ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ٤٥-۳۷

تراریزش گیاه گندم با استفاده از تفنگ ژنی به منظور انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز

نگین محمدی زاده*[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، بهرام ملکی زنجانی[۳]، مطهره محسن پور[٤]

۱، ۲، ٤- به‌ترتیب کارشناس ارشد، استادیاران، پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج
۳- استادیار دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ne.mohammadi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

تولید گیاهچه تراریخته گندم (*Triticum aestivum*) با استفاده از ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز از طریق تفنگ ژنی و پلاسمید pBI121 نوترکیب حاوی ژن انتخابگر نئومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشبر NOS و ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز بررسی شدند. ریزنمونه‌های جنین نارس ۵ ژنوتیپ از ارقام (مغان، آرتا، سایسون و گاسکوژن) و لاین A، پس از جداسازی، بر روی محیط کالوس‌دهی، تولید کالوس جنین‌زا نمودند. کالوس‌های جنین‌زا، با ذرات طلای اندود شده با پلاسمید حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز بمباران شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌دهی انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیترکانامایسین و پس از آن جهت تولید شاخه و ریشه به محیط باززایی انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیترکانامایسین منتقل شدند. بیشترین درصد تراریزش ٤/۸ درصد، مربوط به لاین A و کم‌ترین آن مربوط بود به ارقام سایسون، گاسکوژن و آرتا که هیچ گیاه تراریخته‌ای در آن‌ها مشاهده نگردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنالیز لکه‌گذاری DNA نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نیز نئومایسین فسفوترانسفراز را در ژنوم خود دارا هستند.

واژه‌های کلیدی

تفنگ ژنی،
کانامایسین،
کیتیناز،
گلوکاناز،
گندم تراریخته.

مقدمه

رشد جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه در ۵۰ سال آینده، در حالی اتفاق می‌افتد که هم اکنون سوء تغذیه پدیده‌ای شایع بوده و بالغ بر ۸۰۰ میلیون از مردم دنیا روزانه با گرسنگی و بی‌غذایی روبه‌رو هستند. ٤۰ درصد از زمین‌های دنیا که در حال حاضر برای کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، با تخریب جدی مواجه‌اند و این در حالی است که باید پاسخگوی نیازهای غذایی این جمعیت در حال رشد باشند. ازاین رو افزایش تولید غلات به‌طور اعم و تولید گندم به‌طور اخص به میزان ٤۰ درصد در ۲۰ سال آینده مورد نیاز خواهد بود (Kole and Timothy 2008). گندم یکی از مهم‌ترین دانه‌های غذایی در ایران و جهان است.

Archive of SID

سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار و در ایران در حدود ٦/٦ میلیون هکتار است (Maj 2011) و بیش از ۲۰ درصد کالری و پروتئین را در رژیم غذایی انسان فراهم می‌کند و غذای عمده بیش از ٤٠ کشور جهان می‌باشد که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (Kole and Timothy 2008). در ایران نیز این محصول تامین‌کننده بیشترین نیاز غذایی کشور بوده و روزانه حدود ٤٧ درصد از کالری مصرفی سرانه کشور را تامین می‌نماید (Safikhani 2007). بوته‌های گندم در تمام مراحل رشد و در تمام محیط‌های طبیعی در معرض تنش‌های گوناگون زیستی و غیر زیستی قرار دارند که رشد، عملکرد و تکامل طبیعی آن‌ها را مختل می‌سازد. تنش‌های زیستی شامل آفات و بیماری‌ها وتنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، کمبود یا زیاد بود محتوای مواد معدنی خاک، دمای نامناسب هوا و غیره می‌باشند. روش‌های اصلاحی مرسوم به دلیل پیچیده بودن صفات عملکردی گندم، وقت‌گیر بوده و همچنین نتیجه پایداری را به همراه ندارد. از دیگر اشکالات اساسی در اصلاح سنتی، محدودیت‌هایی است که برای انتقال ژن به واسطه ناسازگاری‌ها و تفاوت‌های بین‌گونه‌ای اتفاق می‌افتد. پیشرفت در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در ورود ژن‌های خارجی مطلوب برای غلبه بر مشکلات ناسازگاری جنسی و محدودیت‌های بین موجودات نتیجه بخش بوده است. فناوری نوین مهندسی ژنتیک قادر است نه تنها ورود یک ژن، بلکه چندین ژن را با روشی دقیق، قابل کنترل و قابل پیش‌بینی‌تر از آنچه در روش‌های مرسوم اصلاحی انجام می‌شده است، فراهم نماید. بنابراین تداوم روش‌های زیست فناوری و مهندسی ژنتیک برای فراهم آوردن غذا جهت رویارویی با نیازهای پیش‌روی بشر در آینده نزدیک مورد نیاز است و می‌توان پیشرفت‌های زیادی را در چارچوب زمانی کوتاه‌تر انجام داد (Kole and Timothy 2008). از آن‌جا که در ژرم پلاسم گندم مقاومت بسیار ناچیزی وجود دارد، مهندسی ژنتیک راه حل مناسبی برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی از جمله فوزاریوم خوشه است، به همین علت، ورود ژن‌های آنتی‌توکسین و ضد قارچی منحصر به فرد از طریق تراریزش ژنتیکی، موجب افزایش پتانسیل مقاومت در ارقام گندم می‌شود. ژن‌های ضد قارچی، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می شوند (Dahleen et al. 2001). یک گروه از این ژن‌ها پروتئین‌هایی مانند β-۱ و۳ گلوکاناز و کیتیناز را رمز می‌کنند (Mackintosh et al. 2007). سوبسترای آنزیم کیتیناز، کیتین است. کیتین عبارت است از یک هموپلیمر خطی از واحدهای N ـ استیل ـ دی ـ گلوکز آمین که با پیوندهای β-۱،٤ به‌هم متصل هستند. کیتیناز پیوند بین کربن‌های ۱و٤ از دو N – استیل گلوکزآمین متوالی در ساختمان کیتین را می‌شکند (Shin et al. 2008). Tohidfar et al. 2005، ژن کیتیناز را برای ایجاد مقاومت به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی[1] (*Verticillium dahlia*) به پنبه منتقل کردند، بررسی نسل سوم گیاهان پنبه تراریخت، بیان پایدار ژن کیتیناز را در ایجاد مقاومت به قارچ (*Verticillium dahlia*) نشان داد. آنزیم β-۱ و ۳ گلوکاناز نیز، پیوند پلی‌ساکارید بین کربن‌های ۱ و ۳ در ساختمان گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ را تخریب می‌کند (Leah et al. 1991). در بافت‌های بیمار تجمع کیتینازها به ویژه به موازات تجمع β – ۱ و ۳ گلوکانازها انجام می‌گیرد که این امر موجب ایجاد مقاومت افزایشی به قارچ‌ها می‌شود. بررسی‌ها نشان دادند هنگامی که آنزیم کیتیناز همراه با آنزیم β-۱ و ۳ گلوکاناز به کار برده می‌شوند اثر بازدارندگی آن‌ها روی قارچ‌ها بیشتر خواهد بود. آناند و همکاران در سال ۲۰۰۳، لاین‌های گندم تراریختی تولید کردند که در تعداد محدودی از آن‌ها، بیان همزمان ژن‌های کیتیناز و β-۱ و ۳ گلوکاناز، مقاومت مناسبی را به فوزاریوم، تنها در آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد و در شرایط مزرعه موفقیتی در ایجاد مقاومت به بیماری حاصل نشد (Anand et al. 2003). بنابراین، در صورت وجود این دو آنزیم در گندم، این گیاه قادر خواهد بود مقاومت بهتر و پایداری را در برابر قارچ‌های عامل بیماری زنگ زرد، قهوه‌ای، سیاهک، سفیدک و فوزاریوم حدالامکان در شرایط گلخانه‌ای از خود نشان دهد. بنابراین مهندسی ژن‌های کدکننده کیتیناز به همراه سایر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی در گیاهان، حفاظت آن‌ها را در برابر

[1] Verticiliumic

Archive of SID
www.SID.ir

پاتوژن‌های قارچی افزایش می‌دهد. این مسیر می‌تواند منجر به کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی گردد(Tohidfar et al. 2005). هدف از این تحقیق، انتقال ژن و تولید گندم تراریخته حاوی دو ژن کیتیناز و گلوکاناز برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی به ویژه فوزاریوم و سفیدک پودری می‌باشد که می‌تواند به کاهش مصرف سموم قارچکش منجر گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور ٤ رقم تجاری گندم نان شامل ارقام پائیزه (سایسون و گاسکوژن) و ارقام بهاره (آرتا و مغان) و نیز لاین A از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج از بخش غلات تهیه شد.

سازه ژنی

در این تحقیق از حامل دوگانه pBI121 نوترکیب حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز تحت کنترل پیشبرهای جداگانه CaMV35S و پایانبرهای جداگانه NOS موسوم به pBI-ChiGlu(-) و نیز نشانگر انتخابی نئومایسین فسفوترانسفراز(*npt*II) تحت کنترل پیشبر NOS و همچنین پایانبر NOS، جهت تراریزش گیاه گندم استفاده شد (شکل ۱) (Mohsenpour et al. 2008).

آماده‌سازی ریزنمونه‌ها جهت بمباران

در ادامه، بذور مورد آزمایش در گلدان کشت و پس از طی کلیه مراحل داشت در گلخانه، بذور نارس آن‌ها در فاصله زمانی ۱۲ الی ۱۸ روز پس از گرده‌افشانی برداشت شد. ریزنمونه‌های جنین نارس گندم پس از ضدعفونی بذور در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه و نیز هیپوکلریت سدیم تجاری به‌مدت ۲۰ دقیقه، در زیر میکروسکوپ جدا شده و به‌مدت ٤٥ روز بر روی محیط کالوس‌دهی (نمک‌ها و ویتامین‌های MS، ۲ میلی گرم بر لیتر توفوردی، ٤٠ میلی گرم بر لیتر تیامین، ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کازئین، ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر گلوتامین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار و pH= ۵/۸)، تحت شرایط تاریکی و دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون، به‌منظور تولید کالوس جنین‌زا قرار گرفتند.

بمباران کالوس‌های جنین‌زا

کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده، توسط ذرات طلای اندود شده با پلازمید نوترکیب بمباران شدند. در این آزمایش، از تفنگ ژنی مدل BioRad, PDS-1000/He، ذرات طلا دارای قطر ۱ میکرون و دیسک پاره‌شونده در دو نوع ۹۰۰PSI و PSI ۱۱۰۰ استفاده شد. کالوس‌های بمباران شده پس از طی مدت ۱ روز نگهداری تحت شرایط تاریکی و دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد، به محیط کالوس‌دهی انتخابی حاوی ۲۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین منتقل شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

کالوس‌های فوق، پس از طی مدت یک هفته در محیط کالوس‌دهی انتخابی، به محیط باززایی انتخابی (نمک‌ها و ویتامین‌های MS، ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH=۵/۷)، حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین تحت شرایط نوری ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در فیتوترون با دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد جهت تولید شاخه و ریشه منتقل شدند. گیاهچه‌های باززاشده پس از تولید شاخه به محیط باززایی فاقد آنتی بیوتیک کانامایسین حاوی ۱/۵ گرم بر لیتر ذغال فعال منتقل شدند. واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام و فاکتورهایی نظیر درصد شاخه‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زای شاخه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰)، درصد ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) و درصد تراریزش (نسبت گیاهچه‌های تراریخت به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های باززاشده در درون شیشه، ابتدا به گلدان‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدان‌های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند.

تائید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

جهت تائید تراریختی، استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های باززا شده به روش دلاپورتا (Dellaporta et al. 1983) انجام گرفت. در ادامه به منظور اثبات تلفیق ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *nptII* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۲۵ نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر MgCl2 (۲۵ میلی مولار) و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X و ٤٠ نانوگرم از

Archive of SID
www.SID.ir

آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. برای اثبات حضور ژن کیتیناز از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز و رو به‌جلو پیشبر CaMV35S استفاده شد. همچنین جهت اثبات حضور ژن گلوکاناز نیز از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاناز و رو به‌جلو پیشبر CaMV35S استفاده شد. برای هر دو ژن، واکنش در ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹٤ درجه، ۳۰ ثانیه در ٦۰ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۷ دقیقه) انجام شد. این برنامه، برای اثبات تلفیق ژن نشانگر انتخابی *npt*II در ژنوم گیاهان تراریخته احتمالی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به‌عقب و رو به‌جلو ژن نئومایسین فسفوترانسفراز، با دمای بهینه اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر سه واکنش از نمونه آب (فاقد هر گونه DNA) و DNA گیاه شاهد، به‌عنوان کنترل منفی و از نمونه پلاسمید به عنوان کنترل مثبت، برای تائید تراریختی گیاه استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید. همچنین برای تایید بیشتر تلفیق ژن، آزمون لکه‌گذاری DNA با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن *npt*II و پیشبر CaMV35S براساس روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد (Sambrook and Russell, 2001). عمل نشاندار کردن کاوشگرها نیز به روش کیت DIG Labeling (شرکت Roche) انجام شد. توالی آغازگرها در زیر آمده است (جدول ۱).

نتایج و بحث

در این تحقیق ۱۵ گیاهچه، شامل ۲ گیاهچه از رقم مغان با درصد تراریزش ۰/۳ درصد و ۱۳ گیاهچه از لاین A با درصد تراریزش ٤/۸ درصد، تراریختی را نشان دادند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که ۱۵ گیاهچه تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد، حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نئومایسین فسفوترانسفراز (*npt*II) را در ژنوم خود دارا هستند (شکل ۵، ٦ و ۷). تجزیه لکه‌گذاری DNA نیز تلفیق ژن‌های فوق را در ژنوم این ۱۵ گیاه در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد که تائید بیشتری بر نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود. این ۱۵ گیاه، همگی از نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آزمون لکه‌گذاری DNA پاسخ مثبت نشان دادند (شکل ۸، ۹ و ۱۰). استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی اثرات سوئی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و فراوانی بالای زالی را به همراه داشت. نتایج حاصل از این مشاهدات نشان دادند که آنتی‌بیوتیک کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کالوس‌دهی و باززایی موجب عدم باززایی می‌شود. همچنین با استفاده از مقادیر ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین در محیط کالوس‌دهی و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه‌زایی به میزان بسیار کم دیده شد که این تعداد نیز پس از چند روز دچار رنگ‌پریدگی شده و در نهایت زالی را نشان دادند (شکل ۲). با حذف کانامایسین از محیط کالوس‌دهی و استفاده از غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه‌زایی بطور بارز مشاهده شد اما ریشه‌زایی دیده نشد. گیاهچه‌های فوق نیز پس از مدتی دچار رنگ‌پریدگی شدند. با انتقال گیاهچه‌ها به محیط باززایی فاقد کانامایسین و حاوی ۱/۵ گرم در لیتر ذغال فعال، رنگ سبز گیاهچه‌ها مجددا پدیدار شد (شکل ۳- ب). به‌همین علت، جهت جلوگیری از تاثیر سوء آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر باززایی ارقام آرتا، مغان، سایسون و گاسکوژن و نیز لاین A، پس از بمباران، کالوس‌های جنین‌زا که دارای ظاهری ترد و شکننده و رنگ کرم روشن بودند، در محیط کالوس‌دهی و باززایی فاقد کانامایسین قرار گرفتند. مراحل مختلف رشد گیاهچه تراریخته احتمالی در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است. از میان ریزنمونه‌های مورد آزمایش تنها ۱۵ گیاهچه شامل ۲ گیاهچه از رقم مغان و ۱۳ گیاهچه از لاین A باززا شدند و همگی به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شکل ۵، ٦ و ۷) و نیز آزمون لکه‌گذاری DNA (شکل ۸، ۹ و ۱۰) پاسخ مثبت نشان دادند و تراریختی آن‌ها حداقل در وجود یک نسخه از هر کدام از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نئومایسین فسفو ترانسفراز تایید شد. در این تحقیق از پلاسمید نوترکیب pBI-ChiGlu که دارای ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، تحت پیشبرهای جداگانه CaMV35S و پایانبرهای جداگانه NOS، در ناحیه T-DNAی خود بوده و ژن مقاومت به کانامایسین (*npt*II) را به عنوان نشانگر انتخابی حمل می‌کند، استفاده گردید، لذا رونویسی و ترجمه هر یک از ژن‌های

www.SID.ir
Archive of SID

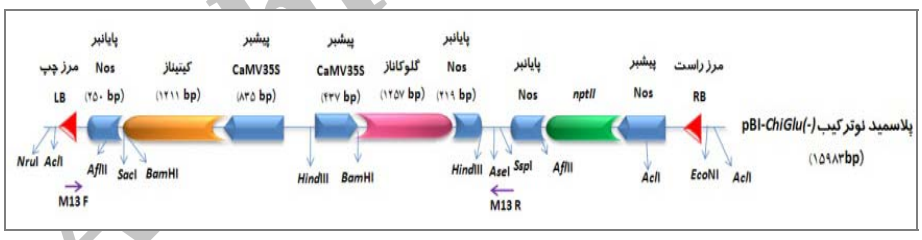
جدول۱ – آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیرهای پلیمراز جهت تایید تراریزش گیاهان تراریخته احتمالی

توالی	آغازگرها	قطعه تکثیری (bp)	دمای بهینه اتصال
گلوکاناز	Forward :CAGGTCCAAGGGCATCAACG TCTCCGACACCACCACCTTC : Reverse	۶۸۰	۶۰
کیتیناز	GAGTGGTGTGGATGCTGTTG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA: Reverse	۸۷۲	۶۰
*npt*II	GAACAAGATGGATTGCACGC : Forward GAAGAACTCGTCAAGAAGGC: Reverse	۷۸۶	۵۸
35S پیشبر	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC: Reverse	۱۲۳	۶۰
35S -کیتیناز	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA : Reverse	۱۰۹۶	۶۰
35S -گلوکاناز	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward TCTCCGACACCACCACCTTC : Reverse	۹۷۲	۶۰

جدول ۲ – فراوانی تراریزش گیاهچه‌های باززا شده از کالوس‌های جنین‌زا در ارقام پاییزه و بهاره

نوع بذر	نوع رقم	تعداد کالوس بمباران شده	درصد شاخه‌زایی	درصد ریشه‌زایی	تعداد گیاهچه تراریخت	درصد تراریزش*
پائیزه	سایسون	۱۳۵	۰	۰	۰	۰
پائیزه	گاسکوژن	۹۰	۰/۸	۰	۰	۰
بهاره	مغان	۶۷۵	۲/۷	۳/۱	۲	۰/۳
بهاره	آرتا	۱۱۲۵	۱/۴	۲/۸	۰	۰
بهاره	Aلاین	۲۷۰	۱۰/۲	۱۱/۷	۱۳	۴/۸

* فراوانی تراریزش از نسبت گیاهچه‌های تراریخت به تعداد کالوس‌های بمباران شده، بدست آمد.

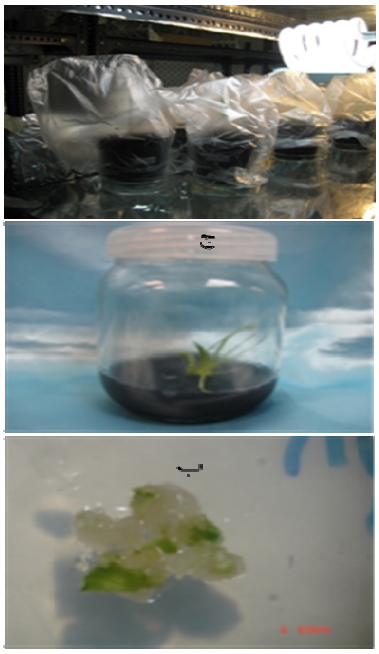


شکل ۱– نمای شماتیک پلاسمید نوترکیب pBI-ChiGlu(-).

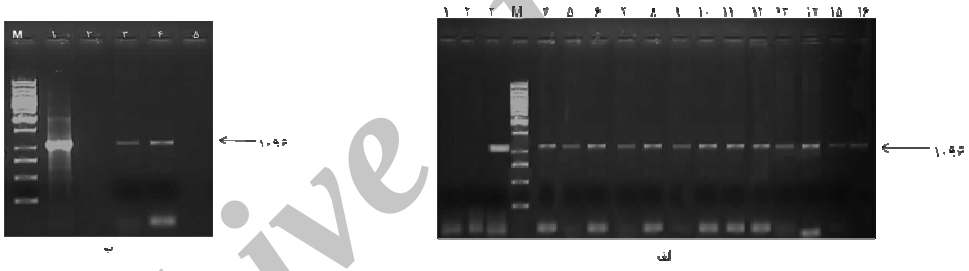
شکل ۲ – گیاهچه زال در محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)

Archive of SID
www.SID.ir

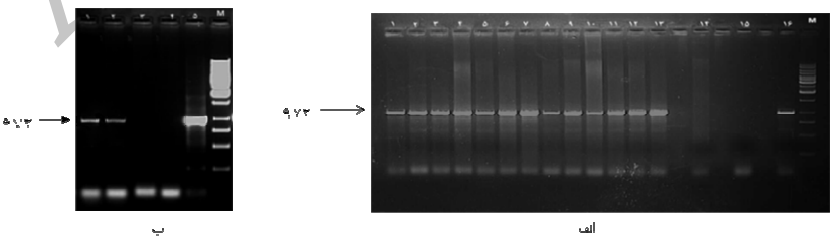
شکل ٤- گیاهان تراریخته الف. گیاهچه باززا شده در گلدان، ب. انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، ج. بذور تراریخت احتمالی



شکل ۳- باززایی در محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک کانامایسین الف. کالوس جنین‌زا، ب. گیاهچه باززا شده در شیشه، ج. گیاهچه‌های باززا شده در گلدان

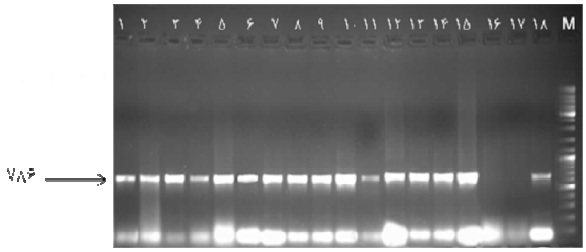


شکل ٥- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به‌جلوی پیشبر CaMV 35S و رو به‌عقب ژن کیتیناز، الف) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A، چاهک ۱) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۲) گیاه شاهد، چاهک ۳) پلاسمید (کنترل مثبت)، M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، چاهک ١٦– ٤) گیاهان تراریخته، ب. آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، چاهک ۱) پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۲) گیاه شاهد، چاهک ۳ و ٤) گیاهان تراریخته رقم مغان، چاهک ٥. نمونه آب (کنترل منفی)

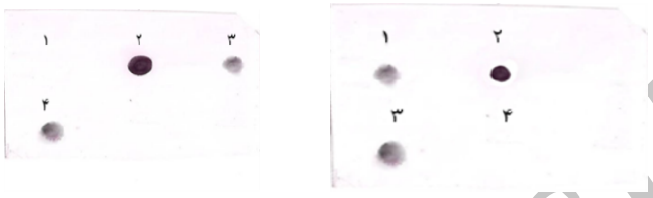


شکل ٦- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به‌جلوی پیشبر CaMV 35S و رو به‌عقب ژن گلوکاناز ، الف) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A، چاهک ١٣–١) گیاهان تراریخته، چاهک ١٤) گیاه شاهد، چاهک ١٥) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ١٦) پلاسمید(کنترل مثبت)، M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، ب) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، چاهک ۱ و ۲) گیاهان تراریخته، چاهک ۳) گیاه شاهد، چاهک ٤) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ٥) پلاسمید (کنترل مثبت)، M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)

Archive of SID
www.SID.ir



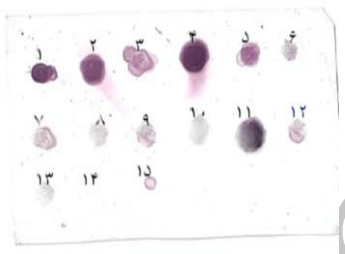
شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به‌جلو و رو به‌عقب ژن *npt*II برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A و رقم مغان، چاهک ۱۳–۱) گیاهان تراریخته لاین A، چاهک ۱٤ و ۱۵) گیاهان تراریخته رقم مغان، چاهک ۱٦) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۱۷) گیاه شاهد، چاهک ۱۸) پلاسمید (کنترل مثبت)، M، نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb plus)



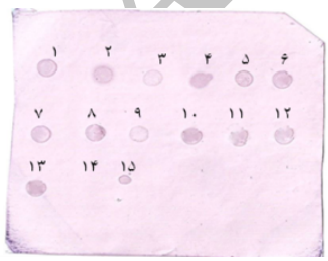
الف ب

شکل ۸- الف: آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای پیشبر CaMV35S. نمونه ۱ و۳) گیاهچه‌های تراریخته رقم مغان، نمونه ۲) پلاسمید(کنترل مثبت)، نمونه ٤) گیاه شاهد(کنترل منفی). ب: آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز . نمونه ۱) گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۲) پلاسمید (کنترل مثبت)، نمونه ۳ و ٤) گیاهچه‌های تراریخته رقم مغان

کیتیناز و گلوکاناز، پس از ادغام موفقیت‌آمیز در ژنوم گیاهی، با دارا بودن نواحی تنظیمی خود، به‌طور مستقل از هم، انجام می‌شوند. به همین منظور از پیشبر CaMV35S در دو اندازه مختلف استفاده گردید، پیشبر اول با طول ۸۳۵ جفت باز برای ژن کیتیناز و پیشبر دوم با طول ٤۲۵ جفت باز برای ژن گلوکاناز. پیشبر دوم از نظر توالی با انتهای ۳ پیشبر اول یکسان بوده و هر دو تمامی دامین‌های لازم برای بیان دائمی ژن تحت کنترل خود را دارا می‌باشند. به‌علت وجود شباهت توالی این دو پیشبر و قسمتی که با طول بیش از ٤۰۰ جفت باز همولوگ، احتمال وقوع کراسینگ آور و نوترکیبی را بالا می‌برد، لذا در این تحقیق از سازه‌ای استفاده گردید که جهت دو پیشبر مذکور نسبت به یکدیگر ناهمسو بوده و بنابراین در صورت وقوع نوترکیبی، قطعه میانی حذف نخواهد گردید. بلکه انتظار بر این است که وقوع نوترکیبی در چنین حالتی تنها باعث جابجایی قطعه شده و گلوکاناز را تحت پیشبری با طول بیشتر و کیتیناز را تحت پیشبری با طول کمتر قرار دهد، بدون اینکه در عملکرد پیشبرها اختلالی ایجاد گردد.



شکل ۹- آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز نمونه های ۱–۱۳. گیاهچه‌های تراریخته لاین A، نمونه ۱٤. گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسمید (کنترل مثبت)



شکل ۱۰- آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای پیشبر CaMV35S نمونه های ۱–۱۳. گیاهچه‌های تراریخته لاین A ، نمونه ۱٤. گیاه شاهد(کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسمید(کنترل مثبت) آزمون لکه‌گذاری DNA، حضور ژن نئومایسین فسفوترانسفراز و پیشبر CaMV35S، را در ۱۵ گیاهچه تراریخته تایید کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

در روش انتقال ژن با تفنگ ژنی، تراریختی زمانی حاصل می‌شود که ژن خارجی در کروموزوم گیاه تلفیق شود. در این حالت می‌توان کالوس‌های تراریخته را به واسطه وجود نشانگر انتخابی در محیط شناسایی کرد. ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز (*npt*II)، سبب مقاومت گیاه در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط کشت می‌شود. با این روش گیاهانی انتخاب می‌شوند که دارای ژن *npt*II هستند و به‌دلیل اینکه این ژن همراه با ژن‌های هدف کیتیناز و گلوکاناز بر روی یک پلاسمید قرار دارد، به‌طور غیر مستقیم نه با احتمال ۱۰۰ درصد، گیاهانی که حاوی ژن‌های هدف می‌باشند انتخاب می‌گردند. با این وجود در این تحقیق پس از اعمال آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی، رخدادهایی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و پدیده زالی به‌میزان بالایی بیش از حد انتظار دیده شد. مشاهدات نشان دادند که آنتی‌بیوتیک کانامایسین در مقادیر بسیار کم نیز موجب از بین رفتن سبزینه گیاه در مرحله شاخه‌زایی در ارقام مورد آزمایش شده و از ریشه‌زایی آن‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. در ادامه با حذف آنتی‌بیوتیک کانامایسین از محیط کشت باززایی، به تدریج شاخه‌زایی، و ریشه‌زایی مشاهده شد. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۱۰/۲ درصد و بیشترین درصد ریشه‌زایی ۱۱/۷ درصد در لاین A مشاهده شد، در حالی‌که در رقم سایسون هیچ‌گونه شاخه‌زایی و ریشه‌زایی دیده نشد. در رقم گاسکوژن نیز تنها ۰/۸ درصد شاخه‌زایی مشاهده شد اما هیچ یک از گیاهچه‌های شاخه‌دار شده، ریشه‌دار نشدند. ارقام آرتا و مغان به ترتیب با ۱/٤ درصد و ۲/۷ درصد، شاخه‌زایی را نشان دادند همچنین درصد ریشه‌زایی در آن‌ها به ترتیب ۲/۸ درصد برای رقم آرتا و ۳/۱ درصد برای رقم مغان بود. در ادامه تنها ۲ گیاهچه از رقم مغان و ۱۳ گیاهچه از لاین A به طور کامل باززا شده و تراریختی آن‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنالیز لکه‌گذاری DNA بررسی شد. استفاده از ذغال فعال در محیط باززایی، علاوه بر جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی که موجب عدم ریشه‌زایی می‌شوند، محیطی کم‌نور، مناسب با رشد ریشه را نیز فراهم می‌آورد، از این رو استفاده از مقادیر مناسب ذغال فعال در محیط باززایی گیاه گندم، می‌تواند در تسریع فرایند رشد ریشه تاثیر بسزایی داشته باشد. ارزیابی صفات (شاخه‌زایی و ریشه‌زایی) در ارقام (سایسون، گاسکوژن، آرتا، مغان) و نیز لاین A، این نکته را بیان داشت که ارقام پائیزه در مقایسه با ارقام بهاره نسبت به کشت بافت پاسخ مناسبی از خود نشان ندادند. از دلایلی که می توان به آن اشاره کرد، نوع ژنوتیپ است. کشت بافت غلات، انواع مختلفی از کالوس را تولید می‌کند که ممکن است از نظر پتانسیل باززایی با هم متفاوت باشند، از این رو پاسخ کالوس و باززایی گیاه بستگی به نوع ژنوتیپ دارد (Baskaran et al. 2005). به‌همین علت در ژنوتیپ‌های پائیزه نسبت به بهاره کالوس‌دهی و باززایی کمتری مشاهده شد. از نکات بسیار مهم در این تحقیق، مشابهت ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز با توالی‌هایی در ژنوم گیاه شاهد است که کاربرد این ژن‌ها را برای تشخیص تراریختی گیاه به علت دیده شدن باند مورد نظر برای ژن‌های فوق در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در گیاه شاهد، با مشکل مواجه خواهد ساخت. به همین دلیل، استفاده از آغازگرهای توالی‌های مجاور ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، نظیر توالی پیشبر، توالی پایانبر و نیز نشانگر انتخابی، به تنهایی و یا همراه با یکی از آغازگرهای ژن‌های فوق، به‌علت هم‌جواری آن‌ها در ناحیه T-DNA و در نتیجه عدم حضور این توالی‌ها در ژنوم گیاه شاهد، امکان اثبات تراریزش را ممکن می‌سازد. بدین منظور، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S، آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S و نیز آغازگرهای رو به عقب و رو به جلو نشانگر انتخابی *npt*II انجام شد. این توالی‌ها تنها در گیاه تراریخت موجود می‌باشند و در گیاه شاهد دیده نمی‌شوند. آزمون لکه‌گذاری DNA نیز با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز و پیشبر CaMV35S انجام و تلفیق ژن در ژنوم این گیاهان تائید شد. انتقال ژن به روش زیست‌پرتابی به‌طور رایج، بهترین انتخاب برای تولید مفید ژرم پلاسم گندم تراریخت است و به‌عنوان معمول‌ترین روش مورد استفاده در انتقال ژن به گندم به کاربرد می‌رود (Rakszegi et al. 2001).با وجود مزایای متعدد، این روش معایب برجسته‌ای مانند ورود چندین نسخه از ژن خارجی و گرایش بالا برای خاموشی ژن به ویژه در نسل‌های بعد را به همراه دارد. خاموشی ژن در سطح رونویسی یا پس از آن اتفاق می‌افتد و این پدیده اغلب با تعداد

www.SID.ir
Archive of SID

بالای نسخه‌های ژن وارد شده مرتبط است. (Shrawat 2007) به همین جهت انجام آزمایشات زیست سنجی در این نسل و نیز در نسل‌های آینده برای اثبات حضور ژن وارد شده و بیان پایدار آن همواره از سوی محققان این پژوهش مورد تاکید خواهد بود. از آن‌جا که بیماری‌های قارچی در گندم از جمله مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده محصول می‌باشند، تولید گیاه گندمی که بتواند در مقابل پاتوژن‌های قارچی مقاومت نشان دهد ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین، با ایجاد مقاومت، مصرف سموم قارچکش و هزینه‌های مربوط به سمپاشی و خرید این سموم نیز کاهش می‌یابد. در این تحقیق، گیاهان گندمی تولید شدند که حاوی دو ژن ضدقارچی کیتیناز و گلوکاناز برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی به‌ویژه فوزاریوم و ارایزیف‌گرامینیس بودند. انتظار می‌رود گیاهان حاصل با دریافت دو ژن کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی، مقاومت پایداری را نسبت به قارچ‌های فوق از خود نشان دهند. از این‌رو همانطور که گفته شد آنالیزهای بیشتری برای اثبات حضور و بیان ژن‌های وارد شده و نیز آزمایشات زیست‌سنجی جهت اثبات مقاومت به بیماری‌های قارچی و در نهایت آنالیز نسل‌های تراریخته برای اثبات پایداری ژن در آینده مورد نیاز خواهد بود.

سپاسگزاری

از بخش غلات مؤسسه تحقیقات و تهیه نهال و بذر کرج جهت تهیه بذور مورد نیاز در این تحقیق کمال تشکر و سپاس را دارم.

منابع

Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill Bikram S, Bockus W, Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum.* Journal of Experimental Botany, Vol. 54, No. 384:1101-1111

Baskaran P, Raja Rajeswari B, Jayabalan N (2005) A simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench for crop improvement. Journal of Agricultural Technology, 1 :179-192.

Dahleen L, Okubara PA , Blech AE (2001) Transgenic Approaches to Combat Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. Crop Science, 41:628–637

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini preparation. version II. Plant Molcular Biology Report,1:19-21.

Kole C, Timothy C (2008) Compendium of Transgenic Crop Plants. Transgenic Cereals and Forage Grasses. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0

Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. Journal Biological Chemistry, 266:1464-1473.

Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium Head Blight. Plant Cell Rep, 26:479–488.

Maj website (accessed July 2011), www.maj.ir.

Mohsenpour M, Babayian jelodar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008) Design and Constract of Four Recombinant Plasmid Vector for Plant transformation by Chitinase, Glucanase and Bt genes. Agri science and Natural resources of Gorgan, 15. 4: 68-80. (In Farsi)

Rakszegi M, Tamas S, Szucs P, Tamas L, Bedo Z (2001) Current status of wheat transformation. Plant Biotechnology, 3:67-81

Safikhani S (2007) Monthly of Domestic animal. Plant and Industry, 94: 58. (In Farsi)

Sambrook J, Russel D (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, Vol 1, Chapter 6, 33-64

Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill Macky R, Baldridge GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum.* Journal of Experimental Botany, 9:2371–2378

Shrawat AK (2007) Genetic Transformation of Cereals Mediated by *Agrobacterium*. Plant Biotechnology Journal, 4:575-603

Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue Organ and Culture, 83: 83–96. (In Farsi)

Archive of SID
www.SID.ir