مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بهینه سازی ارگانوژنز نابجا به شیوهی یک و دو مرحلهای جهت انتقال ژن به روش آگروباکتریوم به گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.)

کیمیا کاشانی[۱]، مختار جلالی جواران*[۲]، احمد معینی[۳]، مهدی محب الدینی[۴]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
[۲ و ۳] دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
[۴] استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی
[۱، ۲ و ۳] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۴] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

سابقه و هدف: سیستمهای گیاهی دارای پتانسیلهای بالایی در تولید ایمن، اقتصادی، ارزان و در مقیاس زیاد زیست داروها هستند. گیاه سیب زمینی یک بیورآکتور مناسب و گزینهی بسیار خوبی برای دستورزیهای ژنتیکی است. باززایی سریع و موثر، اولین و مهم ترین نیاز پس از تراریخت سازی ریز نمونه هاست.

مواد و روش ها: پس از بررسی محیطهای کشت یک و دو مرحلهای مختلف و محاسبهی درصد باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی ارقام دزیره، اگریا و مارفونای گیاه سیب زمینی، بهترین محیطهای کشت یک و دو مرحلهای برای هر یک از این ارقام معرفی و ژن پروانسولین انسانی به روش انتقال به وسیلهی *Agrobacterium tumefaciens* به ژنوم هستهای این گیاه منتقل شد.

یافته ها: میزان هورمونهای زآتین ریبوزاید، نفتالن استیک اسید و جیبرلیک اسید مورد نیاز برای حصول حداکثر باززایی در محیط های مرحلهی اول کشت دو مرحله ای در ارقام دزیره، اگریا و مارفونا به ترتیب (۳، ۰/۱، ۰/۰۲)، (۳، ۰/۱، ۰/۰۲) و (۳/۵، ۰/۱، ۰/۰۲) و در محیط های کشت یک مرحله ای به ترتیب (۴، ۰/۰۲، ۰/۰۵)، (۳، ۰/۰۲، ۰/۰۵) و (۴، ۰/۰۲، ۰/۰۵) میلی گرم در لیتر به دست آمد. در محیطهای کشت مرحله دوم دو مرحله ای نیز میزان هورمون زآتین ریبوزاید و نفتالن استیک اسید به ترتیب به بیست در صد کمتر و یک دهم مقدار مورد استفاده در محیطهای کشت مرحلهی اول کاهش یافت. بررسی گیاهان تراریخت در سه سطح (DNA، RNA و پروتئین) انجام شد.

نتیجه گیری: بهینه سازی ارگانوژنز نابجا در گیاه سیب زمینی (ارقام دزیره، اگریا و مارفونا) میتواند در زمینههای مختلف از جمله انتقال ژنهای گوناگون به این ارقام مورد استفادهی سایر محققین قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کشاورزی مولکولی، *Agrobacterium tumefaciens*، سیب زمینی تراریخته، پروانسولین انسانی و دیابت

مقدمه

توانایی بافت‌های گیاهی را برای ایجاد اندام‌های نابجا و جدید ارگانوژنز گویند. بافت‌های گیاهان، تحت شرایط خاص هورمونی در حالت درون شیشه‌ای می‌توانند از تمایز خارج شوند و مسیر تکاملی دیگری را پیش گیرند. این بافت‌ها قادرند انواع پریموردیوم‌هایی را که به جنین، برگ، گل، نوساقه و ریشه تبدیل می‌شوند، تولید نمایند. در حقیقت سلول یا سلول‌هایی به نام پیش‌ساز وارد مرحله تقسیم شده و توده‌ای از سلول‌های مریستمی با دیوارههای نازک، واکوئل‌های کوچک و ابعاد ایزودیامتریک به نام مریستموئید را تولید می‌نمایند. این مریستموئیدها در اوایل نمو پریموردیوم‌هایی را ایجاد می‌کنند که در نهایت به جنین، برگ، گل، نوساقه و ریشه تبدیل می‌شوند (۳۴). باززایی سریع و موثر، اولین و مهم ترین نیاز پس از تراریخت سازی ریز نمونه هاست. باززایی گیاه سیب زمینی از طیف وسیعی از قطعات ریز نمونه مانند برگ، میان گره و ریز غده قابل انجام و بررسی است. اما بسته به نوع محیط کشت و ترکیبات آن میزان باززایی برای هر رقم و هر یک از

آدرس نویسنده مسئول : گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
Email :m_Jalali@modares.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۷

Archive of SID
www.SID.ir

قطعات ریز نمونه متفاوت و درصد باززایی به شدت به ژنوتیپ وابسته است (۲، ۹). در روش‌های متداول برای انتقال ژن به گیاه سیب‌زمینی، از بخشهای مختلف گیاه مثل قطعات برگ (۶، ۱۲، ۱۸، ۱۹)، میان گره (۵، ۳۵) و ریز غدّه (۲۲، ۳۷، ۴۴) استفاده شده که به تولید موفقیت آمیز گیاهان تراریخت انجامیده است. با این وجود هر یک از این روش‌ها محدودیت‌هایی دارند که از آن جمله می‌توان به قابلیت محدود تراریختی، باززایی کم، وقوع تنوع سوماکلونال به ویژه در سطح پلوئیدی و وابستگی بسیار زیاد به نوع رقم و ژنوتیپ سیب‌زمینی اشاره کرد (۲۱). در اواخر دهه‌ی هشتاد میلادی، تکنولوژی DNAی نوترکیب و تولید پروتئینها در گیاهان مورد استفاده قرار گرفت و سیستم-های بیان گیاهی قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان-تر و ایمن‌تر شدند. تولید زیست داروها و پروتئین‌های مهمّ و کاربردی، از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی می‌نامند (۳۳). باکتری خاکزی *Agrobacterium tumefaciens* در طبیعت و روی بسیاری از گونه های مهم گیاهان زراعی فعالیت کرده و بیماری گال طوقه ایجاد میکند. این باکتری حین آلوده سازی، نسخه های تک رشتهای از T-DNA ی خود را در ژنوم میزبان تلفیق میکند (۱۶، ۱۷، ۳۰، ۴۱). تیپ وحشی T-DNA شامل ژن های متعددی است که وظیفهی بیوسنتز اکسین وسیتوکینین را عهده دار هستند و بیان آن ها در سلول های آلودهی گیاهان، تکثیر غیر عادی سلول ها را موجب میگردد. تومورها به کمک سایر ژن های کد شده توسط T-DNA، قادر به ساختن و ترشح اپینها و نیز مشتقات آمینواسیدهایی خواهند بود که سلولهای گیاه میزبان را به کارخانههای تولید مواد غذایی برای آگروباکتریوم بدل خواهند کرد (۱۰). به دلیل دامنهی وسیع میزبانی، آگروباکتریوم به عنوان ابزاری قدرتمند در دستورزی ژنتیکی بسیاری از گونه های گیاهی و تعدادی از گونه های قارچی عمل میکند (۲۳). دیابت قندی بیماری نسبتاً شایعی است که حاصل کمبود ترشّح یا ضعف عملکرد انسولین است. در کشورهای صنعتی بیماری دیابت نوع یک، پس از بیماریهای قلبی – عروقی و سرطان، سوّمین عامل مرگ و میر است (۴). حدود ۰/۷درصد از جمعیّت جهان از بیماری دیابت وابسته به انسولین (IDDM) رنج میبرند (۴۲). این بیماری در قرن بیست و یکم، به صورت فزایندهای در حال افزایش است. تخمین زده میشود که در بیست و پنج سال آینده شیوع این بیماری به دو برابر میزان کنونی خود برسد و حدود سیصد میلیون نفر از مردم جهان را گرفتار کند (۲۰). ضمناً استفاده از شیوههای غیرتهاجمی مثل رساندن انسولین از طریق ریه، بینی و دهان به فرد بیمار، اگر چه ممکن است مقبول واقع شوند، ولی احتمال دارد برای جبران کاهش میزان جذب، مقدار مصرف بیشتری بطلبند. این شواهد حاکی از افزایش تقاضای این هورمون در آیندهای نه چندان دور خواهد بود. به طوری که برای این افزایش تقاضا رشدی معادل ۳ تا ۴ درصد در سال پیشبینی میشود. روبهرو شدن با این میزان تقاضا، لزوم توسعه روشهای نوین، ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیّت تولید بالا را در آیندهای نه چندان دور نشان میدهد (۲۹، ۲۴). هم اکنون تولید تجاری انسولین در *Escherichia coli* (۷) و یا در *Saccharomyces cerevisiae* (۴۰) صورت می-گیرد. با وجود آن که این سیستمهای تجاری طیّ دو دهه اخیر، مراحل بهینه سازی سختی را پشت سر گذاشتهاند و به تولید حدود پنج تن هورمون انسولین در سال رسیدهاند، ولی آینده نیازها و خواستههای بیشتری دارد. طبق بررسیهای به عمل آمده میزان انسولین مورد نیاز بیماران دیابتی، با احتساب مبتلایانی که در مراحل ابتدایی بیماری هستند، افزایش ۳ تا ۴ درصدی تعداد بیماران دیابتی در سال و تمایل به استفاده از شیوه-های جایگزین تزریق (که کاهش جذبی معادل پنج تا بیست برابر به همراه دارند) افزایش خواهد یافت (۳، ۲۹). برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌توان از گیاهان مختلفی استفاده کرد. سیب‌زمینی از جمله گیاهانی است که دارای مزایای متعددی در این زمینه است. از جمله مزایای این گیاه میتوان به تولید ریز غدّههای تراریخت در شرایط کاملاً کنترل شده (اتاقهای رشد) اشاره کرد. بر خلاف بسیاری از گیاهان گیاه سیب زمینی نیازی به کاشت در سطح مزرعه ندارد. این موضوع احتمال خورده شدن گیاه تراریخت توسّط حیوانات، امکان فرار ژن و احتمال دگرگشنی با دیگر گیاهان هم خانواده را کاهش میدهد و به فراخور آن ایمنی تولید این گیاه تراریخت افزایش مییابد. از مزایای دیگر این گیاه میتوان به امکان کنترل بهتر عوامل محیطی موثّر، عدم وابستگی به فصل رشد، وجود ترکیبات فنلی کمتر و کمپلکسهای لیپیدی و پروتئینی سادهتر در غدّه-

Archive of SID

www.SID.ir

های سیب زمینی نسبت به برگهای سبز این گیاه، خاصیت انبارداری بالای غدهها، عدم وجود متابولیتهای ثانویه فعال از نظر فارماکولوژی در غدههای سیب زمینی، دستورزی ژنتیکی نسبتاً آسان این گیاه، تولید مستمر غده که میتواند به فرآیند پایین دست نیز وابسته باشد، امکان تکثیر گیاهچه های استریل تراریخت سیب زمینی به وسیله جوانههای جانبی و تولید گیاهچه های کاملاً یکنواخت در شرایط درون شیشهای در مقیاس تجاری اشاره کرد (۱۳). انسولین یک پلیپپتید ۵۱ اسیدآمینهای است. این هورمون به صورت پریپروانسولین در سلّولهای بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده تولید میشود. پری پروانسولین تک زنجیرهای، دارای ۱۰۶ اسیدآمینه و پیشساز پروانسولین است. در پریپروانسولین بخشی به نام سیگنال پپتید وجود دارد که موجب هدایت آن به درون شبکه آندوپلاسمی میشود. پریپروانسولین در اثر فعّالیّت آنزیمی و با از دست دادن سیگنال پپتید به پروانسولین تبدیل میشود. (۱۴). پروانسولین پیش-ساز فرم فعّال انسولین است و تنها ۱۰٪ از فعّالیّت انسولین را داراست، به نحوی که قندخون را کندتر از انسولین پایین میآورد، ولی به دلیل نیمهعمر بیشتر آن نسبت به انسولین در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۰۱۹۹ از پروانسولین به عنوان جایگزین انسولین استفاده میشد (۳۲).

مواد و روش ها

برای تولید انبوه گیاهچه های استریل سیب زمینی، غدّههای بذری گیاه سیب زمینی رقم دزیره از مرکز تحقیقات سیب زمینی استان خراسان رضوی و غدههای بذری ارقام اگریا و مارفونا از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیّه گردید. غدّه-های تهیّه شده پس از شستشو و ضد عفونی سطحی درون گلدانهای اتوکلاو شده، محتوی خاک استریل با ترکیب پیت موس، ماسه و خاک سبک به نسبت ۱:۱:۱ در شرایط ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد کشت گردید. از جوانههای جانبی این گیاهان پس از ۳-۴ هفته برای تهیّهی گیاهچه های استریل استفاده شد. محیط کشت تکثیر به صورت مخلوط نمکها و ویتامینهای MS، به اضافه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار در لولههای آزمایش تهیّه و در نهایت pH این محیط روی ۵/۸ تنظیم شد (۲۸). جوانه های جانبی گیاهان گلخانهای سیب زمینی تحت شرایط استریل، پس از ۳۰ ثانیه ضد عفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد، ۵ تا ۸ دقیقه ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و سه بار آب شویی با آب مقطّر استریل توسّط کاغذهای صافی استریل خشک شده و به محیطهای کشت MS تهیّه شده در لولههای آزمایش جهت تکثیر انتقال یافتند. گیاهچه ها در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، در دمای ۱ ± ۲۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (۲۵).

تهیّه محیط کشت یک مرحلهای برای باززایی نوساقه

محیط کشت فوق به شرح زیر تهیه گردید:

نمک های MS (۲۸)، ویتامینهای B_5 (۱۵)، ۱ میلی گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۱ میلی گرم در لیتر پیریدوکسین - HCL، ۱ میلی گرم در لیتر (به صورت استوک) تیامین - HCL و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (به صورت مستقیم) میواینوزیتول،۴۰ میلی گرم در لیتر آدنین سولفات، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر مانیتول و ۸ گرم در لیتر آگار.

pH این محیط روی ۵/۷ تنظیم گردید و برای تعیین بهترین رقم سیب زمینی از نظر باززایی نوساقه از میان ارقام دزیره، اگریا و مارفونا در این محیط کشت و نیز تعیین بهترین غلظت هورمون زآتین ریبوزاید به ترتیب زیر عمل شد:

هورمون جیبرلیک اسید به میزان ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر پس از اتوکلاو و رسیدن محیط کشت به حدود دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و به صورت فیلتر استریل شده اضافه گردید. هورمون نفتالن استیک اسید به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر قبل از اتوکلاو اضافه شد و هورمون زآتین ریبوزاید در سه سطح ۲/۵ ، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت (۴۴) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- ترکیبات هورمونی محیط یک مرحلهای باززایی نوساقه

شماره تیمار	زآتین ریبوزاید (میلی گرم در لیتر)	نفتالن استیک اسید (میلی گرم در لیتر)	جیبرلیک اسید (میلی گرم در لیتر)
۱	۲/۵	۰/۰۲	۰/۰۵
۲	۳	۰/۰۲	۰/۰۵
۳	۴	۰/۰۲	۰/۰۵

ترکیبات هورمونی محیط کشت دو مرحلهای باززایی نوساقه

محیط کشت دو مرحله ای بر پایهی MS و برای تعیین بهترین غلظت هورمون های مورد نیاز برای باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی ارقام دزیره، اگریا و مارفونا تهیّه گردید. برای

Archive of SID

www.SID.ir

تهیّه‌ی این محیط کشت، نمک ها و ویتامینهای MS (۲۸) مورد استفاده قرار گرفت، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار افزوده شد و pH محیط روی ۵/۸ تنظیم گردید. هورمونهای مورد نیاز برای محیط مرحله اوّل شامل نفتالن استیک اسید، جیبرلیک اسید و زآتین ریبوزاید بود که برای تعیین بهترین غلظت این هورمونها و نیز تعیین بهترین رقم سیب زمینی برای باززایی میان گره گیاهچه های استریل ۳ تا ۴ هفتهای ارقام سیب زمینی مورد آزمایش به صورت زیر عمل گردید. هورمون جیبرلیک اسید به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر۰ ثابت در نظر گرفته شد، هورمون نفتالن استیک اسید در دو سطح ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر و هورمون زآتین ریبوزاید در چهار سطح ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ میلی گرم در لیتر بر روی باززایی ارقام اگریا، مارفونا و دزیره مورد بررسی قرار گرفت. در محیط کشت مرحله دوّم میزان هورمون نفتالن استیک اسید به یک دهم مقدار مورد استفاده در مرحله اوّل کاهش یافت و هورمون زآتین ریبوزاید به اندازه ۲۰٪ کمتر از مقدار مورد استفاده در مرحله اوّل استفاده گردید. لازم به ذکر است ریزنمونه ها پس از ۱۲ روز از محیط مرحله اوّل به محیط مرحله دوّم انتقال یافتند. ضمناً هورمون های جیبرلیک اسید و زآتین ریبوزاید پس از اتوکلاو و هنگامی که دمای محیط کشت به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسید و پس از استریل کردن به وسیله فیلتر سر سرنگی (۰/۴۵ میکرومتر) به محیط کشت افزوده گردیدند (۲۵) (جداول شماره ۲ و ۳).

جدول شماره ۲- ترکیبات و غلظتهای هورمونی محیط کشت مرحله اوّل باززایی نوساقه

شماره تیما	زآتین ریبوزاید (میلی گرم در لیتر)	نفتالن استیک اسید (میلی گرم در لیتر)	جیبرلیک اسید (میلی گرم در لیتر)
۱	۲/۵	۰/۱	۰/۰۲
۲	۳	۰/۱	۰/۰۲
۳	۳/۵	۰/۱	۰/۰۲
۴	۴	۰/۱	۰/۰۲
۵	۲/۵	۰/۲	۰/۰۲
۶	۳	۰/۲	۰/۰۲
۷	۳/۵	۰/۲	۰/۰۲
۸	۴	۰/۲	۰/۰۲

جدول شماره ۳- ترکیبات و غلظتهای هورمونی محیط کشت مرحله دوّم باززایی نوساقه

شماره تیمار	زآتین ریبوزاید (میلی گرم در لیتر)	نفتالن استیک اسید (میلی گرم در لیتر)	جیبرلیک اسید (میلی گرم در لیتر)
۱	۲	۰/۰۱	۰/۰۲
۲	۲/۴	۰/۰۱	۰/۰۲
۳	۲/۸	۰/۰۱	۰/۰۲
۴	۳/۲	۰/۰۱	۰/۰۲
۵	۲	۰/۰۲	۰/۰۲
۶	۲/۴	۰/۰۲	۰/۰۲
۷	۲/۸	۰/۰۲	۰/۰۲
۸	۳/۲	۰/۰۲	۰/۰۲

تهیهی محیط های هم کشتی و باززایی، طویل سازی و ریشه زایی برای رقم دزیره

محیط های هم کشتی و باززایی نوساقه به ترتیب به منظور رشد همزمان آگروباکتریوم و سلّولهای میان گرهی گیاه سیب زمینی و باززایی نوساقه از ریزنمونه های میان گرهی این گیاه مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیب محیط های هم کشتی و باززایی، طویل سازی و ریشه زایی یک مرحله ای مورد استفاده به قرار زیر بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴- ترکیبات محیط کشت طویل سازی و ریشه زایی

ترکیبات	غلظت در محیط کشت		
	نو ساقه زایی	طویل سازی و ریشه زایی	
هم کشتی			
نمکهایMS	۱ X	۱ X	۱ X
ویتامینهای B_5	۱ X	۱ X	-
ویتامینهای MS	-	-	۱ X
آدنین سولفات	۴۰ mg L^{-1}	۴۰ mg L^{-1}	-
گلوکز	۲۰ g L^{-1}	۲۰ g L^{-1}	-
مانیتول	۲۰ g L^{-1}	۲۰ g L^{-1}	-
ساکارز	-	-	۳۰ g L^{-1}
جیبرلیک اسید	۰/۰۵ mg L^{-1}	۰/۰۵ mg L^{-1}	-
نفتالن استیک اسید	۰/۰۲ mg L^{-1}	۰/۰۲ mg L^{-1}	-
زآتین ریبوزاید	۴ mg L^{-1}	۴ mg L^{-1}	-
آگار	۸ g L^{-1}	۸ g L^{-1}	۸ g L^{-1}
سفوتاکسیم	-	۵۰۰ mg L^{-1}	۵۰۰ mg L^{-1}
هیگرومایسین	-	۱۰ mg L^{-1}	۱۰ mg L^{-1}

باکتری مورد استفاده

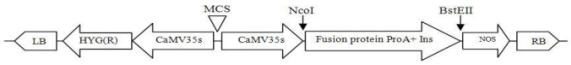
در این تحقیق از *Agrobacterium tumefaciens* سوش LBA4404 برای انتقال ژن استفاده شد. سوش مذکور حاوی ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 است. این ناقل بیانی به طول ۱۲/۵ kb دارای ژن مقاومت به کانامایسین NPT II، جهت بیان در باکتری و برای گزینش کلون های باکتریایی و ژن مقاومت به هیگرومایسین جهت ایجاد مقاومت در گیاه، پیشبرنده CaMV 35S و توالی خاتمه دهنده نسخه برداری Nos، ژنهای بتاگلوکورونیداز (GUS) و (GFP) در جلوی پروموتر 35 s و همچنین محلهای برشی آنزیمهای Nco I و Bst II برای جایگزین کردن ژن مورد نظر به جای ژنهای گزارشگر است.

همچنین ژن پروانسولین انسانی و فیوژن پروتئین متصّل به آن (این فیوژن پروتئین متصّل شونده به ایمونوگلوبولین G، فیوژن پروتئین A نام دارد و از باکتری *Staphylococcus aureus* گرفته شده است. این پروتئین، باعث بیان بالا و

Archive of SID

www.SID.ir

پایداری پروانسولین نوترکیب تولید شده در باکتری میشود و در روشهای تخلیص بر پایه کروماتوگرافی به دام افتاده و به خالص سازی آسانتر پروانسولین انسانی متّصل به آن منجر میگردد.) که دارای کاست ژنی زیر است در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس در محل ژن های گزارشگر کلون شده است. لازم به ذکر است توالی مربوط به پروتئین A، متصّل شونده به ایمونوگلوبولین G، در انتهای '۵ و توالی مربوط به ژن پروانسولین انسانی در انتهای '۳ توالی الگو قرار گرفته است (۲۱) (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- کاست ژنی حاوی ژن پروانسولین انسانی که در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 در محل ژن های گزاشگر جای گرفته است

تعیین آستانهی تحمّل ارقام سیب زمینی مورد آزمایش نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین

برای تعیین آستانه تحمّل ارقام مورد بررسی سیب زمینی نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین از محیطهای باززایی نوساقه یک و دو مرحلهای حاوی ۰، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین استفاده گردید. ریز نمونه های میان گرهی بدون خراش گیاهچه های استریل سه تا چهار هفتهای این ارقام در محیطهای فوق قرار گرفتند و پس از باززایی ۱۰۰ درصد محیط شاهد (بدون آنتی بیوتیک هیگرومایسین)، آستانهی تحمّل ارقام مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین تعیین گردید.

تراریخت سازی گیاه سیب زمینی با استفاده از آگروباکتریوم

میانگره های ۶- ۴ میلی متری گیاهچههای سه تا چهار هفتهای رقم دزیره سیب زمینی که قطر آن ها بیش از ۲ میلیمتر بود، برای انتقال ژن انتخاب شد. ۱۰ میلیلیتر کشت سوسپانسیون یک شبه آگروباکتریوم (۰/۸- ۰/۶ :$OD_{600\,nm}$) حاوی سازهی مورد نظر تحت شرایط دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و روی شیکر با دور rpm ۲۰۰ تهیّه گردید. پس از سانتریفیوژ g × ۱۳۰۰به مدت ۵ دقیقه رسوب باکتری در ۲۰ میلی لیتر محیط القای مایع حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون به حالت تعلیق درآمد و مجدداً در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد با دور rpm ۲۰۰ به مدّت ۲ ساعت قرار گرفت. پس از مدّت مذکور قطعات میان گره به مدت ۴۵ دقیقه در این تعلیق باکتریایی (روی شیکر rpm ۵۰) قرار گرفتند و سپس توسّط کاغذ صافی استریل خشک شده و به مدّت ۳ روز در محیط هم کشتی (شامل نمک های MS (۲۸)، ویتامینهای B_5 (۱۵)، ۴۰ میلی گرم در لیتر آدنین سولفات، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر مانیتول، ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر جیبرلیک اسید، ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید، ۳ میلی گرم در لیتر زآتین ریبوزاید و ۸ گرم در لیتر آگار) در تاریکی قرار داده شدند. در مرحلهی بعد قطعات میان گره تلقیح شده به محیط کشت MS انتخابی (شامل محیط هم کشتی به علاوه هیگرومایسین به میزان ۷/۵ میلی گرم در لیتر و سفوتاکسیم به میزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) انتقال یافتند و به مدّت ۶-۴ هفته در شرایط دمایی ۱ ± ۲۲ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

نوساقههای کوچک باززایی کرده قطع شدند و به ظروف شیشه ای بزرگتر محتوی محیط کشت ریشه زایی و طویل سازی MS محتوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز به اضافه ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و ۷/۵ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین انتقال یافته و تحت شرایط دمایی ۱ ± ۲۲ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدّت حدود ۳ هفته نگهداری شدند.

انتقال جوانه های باززایی شده (احتمالاً تراریخت) به محیط نو ساقه زایی

پس از گذشت ۳ تا ۴ هفته جوانههای نو ساقه، از میان گرههای سیب زمینی (رقم دزیره) ظاهر شدند. جوانههای سبز که به رشد خود ادامه میدادند، به محیطهای کشت MS حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و ۷/۵ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین جهت رشد منتقل شدند. در این محیطها گیاهچه های تراریخت واقعی، سبز مانده و به رشد خود ادامه دادند.

انتقال گیاهچه های باززایی شده (احتمالاً تراریخت) به محیط ریشه زایی

Archive of SID

www.SID.ir

پس از این مرحله، گیاهچه ها به محیط کشت MS محتوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز جهت ریشه زایی منتقل شدند. محیط کشت ریشه زایی همان MS_{20} همراه با آنتی بیوتیکهای هیگرومایسین و سفوتاکسیم به ترتیب به میزان ۷/۵ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بود.

انتقال گیاهان باززایی شده (احتمالاً تراریخت) به خاک

گیاهان حاصل، ابتدا به پیت و پرلایت و سپس به خاک منتقل شدند. این گیاهان در گلخانه و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به رشد خود ادامه دادند و طی مراحل رشد تحت مراقبتهای ویژه قرار گرفتند.

استخراج DNAی ژنومی گیاه سیب زمینی و PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

به منظور تهیّهی DNAی ژنومی، از برگهای جوان و سبز گیاه سیب زمینی استفاده شد و DNAی ژنومی این گیاه به روش CTAB استخراج گردید (۳۱).

برای انجام PCR، از DNAی الگو به میزان ۵۰-۱۰۰ نانو گرم، پرایمر Ins F و Ins R با غلظت ۰/۴ میکرو مولار، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۴ میلی مولار، PCR Buffer با غلظت X۱، dNTPs با غلظت ۰/۲ میلی مولار و Taq DNA Polymerase با غلظت ۱/۵ یونیت استفاده گردید. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر بود و از برنامهی حرارتی Denaturation: ۹۴ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه، Annealing: ۵۷ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه، Extension: ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۵ ثانیه و نهایتاً قرار گرفتن واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰۰ ثانیه برای PCR استفاده شد.

آغازگرهای اختصاصی که برای تکثیر توالی DNAی پروانسولین نوترکیب انسانی و فیوژن پروتئین A مورد استفاده قرار گرفتند عبارت بودند از:5′-CATGCCATGGAAGCGGGATTCAA

CCAATTTAATAAGG -3′

5′-CCGGTCACCTCATTAGTTGCAGTAGTTTTCC

AG-3′

RNAآنالیز گیاهان تراریخت در سطح

برای استخراج RNA از کیت RNX™ (-Plus) شرکت سیناژن استفاده شد.

جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA، در نمونه های RNAی استخراج شده، از کیت حذف DNase I استفاده شد. استخراج RNA و ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد و تکثیر توالی cDNA با استفاده از پرایمرهای فوق الذکر صورت گرفت.

آزمون RT-PCR

برای بررسی بیان ژن نوترکیب در نمونه های سیب زمینی تراریخت از آزمون RT-PCR با شرایط ذکر شده برای PCR و با استفاده از یک شاهد مثبت (باکتری) و دو شاهد منفی (بلانک و RNAی استخراج شده به عنوان الگو) استفاده شد.

آزمون Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

آزمون DAS-ELISA بر اساس روش معمول و متداول انجام گرفت (۱۱). بشقابک های الایزا به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر از رقت توصیه شده IgG در بافر پوشش دهنده کربناتی (۱۵ میلی مولار Na_2CO_3، ۳۵ میلی مولار $NaHCO_3$ و ۵ میلی مولار NaN_3 با pH: 9.6) به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بشقابکهای الایزا چهار بار با فاصلهی پنج دقیقه و به وسیله بافر PBS، شستشو داده شدند.

(PBS: 2.7 mM KCl, 3 mM NaN_3, 8 mM Na_2HPO_4, 1 mM KH_2PO_4 and 0.13 M NaCl in addition 0.05% Tween 20)

سپس ۱۰۰ میکرولیتر یا ۲۰ نانوگرم از عصارهی پروتئین گیاهی به هر چاهک افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از شستشوی بشقابکها، چاهکها با استفاده از رقت ۱:۲۰۰ آنتی بادی پلی کلونال[1] در PBS-T به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از آن چاهکها سه بار به وسیلهی PBS-T شستشو داده شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با رقت ۱۰۰۰ : ۱ anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma A3687) در PBS-T انکوبه شدند.

۱۰۰ میکرولیتر p-nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigma N7653) به هر چاهک اضافه شد. واکنش توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال متوقف گردید و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از ELISA reader (BioTek Elx 800) خوانده شد. در صورتی که میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر مساوی یا بیشتر از

[1] Anti- rabbit polyclonal antibody, (Santa Cruz Biotechnology, Inc)

Archive of SID

www.SID.ir

سه برابر متوسط نمونه های غیر تراریخت بود، نمونهی مورد نظر مثبت (تراریخت) منظور میشد. غلظت پروتئین به وسیله Bradford Protein Assay Reagent Kit با استفاده از BSA به عنوان استاندارد تعیین گردید. برای اندازه گیری میزان بیان پروتئین مقادیر ۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۵ ، ۱۰ و ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر انسولین خالص به ۶ چاهک به عنوان نمونه اضافه شد. جذب این نمونه های مثبت در ۴۰۵ نانومتر برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون دات بلات

آزمون دات بلات فقط به منظور نشان دادن حضور پروتئین انسولین انسانی در لاینهای تراریخت مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون بر اساس روشی صورت گرفت که پیشتر توسط بانتاری و گودوین عنوان شده بود (۳). عصاره-های پروتئینی برگها روی کاغذ نیتروسلولز لکه گذاری شد (0.45 µm pore size, GIBCO, Grand Island, NY). سپس این غشا به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در محلول۲٪ BSA در PBS-T قرار گرفت و بلوکه شد. پس از سه بار شستشو در محلول PBS-T و انکوباسیون در رقت ۱:۲۰۰ آنتی بادی اولیه در PBS-T به مدت یک ساعت و مجددا سه بار شستشو، انکوباسیون با رقت ۱:۴۰۰۰آنتی بادی ثانویه[۲] به مدت یک ساعت صورت گرفت. محلول توسعهی رنگ عبارت بود از: 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride or DAB (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and 0.01% hydrogen peroxide in 50 mM Tris (pH 7.5).

تمام بافرها محتوی سدیم آزاید بودند. توسعهی رنگ قهوهای در مناطق لکه گذاری شده، بیانگر تراریخت بودن لاین مورد نظر بود.

آنالیزهای آماری

تحلیلهای آماری این پژوهش بر پایهی آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح پایهی کاملاً تصادفی در سه تکرار و با ۱۰ ریز نمونه در هر تیمار صورت گرفت. آزمایشات دو بار تکرار شد. داده ها (درصد باززایی نوساقه برای ریز نمونه های میان گرهی چهار هفتهای) به صورت متوسط درصد دو آزمایش برداشت شد. تجزیه واریانس برای آزمون معنی داری اثر ژنوتیپ و غلظت-های مختلف هورمونی بر باززایی نوساقه انجام پذیرفت. میانگین تیمارها به روش LSD مقایسه گردید. تجزیه واریانس با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۱۴ (۲۰۰۵) صورت گرفت. آزمون نرمال بودن دادهها با استفاده از آزمون نرمالیته اندرسون- دارلینگ برنامه Minitab نسخه ۱۴ (۲۰۰۵) انجام پذیرفت.

یافته ها

نتیجه تحقیق حاضر آستانه تحمّل نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین را برای ارقام دزیره، اگریا و مارفونا به ترتیب ۷/۵، ۱۲/۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر تعیین نمود.

انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه سیب زمینی با استفاده از آگروباکتریوم

در این تحقیق انتقال ژن به گیاه سیب زمینی با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 صورت گرفت. ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره سیب زمینی، که با آگروباکتریومهای حاوی ژن هدف تلقیح شده بودند، ابتدا به مدّت ۳ روز بر روی محیط هم کشتی فاقد آنتی بیوتیک هیگرومایسین و سفوتاکسیم قرار گرفتند و سپس بر روی محیط کشت تلفیقی حاوی نمکهای MS و ویتامینهای B_5، محتوی آنتی بیوتیکهای هیگرومایسین(۷/۵ میلی گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی گرم در لیتر)، در تاریکی و در دمای ۱ ± ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

پس از گذشت ۴ تا ۵ هفته، برخی از ریز نمونه های تلقیح شده که احتمالاً ژن مورد نظر را به علاوه ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین دریافت کرده بودند، تولید نوساقه کردند. این در حالی بود که ریز نمونه های میان گرهی تلقیح نشدهی سیب زمینی در همان محیط که فاقدآنتی بیوتیکهای سفوتاکسیم و هیگرومایسین بود، به میزان ۱۰۰ درصد باززایی کردند و ریز نمونه های میان گرهی تلقیح نشده سیب زمینی در محیطی با همان ترکیبات که فاقد آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و دارای آنتی بیوتیک هیگرومایسین به میزان (۷/۵ میلی گرم در لیتر) بود، باززایی و تولید نوساقه نکردند. سپس جوانههای رشد یافته به محیط کشت MS حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و (۵۰۰ میلی گرم در لیتر) سفوتاکسیم انتقال داده شدند. لازم به ذکر است میانگین درصد باززایی پس از تراریختی در مورد ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره ۸/۱۸ ± ۳۰/۴۴ نوساقه برآورد شد.

۲ anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Archive of SID

www.SID.ir

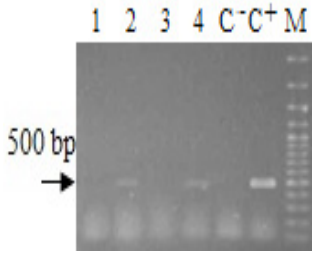
بررسی گیاهان تراریخت با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی

نتیجهی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین انسانی، روی چندین نمونه DNAی ژنومی استخراج شده از گیاهان به دست آمده از محیطهای انتخابی، تراریخت بودن برخی از آنها را تأیید نمود. استخراج DNAی ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام گرفت. آنالیز PCR بر روی DNAی ژنومی این گیاهان، وجود یک قطعه تقریباً ۵۰۰ bp را نشان میداد، در حالی که در گیاهان شاهد (غیر تراریخت) هیچ گونه باندی مشاهده نمیشد (شکل شماره ۲).

شکل شماره ۲- بررسی و آزمایش **DNA**ی ژنومی استخراج شده از گیاهچه های باززایی شده پس از انتقال ژن و گیاهان شاهد با استفاده از روش **PCR** و آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین انسانی ۱، ۴، ۵، ۶ و ۷ محصول **PCR** لاینهای تراریخت، **-c**: کنترل منفی با **ddH_2O** به عنوان الگو، **+c**: کنترل مثبت با پلاسمید حاوی ژن هدف به عنوان الگو، ۲: کنترل منفی با استفاده از **DNA** گیاه غیر تراریخت به عنوان الگو، ۳ گیاه غیر تراریخت و ۸: مارکر وزن مولکولی **kb** (**Gene Ruler™ ۱DNA Ladder ready-to-use**). فلش به تک باند **bp** ۵۰۰ اشاره دارد

بررسی گیاهان تراریخت در سطح RNA با استفاده از روش RT-PCR

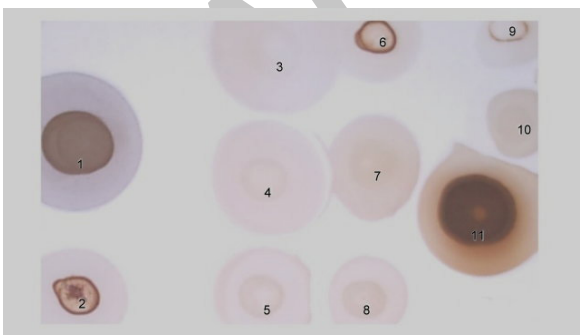
نتیجهی RT-PCR وجود یک قطعه تقریباً bp۵۰۰ را در لاینهای گیاهی تراریخت نشان میداد در حالی که در کنترل منفی که در آن به جای الگو از آب مقطّر تزریقی استفاده شده بود و کنترلهای منفی هر یک از لاینهای تراریخت که در آنها به جای محصول RT-PCR از RNAی استخراج شدهی آن لاین به عنوان الگو استفاده شده بود (برای نشان دادن آلودگی احتمالی RNAی استخراج شده به DNA) هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- بررسی در سطح RNA با استفاده از روش RT-PCR چاهک M مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهکهای ۲ و ۴ محصول RT-PCR گیاهان تراریخت (که آنالیز در سطح DNAی آنها مثبت بوده است)، چاهکهای ۱ و ۳ کنترل منفی (RNAی استخراجی گیاهان تراریخت به عنوان الگو)، کنترل منفی و کنترل مثبت. فلش به تک باند ۵۰۰ bp تکثیر شده اشاره دارد

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین با استفاده از روش الایزا و دات بلات

نتیجهی آزمون الایزا حضور پروتئین پروانسولین نوترکیب انسانی را در نمونه های مورد بررسی نشان داد. پروتئینهای استخراج شده از نمونه های برگی گیاه سیب زمینی با آنتی بادی انسولین انسانی واکنش نشان دادند. بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد انسولین انسانی، متوسط مقدار پروتئین پروانسولین نوترکیب ۰/۰۲۲ درصد TSP تخمین زده شد. نمونه های مثبت در آزمون الایزا، با آزمون دات بلات نیز مورد سنجش قرار گرفتند و نتایج این آزمون نیز موید حضور پروتئین پروانسولین نوترکیب انسانی در نمونه های تراریخت بود (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۵- نتیجهی آزمون دات بلات انسولین نوترکیب انسانی پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت روی غشای نیتروسلولزی لکه گذاری و با پروب آنتی بادی انسولین انسانی هیبرید شدند. ۱، ۲، ۶ و ۱۱: لاینهای تراریخت، ۳ ، ۴، ۵، ۷ و ۸: لاینهای احتمالاً غیر تراریخت، ۹: کنترل مثبت و ۱۰: کنترل منفی

www.SID.ir

نتیجه ی آنالیزهای آماری در مورد محیطهای باززایی نوساقه یک مرحله ای

نتایج صفت در صد باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی ارقام اگریا، مارفونا و دزیره پس از ۶۰ روز با آزمون فاکتوریل در قالب طرح پایهی کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس حاکی از معنی دار بودن سطح هورمون زآتین ریبوزاید با احتمال ۱ درصد بود. اثر نوع رقم یا ژنوتیپ نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. در مورد اثرات متقابل دو جانبه، اثر متقابل نوع رقم در سطح هورمون زآتین ریبوزاید هم با احتمال ۱ درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین اثرات متقابل دو جانبه با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت که نتایج آن حاکی از برتری تیمار ۲ و ۳ برای رقم دزیره بود. ضمناً ضریب پراکندگی (CV)، این آزمایش نیز ۱۴/۹ درصد به دست آمد. میانگین تعداد نوساقه به ازای هر ریز نمونه در محیط کشت یک مرحلهای ۲- دزیره ۱/۷۸ ±۲۲ و در محیط کشت یک مرحلهای ۳- دزیره ۱/۸۷ ± ۲۲/۰۵ بود. رقم دزیره از نظر صفت میانگین در صد باززایی بهترین بود و دو رقم مارفونا و اگریا در حالی که از نظر صفت میانگین درصد باززایی تفاوت معنی داری نشان نمیدادند، در گروه بعدی قرار داشتند. چنین به نظر میرسد، در صورتی که هدف، استفاده از گیاه سیب زمینی به عنوان بیورآکتور است، بهتر است از رقم دزیره و محیطهای ۲ و ۳ یک مرحلهای استفاده شود و با عنایت به این که تفاوت این دو محیط تنها در سطح هورمون زآتین ریبوزاید موجود در آنهاست و نظر به کمیاب بودن و هزینهی سنگین تهیّهی این هورمون، استفاده از محیط ۲ یعنی سطح ۳ میلی گرم در لیتر هورمون زآتین ریبوزاید پیشنهاد میشود. ضمناً اوّلین نوساقههای باززایی شده پس از ۱۲ روز بر روی ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره ظاهر شدند و پس از گذشت سه هفته باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی این رقم به ۱۰۰ درصد رسید. در ضمن زمان ظهور اوّلین نوساقهها در مورد رقم مارفونا ۴۵ روز و در مورد رقم اگریا ۶۰ روز بود که پس از گذشت ۲ تا ۳ هفته به ۸۵ تا ۱۰۰ درصد رسید.

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین آزمایش باززایی نوساقه یک مرحله ای به روش LSD

ترکیب تیماری محیط کشت	میانگین درصد باززایی
۱- اگریا	۱۳/۳۳۳۳
۲-اگریا	۶۳/۳۳۳۳
۳-اگریا	۵۳/۳۳۳۳
۱-دزیره	۵۳/۳۳۳۳
۲-دزیره	۸۶/۶۶۶۷
۳-دزیره	۱۰۰
۱-مارفونا	۴۳/۳۳۳۳
۲-مارفونا	۳۰
۳-مارفونا	۶۳/۳۳۳۳

LSD ٪۵: ۱۴/۳۹۱۸۵

LSD ٪۱: ۱۹/۷۱۴۳

نتیجه آنالیزهای آماری در مورد محیط های باززایی نوساقه دو مرحله ای

نتایج صفت در صد باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی پس از ۶۰ روز توسط نرم افزار SPSS 18 با استفاده از آزمون فاکتوریل در قالب طرح پایهی کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تجزیهی واریانس حاکی از معنی دار بودن اثر سطح هورمون زآتین ریبوزاید در سطح احتمال ۱ درصد بود. اثر سطح هورمون نفتالن استیک اسید نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد و اثر نوع رقم یا ژنوتیپ نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. در مورد اثرات متقابل دو جانبه، اثر هورمونهای زآتین ریبوزاید و نفتالن استیک اسید و نیز اثر متقابل هورمون نفتالن استیک اسید در نوع رقم در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. ولی اثر متقابل هورمون زآتین ریبوزاید در نوع رقم در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد. اثر متقابل سه جانبه یعنی اثر متقابل هورمون زآتین ریبوزاید در نوع رقم در هورمون نفتالن استیک اسید نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. ضریب پراکندگی (CV) این آزمایش نیز ۱۱/۱۹ درصد محاسبه شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه جانبه با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت که نتایج آن حاکی از برتری محیطهای ۲- دزیره (ترکیب هورمون زآتین ریبوزاید به میزان ۳ میلی گرم در لیتر، هورمون نفتالن استیک اسید به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر و هورمون جیبرلیک اسید به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر)، ۳- دزیره (ترکیب هورمون زآتین ریبوزاید به میزان ۳/۵ میلی گرم در لیتر، هورمون نفتالن استیک اسید به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر و هورمون جیبرلیک اسید به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر) و ۲- اگریا

Archive of SID

www.SID.ir

(ترکیب هورمون زآتین ریبوزاید به میزان ۳ میلی گرم در لیتر، هورمون نفتالن استیک اسید به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر و هورمون جیبرلیک اسید به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر) بود. بر اساس مشاهدات انجام شده و با توجّه به برتری رقم دزیره از لحاظ کوتاه بودن زمان باززایی نوساقه و به حداکثر رسیدن در صد باززایی از ریز نمونه های میان گرهی نسبت به اگریا (۲۱ روز در مقابل ۶۰ روز) و زیادتر و قوی تر بودن نوساقههای باززایی شده از ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره نسبت به رقم اگریا، رقم دزیره به عنوان رقم برتر برای انتقال ژن انتخاب شد و با توجّه به این که محیط ۲- دزیره و ۳- دزیره بر روی باززایی این رقم تفاوت معنی داری نداشتند و با عنایت به این که تنها تفاوت این دو محیط در سطح هورمون زآتین ریبوزاید مورد استفاده بود، محیط ۲- دزیره، (حاوی سه میلی گرم در لیتر زاتین ریبوزاید) و محیط ۳- دزیره، (حاوی سه و نیم میلی گرم در لیتر زاتین ریبوزاید) و با تأکید بر سخت بودن دسترسی به این هورمون و هزینه بالای خرید آن محیط ۲- دزیره برای انجام کارهای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. ضمناً میانگین تعداد نوساقه به ازای هر ریز نمونه در محیط دو مرحلهای ۲- دزیره، ۳- دزیره و ۲- اگریا به ترتیب ۱/۶۱ ±۱۷/۸، ۰/۶۹ ± ۸/۸۶ و ۲/۲۸ ± ۶/۷۸ بود.

جدول شماره ۶- مقایسه میانگین آزمایش باززایی نوساقه دو مرحلهای به روش LSD

ترکیب تیماری محیط کشت و رقم	میانگین درصد باززایی
۱-اگریا	۴۶
۱-دزیره	۷۴
۱-مارفونا	۸
۵-اگریا	۵۶
۵-دزره	۶۶
۵-مارفونا	۱۲/۵
۲-اگریا	۹۲
۲-دزیره	۱۰۰
۲-مارفونا	۴۳
۶-اگریا	۵۶
۶-دزیره	۶۷/۹۹۶
۶-مارفونا	۴۰
۳-اگریا	۷۲
۳-دزیره	۹۴
۳-مارفونا	۵۸/۳۳
۷-اگریا	۵۶
۷-دزیره	۶۶
۷-مارفونا	۱۲/۵
۴-اگریا	۷۴
۴-دزیره	۷۶
۴-مارفونا	۳۲
۸-اگریا	۵۶
۸-دزیره	۷۲
۸-مارفونا	۳۶

LSD٪۵: ۱۱/۵۰۲۲

LSD٪۱: ۱۵/۲۴۷۶۴

بحث

با توجّه به اهمّیّت و ضرورت توجّه ویژه به کشاورزی مولکولی، جهت فرآهم آوردن امکان تولید انبوه و ارزان پروتئینهای نوترکیب، این فن آوری در اولویّت تحقیقات زیستی قرار گرفته است. به منظور تبدیل گیاهان به کارخانههای تولید پروتئینهای نوترکیب لازم است، ابتدا سیستم کشت بافت و انتقال ژن به آنها بهینه گردد. در این تحقیق برای بهینه سازی سیستم کشت بافت و ارگانوژنز نابجا، محیطهای کشت یک و دو مرحلهای بسیاری مورد بررسی قرار گرفت. پس از بهینه سازی سیستم کشت بافت، رقم دزیره به عنوان بهترین رقم با بالاترین میزان باززایی نوساقه انتخاب شد و ریز نمونه های میان گرهی به عنوان بهترین ریز نمونه ها جهت باززایی نوساقه و انتقال ژن برگزیده شدند. مطالعات بنرجی نشان داد، باززایی گیاه سیب زمینی از طیف وسیعی از قطعات ریز نمونه مانند برگ، دمبرگ، میان گره و ریز غدّه قابل انجام است و میزان باززایی در ژنوتیپها و ریز نمونه های مختلف آن کاملاً متفاوت است (۲). یافته های این تحقیق نیز مویّد این نتایج است. هم- چنین بیوجین و همکاران، میزان باززایی گیاه سیب زمینی را به عواملی همچون ژنوتیپ، نوع و منشأ قطعات ریز نمونه و نیز نوع و غلظت تنظیم کنندههای رشد وابسته دانستهاند (۵)، که نتایج پژوهش حاضر نیز تأیید کننده این یافتههاست. برخی یافتهها از اثر تقریباً مشابه هورمون زآتین و زآتین ریبوزاید در باززایی نوساقه از گیاه سیب زمینی حکایت دارد (۴۳)، در حالی که پژوهش حاضر نشان داد که هورمون زآتین ریبوزاید، از نظر درصد باززایی و تکرار پذیری آن به هیچ وجه با هورمون زآتین قابل قیاس نیست که شاید علّت این تفاوت در اثر ژنوتیپ و شرایط محیطی بر باززایی نوساقه از گیاه سیب زمینی باشد. مهم ترین تفاوت محیط یک مرحلهای مورد استفاده در این پژوهش با بیشتر محیطهایی که برای باززایی ریز نمونه های میان گرهی گیاه سیب زمینی معرّفی شدهاند، منبع و سطح کربوهیدرات (ساکارز یا گلوکز به میزان ۵ تا ۳۰ گرم در لیتر، حضور قند مانیتول و نوع و غلظت هورمونهای مورد استفاده (نفتالن استیک اسید، جیبرلیک اسید و زآتین ریبوزاید) است. در تحقیق حاضر و در حضور منبع کربوهیدرات مورد استفاده (گلوکز)، کالوسهای سبز فشرده با قابلیّت زیاد باززایی نوساقه ایجاد شد. در حالی که

Archive of SID

www.SID.ir

در محیطهایی که منبع کربوهیدرات آنها، ساکارز بود، کالوسهای سبز و سفید رنگی ایجاد میشد که قابلیّت باززایی کمی داشتند. ضمناً نوساقههای باززایی شده دارای فنوتیپ نرمال و بسیار قوی بودند. افزودن ۲۰ گرم در لیتر قند مانیتول در کنار استفاده از ۲۰ گرم در لیتر قند گلوکز، رشد کلونیهای سلّولی بسیار فشردهای را که برای باززایی نوساقه ایده آل بودند، تحریک کرد. این نتایج، با یافته های یوتوشینکو و همکاران مطابقت داشت (۴۴). از بین سیتوکینین های مورد استفاده، بهترین پاسخ باززایی نوساقه در محیطهای حاوی هورمون زآتین ریبوزاید به دست آمد که این نتیجه مویّد نتایج شیرمن و استیکما است (۳۶، ۳۹). بررسی انجام شده مقدار هورمون زآتین ریبوزاید مورد نیاز برای باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره را ۳ میلی گرم در لیتر به دست آورد در حالی که یافته های یوتوشینکو و همکاران، ۲ میلی گرم در لیتر هورمون زآتین ریبوزاید را برای باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره مناسب دانسته است که شاید به دلیل تفاوت در شرایط محیطی باشد. ضمناً زمان مورد نیاز برای ظهور نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی رقم اگریا در محیط یک مرحلهای مورد استفاده در این پژوهش، حدود ۶۰ روز و زمان لازم برای ظهور نوساقه بر روی ریز نمونه های میان گرهی رقم مارفونا حدود ۴۵ روز بود که این نتیجه با یافته های نادری مشکین مغایر است (۱). در مورد مصرف آنتی بیوتیک هیگرومایسین به عنوان عامل گزینشگر گیاهی باید توجّه داشت که افزایش بیش از حد غلظت این آنتی بیوتیک ممکن است موجب حذف گیاهان تراریخت شود. هیگرومایسین قادر است با ایجاد اختلال در فرآیند ترجمه، پروتئین سازی را در سلّول-های باکتریایی، قارچی و یوکاریوتی متوقّف سازد. میزان مقاومت به هیگرومایسین در یک سلّول گیاهی تراریخت، بستگی به تعداد نسخههای ژن مقاومت به هیگرومایسین و جایگاه قرار گیری آن در ژنوم هستهای دارد. از طرف دیگر به دلیل مرگ سلّولهای گیاهی غیر تراریخت که در اثر آنتی بیوتیک هیگرومایسین روی میدهد، ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئلها به محیط بیرون منتقل میشود. این ترکیبات میتوانند بر روی سلّولهای دیگر از جمله سلّولهای تراریخت، اثر منفی بگذارند. علّت مرگ تعدادی از سلّولهای گیاهی از جمله سلّولهای تراریخت، نه تنها به واسطه عامل گزینشگر (هیگرومایسین)، بلکه به علّت آزاد شدن ترکیبات نامطلوب و سمّی از سلّولهای مرده است (۸). تولید تک باند تقریباً bp ۵۰۰ با استفاده از تکنیک PCR دلیل بر تراریخت بودن تعدادی از لاینهای گیاه سیب زمینی بود. در ضمن آزمونهای RT-PCR، الایزا و دات بلات نیز بیان ژن پروانسولین نوترکیب انسانی را در سطوح RNA و پروتئین تأیید نمودند. همانطور که در بخش مقدمه ذکر گردید، افزایش میزان تقاضا برای هورمون انسولین در آینده نزدیک اجتناب ناپذیر است. این مسئله لزوم توسعه و گسترش روشهایی با کارآیی بیشتر و خطر و هزینهی کمتر برای تولید هورمون انسولین را نشان میدهد. گیاه سیب زمینی بنا به دلایلی که در بخش مقدمه بدانها اشاره شد یکی از بهترین بیورآکتورهاست. بیان ژن پروانسولین نوترکیب انسانی به میزان (۰/۰۲۲ درصد TSP) به شدت وابسته به تعداد نسخههای ژن و موقعیت آن در ژنوم هستهای است. CaMV35S یکی از معمولترین پروموترهای مورد استفاده برای افزایش میزان بیان ژن در گیاهان دو لپهای است. هدف این پژوهش بهینه سازی ارگانوژنز نابجا و بیان ژن پروانسولین نوترکیب انسانی در ارقام دزیره، اگریا و مارفونا بود. با توجه به این که دو رقم اخیر از مهم ترین ارقامی هستند که در ایران کشت میشوند، بهینه سازی ارگانوژنز نابجا در این ارقام میتواند راه انتقال ژنهای مختلف را بدانها هموار سازد. برای افزایش بیان هورمون پروانسولین، ایجاد تغییراتی در این سازه و تولید سازههای دیگر با پروموترهای tuber specific و یا دارای enhancer sequences توصیه میشود که احتمالاً به افزایش میزان بیان پروتئین منجر خواهد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱) نادری مشکین، ح. ۱۳۸۶، بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژنهای gus و bar به گیاه سیب زمینی.*Solanum tuberosum* (L) و بررسی پروتئینهای وابسته به پاتوژن (PRs) در رابطه با آفت سوسک کلرادو (*Leptinotarsa decemlineata* S.) سیب زمینی. پایان نامه کارشناسی ارشد سلّولی مولکولی، پردیس دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران.

2) Banerjee A K, Prat S, Hannapel DJ. Efficient Production of Transgenic Potato Plants (S. tuberosum L. ssp. andigena) via Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation. Plant Sci, 2006; 170(4): 732-738.

3) Banttari EE, Goodwin PH. Detection of Potato Viruses S, X, and Y by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membranes (Dot-ELISA). Plant Dis, 1985; 69 :202-205.

4) Barfoed HC. Insulin Production Technology. Chem Eng Prog, 1987; 83: 49-54.

5) Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnel A, Sangwan-Norreel BS. Agrobacterium-Mediated Transformation of Three Economically Important Potato Cultivars Using Sliced Internodal Explants: An Efficient Protocol of Transformation. J Exp Bot, 1998; 49(326): 15891595-.

6) Block M. Genotype-Independent Leaf Disc Transformation of Potato (Solanum tuberosum) Using Agrobacterium tumefaciens. TAG Theor Appl Genet, 1988; 76(5): 767-774.

7) Chan SJ, Weiss J, Konrad M, White T, Bahl C, Yu SD, Marks D, Steiner DF. Biosynthesis and Periplasmic Segregation of Human Proinsulin in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78: 5401-5405.

8) Chawla HS. Introduction to Plant Biotechnology. Second edn.Printed in India, Science publishers, Inc., Enfield, NH, USA, 2002, 359-396.

9) Cingel A, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Ćalić-Dragosavac D, Smigocki AC, Ninković1 S. Agrobacterium-Mediated Transformation of Two Serbian Potato Cultivars (Solanum tuberosum L. cv. Dragačevka and cv. Jelica)., Afr J Biotechnol, 2010; 9 (30): 4644-4650.

10) Citovsky V, Magori SH. The Role of the Ubiquitin-Proteasome System in Agrobacterium tumefaciens- Mediated Genetic Transformation of Plants. Plat Physiol, 2012; 160: 65-71.

11) Clark MF, Adams AN. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J Gen Virol, 1977; 34: 475-483.

12) Craig W, Gargano D, Scott N, Nguyen T, Lao N, Kavanagh T, Dix P, Cardi T. Direct Gene Transfer in Potato: A Comparison of Particle Bombardment of Leaf Explants and PEG-Mediated Transformation of Protoplasts. Plant Cell Rep, 2005; 24(10): 603-611.

13) During K. Growing A Novel Biofactory; Transgenic Potato Tuber Technology. BioProcess Int, 2005; 2-6.

14) Farinas CS, Leite A, Miranda EA. Aqueous Extraction of Recombinant Human Proinsulin from Transgenic Maize Endosperm. Biotechnol Prog, 2005; 21: 1466-1471.

15) Gamborg Ol, Miller RA, Ojima K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp Cell Re, 1968; 50: 151- 158.

16) Gelvin SB. Agrobacterium and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000; 51: 223-256.

17) Gelvin SB. Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation. Annu Rev Phytopathol, 2010; 48: 45-68.

18) Horsch RB, Klee HJ. Rapid Assay of Foreign Gene Expression in Leaf Discs Transformed by Agrobacterium tumefaciens: Role of T-DNA Borders in the Transfer Process. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83(12): 4428-4432.

19) Janssen BJ, Gardner R. Localized Transient Expression of GUS in Leaf Discs Following Co-Cultivation with Agrobacterium. plant mol biol, 1990; 14(1): 61-72.

20) Kjeldsen T, balschmidt P, Diers I, Hach M, Kaarsholm NC, Ludvigssen S. Expression of Insulin in Yeast: The Importance of Molecular Adaptation for Secretion and Conversion. Biotechnol Genet Eng Rev, 2001; 18, 89-121.

21) Krap A. On the Current Understanding of Somaclonal Variation. Oxf Surv Plant Mol Cell Biol, 1991; 7: 1-58.

22) Kumar A, Miller M, Whitty P, Lyon J Davie P. Agrobacterium-Mediated Transformation of Five Wild Solanum Species Using In Vitro Microtubers. Plant Cell Rep, 1995; 14(5): 324-328.

Archive of SID

www.SID.ir

23) Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, Citovsky V. A Case of Promiscuity: Agrobacterium Endless Hunt for New Partners. Trends Genet, 2006; 22: 29-37.

24) Markley N, Nykiforuk C, Boothe J, Moloney M. Producing Proteins Using Transgenic Oilbody-Oleosin Technology. BioPharm Int, 2006; 19: 34-46.

25) Millam S. Potato (Solanum tuberosum L.). In: wang K (ed), Methods in Molecular Biology. Volume 2, Second edn, Totowa, New Jersey, Humana Press, 2006, 25-36.

26) Minitab, Inc. MINITAB Statistical Software Release 14 for Windows. State College, PA, 2005.

27) Mohebodini M, Jalali Javaran M, mahboodi F, Alizadeh H, Ajhdari H. Human Proinsulin Gene Cloning in Plant Expression Vector pCAMBIA1304. Paper presented at the 6th national biotechnology congress of Iran, Milad Tower Conference Hall, Tehran-Iran, 13-15 August 2009.

28) Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Cultures. Physiol Plant, 1962; 15: 473- 497.

29) Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM. Transgenic Expression and Recovery of Biologically Active Recombinant Human Insulin from Arabidopsis thaliana Seeds. Plant Biotechnol J, 2006; 4: 77-85.

30) Pitzschke A, Hirt H. New Insights into an Old Story: Agrobacterium- Induced Tumour Formation in Plants by Plant Transformation. EMBOJ, 2010; 29: 1021-1032.

31) Porebski S, Bailey L, Baum B. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. Plant Mol Biol Rep, 1997; 15:8-15.

32) Rosak C, Boehm BO, Althoff PH Schoffling K. Biosynthetic Human Proinsulin, A New Therapeutic Compound for Diabetics? A Comparative Study of Biosynthetic Human Proinsulin with Biosynthetic Human Insulin. Horm Metab Res Suppl, 1988; 18: 16-21.

33) Schillberg S, Emans N, Fischer R. Antibody Molecular Farming in Plants and Plant Cells. Phytochem Rev, 2002; 1: 45-54.

34) Schwarz OJ Beaty RM. Organogenesis. In R. N. Trigiano and D. J. Gray (Eds.), Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. 1996; 125-137.

35) Seabrook J, Douglass L Tai G. Segregation for Somatic Embryogenesis on Stem-Internode Explants from Potato Seedlings. Plant Cell Tiss Org, 2001; 65(1): 69-73.

36) Sheerman S Bevan MW. A Rapid Transformation Method for Solanum tuberosum Using Binary Agrobacterium tumefaciens Vectors. Plant Cell Rep, 1988; 7(1): 13-16.

37) Snyder GW, Belknap WR. A Modified Method for Routine Agrobacterium-Mediated Transformation of In Vitro Grown Potato Microtubers. Plant Cell Rep, 1993; 12(6): 324-327.

38) SPSS Inc. SPSS Base 14.0 for Windows User´s Guide. SPSS Inc., Chicago, IL, 2005.

39) Stiekema WJ ,.Heidekamp F, Louwerse JD, Verhoeven HA, Dijkhuis P. Introduction of Foreign Genes into Potato Cultivars Bintje and Désirée Using an Agrobacterium tumefaciens Binary Vector. Plant Cell Rep, 1988; 7(1): 47-50.

40) Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, Fiil NP. Secretion and Processing of Insulin Precursors in Yeast. Proc Natl Acad Sci, 1986; 83: 6766-6770.

41) Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. Involvement of Targeted Proteolysis in Plant Genetic Transformation by Agrobacterium. Nature, 2004; 431: 87-92.

42) Winter J, Neubauer P, Glockshuber R, Rudolph R. Increased Production of Human Proinsulin in the Periplasmic Space of Escherichia coli by Fusion to DsbA. J Biotechnol, 2000; 84: 175-185.

43) Yadav N, Sticklen M. Direct and Efficient Plant Regeneration from Leaf Explants of Solanum tuberosum l. cv. Bintje. Plant Cell Rep, 1995; 14:645-647.

44) Yevtushenko DP, Sidorov VA, Romero R, Kay WW, Misra S. Wound-Inducible Promoter from Poplar is Responsive to Fungal Infection in Transgenic Potato. Plant Sci, 2004; 167: 715-724.

Archive of SID

www.SID.ir