

باززایی شاخه القا شده با تدیازورون و تراریختی ژنی با آگروباکتریوم^۱ در گیاه کلزا (برسیکانلیپوس ال.)^۲

پریسا جنوبی: دانشگاه تربیت معلم

امیر موسوی: مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

احمد مجد: دانشگاه تربیت معلم

علی هاتف سلمانیان: مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

مختار جلالی جواران: دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

جهانفر دانشیان: بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

چکیده

تولید گیاهان تراریخت کلزا با استفاده از میانجی آگروباکتریوم نیاز به بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت و تراریختی دارد. برای این منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) (۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و تدیازورون (TDZ) (۰، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) با سنین مختلف جداگشت‌های محور زیر لپه (۷، ۱۴ و ۲۱ روزه) مورد بررسی قرار گرفتند. تفاوت معنی‌داری در اثر متقابل هورمون‌های BA و TDZ دیده شد، به نحوی که بیشترین درصد شاخه‌زایی (% ۱۷۴) از کاربرد ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ حاصل شد. سن جدا کشت نیز تأثیر معنی‌داری بر درصد شاخه‌زایی داشت. جداگشت‌های ۲۱ روزه توانایی تولید بیشترین درصد شاخه‌زایی را داشتند. شاخه‌های تولید شده پس از انتقال به محیط ریشه‌زایی دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید تولید ریشه کردند. با دستیابی به بهترین تیمار هورمونی و سن جدا کشت اقدام به انجام تراریختی توسط میانجی آگروباکتریوم شد. آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان تراریخت نشده در محیط انتخاب، حاوی کانامایسین با از دست دادن ساختار کلروفیلی به رنگ سفید یا ارغوانی درآمدند و حذف گردیدند، در حالی‌که گیاهان تراریخت شده با دریافت ژن *NPTII* و ایجاد مقاومت در مقابل کانامایسین و حفظ کلروفیل در محیط انتخاب، به رنگ سبز باقی ماندند و ریشه کردند. گیاهان ریشه‌دار به خاک منتقل شدند و تولید گل و دانه کردند. از گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین آزمون GUS انجام شد. ظهور رنگ آبی در حضور سوبسترای X-Gluc نشانگر بیان ژن *GUS* در گیاهان تراریخت بود. از برگ‌های سبز گیاهان مقاوم به کانامایسین DNA ژنومی استخراج شد و پس از PCR ظهور باندها ۵۲۰ pb بیانگر حضور ژن *GUS* در این گیاهان بود. بنا براین با استفاده از این روش می‌توان اقدام به انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کرد.

^۱- *Agrobacterium*

^۲- *Brassica napus L.*

مقدمه

کلزا از نظر تولید روغن گیاه زراعی مهم و با ارزشی است که با تولید % ۱۴ روغن جهان پس از سویا مقام دوم را از نظر تولید روغن دارد. تلاش‌های به زراعی و به نژادی به افزایش کمیت و کیفیت محصول و ویژگی‌های زراعی آن منجر شده است، اما روش‌های مرسوم جوابگوی نیاز جمعیت روبه افزایش بشر نیست. بنا براین ضرورت توجه به روش‌های مهندسی ژنتیک و انتقال ژن رویکردهای جدیدی را در این زمینه اقتضا می‌کند. از کاربردهای مهم انتقال ژن، می‌توان به تولید ارقام مقاوم به بیماری‌ها، حشرات، علف‌کش‌ها و تولید ارقام مناسب از نظر بهبود کیفیت روغن و پروتئین اشاره کرد. انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم یکی از کاراترین روش‌های انتقال ژن به گیاه است. پیش از این جدا کشت‌های مختلف توسط محققان متعدد مورد استفاده قرار گرفته است. «بارفیلد و پوا (۱۹۹۱)، رادکی و همکاران (۱۹۹۲)، شرودر و همکاران (۱۹۹۶) و تاکاساکی و همکاران (۱۹۹۷)» از جدا کشت محور زیرلپه جهت انتقال ژن با میانجی‌گری آگروباکتریوم استفاده کرده‌اند [۱]، [۲]، [۳]. به منظور انتقال ژن به گیاه کلزا لازم بود تا ابتدا روش کشت بافت آن در شرایط *In vitro* بهینه‌سازی شود. از این رو ابتدا به تعیین بهترین سن جدا کشت و ترکیب هورمون‌های بنزیل‌آدنین و تدیازورون مبادرت گردید. وجود هورمون‌های سیتوکینینی در محیط شاخه‌زایی بر میزان شاخه‌زایی مؤثر است. تدیازورون که در گذشته به عنوان عامل برگ ریز در مزارع پنبه استفاده می‌شد [۵]، برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط «موک و همکاران» به عنوان یک ترکیب شبه ستوکینینی در لوبیا به کار رفت. پس از آن «توماس و کاترمن (۱۹۸۶)» از TDZ برای القای تولید کالوس در سویا استفاده کردند [۷]. در گزارش‌های دیگر توانایی TDZ برای تحریک تکثیر شاخه‌های جانبی آشکار گردید و مشخص شد که TDZ همانند BA و یا فعال‌تر از آن برای تحریک شاخه‌زایی عمل می‌کند [۸]. از آن پس TDZ به عنوان یک ترکیب شبه سیتوکینینی در فرآیند شاخه‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق نیز برای دستیابی به بالاترین میزان شاخه‌زایی در گیاه کلزا از جدا کشت‌های محور زیر لپه در سنین متفاوت و در محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف TDZ و BA استفاده شد تا بهترین شرایط کشت و سن جدا کشت برای رسیدن به بالاترین میزان شاخه‌زایی مشخص گردد. از این شرایط، در عمل تراریختی توسط آگروباکتریوم و انتقال ژن‌های گزارش‌گر استفاده شد. در صورت بهینه‌سازی روش تراریختی می‌توان با انتقال ژن‌های مفید گیاهانی با قابلیت‌های جدید و مقاوم در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

دانه‌های کلزا رقم پانیزه SLM 460، با هیپوکلیت سدیم % ۱/۵ و تریتون X-۱۰۰ % ۰/۰۱ به مدت

۱۰ دقیقه سترون شدند و ۵ بار با آب مقطر سترون شده، شستشو داده شدند. این دانه‌ها در محیط کشت جوانه‌زنی شامل نیمی از نمک‌های محیط MS [۹] فاقد ویتامین و هورمون کشت شدند. از محور زیر لپه دانه رست‌ها با سنین متفاوت (۷، ۱۴ و ۲۱ روزه)، قطعات ۷-۵ میلی‌متر جدا شدند و در محیط القای کالوس دارای محیط کشت B5 [۱۰] همراه با ۱ میلی‌گرم از «۲ و ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)»، ۷ گرم برلیتر آگار و pH: ۵/۸ کشت گردیدند. در هر ظرف پتری ۱۰ سانتی‌متری ۲۰ قطعه جدا کشت قرار گرفت. پس از ۷ روز، جداکشت‌ها به محیط القای شاخه شامل محیط پایه B5 و نسبت‌های مختلف هورمون‌های بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر و تدیازورون (TDZ) با غلظت‌های ۰، ۰/۱۵، ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر و ۷ گرم بر لیتر آگار و pH: ۵/۸ منتقل شدند و هر دو هفته به محیط تازه مشابه واکشت گردیدند. پس از ۶ هفته شاخه‌های نوپدید از کالوس‌ها جدا شدند و به محیط طویل شدن شاخه که محیط کشت B5 فاقد هورمون بود منتقل گردیدند و پس از دو هفته به محیط القای ریشه که محیط کشت B5 همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ایندول بوتیریک اسید (IBA)، ۶ گرم بر لیتر آگار و ۱۰ گرم بر لیتر ساکاروز و pH: ۵/۸ واکشت شدند. شرایط نوری برای همه کشت‌ها ۱۶ ساعت روشنایی ($30-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

پس از تشکیل و توسعه ریشه، گیاهک‌های ریشه دار به گلدان‌های دارای ورمیکولیت انتقال یافتند و پس از سازگاری با محیط رطوبتی جدید به گلدان‌های حاوی ورمیکولیت و خاک و سپس به خاک منتقل شدند. به منظور بهاره سازی، گیاهان به مدت ۴۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شده و تولید گل و دانه نمودند.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

برای بررسی اثر سن جدا کشت، هورمون بنزیل آدنین و تدیازورون بر شاخه زایی جداکشت‌های محور زیر لپه گیاه کلزا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه نوبت تکرار اجرا شد. عامل سن جداکشت در سه سطح ۷، ۱۴ و ۲۱ روز، هورمون بنزیل آدنین در سه سطح شامل غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر و تدیازورون در سه سطح شامل غلظت‌های ۰، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه آماری شدند. نتایج به دست آمده از فراوانی شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه قبل از تجزیه واریانس به ترتیب به صورت لگاریتمی و جذری درآمدند. میانگین‌های صفات مورد بررسی با آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq 0/05$ مقایسه شدند.

سویه باکتری و آغشتگی جداگشت‌ها با آگروباکتریوم

آگروباکتریوم تومفاسین^۱ سویه LBA4404 [۱۱] دارای ناقل دوگانه (Clontech) pBI121 مورد استفاده قرار گرفت. این ناقل دارای ژن‌های مقاومت به کانامایسین (*NPTII*) و β -گلوکورونیداز (*GUS*) همراه با پرموتر CaMV35S است. کشت شبانه باکتری در محیط کشت مایع LB در حضور ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین صورت پذیرفت. از سوسپانسیون سلولی با $OD_{600} = 1/10$ ($10^9 \times 1/2$) رقت 1:10 تهیه شد. پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه، محیط کشت LB حذف گردید و سلول‌ها در محیط آغشتگی باکتری شامل نمک‌های MS با ۵٪ گلوکز و pH: ۵/۲ به صورت سوسپانسیون در آمدند.

جداگشت‌های محور زیرلپه به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون سلول باکتری آغشته شدند و پس از خشک شدن به محیط هم‌کشتی حاوی نمک‌های MS، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر تیامین - HCl، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر KH_2PO_4 ، ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D، ۳٪ ساکارز، ۰/۶٪ آگار و pH: ۵/۲ به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی منتقل شدند. پس از هم‌کشتی جداگشت‌ها با آگروباکتریوم، قطعات جداگشت به محیط القای کالوس غنی شده با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند.

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

آزمون بافت شیمیایی GUS

بررسی بیان ژن *GUS* و تولید آنزیم β -گلوکورونیداز که با تجزیه سوبسترای X-Gluc منجر به تولید رنگ آبی می‌شود در محلول بافری شامل: بافر فسفات ۵۰ mM با pH: ۷/۰، ۵-برمو-۴-کلرو-۳-ایندول- β -D گلوکورونید (X-Gluc) ۱ میلی‌مول، EDTA ۱ میلی‌مول، تریتون X-100 ۰/۰۰۱٪ و β -مرکاپتواتانل ۱۰ میلی‌مول انجام پذیرفت. قطعات برگ و دمبرگ گیاهان تراریخت در محلول بافری فوق، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب تیمار شدند. برای مشاهده رنگ آبی در بافت‌های گیاهی، کلروفیل زدای توسط اتانل ۹۶٪ انجام شد. برش‌های میکروسکوپی از برگ و دمبرگ مورد بررسی بافت‌شناسی قرار گرفت.

1- *Agrobacterium tumefaciens*

استخراج DNA ژنومی و PCR

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

5'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCAT-3'

5'-TGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3'

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۳ میلی‌مول، dNTP ۲۵۰ میکرومول، هر یک از جفت پرایمرها ۰/۲۵ میکرومول، بافر PCR ۱x و ۰/۵ unit از آنزیم تک پولی‌مراز^۱ (Cinagene) انجام پذیرفت. شرایط PCR شامل ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C یک دقیقه، ۵۸ °C یک دقیقه، ۷۲ °C یک دقیقه) و دمای طویل شدن نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه پرکین المر^۲ ۹۶۰۰ بود. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱% سوار شد و با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید در حضور اشعه UV قابل مشاهده بود.

نتایج

باززایی شاخه از جداگشت‌های محور زیرلپه

به منظور دستیابی به بهترین شرایط شاخه‌زایی، در ابتدا سنین مختلف جداگشت‌های محور زیرلپه و غلظت‌های هورمون‌های شاخه‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند تا پس از بهینه‌سازی شرایط کشت، عمل تراسختی گیاه در آن شرایط صورت پذیرد. پس از انتقال جداگشت‌ها به محیط دارای 2,4-D، کالوس‌زایی در کلیه جداگشت‌ها انجام شد (شکل- ۱A). دو هفته پس از انتقال به محیط شاخه‌زایی، شاخه‌های نوپدید بر روی کالوس‌ها ظاهر گردیدند. شاخه‌های سالم و طبیعی از کالوس‌ها جدا شده و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند.

اثر سن جداگشت و غلظت هورمون‌های بنزیل آدنین و تديازورون بر روی صفاتی از قبیل درصد فراوانی شاخه‌های باززایی شده به تعداد کل جداگشت‌ها (RF)^۳ و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه در محیط ریشه‌زایی به کل شاخه‌های باززایی شده (RS)^۴ مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان دادند که اختلاف بسیار معنی داری در سنین مختلف جداگشت از نظر RF و RS وجود داشت. در مقایسه میانگین با آزمون دانکن، بیشترین درصد شاخه‌زایی (۱۲۶/۹%) از جداگشت‌های ۱۴ روزه به دست آمد که با جداگشت‌های ۲۱ روزه در یک گروه آماری قرار گرفتند. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۷%) نیز از جداگشت‌های ۲۱ روزه حاصل شد (جدول- ۱). حضور هورمون‌های سیتوکینینی از جمله بنزیل آدنین برای شاخه‌زایی در محیط کشت ضروری

۱- Taq polymerase

۲- Perkin Elmer

۳- Regeneration Frequency

۴- Rooting Shoot Percent

بوده و در غیاب این هورمون‌ها شاخه زایی مشاهده نشد. تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت بسیار معنی‌داری در RF و RS با کاربرد هورمون BA نشان داد. بیشترین درصد شاخه زایی (۱۴۴/۶%) و ریشه زایی (۱۷/۳%) از کاربرد غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به دست آمد (جدول-۱). به کارگیری هورمون TDZ نیز تفاوت بسیار معنی‌داری در RF و RS بوجود آورد، به نحوی که بالاترین درصد شاخه زایی (۱۵۰/۴%) و ریشه‌زایی (۱۶/۷%) از کاربرد غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون حاصل شد (جدول ۱).

اثر متقابل سن جداکشت و هورمون BA تفاوت بسیار معنی‌داری ($P \leq 0.01$) در RF و RS نشان داد. بیشترین فراوانی شاخه‌زایی (۱۵۶/۶%) از کاربرد ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و جداکشت‌های ۱۴ روزه به دست آمد و بالاترین درصد ریشه‌زایی (۲۲/۴%) از تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و جداکشت‌های ۲۱ روزه حاصل شد (جدول ۲).

جدول ۱: اثر سن جدا کشت، BA و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

سن جدا کشت (روز)	BA (mg l ⁻¹)	TDZ (mg l ⁻¹)	شاخه‌های باززایی شده (%)	شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه (%)
۷			b ۱۰۵/۹	a ۱۴/۲
۱۴			a ۱۲۶/۹	a ۱۳/۹
۲۱			a ۱۲۴/۶	a 17
	۱/۵		b ۷۰/۶	ab ۱۶/۴
	۳		a ۱۴۴/۶	a ۱۷/۳
	۴/۵		a ۱۴۲/۲	b ۱۱/۴
	۰	۰	c ۸۸/۹	a ۱۵
	۰/۱۵	۰/۱۵	b ۱۱۸/۱	a ۱۳/۴
	۰/۳	۰/۳	a ۱۵۰/۴	a ۱۶/۷

مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq 0.05$ است.

جدول ۲: اثر متقابل سن جدا کشت و BA بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

سن جدا کشت (روز)	BA (mg l ⁻¹)	شاخه‌های باززایی شده (%)	شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه (%)
۷	۱/۵	e ۴۷/۲	Ab ۱۳/۱
	۳/۰	bc ۱۰۸/۳	Ab ۱۸/۳
	۴/۵	a ۱۶۲/۲	B ۱۱/۱
۱۴	۱/۵	cd ۸۳/۹	Ab ۱۳/۵
	۳/۰	a ۱۶۵/۶	Ab ۱۵/۶
	۴/۵	ab ۱۳۱/۱	Ab ۱۲/۵
۲۱	۱/۵	d ۸۰/۶	A ۲۲/۴
	۳/۰	a ۱۶۰	Ab ۱۸
	۴/۵	Ab ۱۳۳/۳	B ۱۰/۵

مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq 0.05$ است.

اثر متقابل سن جدا کشت و هورمون TDZ اختلاف معنی داری را در RF و RS ایجاد نکرد، هر چند بیشترین غلظت TDZ بالاترین درصد شاخه زایی را در کلیه سنین جدا کشت نتیجه داد.

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

اختلاف معنی‌داری از به کارگیری همزمان دو هورمون BA و TDZ در درصد شاخه‌زایی مشاهده شد، به نحوی که فراوانترین درصد شاخه‌زایی (۱۷۴/۰%) از کاربرد ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به دست آمد. افزایش غلظت TDZ در کلیه سطوح BA منجر به افزایش شاخه‌زایی شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۸/۷%) از تیمار ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ حاصل گردید که با دیگر تیمارها در آزمون دانکن در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۳: اثر متقابل سن جدا کشت و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

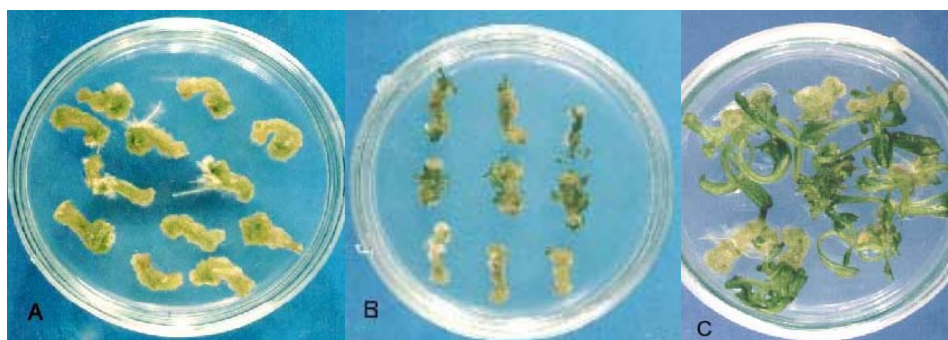
سن جدا کشت (روز)	TDZ (mg l ⁻¹)	شاخه‌های باززایی شده (%)	شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه (%)
۷	۰	c ۸۷/۲	a ۱۷
	۰/۱۵	bc ۹۹/۴	a ۱۱/۸
	۰/۳	ab ۱۳۱/۱	a ۱۳/۷
۱۴	۰	bc ۹۴/۴	a ۱۴/۳
	۰/۱۵	ab ۱۲۱/۷	a ۱۰/۲
	۰/۳	a ۱۶۴/۴	a ۱۷/۱
۲۱	۰	c ۸۵	a ۱۳/۶
	۰/۱۵	ab ۱۳۳/۳	a ۱۸/۱
	۰/۳	ab ۱۵۵/۶	a ۱۹/۲

جدول ۴: اثر متقابل BA و TDZ بر درصد شاخه‌های باززایی شده و درصد شاخه‌های تشکیل دهنده ریشه

شاخه های تشکیل دهنده ریشه		شاخه های باززایی شده		TDZ	BA
(%)		(%)		(mg l ⁻¹)	(mg l ⁻¹)
a	۱۷/۱	e	۴۱/۱	۰	۱/۵
a	۱۳/۶	d	۶۶/۱	۰/۱۵	
a	۱۸/۴	c	۱۰۴/۴	۳	
a	۱۸/۵	bc	۱۱۷/۸	۰	۳
a	۱۴/۷	abc	۱۴۳/۳	۰/۱۵	
a	۱۸/۷	a	۱۷۲/۸	۳	
a	۹/۲	bc	۱۰۷/۸	۰	۴/۵
a	۱۱/۹	ab	۱۴۵	۰/۱۵	
a	۱۳	a	۱۷۳/۹	۳	

مقادیر ارایه شده بر اساس میانگین سه تکرار و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq 0/05$ است.

نتایج به دست آمده از آزمایش حاکی از آن است که سنن پائین جداگشت (۷ روزه) در غلظت‌های اندک هورمونی ($1/5 \text{ mg l}^{-1}$ BA و بدون TDZ) کمترین درصد شاخه زایی (% ۴۱/۱۱) را سبب می‌شدند و اغلب شاخه‌های تولید شده نیز دارای ریخت غیرطبیعی و فاقد برگ‌های گسترده‌اند (شکل B ۱) و در محیط ریشه‌زایی قادر به تولید ریشه نبودند، در حالی که سنن بالای جداگشت (۲۱ روزه) در تیمارهای سنگین هورمونی (۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ) بیشترین درصد شاخه‌زایی (% ۱۷۴) را موجب شدند. شاخه‌های حاصل از نظر ریخت‌شناسی طبیعی بوده و برگ‌های گسترده و سبز بود تولید کردند (شکل C ۱). این شاخه‌ها در محیط ریشه زایی قادر به تولید ریشه انبوه بوده و پس از بهار شدن تولید گل و دانه‌های سالم کردند. از این تیمار هورمونی و سن جداگشت جهت عمل تراریختی نمونه‌ها با آگروباکتریوم استفاده شد.



شکل ۱-

- A- تشکیل کالوس دو هفته پس از انتقال به محیط کالوس زایی دارای 2,4-D
 B- شاخه‌های حاصل از جداگشت‌های ۷ روزه در محیط شاخه زایی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدون TDZ با برگ‌های کوچک و توسعه نیافته
 C- شاخه‌های تولید شده از جداگشت‌های ۲۱ روزه در محیط شاخه زایی حاوی ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ با برگ‌های طبیعی و گسترده

تراریختی و انتخاب در محیط دارای کانامایسین

آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان عامل انتخاب‌گر در محیط کشت تراریختی به کار می‌رود. جداگشت‌های تراریخت نشده در محیط کالوس‌زایی و شاخه‌زایی دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین قادر به تشکیل کالوس سبز و شاخه سبز نیستند و به علت حضور کانامایسین ساختار کلروفیلی خود را از دست می‌دهند و به رنگ سفید یا ارغوانی درمی‌آیند. وجود ژن *NPT II* در بخش T-DNA ناقل pBI121 که به ژنوم گیاهان تراریخت شده منتقل شده بود، باعث ساخته شدن آنزیم نئومایسین فسفوترانسفراز و ایجاد مقاومت در برابر کانامایسین و حفظ ساختار کلروپلاستی شده و جداگشت‌های دریافت کننده این ژن در محیط کالوس‌زایی و شاخه‌زایی با تشکیل کالوس‌های سبزرنگ و شاخه‌های سبز توان بقاء در حضور کانامایسین را داشتند و در محیط ریشه زایی قادر به تولید ریشه بودند. از ۷۵ جداگشت محور زیرپله بکار گرفته شده ۶ گیاه مقاوم به کانامایسین حاصل شد که همگی تولید گل و دانه کردند (شکل ۲).

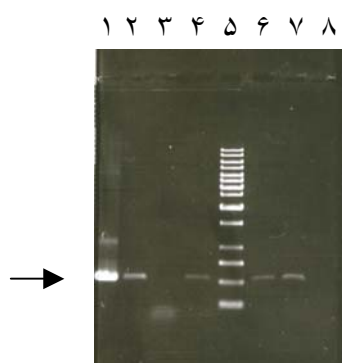
ارزیابی ژن *GUS* از طریق آزمون شیمیایی و PCR

تأیید انتقال ژن *GUS* به ژنوم گیاه با کمک PCR انجام شد. برای این منظور از برگ‌های سبز گیاهان مقاوم به کانامایسین DNA ژنومی استخراج شد و در حضور پرایمرهای اختصاصی ژن *GUS*، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز انجام شد. ظهور باند ۵۲۰ Pb بیان‌گر وجود این ژن در ژنوم گیاهان تراریخت شده بود (شکل ۳).



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

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



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز قطعه 520 bp محصول PCR ژن *GUS* چاهک (۱) کنترل مثبت؛ چاهک‌های ۲، ۴، ۶ و ۷ گیاهان تراریخت؛ چاهک (۳) گیاه تراریخت نشده چاهک (۸) کنترل منفی؛ چاهک (۵) نشانگر مولکولی ۱ Kb



شکل ۴- بررسی آزمون GUS در گیاهان تراریخت شده در حضور سوبسترای X-Gluc
 ظهور رنگ آبی نشانگر بیان ژن GUS در گیاهان تراریخت (چپ)
 در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت (راست) است

بحث

پژوهش انجام شده روش بهبود یافته‌ای را برای باززایی شاخه با استفاده از هورمون‌های بنزیل آدنین و تدیازورون و بهترین سن جداگشت‌های محور زیرلپه ارائه می‌کند. براساس نتایج به دست آمده می‌توان برای دستیابی به بالاترین درصد شاخه‌زایی از جداگشت‌های محور زیرلپه دانه رست‌های ۲۱ روزه در حضور غلظت‌های ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بهره جست. « کریستی و همکاران (۱۹۹۹)» نیز از جداگشت‌های محور زیرلپه (*B. napus*) با به کارگیری ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به بیشترین درصد باززایی شاخه دست یافتند. « دی بلاک و همکاران (۱۹۸۹)» از جداگشت‌های محور زیرلپه دانه رست‌های ۱۲ تا ۱۴ روزه (*B. napus*) در محیط شاخه‌زایی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و 1 mg l^{-1} BA و 0.01 mg l^{-1} GA₃ گیاهان باززایی شده تولید کردند. « چنگ و همکاران (۲۰۰۱)» از جداگشت‌های محور زیرلپه گیاهان سه روزه (*B. oleracea*) دارای رشد سریع با به کارگیری $4/5 \text{ mg l}^{-1}$ BA بیش از ۹۰٪ باززایی و با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به ۹۴٪ باززایی شاخه دست یافتند. این گزارش‌ها با نتایج تحقیقات حاضر که به نقش مؤثر BA و TDZ در باززایی شاخه تأکید دارد، همسویی دارد.

تدیازورون یکی از چند اوره جانشین شونده در ترکیباتی چون N'-N دی فنیل اوره است. با وجود این‌که فعالیت بیوشیمیایی فنیل اوره‌ها بطور کامل شناخته نشده است، ولی اعتقاد بر آن است که در تنظیم سیتوکینین‌های پورینی فعالند و یا عملکرد مستقیمی مانند سیتوکینین‌ها دارند، یا در همکاری با سیتوکینین‌ها عمل می‌کنند [۶].

« نیلسن و همکاران (۱۹۹۵) » با ذکر این موضوع که اثر همکاری BA و TDZ تاکنون گزارش نشده است، با به کارگیری TDZ در اولین محیط کشت و کاربرد BA در واكشت‌های بعدی به همکاری اثر این دو هورمون اشاره داشتند و مدلی را بر اساس آنالوگی با سیستم هورمونی جانوران برای فعالیت سیتوکینین‌ها در سلول گیاهی پیشنهاد کردند. بر اساس این مدل، هر دو سیتوکینین BA و TDZ می‌توانند به گیرنده پروتئین متصل شونده به سیتوکینین‌ها^۱ (CBP) اتصال یابند. CBP دوجایگاه اتصال مختلف دارد یک جایگاه به طور طبیعی با سیتوکینین‌های تیب آدنین متصل می‌شود، در حالی که دیگری توانایی اتصال با سیتوکینین‌های تیب فنیل اوره را دارد و اتصال TDZ به جایگاه فنیل اوره CBP باعث افزایش اتصال BA به جایگاه آدنینی می‌شود و باعث بهبود اثر BA می‌گردد. پیشنهاد دو جایگاه اتصال بر روی یک گیرنده می‌تواند بازگو کننده این نکته باشد که اثر سیتوکینین TDZ در گونه‌های متفاوت بسیار متغیرتر از اثرات سیتوکینین‌های آدنینی است. در مطالعه کنونی نیز حضور TDZ همراه با BA باعث افزایش باززایی شاخه شد. « کین یاند و همکاران (۱۹۹۴) » نیز حضور مداوم TDZ حتی در مقدار اندک (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) را برای القای شاخه‌زایی و تشکیل تعداد بیش‌تر شاخه در گیاه بادام زمینی^۲ ضروری دانستند که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی دارد.

سیتوکینین‌ها در سلول از طریق مکانیسم شکست اکسیداتیو زنجیره N^۶- توسط سیتوکینین اکسیدازها غیرفعال می‌شوند، TDZ به عنوان مهارکننده غیررقابتی سیتوکینین اکسیداز می‌تواند موجب افزایش سیتوکینین درون‌زا شود و باززایی شاخه را به طریق (*de novo*) القا کند [۷]، [۵]. TDZ اثر شبه سیتوکینین شناخته نشده‌ای را در گیاه القا می‌کند. بدین معنی که ریبونوکلوئتید سیتوکینین را به شکل بسیار فعال زیستی ریبونوکلوئوزید در بافت کالوس لوبیا القا می‌کند [۱۸]. « برتاگن و همکاران (۱۹۹۴) » دو فرضیه برای نحوه عمل TDZ بیان کردند. نخست آن که TDZ می‌تواند به طور مستقیم باعث تحریک رشد شود که ناشی از فعالیت زیستی آن در یک مسیر مشابه سیتوکینین‌های جانشین شده N^۶ است، و یا ممکن است باعث القای سنتز یا تجمع سیتوکینین‌های آندوژن شود. اختلاف میان ارقام و گونه‌ها از نظر میزان هورمون به کار رفته وجود دارد. زیرا سلول‌ها در گیاهان مشابه نیز می‌توانند سطوح مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی آندوژن داشته باشند. علاوه بر این تنوع و کارایی گیرنده‌ها یا حساسیت سلولی به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متفاوت است [۲۰]. به نظر می‌رسد با افزایش سن جداکشت‌ها در پژوهش کنونی، سطح هورمون آندوژن دچار تغییر شده و پاسخ سنین مختلف به هورمون‌های سیتوکینینی آگزوژن نیز متفاوت باشد.

بر اساس تحقیق انجام شده و دست‌یابی به بهترین سن جداکشت و غلظت هورمون‌های BA و TDZ، از جداکشت محور زیرلپه در شرایط بهینه عمل ترارايختی توسط آگروباکتریوم انجام شد. انتقال ژن‌های *NPTII* با

۱-Cytokinin Binding Protein

۲- *Arachis hypogea*

غربالگری در محیط حاوی کانامایسین و *GUS*، با ظهور رنگ آبی در حضور سوبسترای X-Gluc و مشاهده باند ۵۲۰ pb در PCR به تأیید رسیدند. فراوانی تراریختی در این تحقیق ۷% بود که با گزارش‌های «شرودر و همکاران در ۱۹۹۴» که به ۱۰% کارایی تراریختی در کلزا دست یافتند، «رادکی و همکاران (۱۹۹۲) و تاکاساکی و همکاران (۱۹۹۷)» که با استفاده از جداگشت‌های محور زیرلپه به فراوانی‌های ۲/۲% و ۵% رسیدند قابل مقایسه است. با توجه به روش ارائه شده و فراوانی تراریختی حاصل می‌توان از این فن برای انتقال ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به گیاه کلزا استفاده کرد. انتقال ژن مقاومت به علفکش با این روش در حال انجام گرفتن است.

References

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

15. P.K.Cheng, P. Lakshmanan and S. Swarup, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, Vol. 37(2001) 592-598.
16. J.M. Nielsen, J. Hansen and K. Brandt, Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., Vol. 41(1995) 165- 170.
17. M. Kanyand, A.P. Dessai and C.S. Prakash, Plant Cell Rep, Vol. 14(1994) 1-5.
18. S.C. Capelle, D.W.S. Mok, S.C. Kirchner and M.C. Mok, Plant Phisiol, Vol.73(1983) 796-802.
19. B. Bretagne, M. C. Chupeau, Y. Chupeau and G. Fouilloy, Plant Cell Rep., Vol. 14(1994) 120-124.
20. S.C. Minocha, In J.M. Bonga and D.J. Durzan(eds) Cell and tissue culture in forestry, Vol.1(1987) 125-141.