمانی و فعال می‌شود. در نتیجه، این تنش‌های شدید محیطی اغلب باعث فعال شدن مسیرهای علامتی سلولی و پاسخ‌های سلولی مشابهی (مانند تولید پروتئین‌های تنشی، تنظیم بالا دستی آنتی اکسیدانت‌ها و انباشتگی مواد محلول سازگار) می‌شوند (Cushman and Bohnert, 2000). همان طور که ذکر شد بر خلاف اغلب صفات تک ژنی مانند مقاومت به آفات و بیماریها، پاسخهای پیچیده ژنتیکی به تنش‌های غیر زیستی کنترل آن را مشکل می‌نماید. راهکارهای جدید مهندسی ژنتیک مبتنی بر انتقال یک یا چند ژن است که اغلب یا در مسیرهای علامتی و تنظیمی دخالت دارند و یا این که آنزیم هایی را رمز سازی می‌کنند که در مسیر بیوسنتزی ترکیبات حفاظت کننده مانند اسمولیت‌ها و آنتی اکسیدانت‌ها نقش دارند و یا اینکه پروتئین‌های دخیل در تحمل به تنش را القا می‌کنند. راهکارهای متفاوتی جهت تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های غیر زیستی به

Archive of SID

www.SID.ir

کار گرفته شده است. در تمامی این روش‌ها معمولاً از یک ژن جهت تراریختی استفاده شده است. به‌عنوان مثال استفاده از ژن‌های بیوسنتزی انواع اسمولیتها (مانند گلیسین- بتائین، مانیتول، پرولین، میواینوزیتول، ترهالوز و...)، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون- ترانسفراز و. . .)، ناقل‌های یونی (HKATPase, HATPase و...) را می‌توان نام بـرد (Smirnoff,1998). همان طور که ذکر شد استفاده از عوامل رونویسی یکی از راهکارهای ایجاد مقاومت در گیاهان است. این عوامل با اتصال به جایگاههای اختصاصی در مولکول DNA باعث تنظیم فعالیت ژن‌های پائین دستی می‌شوند. از جمله این عوامل رونویسی که در پاسخ به تنش‌های اسمزی (شوری، خشکی و سرما) در گیاه فعال می‌شوند می‌توان به DREB اشاره نمود که با اتصال به عناصر DRE موجود در پیشبرهای مختلف باعث کنترل بیان ژن مربوطه می‌شوند. بدین ترتیب با استفاده از این عوال رونویسی می‌توان مجموعه‌ای از ژن‌های پائین دستی را کنترل نمود. تراریختی گیاه آرابیدوپسیس با ژن *DREB1A* که تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* قرار داشت، باعث افزایش مقاومت به تنش‌های خشکی و انجماد گردید اما فنوتیپ گیاه تراریخته کوتوله بود (Kasuga *et al* ,.1999). استفاده از پیشبر القائی *rd29A* باعث شد که گیاهان حاصله ضمن اینکه مقاومت بالائی به انواع تنش‌های شوری، خشکی و سرما نشان دهند رشد طبیعی هم داشته باشند (Kasuga *et al* ,.1999). هم چنین انتقال ژن *DREB1A* تحت کنترل پیشبر *rd29A* به گیاه توتون هم باعث افزایش مقاومت به تنش‌های خشکی و سرما گردید (Kasuga *et al.,* 2004). پله گرینسچی و همکاران (۲۰۰۲) در CIMMYT با انتقال سازه ژنی فوق به گیاه گندم توانسته‌اند که میزان مقاومت این گیاه زراعی مهم را به تنش خشکی افزایش دهند. انتقال ژن *DREB1A* به گیاه برنج هم توانسته است میزان تحمل به انواع تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی, شوری و سرما را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. ذرت با داشتن مسیر فتوسنتزی C4 ، دگرگشنی، بنیهٔ هیبریدی و تنوع بسیار زیاد آن گیاهی ایده آل از نظر نقش مستقیم و غیرمستقیم در تأمین غذا و بسیاری از نیازهای صنعتی و حتی تزئینی انسان می‌باشد. با توجه به نیاز مبرم تولید ذرت در کشور و به دلیل این که تنش‌های غیر زیستی به شدت عملکرد دانه و علوفهٔ ذرت را کاهش می‌دهند و ژنوتیپ مناسبی برای مقابله با چنین مشکلاتی وجود ندارد، ایجاد ارقام مقاوم از طریق تراریختی حائز اهمیت است. به منظور انتقال ژن (*DREB1A*) موثر در تحمل به تنش‌های غیر زیستی به گیاه ذرت این آزمایش طرح ریزی شد.

مواد و روش ها

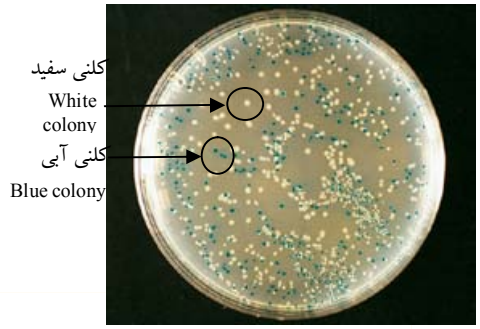
ساخت سازه پلاسمیدی

جهت ساخت سازه پلاسمیدی مورد نظر از ناقل همسانه ساز pUC۱۸ استفاده شد. طبق نقشه طراحی شده (شکل۱) می‌بایست کاست ژنی شامل پیشبر *rd29A*، ژن *DREB1A* و پایانبر *nos* ابتدا به ناقل pUC۱۸ منتقل شود و سپس کاست ژنی درون ناقل بیانی pCAMBIA ۳۳۰۰ قرار گیرد. ابتدا ژن *DREB1A* که درون ناقل همسانه ساز pTZ۵۷R/T قرار داشت با آنزیم *Eco*R1 هضم شد و همچنین ناقل همسانه ساز pUC۱۸ نیز توسط آنزیم مشابه مورد هضم شبانه و جهت جلوگیری از خود اتصالی پلاسمیدی با استفاده از ۳ میکرولیتر آلکالین فسفاتاز و به مدت ۴۵ دقیقه دفسفره شدند. به ترتیب قطعات ۶۵۱ bp و ۲۶۸۶ bp از روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از روش خالص سازی اسیدهای نوکلئیک خالص سازی و با استفاده از روش Rapid ligation kit (شرکت Roche) الحاق شدند، مخلوط اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E.coli* توسط شوک حرارتی تراریزش شد (Sambrook and Russel 2000,). پس از کشت باکتری‌های تراریخته و غیر تراریخته (کلنی‌های سفید وآبی) در محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آمپی سیلین (نشانگر انتخابی پلاسمید pUC۱۸ و ۴ میکرولیتر IPTG بیست درصد و ۴۰ میکرولیتر X-gal دو درصد(رشد کردند که تشکیل کلنی‌های سفید به دلیل وارد شدن قطعه ژن هدف در مکان برشی چند گانه اپران *LacZ* بود (شکل۲). استخراج پلاسمید از کلنی‌های سفید به منظور تایید حضور قطعه ژن

Archive of SID

www.SID.ir

هدف صورت گرفت.



شکل ۱: تشکیل کلنی‌های سفید و آبی بر روی محیط انتخابی حاوی Xgal و IPTG

Figure 1: Blue and white colonies formed on selective medium containing Xgal and IPTG

در مرحله بعد پیشبر *rd29A* با اندازه ۹۱۰ bp از ژنوم گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی

F *rd29A* (AAG CTT GCC ATA GAG CAT TTC AA)-R

(TCC AGA TTC CAA AGA TTT TTC T) *rd29A* تکثیر شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ °C، به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۳ °C به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتا یک چرخه بسط نهایی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ °C بود. برای کلون کردن اولیه ژن از ناقل پلاسمیدی همسانه ساز pGEM–7Zf(+)استفاده شد. سپس با استفاده از توالیهای آنزیمی که برای دو سر پیشبر *rd29A* طراحی شده بود قطعه ۹۱۰ bp از ناقل همسانه ساز pGEM–7Zf(+) توسط دو آنزیم *Xba*I و *Hin*dIII هضم و از روی ژل آگارز خالص سازی شد. همچنین ناقل همسانه ساز *DREB1A*-pUC18 نیز توسط آنزیم مشابه مورد هضم قرار گرفت و قطعه ۳۴۸۹bp از روی ژل آگارز خالص سازی گردید. استخراج پلاسمید از کلنی‌ها به منظور تایید حضور قطعه مورد نظر انجام شد و هضم ناقل همسانه ساز نوترکیب pUC18-*DREB1A*-*rd29A* با دو آنزیم *Hin*dIII و *Xba*I باعث استخراج قطعه ۹۱۰ bp شد. در ادامه پایانبر *nos* از داخل ناقل بیانی pBI۱۲۱ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F *nos* (gtt cag atc ctg) و R-*nos* (caa aca ttt g) (gaa ttc ccg atc tag taa cat ag) که از سمت چپ سایت برشی *Pst*I و سمت راست سایت برشی *Eco*RI تعریف شده بود به وسیله PCR با چرخه‌های حرارتی که شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ °C، به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتا یک چرخه بسط نهایی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ °C بود، تکثیر شد و توسط PCR Cloning Kit داخل ناقل همسانه سازی pTZ۵۷R کیت کلون گردید. در ادامه ترکیب واکنش هضم آنزیمی پایانبر *nos* و ناقل pUC18-*DREB1A*-*rd29A* جهت ریکاوری انجام و سپس واکنش اتصال بین pUC18-*DREB1A*-*rd29A* و پایانبر *nos* صورت گرفت. استخراج پلاسمید از کلنی‌ها جهت تایید حضور قطعه ژن هدف انجام شد و با هضم ناقل نوترکیب pUC18-*DREB1A*-*rd29A* توسط دو آنزیم *Pst*I و *Eco*RI قطعه ۲۶۰ bp پایانبر *nos* استخراج شد.

ناقل بیانی pCAMBIA۳۳۰۰ که پلاسمید هدف می‌باشد و ناقل pUC18-*DREB1A*-*rd29A*-*nos* هر دو توسط آنزیمهای *Hin*dIII و *Eco*RI هضم شدند و به ترتیب قطعات ۸۴۲۸ bp و ۱۸۲۱ bp خالص سازی گردیدند. پس از انجام واکنش اتصال مخلوط اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E.coli* با استفاده از شوک حرارتی منتقل شد. در انتها ناقل بیانی نوترکیب pCRDREB نیز جهت تایید ورود کاست ژنی توسط آنزیمهای *Hin*dIII و *Eco*RI مورد هضم قرار گرفت.

مواد گیاهی

در این پژوهش لاین‌های A۱۸۸، S۶۱ و B۷۳ذرت مورد استفاده قرار گرفتند. بذور ارقام ذرت داخل گلخانه در دمای ۲۵±۳ °C (روشنایی) و ۱۸±۳ °C (تاریکی) تحت یک دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (شب/روز) با شدت نور ۲۵۰ میکرو مول بر

Archive of SID
www.SID.ir

متر مربع در ثانیه پرورش داده شدند. بذور ابتدا در گلدان‌های کوچک کشت و سپس گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ منتقل شدند. بلال‌ها ۱۴-۱۰ روز پس از گرده افشانی برداشت شدند. جهت ضدعفونی، بلال‌ها سه دقیقه در الکل ۷۰%، ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس) به نسبت ۱:۱ آب استریل و هیپوکلریت سدیم، حاوی دو قطره توین ۲۰ و سه مرتبه با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. با کمک یک پنس سرکج قطعه بلال به کف پتری تکیه داده شد و با یک اسکالپل تیز یک سوم تا نیمی از دانه قطع و با یک قاشقک فلزی و نازک باقیماندهٔ آندوسپرم بدون اینکه خرد شود بیرون کشیده و جنین‌های نارس ۲-۱ میلی متری از طرف شکاف جنینی آن (طرف صاف) داخل محیط پیش تیمار (N6P) حاوی محیط پایه N۶ (Chu *et al*, 1975)، ۹ میلی گرم/ لیتر نیترات نقره، ۷۰۰ میلی گرم/ لیتر ال-پرولین، ۲ میلی گرم/ لیتر D-۲,۴، ۳۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۳ گرم/ لیتر ژلرایت قرار داده شد (Fromm, 1994). حدود ۵۰ تا ۶۰ جنین در یک پتری دیش ۱۰ سانتیمتری کشت شدند. پتری‌ها در تاریکی ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. چهار روز بعد جنین‌ها به صورت مجتمع در یک دایره به قطر ۲ سانتیمتر روی محیط اسمزی N6Y حاوی محیط پایه N۶، ۹ میلی گرم/ لیتر نیترات نقره، ۷۰۰ میلی گرم/ لیتر ال-پرولین، ۲ میلی گرم/ لیتر D-۲,۴، ۱۲۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۳ گرم/ لیتر ژلرایت کشت شدند و به مدت چهار ساعت پیش از بمباران در شرایط اتاق نگهداری شدند.

انتقال ژن با ذرات طلا

از دستگاه تفنگ ژنی برای انتقال ژن‌های *DREB1A* و *bar*) BioRad PDS1000 He gun) استفاده شد. DNA پلاسمیدی به صورت مخلوطی از ۳ میلی گرم ذرات طلای ۱ میکرومتری، ۱۰ میکرولیتر)۱۰- ۸ نانوگرم(مخلوط DNA پلاسمیدی، ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم (۲/۵ مولار)، ۲۰ میکرولیتر اسپرمیدین عاری از باز (۰/۱ مولار) آماده و به مدت ۲-۳ دقیقه به شدت با ورتکس هم زده شد. مخلوط به مدت ۵ ثانیه با حداکثر دور سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. به مخلوط ۲۵۰ میکرولیتر الکل مطلق زده به مدت ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس و سپس به مدت ۲۰ ثانیه به شدت سانتریفیوژ شد. مایع رویی حذف شد. به مخلوط ۶۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه کرده به مدت ۳ تا ۵ دقیقه به شدت ورتکس شد. درحالی که تیوب ورتکس می‌شد ۱۰ میکرولیتر محتویات آن روی غشای بزرگ حامل استریلی که قبلا در نگهدارنده مخصوص سوار شده بود پخش شد و در معرض جریان هوای استریل لامینار خشک گردید. در نگهدارنده ریز حامل یک غشای psi۹۰۰ یا Psi۱۱۰۰ قرار داده شد و پس از قراردادن توری فلزی و ماکروکریر در جای خود، همگی روی دستگاه سوار شده، پتری محیط اسمزی حاوی جنین‌ها در فاصله ۹ سانتیمتری قرار گرفت و هر پلیت دو مرتبه از دو جهت با فشار هلیم psi ۹۰۰ و مکش psi۲۲۰ بمباران شد (*et al*.,2003 Koziel). ارقام S۶۱ و B۷۳ به وسیله طلای با قطر ۱ میکرون شلیک شدند و رقم A۱۸۸ با دو قطر ۰/۶ و ۱ میکرون طلا شلیک شدند. جنین‌ها بلافاصله از محیط اسمزی جدا و روی محیط استراحت Rest N۶ (محیط کالوس زایی فاقد انتخابگر) منتقل گردیدند و به مدت ۲ تا ۷ روز در تاریکی ۲۷ درجه نگهداری شدند.

محیط انتخابی

جهت تعیین بهترین محیط انتخابی از محیط پایه N۶، ۹ میلی گرم/ لیتر نیترات نقره،، ۲ میلی گرم/ لیتر D-۲,۴، ۳۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۳ گرم/ لیتر ژلرایت و پنج غلظت صفر، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر PPT در سه تکرار استفاده شد. در هر پتری دیش ۱۰ جنین (جنین نارسی که چهار روز داخل محیط پیش تیمار N6P قرار داشته) کشت شد. پتریها به اتاق تاریک با دمای ۲۷ درجه منتقل شدند. به منظور حفظ فشار انتخاب، محیط کشت‌ها هر دو تا سه هفته یک بار تعویض شدند (Somers and Hibberd, 1994) طبق نتایج تیمارهای بالا برای انتخاب کالوس‌های مقاوم از یک انتخاب تدریجی

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. برای ژن *bar* ابتدا محیط انتخاب ملایم (۵ میلی گرم/ لیتر PPT) N۶PPT۵، به مدت دو هفته به کار برده شد سپس بسته به سرعت رشد کالوس ۲ تا ۲۰ هفته در محیط قویتر) ۱۰ میلی گرم/ لیتر(PPT N۶PPT۱۰ پرورش داده شد. در محیط انتخابی PPT به خاطر جلوگیری از اثر خنثی کننده اسیدهای آمینه پایین دست، ال-پرولین حذف گردید.

در ادامه اثر سه رقم A۱۸۸، B۷۳ و S۶۱ بر روی درصد جنین‌های نارس کالوس زا به صورت طرح پایه کاملا تصادفی انجام شد.

رسیدگی و باززایی

بسته به روش تراری‌ختی و سرعت رشد کالوس، کالوس‌های مقاوم احتمالی از هفتهٔ پنجم (Fromm, 1994) تا دهم (Nakano *et al*., 1987) بعد از تراریختی به محیط رسیدگی (MS Maturation) حاوی محیط پایه MS (Murashige and Skoog.,1962)، ۱ میلی گرم/ لیتر IAA، ۰/۵ میلی گرم/ لیتر زئاتین، ۱/ میلی گرم/ لیتر ABA، ۱۰ میلی گرم/ لیتر PPT، ۶۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۸ گرم/ لیتر آگار منتقل شدند و در آن کالوس‌ها ۲ تا ۳ هفته در تاریکی ۲۷ درجه سانتیگراد از محیط غنی از ساکاروز تغذیه شده تا به اندازه کافی نشاسته ذخیره کرده و به خوبی برسند. سپس جنین‌های رویشی سفید رنگ اسکوتلوم دار از کالوس جدا شده به محیط باززایی حاوی محیط پایه MS، ۱ میلی گرم/ لیتر IAA، ۰/۵ میلی گرم/ لیتر زئاتین، ۰/۱میلی گرم/ لیتر ABA، ۰/۱ میلی گرم/ لیتر تیدیازوران، ۱۰ میلی گرم/ لیتر PPT، ۳۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۸ گرم/ لیتر آگار منتقل و در نور ۸۰ تا ۱۰۰ میکرومول در متر مربع در ثانیه قرار داده شدند تا گیاهچه‌های مقاوم به دست آید. پس از این که گیاهچه‌ها دارای یک برگچه و یکی دو ریشه چه شدند به محیط ریشه زایی حاوی محیط پایه MS، ۱۰ میلی گرم/ لیتر PPT، ۲۰ گرم/ لیتر ساکارز، ۶ گرم/ لیتر آگار داخل شیشه مربایی انتقال یافتند تا به ارتفاع ۷ تا ۱۲ سانتیمتر رشد کرده، تعدادی برگ و سیستم ریشه‌ای قوی تشکیل دهند (Armstrong *et al*., 1994). در تمامی این محیط‌ها شرایط شدید انتخاب حفظ شد و روش تراریختی محیط‌های رسیدگی، باززایی و ریشه دهی یکسان بود. پس از شستشوی ریشه از باقیماندهٔ محیط کشت با آب ولرم، گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان ۱۰ سانتیمتری محتوی مخلوط پرلیت، پیت به نسبت‌های ۲:۱ استریل منتقل شدند. به منظور جلوگیری از تبخیر و تعرق شدید یک کیسهٔ پلاستیکی شفاف استریل روی گلدان کشیده و با کش به لبهٔ بیرونی گلدان محکم شد. گلدان‌ها در اتاق رشد روشن به مدت چند هفته پرورش داده شد. بعد از یک هفته با تعبیهٔ چند سوراخ به گیاه اجازهٔ مبادلهٔ هوا با محیط داده شد و ظرف دو هفته کیسهٔ پلاستیکی به کلی برداشته شد. در این مدت گیاهچه‌ها از طریق آبی که در پای گلدان آن ریخته شد آب و مواد غذایی را به صورت محلول ۳ گرم درلیتر کود N.P.K دریافت داشت. گیاهچه‌ها پس از چهار برگی شدن به گلدان بزرگ ۱۰ لیتری حاوی ترکیبات فوق منتقل و به گلخانه برده شد.

استخراج DNA و آنالیز PCR

DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی ذرت با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا (سال ۱۹۸۳) استخراج شد. به برگ پودر شده با ازت، بافر استخراج (۱ µl)، SDS ۱۰% (۱۰۰ µl) اضافه کرده و ۱۵ در °C ۶۵ انکوبه کرده، ۳۰۰ µl پتاسیم استات ۵ مولار اضافه و ۲۰ روی یخ منتقل شد. نمونه ‹۲۵ در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوز شد و فاز رویی به دو تیوپ جدید منتقل گردیدند. ایزوپروپانول به نسبت ۱:۱ به تیوپ‌ها اضافه کرده و به مدت ۱-۰/۵ ساعت درون °C ۲۰- انکوبه گردید. سپس ‹۳۰ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب DNA با ۷۰۰ µl-۵۰۰ اتانول ۷۰% شستشو گردید. پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعات ۶۵۱ bp و ۵۰۰ bp به ترتیب ژن‌های *DREB1A* و *bar* شامل TCT-)F3 *DREB1A* (5''AGA GTT ACC TTA TCC AG-3) و R2 *DREB1A* (‹CTG-CAG CGT ACT AAA AAT G-3-‹5)، F *bar*

Archive of SID

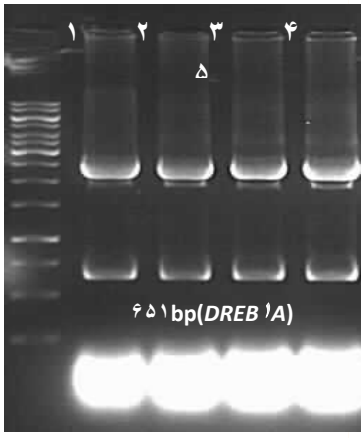
www.SID.ir

(‹CTC GAG TCA AAT CTC GGT GAC GGG- 3-´5)
و *bar* CGA GTC TAC CAT GAG CCC AGA-´5 R
ACG- 3›) می‌باشند. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹۴، به مدت ’۵، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ^{o}C ۹۴
به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ^{o}C ۶۱ به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن *DREB1A* و ^{o}C ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن *rd29A* و نهایتا یک چرخه بسط نهایی به مدت۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۷۲ بود.

نتایج و بحث

ساخت پلاسمید نوترکیب pCRDREB

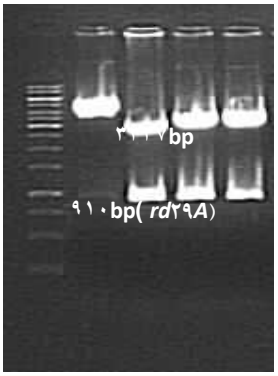
ژن *DREB1A* از پلاسمید نوترکیب pUC۱۸، پس از استخراج کلنی‌های سفید که در محیط LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده بودند، توسط هضم با آنزیم *Eco*RI خارج گردید (شکل ۲).



شکل ۲: هضم آنزیمی pUC۱۸ با*Eco*RI جهت خروج ژن *DREB1A*1. نشانگر اندازه 2.1 kb الی 5 pUC18 نوترکیب که با *Eco*RI هضم شده است

Figure 2: pUC18 digested with EcoRI for exit DREB1A gene 1. 1kb DNA Ladder. 2 to 5 pUC18 recombinant was digested with EcoRI

پیشبر *rd29A* پس از همسانه سازی در پلاسمید نوترکیب pUC۱۸– *DREB1A*، جهت تایید توسط آنزیمهای *Xba*I و *Hin*dIII مورد هضم قرار گرفت (شکل ۳).



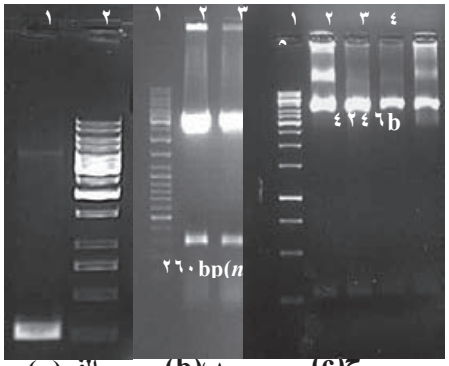
شکل۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pUC18- *DREB1A*-*rd29A*جهت خروج پیشبر *rd29A* باآنزیمهای *Xba*I و *Hin*dII
۱- نشانگر اندازه kb ۱، ۵-۲- هضم با دو آنزیم *Hin*dIII و *Xba*I

Figure 3: Enzymatic digestion of pUC18-DREB1A-rd29A plasmid for exit rd29A promoter with XbaI and HindIII 1. 1kb DNA Ladder, 2-5. digested with HindIII and XbaI

در ادامه پایانبر *nos* از ناقل بیانی pBI۱۲۱ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در توالیهای انتهایی دو سر آن به ترتیب از سمت چپ سایت برشی *Pst*I و سمت راست سایت برشی *Eco*RI تعریف شده بود توسط PCR تکثیر شد (شکل ۴ الف)، و توسط PCR Cloning Kit داخل ناقل همسانه سازی pTZ۵۷R/T کیت کلون گردید. سپس پایان بر *nos* که در ناقل همسانه سازی pTZ۵۷R کیت کلون شده بود با هضم به وسیله آنزیمهای *Pst*I و *Eco*RI خارج ’گردید (شکل ۴ ب). در ادامه پایان بر *nos* به ناقل همسانه ساز pUC۱۸--*DREB1A*-*rd29A* با استفاده از Rapid ligation kit الحاق شد. پس از انجام واکنش، مخلوط اتصال به درون باکتریهای مستعد *E.coli* با استفاده از شوک حرارتی تراریخته شد. پایان بر *nos* از پلاسمید نوترکیب pUC18- *DREB1A*-*rd29A*-*nos* پس از استخراج کلنی‌ها که در محیط LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده بودند، توسط هضم با آنزیم‌های *Pst*I و *Eco*RI خارج گردید (شکل ۵-ج).

Archive of SID

www.SID.ir



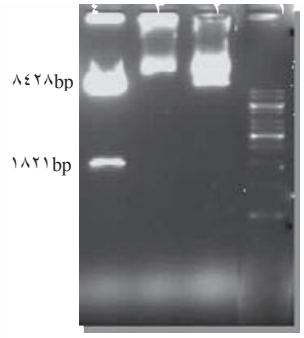
شکل۴: مراحل همسانه سازی پایان بر *nos*. الف: تکثیر پایانبر *nos* از داخل ناقل بیانی pBI۱۲۱ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ۱- تکثیر پایانبر *nos* از داخل ناقل بیانی pBI۱۲۱، ۲- نشانگر اندازه ۱.kb

ب. هضم آنزیمی ناقل همسانه ساز pTZ۵۷R جهت خروج پایانبر *nos* به وسیله آنزیمهای *Pst*I و *Eco*RI، ۱- نشانگر اندازه ۱kb، ۲-۳- هضم آنزیمی ناقل نوترکیب pTZ۵۷R جهت خروج پایانبر *nos*

ج: تایید حضور پایانبر *nos* داخل ناقل نوترکیب pUC۱۸-*DREB1A-rd29A-nos* توسط هضم با دو آنزیم *Eco*RI و *Pst*I. ۱- نشانگر اندازه kb ۱، ۲-۴- هضم آنزیمی ناقل pUC-rd-DREB با دو آنزیم *Eco*RI و *Pst*I

Figure 4: Stages of nos terminator cloning a: Amplification of *nos* terminator of pBI121 vector with specific primer 1: amplification *nos* terminator from pBI121 vector 2: 1kb DNA Ladder b: Digestion of pTZ57R recombinant vector with *Pst*I and *Eco*RI for exit *nos* terminator 1: 1kb DNA Ladder 2,3: pTZ57R recombinant vector digested with *Pst*I and *Eco*RI c: confirm the *nos* terminator in the pUC18-*DREB1A-rd29A-nos* recombinant vector by digestion with *EcoRI* and *Pst*I. 1 – 1kb DNA ladder 2-4 - pUC-rd-DREB vector digested with *Pst*I and *Eco*RI.

در انتها واکنش اتصال بین کاست ژنی *rd29A-DREB1A-nos* و ناقل بیانی pCAMBIA۳۳۰۰ صورت گرفت و پلاسمید نوترکیبpCRDREB ساخته شد. مخلوط اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E.coli* با استفاده از شوک حرارتی منتقل شد. باکتری‌های تراریخته روی محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین رشد کردند و کلنی تشکیل دادند. در انتها ناقل بیانی نوترکیب pCRDREB جهت تایید ورود کاست ژنی مورد نظر توسط آنزیم‌های *Hin*dIII و *Eco*RI مورد هضم قرار گرفت و کاست ژنی bp ۱۸۲۱ روی ژل بیانگر صحت ورود کاست در سازه نوترکیب بود. (شکل ۵).



شکل ۵: هضم آنزیمی ناقل بیانی pCRDREB با استفاده از آنزیمهای *Eco*RI و *Hin*dIII جهت تایید حضور کاست ژنی *rd29A- DREB1A-nos* که نمونه چاهک ۴ درست است. ۱- نشانگر اندازه kb ۱، ۴-۲- خروج قطعه bp ۱۸۲۱ در اثر هضم آنزیمی ناقل بیانی pCRDREB با استفاده از آنزیمهای *Eco*RI و *Hin*dIII

Figure 5: Digestion of pCRDREB binary vector using EcoRI and HindIII to confirm of *r*d29A-DREB1A-nos gene cassette that the sample 4 is true. 1 – 1kb DNA ladder, 2-4 – Extraction segment 1821 bp using digestion pCRDREB binary vector using EcoRI and HindIII

نقشه نهایی سازه نوترکیب pCRDREB که در تراریختی ذرت مورد استفاده قرار گرفت در شکل۶ ارائه شده است.

شکل ۶: جایگاه کاست ژنی داخل سازه نوترکیب pCRDREB

Figure 6: Location of the gene cassette inside the pCRDREB recombinant vector

Archive of SID
www.SID.ir

این سازه برای انتقال ژن به گیاهان مناسب بوده و ژن *DREB1A* به دلیل دارا بودن پیش بر و پایانبر قادر به رونویسی و ترجمه در ژنوم میزبان خواهد بود. همچنین این ناقل حاوی ژن *bar* مقاومت به علف کش است که برای انتخاب گیاه ذرت تراریخته کاربرد دارد.

تراریختی ذرت با سازه نوترکیب pCRDREB

نتایج انتقال ژن‌های *DREB1A* به جنین‌های نارس سه رقم، A188 S61 و B73 در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی انتقال ژن *DREB1A* به جنین‌های نارس سه رقم، A188 S61 و B73

Table 1: Results of the study of gene transformation using DREB1A gene into the Immature embryos of three cultivar A188, S61 and B73

ارقام cultivars	دفعات آزمایش Testing times	تعداد جنین های شلیک شده(A) The number of embryos is shot	تعداد جنین های کال زا The number of callus embryos	تعداد گیاهچه های باززا شده The number of regenerative seedlings	تعداد گیاهان PCR^+ (B) Number of plants PCR^+ (B)	بازده انتقال ژن(B/A) Gene transformation efficiency
S61	88.2.3	356	315	0	0	0
	88.3.2	73	51	0	0	0
	88.3.4	25	25	0	0	0
	88.3.6	134	106	0	0	0
	88.3.8	50	50	0	0	0
	88.3.10	66	50	0	0	0
	88.3.11	239	209	0	0	0
	88.3.12	82	76	0	0	0
	88.3.13	328	323	0	0	0
	88.3.15	16	16	0	0	0
B73						
	88.3.19	200	22	0	0	0
	88.4.3	140	16	0	0	0
	88.4.9	160	15	0	0	0
	88.4.11	250	36	0	0	0
A188						
	88.5.8	170	165	2	1	0.006
	88.5.8	100	99	1	1	0.01
	88.5.10	200	180	3	2	0.01

بازده انتقال ژن از تقسیم تعداد گیاهان PCR^+ واجد ژن‌های *DREB1A* و *bar* بر تعداد جنین‌های نارس شلیک شده ضرب در صد محاسبه شد. در ادامه تاثیر اثر رقم روی درصد جنین‌های نارس کالوس زا به صورت طرح پایه کاملا تصادفی انجام شد که تیمارهای مورد مطالعه عبارت بودند از سه رقم A۱۸۸، B۷۳ و. S۶۱ تجزیه واریانس تیمارهای مذکور روی درصد جنین‌های نارس کالوس زا در جدول ۲ آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

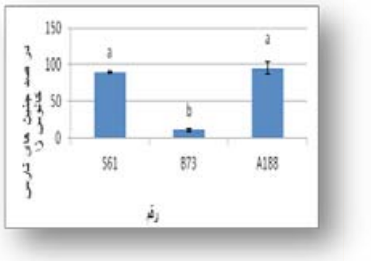
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر رقم روی درصد جنین‌های نارس کالوس زا

Table 2: Analysis of variance effect of cultivar on the percent immature embryos Forming callus

	درصد جنین های نارس کالوس زا the percent immature embryos Forming callus		
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F مقدار
رقم	2	6738.860	**831.058
خطا error	6	8.109	
CV%	4.37%		

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱%

جدول ۲ نشان می‌دهد بین اثر رقم و درصد جنین‌های نارس کالوس زا از نظر آماری اختلاف معنی‌داری



شکل ۷: اثر رقم روی درصد جنین‌های نارس کالوس زا

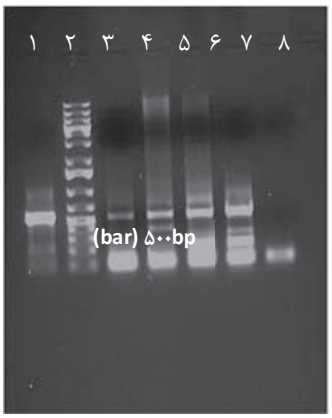
Figure 7: Effect of cultivar on the percentage of callus from immature embryos

حضور ژن *DREB1A* توسط روش PCR تایید شد (شکل ۹).

جدول ۲ نشان می‌دهد بین اثر رقم و درصد جنین‌های نارس کالوس زا از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به نمودار مقایسه میانگین رقم A۱۸۸ و S۶۱ درصد جنین‌های نارس کالوس زا بیشتری نسبت به رقم B۷۳ دارند (شکل ۷). نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با یک جفت آغازگر اختصاصی ژن *bar* و ژن *DREB1A*، ۴ گیاه از رقم A۱۸۸ باند مربوط به این دو ژن را نشان دادند.

آنالیز گیاهان تراریخت

حضور ژن ***bar*** با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش **PCR** در ۴ گیاه تایید شد (شکل ۸).



شکل ۸: انجام PCR بر روی گیاهچه‌های باززایی شده، ۱- پلاسمید، ۲- نشانگر اندازه kb ۱، ۳-۶- نمونه گیاهی تراریخت (باند bp ۵۰۰)، ۷- نمونه گیاهی شاهد، ۸- آب

Figure 8: PCR Analysis of regenerated plantlets. 1 - plasmid, 2-1kb DNA ladder, 3-6 – the transgenic plant(Bond 500bp), 7-control plant samples, 8-water

شکل ۹: انجام PCR بر روی گیاهچه‌های باززایی شده برای ژن DREB1A، ۱- پلاسمید، ۲- نشانگر اندازه kb۱، ۳-۵- نمونه گیاهی تراریخت (باند bp۶۵۱)، ۶- نمونه گیاهی شاهد، ۷- آب

Figure 9: PCR performed on putative transgenic plants for gene *DREB1A*, 1 - plasmid, 2-1kb ladder, 3-5, the transgenic plant(Bond 651bp), 6-control plant samples, 7-water

از سه رقم، A188 B73 و S61 که روی محیط N۶P کشت

www.SID.ir

شدند رقم B۷۳ که والد مادری هیبرید SC۷۰۴ است (بیش از ۹۰% مزارع کشور زیر کشت آن می‌باشد) مقدار کمی کالوس جنین زا تولید کرد ولی هیچ کدام طبق جدول ۱ باززا نشدند که بهینه سازی محیط کشت آن لازم می‌باشد. به کارگیری رقم S۶۱ به‌عنوان یک واسطه دارای این امتیاز است که بر خلاف ژنوتیپ‌های مذکور رقم S۶۱ برگزیده تجاری که استفاده از آن خطری از نظر انتقال ناخواسته ژن‌های مضر بوجود نخواهد آورد. درصد جنین زایی و باززایی در محیط‌های تغییر یافته‌ای که پایه N۶ دارند برای رقم S۶۱ مناسب هستند. این گونه محیط‌ها برای انتقال ژن به روش بمباران مناسب هستند (Koziel *et al*., 2003 , Frame *et al*.,2000, Frame *et al* 2002). در انتقال ژن به رقم S۶۱ پس از انتقال جنین‌ها به PPT ۵ و سپس ۱۰ میلی گرم در لیتر، در محیط‌های کالوس زایی و رسیدگی در تاریکی مقاومت در تعدادی از کالوس‌ها مشاهده شد اما پس از بردن به محیط باززایی و انتقال به نور از بین رفتند.

به دلیل واکنش خوب رقم A۱۸۸ به کشت بافت و تولید کالوس قابل باززایی در اکثر برنامه‌های تراریختی از این رقم استفاده می‌شود.

(Danilova *et al*., 2002 ; Comai and Stalker, 1986 ; D'Halluin *et al*, 1992).

ما ۶ گیاهچه باززاشده از رقم A188 به دست آوردیم که ۲ تا در مرحله انتقال به گلدان از بین رفتند و ۴ گیاه PCR^+ به دست آمد. پیش کشت جنین‌ها به مدت ۴ روز روی محیط N۶P کالوس زایی این سلول‌ها را تحریک کرده و هم تعداد سلول‌های مستعد را زیاد می‌کند و هم آنها را در معرض بمباران قرار می‌دهد.

(Brettschneider *et al*., 1997 ; Sardana *et al*., 1996)

در مطالعات اولیه که جنین تازه جدا شده، بلافاصله بمباران می‌شد به دلیل عدم استقرار و آسیب پذیری جنین در اثر شلیک راندمان تراریختی بسیار پایین بود (Klein *et al*., 1988). به همین دلیل تراریختی زمانی صورت می‌گیرد که سلول‌ها پس از چهار روز در محیط کشت رشد کرده به سطح رسیده باشند تا راحت تر هدف بمباران قرار گیرند (Brettschneider R, 1997). مرحله استراحت بدون انتخاب گر که در این تحقیق بکار برده شد به سلولهای تراریخته فرصت می‌دهد تا خسارت ناشی از بمباران را بازسازی کرده تا بتواند به رشد و تقسیم خود ادامه بدهند. تراژن در مدت این یک هفته به کروموزوم ملحق می‌گردد. (Fromm, 1994) مطالعات قبلی نشان داده بود که ژن *nptII* انتخاب گر مناسبی برای تراریختی ذرت نیست. ژن *bar* که آنزیم فسفینوتریسین-N-استیل ترانسفراز (PAT) را کد می‌کند، تحمل به PPT-L را در گیاهان تراریخته ارائه می‌دهد. ژن *bar* به همراه پیشبرهای گیاهی، یک ژن نشانگر ااابل گزینش موثر در *Brassica napus* و *Brassica olera-cea* می‌باشد (DeBlock *et al*., 1989). استفاده از ژن *bar* علاوه بر این که به‌عنوان انتخاب گر از شایستگی بیشتری برای تراریختی ذرت برخوردار است این امکان را نیز فراهم می‌سازد که از آن به صورت یک ژن تجاری برای مقاومت به علف کش کامل گلایفوزینیت آمونیوم هم استفاده کرد. به همین دلیل از میان این دو، ژن انتخاب گر *bar* برای غربال گیاهان تراریخته برگزیده شد. ال- پرولین به علت این که اثر کشندگی PPT را خنثی می‌کند از محیط‌های انتخابی حذف شد. استفاده از محیط ملایم در آغاز انتخاب، هم از شوک ناگهانی ناشی از دوز کشندهٔ علف کش که با کشتن سلول‌های در برگیرندهٔ سلول‌های تراریخته آنها را نیز می‌کشد جلوگیری می‌کند و هم شرایط تحریک بیان ژن انتخاب گر را فراهم می‌آورد. محیط شدید انتخابی بعدی با کشتن سلول‌های غیر تراریخته اجازه می‌دهد سلول‌های تراریخته‌ای که توانایی بیان ژن مقاومت به علفکش را دارند به رشد انتخابی خود ادامه دهند (Somers and Hibberd., 1994). یکی از مسائلی که در انتخاب با PPT وجود داشت رشد زیاد کالوس‌ها بود. به نظر می‌رسد این عمل ناشی از اثر شبه اکسینی آن باشد که باعث تاخیر در باززایی شد. (Co-mai and Stalker, 1986) بنابراین بررسی بیشتری دربارهٔ اثر متقابل آن با اکسین‌ها مخصوصًا D-۲,۴ شاید بتواند چنین

Archive of SID

www.SID.ir

مشکلی را حل کند. پرورش کالوس‌های انتخابی در محیط رسیدگی غنی از ساکارز و در تاریکی ضمن کمک به تشکیل ساختارهای جنینی، سبب تجمع نشاسته می‌شود. ذخیرهٔ نشاسته در سیتوپلاسم در هنگام رشد و نمو کلروپلاست‌ها و شروع زندگی خودکفای‌ی گیاهچه‌ها لازم است. در این هنگام معمولا یک رژیم فتوپریودی ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب نیاز است تا نور شدید دائم گیاهچه‌های ضعیف کشت بافتی را از بین نبرد. (Armstrong, 1994)

کاهش غلظت علف کش PPT از ۱۰ میلی گرم به نصف توصیه می‌شود چون به نظر می‌رسد علت مرگ جنین‌های رسیده که در شرایط تاریکی مقاومت نشان دادند اما پس از انتقال به نور مردند، تاثیر نور در افزایش شدت اثر PPT باشد. غلظت کم نمک‌ها و آگار محیط کشت ریشه زایی هم از فشار اسمزی شدید بر گیاهچه‌ها جلوگیری می کند و هم ریشه‌ها به آسانی از محیط کشت جدا می‌شوند. شرایط شدید انتخاب ممکن است سبب مرگ گیاهچه‌های سبز مشکوک به تراریختی شده باشد. در این صورت ریشه زایی در محیط فاقد انتخاب گر به نظر می‌رسد بتوا ند مشکل را حل کند (Somers *et al*., 1994). البته در مورد مقاومت به علفکش فسفینوتریسین این کار ممکن است فراوانی گیاهان فراری را افزایش دهد زیرا محققینی که از ژن *bar* برای انتخاب استفاده کرده‌اند امکان بر آمدن گیاهان غیر تراریخته ناشی از انتخاب (فرار) آن را حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد برآورد کرده‌اند. (Bohorova *et al*., 2001 , Sawahel W 2002 , Bohorova *et al*., 1999)

Archive of SID

www.SID.ir

References **منابع**

Armstrong, C., G. Parker, J. Pershing, S. Brown, P. Sanders, D. Duncan, T. Stone, D. Dean, D. DeBoer, J. Hart, A. Howe, F. Morrish, M. Pajeau, B. Peterson, B. Reich, R. Rodriguez, C. Santino, S. Sato, W. Schuler, S. Sims, S. Stehling, L. Tarochione, M. Fromm, 1995. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringeneinsis*. Crop Sci. 35: 550-570.

Armstrong, C. L. 1994. Regeneration of plants from somatic cell cultures: application for *in vitro* genetic manipulation. In: The Maize Handbook Freeling M, Walbot V, eds. Springer-Verlag, New York, Inc. 663-671.

Bohorova, N., R. Frutos, M. Royer, P. Estanol, M. Pacheco, Q. Rascon, S. McLean, D. Hoisington, 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringensis* cry1B and cry1B-cry1Ab translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armywarm in transgenic tropical maize. Theo Appl Genet. 103/6-7: 817-826.

Bohorova, N., W. Zhang, J P. ulstrum, S. McLean, B. Luna, RM. Brito, L. Diaz, M. E. Ramos, P. Estanol, M. Pacheco, M. Salgado, D. Hoisington, 1999. Production of transgenic tropical maize with *cry1Ab* and *cry1Ac* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. Theo Appl Genet. 99: 437-444.

Bray, E. A., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk, 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones, eds), pp. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md. 1158-1203.

R. Brettschneider, D. Becker, H. Lorz, 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. Theor Appl Genet. 94: 737-748.

Chu, C. c., C. S. Sun, 1975. Establishment of an efficient medium for anter cultire of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18:659.

Comai, L., D. Stalker, 1986. Mechanisms of herbicide resistance and their manipulation. Oxford Survey of Plant Mol. Cell. Biol. 3: 166-173.

Cushman, J. C., H. J. Bohnert, 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Curr Opin Plant Biol. 3: 117–124.

Danilova, S. A., Yu. I. Dolgikh, E. S. Osipova, N. S. Lyapkova, A. V. Kibardin, 2002. *Agrobacterium tumefaciense*-meiated transformation of maize. Maize Genetics Coopration Newsletter. 76:47-54.

DeBlock, M., D. De Brower, P. Tenning, 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Bras-*

Archive of SID

www.SID.ir

sica oleracea using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. Plant Physiol. 91: 694–701.

D'Halluin, K. D., E. Bonne, M. Bossut, M. DeBeuckeleer, J. Leemans, 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. The Plant Cell. 4: 1495-1505.

Flowers T. J, M. L Koyama, S. A Flowers, C Sudhakar, K. P Singh, A. Yeo R 2000. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. J Exp Bot. 51: 99–10628.

Frame, B. R., H. Shou, , , R. K. Chikwamba, Z. Zhang, C. Xiang, T. M. Fonger, S. E. K. Pegg, Li, B., D. S. Nettleton, D. Pei, K. Wang, 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiology. 129: 13-22.

Frame, B., Z. Zhang, S. M. Cocciolone, , L. V. Sidorenko, C. R. Diatrich, S. E. Pegg, S. F. Zhen, P. S. Schnable, K. Wang, 2000. Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In vitro* Cellular and developmental Biology-Plant. 36/1: 21-29.

Fromm, M. 1994. Production of transgenic maize plants via microprojectile-Mediated gene transfer. In: The Maize Handbook – M. Freeling, V. Walbot, eds. Springer-Verlag, New York, Inc. 677-684.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*. 17: 287-291.

Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and Stress-Inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer, *Plant Cell Physiology*. 45: 346-350.

Klein, T. M., Fromm, M. E., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M., Sanford, J. C. 1988. Transfer foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4305-4309.

Koziel, M., Desai, N., Lewis, K., Kramer, V., Warren, G., Evola, S., Crossland, L. D., Wright, M., Merlin, E., Launis, K., Rothstein, S. J., Bowman, C., Dawson, J., Dunder, E., Pace, G. M., Suttie, J., Carzzi, N., De Framond, A., Linder, J. O., Miller, R. L., Skillings, B. W, Mousel, A. W., Hornbrook, A. R., Clucas, P., Meghji, M. R., Tanner, A. H., Cassagne, F. E., Pollini, G., Colbert, T. R., Cammak, F. P. 2003 . Method of producing transgenic maize using direct transformation of commercially important genotypes. US Patent & Trademark Of-

Archive of SID

www.SID.ir

fice, US Patent Application. 20030237117/A1.

Langridge, ge. p. paltridge., N. and fincher, G. 2006. functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. 4(4): 343-354.

Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys. 444: 139-158.

Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum,* 15: 473-497.

Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinachychloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation bmonodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiol. 28: 131–140.

Pellegrineschi, A., Noguera, L. M., Skovmand, S., Brito, R. M., Velazquez, L., Hernandez, R., Warburton, M., and Hoisington, D. 2002. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. Genome. 45:430–421 .

Ribaut, J. M. D., Gonz, L. C. 1997. In Identification and transfer of ASI quantitative trait loci (QTL): A strategy to improve drought tolerance in maize lines and populations. Paper presented at the In Edmeades GO, M. 392-395. Mexico, D. F. : CIMMYT.

Sambrook, J. and Russel, D. W. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Sardana, R., Dukiandjiev, S., Giband, M., Cheng, X., Cowan, K., Sauder, C., Altossar, I. 1996. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b & c) by expression in maize endosperm culture. Plant cell Reports. 15: 677-681.

Sawahel, W. 2002. Production of herbicide-resistant transgenic maize plants usin electroporation of seed-derived embryos. Plant Molecular Biology Reporter (electronic version). 20: 303a-303h.

Smirnoff N 1998. Plant resistance to environmental stress. Curr Opin Biotechnol. 9: 214–219.

Somers, D. A., Hibberd, K. A. 1994. In vitro selection. in: The Maize Handbook – M Freeling, V Walbot, eds. Springer-Verlag, New York, Inc. 685-689.

Sreenivasulu, N., Sopory, S. K. and Kavi Kishor, P. B. 2007. Deci phering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene. 388: 1-13.

Wang, W. X., Pelah, D., Alergand, T., Shoseyov, O., Altman, A. 2001. Denaturate stable and/or protease resistant, chaperonelike oligomeric proteins, polynucleotides encoding same and their uses. Provisional Patent Application No. 60/272,771,USA.

Archive of SID

www.SID.ir