بررسی برخی فاکتورهای موثر در انتقال ژن به گیاه دوپایه ترشک (*Rumex acetosa* L.)

بهناز نجفی[۱*]، علی‌رضا سیفی[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۱] و علی محمد شکیب[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱۲/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۷/۳)

چکیده

ترشک(*Rumex Acetosa* L.)، گیاه دوپایه مدل برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت می‌باشد. در این تحقیق، انتقال ژن گزارشگر *gus* به وسیله Agrobacterium tumefaciens به ریزنمونه‌های برگ این گیاه، بر اساس بیان موقت این ژن بررسی شد. سه نـژاد LBA4404، C58 و EHA اگروباکتریوم و دو نوع سوسپانسیون باکتری (سوسپانسیون I: باکتری کشت داده شده در محیط کشت LB با PH معادل ۷ و سوسپانسیون II: رسوب باکتری معلق در محیط کشت MS حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار استوسیرینگون با PH معادل۵/۲) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. سه زمان مختلف ۰، ۲ و ۴ روز پیش‌کشت ریزنمونه‌ها نیـز آزمـایش شـد. نتایج نشان داد که بین سه نژاد باکتری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد حال آن‌که سوسپانسیون I و ریزنمونه‌های بدون پیش‌کـشت، کـارایی بالاتری در انتقال ژن به این گیاه دارند. با توجه به نتایج فوق، آزمایش‌های انتقال پایدار ژن با روزهای مختلـف هـم‌کـشتی انجـام شـد و مشخص شد ۴ روز هم‌کشتی، مناسب‌تر از ۲ روز هم‌کشتی برای انتقال ژن به ترشـک مـی‌باشـد. گیاهـان تراریخـت احتمـالی بـا آزمـون هیستوشیمیایی GUS و هم‌چنین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بررسی شدند. نتایج نشان داد که تعدادی از این گیاهان، حداقل یک نسخه از ژن یا ژن‌های انتقالی را در مقایسه با گیاهان شاهد دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: ترشک، دوپایه، انتقال ژن، ژن *gus*، بیان موقت، بیان پایدار

مقدمه

تعیین و تشکیل اندام‌های جنـسی در گیاهـان از مراحـل اصـلی نمـوی اسـت کـه در نهایـت بـه جـدایی فیزیکـی سـاختارهای تولیدکنندهٔ گامت نر و ماده می‌انجامد. اگر چـه اکثـر گونـه‌هـای گیاهی گل‌دار، دوجنـسی هـستند ولـی تقریبـاً ۱۰ درصـد آنهـا، گل‌های تک‌جنسی تولید می‌کنند (۲۶). این گونه‌ها به دو گـروه گیاهان یک‌پایه و دوپایه تقسیم می‌شوند. تقریباً ۶ درصد گونه‌ها دوپایه هستند و در تعداد کمی از آنها دوپایگی با کروموزوم‌های جنسی مـشخص مـی‌شـود. کرومـوزوم‌هـای جنـسی تنهـا در ۶ خـــانواده گیـــاهی، شـــامل ۸ گونـــه و دو گـــروه گونـــه‌ای

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران

۲. اعضای هیئت علمی مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Behnaznajafi2007@Yahoo.com

اصلی اثبات شده است و نسبت به حیوانات، کروموزوم‌های جنسی در گیاهان دیرتر تکامل یافته‌اند (۳). در بین این گروه کوچک از گیاهان، دو نوع سیستم تعیین جنسیت وجود دارد که این سیستم‌ها مشابه با سیستم‌های موجود در حیوانات هستند. یکی از این سیستم‌ها، سیستم کروموزوم y فعال است که به عنوان مثال در سیلین (*Silene latifolia*) دیده می‌شود که نرها xy و ماده‌ها xx هستند و کروموزوم y به عنوان انگیزانندهٔ نرینگی و ممانعت کنندهٔ رشد مادگی ایفای نقش می‌کند (۱۲) و سیستم دوم تعیین جنسیت که به عنوان مثال در ترشک وجود دارد و نسبت بین کروموزوم‌های x به اتوزوم‌ها تعیین کننده اصلی تعیین جنسیت است و تعیین جنسیت اولیه، مستقل از وجود یا عدم وجود کروموزوم y است (۲۳).

ترشک با نام علمی *Rumex acetosa* L. گیاهی چند ساله، علفی و دوپایه از خانواده پلی‌گوناسه‌آ می‌باشد که از طریق رویشی (ریزوم) و زایشی (بذر) می‌تواند تکثیر گردد. خصوصیات ویژهٔ این گیاه از جمله تعداد کم کروموزم، دوپایه بودن، داشتن کروموزوم‌های جنسی و کوتاه بودن دورهٔ رشد و نمو موجب شده است تا این گیاه به عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد (۳ و ۲۳). تا کنون تعدادی ژن از خانواده MADS-box (از جمله ژن‌های *RAP*1، *RAD*1 و *RAD*2)، که در تعیین هویت اعضای گل دخالت دارند، از این گیاه جداسازی شده است (۲). انتقال این ژن‌ها به گیاه توتون، تغییراتی به ویژه در اندام‌های گل ایجاد کرده است. تعیین نقش دقیق‌تر این ژن‌ها با انتقال آنها به پایه‌های نر و ماده خود گیاه ترشک مشخص می‌شود (۲۴).

انتقال ژن و انتخاب گیاهان تراریخت، نیازمند روش مناسب کشت بافت و باززایی در گیاهان می‌باشد. مطالعاتی روی کشت بافت و باززایی گیاه ترشک انجام شده است (۱ و ۶) ولی تا کنون گزارشی از انتقال ژن در این گیاه ارائه نشده است.

در چندین سال اخیر، روش‌های مختلف انتقال ژن به گیاهان گسترش یافته‌اند که انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به دلیل برتری الگوی الحاق ژن، سادگی و کم هزینه بودن آن، به طور متداول‌تری برای انتقال ژن به گیاهان، به ویژه گیاهان دولپه مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی عوامل مؤثر در انتقال ژن به ترشک از طریق اگروباکتریوم و با استفاده از ژن مارکر *uidA* می‌باشد (۸).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق در مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کرج انجام شد و مواد گیاهی مورد نیاز، از همین مؤسسه تهیه گردید. از بذرهای حاصل از تلاقی یک واریته اصلاح شده (خریداری شده از شرکت Unwin, UK) و یک تیپ وحشی ترشک، ۵ کلون ماده انتخاب شد و قطعات تقریباً نیم سانتی‌متری ساقه گل‌دهنده، حاوی جوانه‌های جانبی، به عنوان ریز نمونه از آنها جدا گردید. برای ضدعفونی سطحی، ساقه گل‌دهنده به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم قرار گرفت و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شد. این ریز نمونه‌ها روی محیط کشت MS با ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار و pH معادل ۵/۸ قرار داده شدند تا جوانه‌های جانبی آنها رشد کرده و تکثیر شوند. کشت‌ها در شرایط ۲۲ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ پالس نگه‌داری شدند. اندام‌های هوایی حاصل از جوانه‌های جانبی این پنج کلون، تکثیر و نگه‌داری شده و به عنوان مواد گیاهی در طول مراحل آزمایش استفاده شد.

ارزیابی قابلیت باززایی کلون‌های تهیه شده

از آنجا که ریزنمونه برگ و محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳- استیک اسید (IAA) به ترتیب، بهترین ریزنمونه و محیط، برای باززایی این گیاه می‌باشد (۱)؛ برای تعیین بهترین کلون از لحاظ میزان باززایی، ریزنمونه‌های برگ (به ابعاد ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر مربع) به‌طور تصادفی از گیاهان تقریباً جوان هر کلون تهیه و روی این محیط قرار

گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵۰ ریزنمونه برای هر کلون انجام شد. در هر پتری، تقریباً ۳۰ میلی‌لیتر محیط باززایی و ۱۵ ریزنمونه برگ قرار داشت و پتری‌ها به طور تصادفی دراتاق کشت با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ پالس نگه‌داری شدند. بعداز یک ماه ریزنمونه‌ها واکشت و پس از گذشت سه ماه، درصد باززایی شاخساره برای هرکلون محاسبه شد. شاخساره‌های باززایی شده برای تولید ریشه به محیط کشت MS فاقد هورمون منتقل شدند.

نژادهای باکتری و ناقل مورد استفاده

سه نژاد LBA4404، C58 و EHA101 اگروباکتریوم که حاوی ناقل دوگانه pCAMBIA3301 بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. این ناقل در قسمت T-DNA، دارای کاست ژنی p35S-*uidA*-intron-NospolyA، به عنوان ژن گزارشگر و کاست ژنی p35S–*ppt*–CaMV35S polyA، به عنوان ژن انتخابگر گیاهی بوده و در خارج ازT-DNA دارای ژن مقاومت به کانامایسین (نئومایسین فسفوترانسفراز)، به عنوان انتخابگر باکتریایی می‌باشد.

تعیین آستانه تأثیر فسفینوتریسین به عنوان عامل گزینش بافت‌های تراریخت

تأثیر غلظت‌های مختلف فسفینوتریسین بر ریزنمونه‌های برگ ترشک مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی با غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین در محیط باززایی حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم درلیتر کربنی‌سیلین صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با۳۰ ریزنمونه برای هر غلظت (در هر پتری ۱۰ ریزنمونه) و ۳ بار تکرار انجام شد. بعد از دو هفته، میزان القا کالوس و از بین رفتن ریزنمونه‌ها مشاهده و ثبت گردید. در آزمایش جداگانه‌ای آستانه تأثیر فسفینوتریسین روی شاخساره‌های غیرتراریخت نیز بررسی شد.

بررسی نژادهای مختلف اگروباکتریوم و دو نوع سوسپانسیون باکتری از طریق بیان موقت ژن *gus*

تأثیر سه نژاد LBA4404، C58 و EHA101 اگروباکتریوم و دو نوع مختلف سوسپانسیون باکتری بر انتقال ژن به سلول‌های برگ گیاه ترشک مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. برای هرتیمار، ۱۰۰ ریزنمونه (قطعات کوچک‌تر از ۱ سانتی‌متر مربع از برگ‌های جوان کلون ۱) با باکتری تلقیح و در هر پتری ۱۰ ریزنمونه قرار داده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون I

یک تک کلونی از نژاد مربوطه (از پتری تازه واکشت شده) در ۵ میلی‌لیتر محیط LB (pH معادل ۷) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم درلیتر کانامایسین کشت شده و این کشت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، ۵۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از آن در ۲۵ میلی‌لیتر محیط جدید کشت شده و درهمان دما و سرعت نگه‌داری شد. پس از گذشت ۱۲ الی ۱۷ ساعت درOD_{600} برابر با ۰/۷ الی ۰/۸ ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند.

آماده‌سازی سوسپانسیون II

در این روش بعد از انجام مراحل قبل، در OD600 برابر با ۰/۸-۰/۷ سلول‌های باکتری در ۳۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل در محیط کشت MS مایع با همان حجم اولیه شستشو گردید و پس از سانتریفوژ مجدد، رسوب باکتری درهم حجم اولیه در محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار استوسیرینگون با pH معادل ۵/۲ حل شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ دور در دقیقه نگه‌داری و سپس ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری تلقیح گردیدند.

در هر تیمار، ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از

سوسپانسیون باکتری خارج شده و بعد از کمی خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، روی محیط هم‌کشتی که عبارت بود از محیط باززایی حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار استوسیرینگون قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به مدت سه روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با باکتری هم‌کشت شده و سپس به محیط باززایی حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم درلیتر کربنی‌سیلین منتقل و در همان شرایط به مدت ۴ روز دیگر نگه‌داری شدند. بعد از این مدت، بیان موقت ژن گزارشگر *gus* در ریزنمونه‌ها بررسی و برای هر تیمار، نقاط آبی روی ریزنمونه‌ها شمارش گردید. تجزیه واریانس داده‌ها پس از تبدیل آنها ($X^{0.5}$) با نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

بررسی روزهای مختلف پیش‌کشت ریزنمونه‌ها از طریق بیان موقت ژن *gus*

روزهای مختلف ۰، ۲ و ۴ روز پیش‌کشت ریزنمونه‌ها قبل از تلقیح، بر انتقال ژن به ترشک مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تکرار انجام شد و محیط باززایی برای پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در نظر گرفته شد. برای هر تیمار ۱۰۰ ریزنمونه برگ (به طور تصادفی از برگ‌های جوان کلون شماره ۱) با سوسپانسیون I نژاد C58 تلقیح و بعد از یک هفته، بیان موقت ژن گزارشگر *gus* در ریزنمونه‌های هر تیمار بررسی و نقاط آبی آنها شمارش گردید.

بررسی روزهای مختلف هم‌کشتی در انتقال پایدار ژن

با توجه به نتایج آزمایش‌ها قبلی، آزمایشی برای انتقال پایدار ژن با روزهای مختلف هم‌کشتی انجام گرفت. دو و چهار روز هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲۰ ریزنمونه (۱۲پتری) برای هر تیمار و ۴ تکرار بررسی شد. ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون I نژاد LBA4404 تلقیح و بعد از ۲ یا ۴ روز هم‌کشتی به محیط انتخابی (محیط باززایی حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کربنی‌سیلین و یک میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین) منتقل شدند. ریزنمونه‌ها و کالوس‌های سبز هر ۵ الی ۶ هفته روی محیط انتخابی جدید واکشت و شاخساره‌های باززایی شده برای تولید ریشه به محیط کشت MS حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم درلیتر کربنی‌سیلین و ۲ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین منتقل گردیدند. گیاهان باقی‌مانده پس از یک ماه، به محیط حاوی ۳ میلی‌گرم درلیتر فسفینوتریسین منتقل شدند و حدود ۵ هفته بعد غلظت فسفینوتریسین به ۵ میلی‌گرم در لیتر فزایش یافت.

بررسی بیان ژن گزارشگر *gus* از طریق آزمون هیستوشیمیایی

این بررسی مطابق روش جفرسون با اندکی تغییرات انجام گرفت(۱۵). در آزمایش‌ها بر اساس بیان موقت این ژن، ریزنمونه‌ها یک هفته بعد از تلقیح، در محلول X-Gluc قرارگرفته و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شده و سپس در سری اتانول ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد هر کدام به مدت ۵ دقیقه و اتانول ۱۰۰ درصد به مدت یک ساعت بی‌رنگ شدند. سپس نقاط آبی ریزنمونه‌ها (سلول‌های بیان کننده ژن *gus*) با استفاده از لوپ، شمارش و ثبت گردید و بر این اساس تیمارها مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند.

بررسی بیان پایدار ژن *gus* از طریق گیاهان باززایی شده درمحیط انتخابی انجام گرفت. به این منظور، قسمت‌های مختلف این گیاهان شامل برگ، دمبرگ و ریشه درمحلول X–Gluc قرار گرفته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شدند. سپس با استفاده از اتانول رنگ‌بری و زیر لوپ مشاهده گردیدند. محلول X–Gluc مورد استفاده حاوی ۲۰ درصد متانول بوده که از فعالیت GUS داخلی که در بعضی از گیاهان وجود دارد، جلوگیری می‌کند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روی گیاهان تراریخت احتمالی

DNA ژنومی گیاهان تراریخت احتمالی، به روش دلاپورتا استخراج شد (۹) و حدود ۱۰۰ نانوگرم از آن در واکنش ۲۰ میکرولیتری محتوی ۲ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میلی‌مولار

MgC_{l2}، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱ میکرومولار از هر پرایمر و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، جهت تکثیر ژن *gus* احتمالی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش برای مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس ۳۰ چرخه دمایی، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه/ ۷۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه اعمال گردید و در نهایت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان بسط نهایی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

قابلیت باززایی کلون‌های مختلف

درصد باززایی ۵ کلون موجود، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵۰ ریزنمونه برگ برای هر کلون مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌ها روی محیط باززایی، در سطح برش، کالوس تشکیل داده و از هفته سوم به بعد شاخساره از برخی کالوس‌ها باززایی شد. معمولاً شاخساره‌های چندگانه از این کالوس‌ها باززایی شد و لذا برای محاسبه نرخ باززایی هر کلون، تعداد ریزنمونه‌های تولید کننده شاخساره و نه تعداد شاخساره باززایی شده در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد، کلون شماره ۱ با ۵۲/۲۲ درصد باززایی، بالاترین باززایی را در بین ۵ کلون دارد و از آنجا که باززایی بالاتر، منجر به کارایی بالاتر در انتقال ژن با اگروباکتریوم می‌شود، از ریزنمونه برگ این کلون به عنوان ماده گیاهی در آزمایش‌های بعدی استفاده گردید.

تعیین آستانه تأثیر فسفینوتریسین

از آنجا که انتخاب دقیق بافت‌های تراریخت و سپس باززایی این بافت‌ها، تولید گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد، تعیین آستانه تأثیر عامل انتخابی بافت‌های تراریخت اهمیت زیادی دارد. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف فسفینوتریسین بر ریزنمونه‌های برگ که در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفته بود، بعد از دو هفته بدین قرار می‌باشد:

در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، حدود ۸۰ الی ۹۰ درصد ریزنمونه‌ها زرد شده و از بین رفتند و هیچ گونه اثری از القای کالوس در آنها دیده نمی‌شد. در غلظت‌های ۱/۵ میلی‌گرم و بالاتر نیز، تقریباً ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها از بین رفتند. بنابراین از آنجا که تفاوت بین ریزنمونه‌های موجود در محیط با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه‌های شاهد خیلی زیاد بود، این غلظت به عنوان آستانه تأثیر فسفینوتریسین روی ریزنمونه‌های برگ گیاه ترشک در نظر گرفته شد.

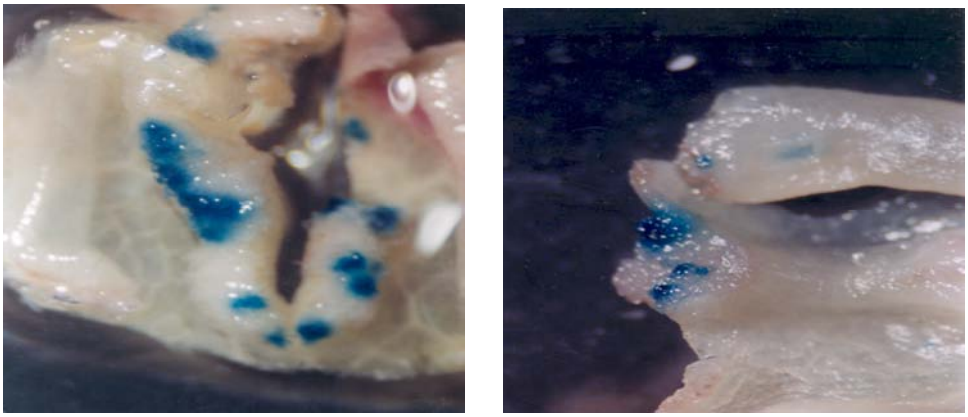
بررسی نژادهای مختلف اگروباکتریوم و دو نوع سوسپانسیون باکتری از طریق بیان موقت *gus*

تأثیر سه نژاد مختلف باکتری و دو نوع سوسپانسیون باکتری بر انتقال ژن به ریزنمونه‌های برگ ترشک به صورت فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی‌ها بر اساس بیان موقت ژن *gus*، هر نقطه آبی روی ریزنمونه‌ها نشان دهنده تعدادی از سلول‌هاست که ژن *gus* را به طور موقت بیان می‌کنند. بنابراین نقاط آبی بر روی ریزنمونه‌های هر تیمار شمارش شد و متوسط تعداد نقاط آبی به ازای هر ریزنمونه در تیمارهای مختلف مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت. در شکل ۱ بعضی از این نقاط آبی مشاهده می‌شود.

نتایج تجزیه واریانس مربوط به سه نژاد باکتری و دو نوع سوسپانسیون باکتری (جدول ۱) نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین سه نژاد اگروباکتریوم در انتقال ژن به ترشک وجود ندارد ولی بین دو نوع سوسپانسیون باکتری، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد و سوسپانسیون I، کارایی بالاتری در انتقال T-DNA به سلول‌های برگ گیاه ترشک دارد.

اگر چه نژاد اگروباکتریوم، از جمله فاکتورهای مؤثر بر انتقال ژن در بعضی مطالعات بوده (۷ و ۱۶) اما در مورد مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش مانند بعضی کلون‌های صنوبر شرقی که توسط هان و همکاران بررسی شدند(۱۳)، نژاد باکتری تأثیر معنی‌داری نداشته است و بنابراین می‌توان از هر سه نژاد اگروباکتریوم برای انتقال ژن به کلون شماره ۱ ترشک استفاده کرد.

از آن‌جا که ژن‌های *vir* برای انتقال T-DNA و مراحل قبل از الحاق آن به درون ژنوم گیاه لازم هستند (۱۰)، در



شکل ۱. بیان موقت ژن گزارشگر *gus* (نقاط آبی) یک هفته بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم (نقاط آبی در تصویر سیاه و سفید به صورت لکه‌های سیاه دیده می‌شوند.)

جدول۱. آنالیز تأثیر نژاد اگروباکتریوم و دو نوع سوسپانسیون باکتری بر میزان انتقال ژن *gus*

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	مقدارF
نژاد باکتری	۲	۱/۱۰۷	۳/۲۳^{ns}
سوسپانسیون باکتری	۱	۴/۰۷۶	۲۴/۴۶ **
نژاد باکتری × سوسپانسیون	۲	۰/۹۱۱	۲/۷۴^{ns}
^{ns} و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد		C.V.= ۱۵/۵	

سوسپانسیون II سعی شد شرایطی برای القا بهتر ژن‌های *vir* فراهم گردد. با توجه به این‌که ترشحات فنولی سلول‌های آسیب‌دیده گیاهی و یا اضافه کردن ترکیبات فنلی مختلف مثل استوسرینگون می‌تواند باعث القای رونویسی این ژن‌ها شود و بعضی قندها نیز به‌طور توامان با این القاکننده‌های فنلی همکاری می‌کنند (۴) و از طرفی شرایط اسیدی نیز بیان بهتر این ژن‌ها را سبب می‌شود (۱۱)؛ سلول‌های باکتری در محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار استوسیرینگون و ۳ درصد ساکارز با pH معادل ۵/۲ حل شد و این روش تقریباً مشابه با بعضی روش‌های استفاده شده برای انتقال ژن به گیاهان دیگر است (۷، ۱۳، ۱۶، ۲۱ و ۲۷) ولی با توجه به نتایج، روشی که برای القای ژن‌های *vir* به کار گرفته شد (سوسپانسیون II) نسبت به سوسپانسیون I، کارایی پایین‌تری در انتقال ژن به ترشک داشته است. بنابراین در ادامه آزمایش‌ها، از سوسپانسیون I برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. سوملوا و همکاران (۲۵) و چاکرابارتی و همکاران (۵) نیز برای انتقال ژن به ترتیب به Switchgrass و گل‌کلم، از سوسپانسیونI استفاده کردند و در این گیاهان احتمالاً، ترشحات فنولی سلول‌های آسیب‌دیده برای ترجمه ژن‌های *vir* کافی است.

بررسی روزهای مختلف پیش‌کشت ریزنمونه‌ها از طریق بیان موقت ژن *gus*

اثر ۰، ۲ و ۴ روز پیش‌کشت ریزنمونه‌ها روی محیط باززایی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰۰ ریزنمونه برای هر تیمار و ۲ تکرار بر انتقال ژن به سلول‌های برگ گیاه ترشک مورد بررسی قرار گرفت. پس از آزمون هیستوشیمیایی GUS،

جدول ۲. متوسط تعداد نقاط آبی به ازای هر ریزنمونه بعد از روزهای مختلف پیش‌کشت روی محیط باززایی

روزهای مختلف پیش‌کشت	تکرار اول	تکرار دوم
بدون پیش کشت	۱۱/۹	۹/۱
۲	۵/۰	۵/۴
۴	۱/۰	۱/۱

متوسط تعداد نقاط آبی به ازای هر ریزنمونه در هر تیمار محاسبه شد (جدول ۲).

با توجه به جدول ۲، پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در انتقال T-DNA کارا نبوده است و ریزنمونه‌ها بدون پیش‌کشت، راندمان بالاتری در بیان ناپایدار ژن گزارشگر *gus* نشان می‌دهند.

اثر پیش‌کشت ریزنمونه‌ها بر انتقال پایدار ژن نیز، مورد بررسی قرار گرفت ولی از این تیمارها گیاهی باززا نشد (این آزمایش‌ها نشان داده نشده‌اند). در نتیجه با این‌که پیش‌کشت ریزنمونه‌ها باعث افزایش کارایی انتقال ژن در برخی گزارش‌ها شده است (۵ و ۱۳)، در این گیاه مانند نتایج لیور و همکاران (۱۷) روی گیاه سداب، پیش‌کشت ریزنمونه‌ها مؤثر نبوده است.

بیان موقت ژن، شواهدی مبنی بر انتقال موفق T-DNA و بیان صحیح ژن انتقالی فراهم می‌کند و در نتیجه در بسیاری از گزارش‌ها، فاکتورهای مؤثر در انتقال ژن از طریق بیان موقت ژن انتقالی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۷، ۱۳، ۱۶، ۲۱ و ۲۷). با این‌که شواهدی وجود دارد که بیان ناپایدار بالا، لزوماً منتج به انتقال پایدار ژن با راندمان بالا نمی‌شود (۱۴، ۱۸) ولی اکثر مطالعات نشان داده‌اند که هم‌بستگی مثبتی بین بیان ناپایدار و انتقال پایدار ژن وجود دارد (۵، ۷، ۱۶ و ۲۷).

بررسی اثر روزهای مختلف هم‌کشتی بر انتقال پایدار ژن

با توجه به نتایج آزمایش‌ها قبلی بر اساس بیان ناپایدار ژن گزارشگر *gus*، آزمایشی برای انتقال پایدار این ژن انجام شد. در این آزمایش، ۲ یا ۴ روز هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲۰ ریزنمونه برای هر روز و ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که از لحاظ آماری تفاوتی بین نژادهای باکتری نبود، آزمایش‌ها برای انتقال پایدار ژن تنها با باکتری LBA4404 که به راحتی با ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کربنی‌سیلین کنترل می‌شد، انجام گرفت و ریزنمونه‌های برگ بدون پیش‌کشت با سوسپانسیون I این باکتری تلقیح شدند.

از ریزنمونه‌های با ۲ روز هم‌کشتی، شاخساره‌ای باززایی نشد در حالی‌که ۱۵ شاخساره از ریزنمونه‌های با ۴ روز هم‌کشتی باززیی شد. نتایج نشان می‌دهد که زمان هم‌کشتی طولانی‌تر، منتج به شاخساره‌های باززایی شده بیشتری در این گیاه شد. این نتیجه مشابه نتیجه چاکرابارتی و همکاران است که سه روز هم کشتی را بهتر از دو روز برای انتقال ژن به گل‌کلم دانستند. زامبر و همکاران نیز نشان دادند که زمان هم کشتی طولانی‌تر بیان ناپایدار ژن *gus* را نسبت به مدت زمان هم‌کشتی ۴۸ ساعت افزایش می‌دهد (۵ و ۲۷).

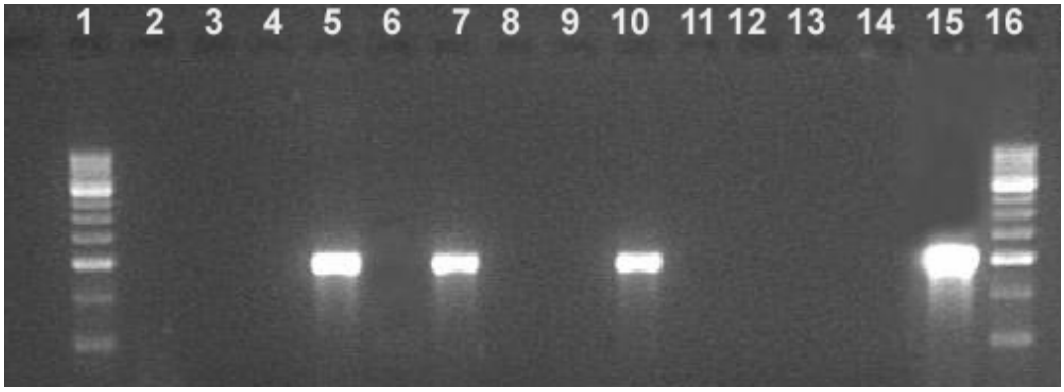
غربال بیشتر گیاهان تراریخت احتمالی با ریشه‌دار شدن روی محیط کشت MS با غلظت‌های بالاتر فسفینوتراسین انجام گرفت و در نهایت ۱۰ گیاه در محیط با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین باقی ماندند.

آنالیز گیاهان تراریخت احتمالی

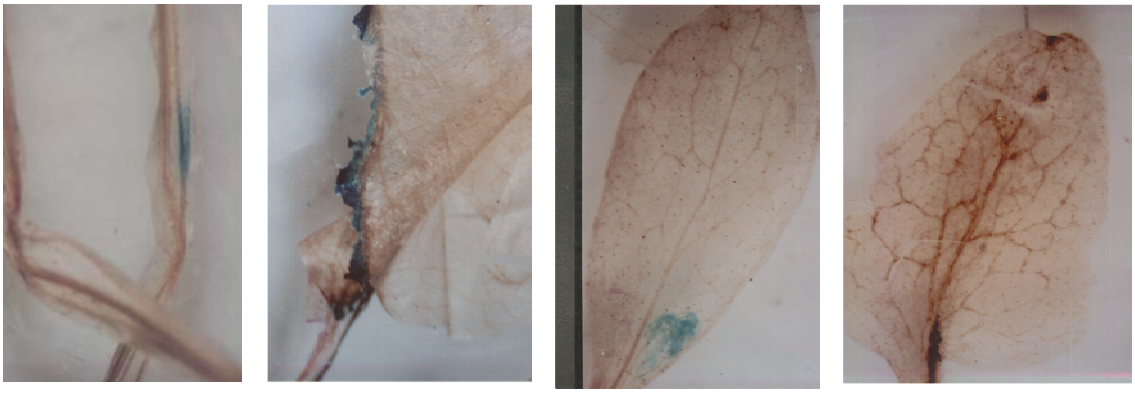
الف) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

DNA ژنومی گیاهان تراریخت احتمالی توسط آغازگر طراحی شده برای ژن *gus*، تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان می‌دهد که گیاهان شماره ۵، ۷ و ۱۰ حداقل یک کپی از ژن *gus* را دارا هستند، در حالی‌که بقیه گیاهان فاقد این ژن می‌باشند. عدم دارا بودن ژن *gus* در بعضی از این گیاهان یا به علت فرار و یا مربوط به وقایع الحاق T-DNA می‌باشد. در مورد اول، به دلیل حفاظت تقاطعی (Cross protection)، بافت‌های تراریخت مقدار آنتی‌بیوتیک را در اطراف بافت‌های غیرتراریخت کاهش می‌دهند و در نتیجه هردو بافت تراریخت و غیرتراریخت به رشد ادامه داده و امکان ایجاد شاخساره‌های شیمر یا



شکل ۲. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن *gus*. چاهک‌ها به ترتیب عبارت‌اند از: ۱ و۱۶ مارکر 1 Kb . ۲ الی ۱۱ گیاهان تراریخت احتمالی. ۱۲ الی۱۴ گیاهان غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی. ۱۵ ناقل به عنوان شاهد مثبت



شکل ۳. بیان ژن گزارشگر gus (رنگ آبی) در برگ و ساقه گیاه تراریخت. از راست به چپ: برگ گیاه کنترل (غیر تراریخت)، برگ و ساقه گیاه تراریخت

شاخساره‌های غیرتراریخت وجود دارد (۲۱ و ۲۲) و در مورد دوم، تنها یکی از دو ژن *gus* یا *bar* (ژن مقاومت به علف‌کش فسفینوتریسین) توانسته در ژنوم الحاق شود و با توجه به این‌که سیستم انتقال ژن، در جهت انتخاب بافت‌های مقاوم به علف‌کش می‌باشد، سلول‌ها یا بافت‌های دارای ژن *gus* تنها از بین می روند و سلول‌ها یا بافت‌های دارای ژن *bar* تنها، رشد خواهند کرد.

ب) آزمون هیستوشیمیایی GUS

بعد از آزمون هیستوشیمیایی ژن *gus* بر روی گیاهان تراریخت احتمالی، تنها یکی از گیاهان که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز باند مربوط به ژن *gus* را نشان داده بود، بیان ژن گزارشگر را در بعضی قسمت‌های برگ و ساقه نشان داد (شکل ۳).

انتقال ژن به گیاهان همیشه منتهی به بیان کافی ژن انتقالی نمی‌گردد و عواملی مانند اثرات مکانی (Positional effect) و خاموشی ژن، بیان آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. T-DNA می‌تواند نزدیک یا دور از عناصر فعال‌کننده رونویسی الحاق شود و منتج به فعال‌سازی یا فقدان بیان ژن انتقالی شود. هم‌چنین T-DNA می‌تواند درون مناطق فعال از نظر رونویسی یا مناطق غیرفعال از نظر رونویسی (نواحی هتروکروماتینی) الحاق شود (۱۱). خاموش شدن ژن انتقالی نیز، می‌تواند به

علت وقایع پس از رونویسی باشد که در این صورت ژن انتقالی رونویسی می‌شود ولی RNA تولید شده ناپایدار است و این پدیده اغلب وابسته به الحاق کپی‌های چندگانه ژن انتقالی درون یک سلول می‌باشد (۱۹). عامل دیگر خاموشی ژن در گیاهان، متیله شدن DNA انتقالی است که مانع رونویسی آن می‌گردد (۲۰).

هم‌چنین ممکن است این گیاهان واقعاً تراریخت نبوده و باند دیده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به علت آلودگی بافت‌های گیاهان باززایی شده با اگروباکتریوم باشد. برای یافتن دلیل اصلی، بررسی‌های بیشتری مانند انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با یک ژن پلاسمیدی که در خارج از T-DNA وجود دارد، RT-PCR برای بررسی بیان ژن الحاق شده در سطح RNA و آنالیزهای سادرن‌بلات و نوردرن‌بلات نیاز است.

در این تحقیق مشخص گردید که بین سه نژاد LBA4404، C58 و EHA101 تفاوت معنی‌داری در انتقال ژن به ریزنمونه برگ گیاه ترشک وجود ندارد و سوسپانسیون I کارایی بالاتری در انتقال T-DNA دارد. هم‌چنین مشخص گردید که ریزنمونه‌ها بدون پیش‌کشت، راندمان بالاتری در انتقال ژن به ترشک دارند. با استفاده از این نتایج و در نظر گرفتن زمان هم‌کشتی ۴ روز، چندین گیاه احتمالاً تراریخت به‌دست آمد که بعضی از آنها وجود حداقل یک کپی از ژن گزارشگر *gus* را از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آزمون هیستوشیمیایی GUS نشان دادند.

منابع مورد استفاده

۱. ایزدی دربندی، ع. و ع. م. شکیب. ۱۳۸۳. باززایی گیاهچه با فراوانی بالا در گیاه دوپایه ترشک. مجله علوم زراعی ایران ۶: ۱۷۹-۱۷۱.

2. Ainsworth, C., S. Crossley, V. Buchanan-Wollaston, M. Thangavelu and J. Parker. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. Plant Cell 7:1583-1598.
3. Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. Ann. Bot. 86:211-221.
4. Cangelosi, G. A., R. G. Ankenbauer and E. W. Nester. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proc Natl Acad Sci USA. 87:6708–6712.
5. Chakrabarty, R., V. Viswakarma, S. R. Bhat, P. B. Kirti, B. D. Singh and V. L. Chopra. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of Cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. J. Biosci. 27: 495-502.
6. Culafic, L., S. Budimir, R. Vujicic and M. Neskovic. 1987 a. Induction of Somatic embryogenesis and embryo development in *Rumex acetosella* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11:125-131.
7. De Clercq, J., M. Zamber, M. Van Montagu, W. Dillen and G. Angenon. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Rep. 21:333-340.
8. De La Riva, G. A., J. Gonzalez-Cabrera, R. Vazquez-Pardon and C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. Electronic J. Biotechnol. 1:118-133.
9. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II., Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
10. Gelvin, S. B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:223–256.
11. Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 67:16–37.
12. Grant, S., A. Houben, B. Vyskot, J. Siroky, W. H. Pan, J. Macas and H. Saedler. 1994. Genetics of sex determination in flowering plants. Develop. Gen. 15:214- 230.
13. Han, K. H., R. Meilan, C. Ma and S. H. Strauss. 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (*Genus populus*). Plant Cell Reports 19:315-320.
14. Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat Biotechnol 14:745–750.

15. Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the genes fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.
16. Koroch, A., J. Kapteyn, H. R. Juliani and J. E. Simon. 2002. *In Vitro* Regener. PP: 522-526. and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpurea* leaf explants. Terends in new crop and new uses. *In*: J. Janick and A. Whpkey (Eds.), ASHP Press, Alexandria, VA.
17. Lievre, K., A. Hchn, T. L. Minh Tran, A. Gravot, B. Thomasset, F. Bourgaud and E. Gontier. 2005.Genetic transformatio of the medicinal plant *Ruta graveolensl* By an *Agrobacterium tumefaciens*-medieated method. Plant sci. 168:883-888.
18. Maximova, S. N., A. M. Dandekar and M. J. Guiltinan. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Mol. Biol. 37:549–559.
19. Meins, F. 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. Plant Mol. Biol. 43:261–273.
20. Meyer, P. 2000. Transcriptional transgene silencing and chromatin components. Plant Mol. Biol. 43:221–234.
21. Mullins, K. V., D. J. Liewellyn, V. J. Hartney, S. Strauss and E. S. Dennis. 1997. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Rep. 16:787-791.
22. Park, S. H., S. C. Rose, C. Zapata, M. Srivatanakul and R. H. Smith.1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro* Cell Dev Biol. 34:117-121.
23. Parker, J. S. and M. S. Clark. 1991. Dosage sex-chromosome systems in plants. Plant Sci. 80:79-92.
24. Shakib, A. M. 1999. MADS box genes in sorrel (*Rumex acetosa* L.). Ph.D Thesis, University of London.
25. Somleva, M. N., Z. Tomaszewski and B. V. Conger. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Switchgrass. Crop Sci. 42:2080-2087.
26. Yampolsky,C. and H. Yampolsky. 1922. Distribution of the sex forms in the phanerogamic flora. Bibl. Genet. 3:1-62. Renner, S. S. and R. E. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. Amer. J. Bot. 82:596-606.
27. Zamber, M., N. Terryn, J. De clercq, S. De buck, W. Dillen, M. Van Montagu, D. Van Der Straeten and G. Angenon. 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Planta 216:580-586.