

بهینه‌سازی تراریختی در گیاه کلزا (*B.napus L.*) با کنترل تولید گاز اتیلن و افزایش تدریجی عامل انتخاب‌کننده

روح اله کاظمی^۱، جعفر امانی^۲، علی شرفی^۳، علیرضا عباسی^۴، علی هاتف سلمانیان^{۱*}

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی

^۲ تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی

^۳ زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی

^۴ کرج، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۱

چکیده

کلزا (*Brassica napus L.*) یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی جهان به شمار می‌رود. علی‌رغم تولید گیاهان تراریخته کلزا کارایی انتقال به این گیاه پایین می‌باشد. با توجه به اهمیت تأثیر ژنوتیپ گیاه و ترکیب محیط کشت بر تراریختی و باززایی و همچنین سمیت کانامایسین برای رشد این گیاه، توسعه یک روش مناسب جهت انتقال ژن بسیار ضروری است. در این پژوهش از ریزنمونه‌های برگهای لپه ای با استفاده از آگروباکتریوم تومی فاشینس سویه‌های حاوی ژن EPSPS برای تراریخت نمودن رقم PF 7045-91 استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از تلقیح با آگروباکتریوم محیطهای مختلف همکشتی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرارداد شد. طی باززایی به منظور جلوگیری از نکروز شدن ریزنمونه‌ها و گزینش مؤثر از نیترات نقره به عنوان ممانعت‌کننده تولید اتیلن و افزایش پلکانی غلظت کانامایسین به عنوان ماده انتخاب‌کننده استفاده شد. برای این منظور ابتدا ریزنمونه‌ها در محیط باززایی حاوی نیترات نقره و بدون حضور کانامایسین نگهداری شدند. پس از آن با حفظ غلظت ثابتی از نیترات نقره (۵ میلی‌گرم بر لیتر)، کانامایسین در یک فاصله ۱۰ روزه به غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش داده شد. نوساقه‌های باززا شده به منظور القای ریشه‌زایی به محیط پایه MS حاوی ۱۵ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر از IBA منتقل شدند. انتقال مؤثر ژن به گیاهان با آزمونهای مولکولی تأیید شد. در این بررسی مشخص شد که با افزایش تدریجی عامل انتخابی، درصد تراریختی نیز افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، آگروباکتریوم تومی فاشینس، محیط همکشتی، کنترل تولید اتیلن، افزایش تدریجی غلظت کانامایسین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۶۵-۰۲۱، پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

این گیاه به دلیل کیفیت بالای روغن و کنجاله غنی از پروتئین یکی از مهمترین گیاهان زراعی به شمار می‌رود. بر اساس این نکات سطح زیر کشت جهانی این گیاه در چند سال گذشته توسعه چشمگیری داشته است (۴۰).

از طرف دیگر به کارگیری روشهای مهندسی ژنتیک باعث تولید واریته‌های جدیدی از گیاه کلزا شده است که از نظر

گیاه کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان تولیدکننده روغن محسوب شده و بعد از سویا و نخل روغنی به عنوان سومین گیاه تولیدکننده این ماده غذایی به شمار می‌آید. این گیاه حدود ۱۳ درصد روغن خوراکی جهان را تأمین کرده و از نظر سطح زیر کشت گیاهانی مانند بادام زمینی، آفتابگردان و پنبه را نیز پشت سر گذاشته است. به علاوه

صفات با ارزش کشاورزی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. مهندسی ژنتیک در گیاهان زراعی و باغبانی به منظور تولید گیاهان تراریخت با توانایی بیان ژن خارجی برای ایجاد مقاومت به عواملی چون ویروسها، حشرات، علف‌کشها، عوامل فساد بعد از برداشت و افزایش فرآورده‌های ذخیره‌ای تغییر شکل یافته، به کار رفته است (۱۷ و ۲۹). گزارشات بسیاری نیز برای انتقال ژن به گیاه کلزا جهت تغییر در ژنوتیپ این گیاه از قبیل مقاومت به علف‌کشها، افزایش کمیت و کیفیت روغن و همچنین استفاده از این گیاه به عنوان ذخیره‌کننده پروتئین وجود دارد (۱۰ و ۲۱). از طرف دیگر در کشت بافت گیاهی و آزمایشات تراریختی، عوامل متعدد و پیچیده‌ای دخالت می‌کنند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود. تاکنون در کشت بافت و انتقال ژن به کلزا از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به میکروسپورهای جدا شده (۱۱)، قطعات ریشه (۱۵)، محور زیر لپه (هیپوکوتیل) (۱۳، ۳۴ و ۳۸) و برگهای لپه‌ای (کوتیلدون) (۲۷) اشاره کرد. در انتقال ژن به گیاه کلزا هنگامی که از ریشه استفاده می‌شود ۴ هفته زمان برای باززایی گیاه مورد نیاز می‌باشد و در صورت استفاده از هیپوکوتیل باید ۷-۸ هفته جهت باز زایی زمان صرف نمود. به همین دلیل استفاده از کوتیلدون برای انتقال ژن یک روش مناسب از لحاظ صرف زمان و ساده و ارزان از لحاظ تجهیزات و مواد آزمایشگاهی می‌باشد. اگرچه این روش نیز نیاز به تنظیم و بهینه‌سازی جهت انتقال ژن دارد (۴، ۲۰ و ۲۶). تا به امروز گزارشات متعددی برای افزایش کارایی انتقال ژن به این گیاه ارائه شده است که این نسبت بین ۴- ۲۵ درصد، متغیر بوده و با توجه به گونه و ژنوتیپهای مختلف گیاه نیز متفاوت است (۱۶ و ۳۸). روش انتقال ژن از طریق آگروباکتريوم به گونه‌های مختلف گیاه کلزا نظیر *B.oleracea* *B.napus* *B.carinata* *B.junceae* و *B.campestris* نیز بهینه شده است (۲۱).

بین عوامل انتخاب‌کننده، آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان یک گزینشگر انتخابی به طور معمول در آزمایشهای تراریختی به کار می‌رود. این گزینشگر انتخابی با تداخل در ساخت پروتئین در پلاستیدها (نظیر کلروپلاست) منجر به مرگ سلولهای غیر تراریخت که فاقد ژن نئومایسین فسفوترانسفراز تراژن هستند، می‌شود. اثر این آنتی‌بیوتیک به شکل بی‌رنگ شدن ریزنمونه‌ها و ممانعت از ساقه‌زایی و ریشه‌زایی در بافتهای حساس غیر تراریخت قابل مشاهده است (۱۴). گزارشهای مختلفی از اثرات بازدارنده غلظتهای بالای کانامایسین بر باززایی و تراریختی گیاهان وجود دارد (۱۴، ۲۲ و ۴۲). میزان حساسیت هر گیاه به کانامایسین وابسته به عوامل مختلفی نظیر ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، دوره رشدی گیاه و شرایط کشت بافت می‌باشد. بر این اساس بایستی تراریختی هر گیاه در شرایط موجود بهینه‌سازی شود (۱۴). با توجه به اینکه اتیلن به عنوان یک هورمون‌گازی شکل، در کشت بافت گیاهی و در طی فرآیندهای گیاهی با منابع دیگری نظیر آگار تولید شده و در ظروف کشت تجمع می‌یابد، تجمع اتیلن در ظروف کشت به عنوان یکی از عوامل مهارى رشد و ممانعت‌کننده باززایی مطرح است (۸ و ۲۳). همچنین اثر مهارى اتیلن در تراریختی گیاهان با آگروباکتريوم به واسطه ممانعت از بیان ژنهای بیمارزایی (*vir*) این باکتری نیز گزارش شده است (۳۰). به کارگیری موادی که مانع از عمل یا تولید اتیلن می‌شوند نظیر نیترات نقره و AVG (آمینو اتوکسی وینیل گلیسین) منجر به افزایش میزان تراریختی گیاهان مختلف می‌گردد (۱۲ و ۲۴).

در این تحقیق با توجه به میزان پایین درصد تراریختی در گیاه کلزا برخی عوامل مهم مؤثر بر تراریختی مورد بررسی قرار گرفته است. بر این اساس سعی شده است کارایی تراریختی با استفاده از ۳ سویه مختلف آگروباکتريوم مورد ارزیابی و سپس با استفاده از ریزنمونه کوتیلدونی گیاه کلزا و تنظیم چند عامل مؤثر در تراریختی، انتقال ژن به این

این ناقل حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بوده که توسط پروموتور و خاتمه دهنده NOS (nopaline synthase) کنترل می‌شود.

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن: قبل از تراریختی گیاه کلزا، غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP (۱، ۲، ۴، ۶ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۶ میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت، به منظور دستیابی به شرایط بهینه هورمونی برای باززایی ریز نمونه برگ‌های لپه ای (کوتیلدون) گیاه غیر تراریخت مورد بررسی قرار گرفت. بهترین شرایط به دست آمده، در مرحله بعد در ترکیب محیط کشت برای باززایی گیاهان تراریخت استفاده شد.

برگ‌های لپه ای از گیاهچه های ۵ روزه استریل جدا شده پس از حذف مریستم انتهایی روی محیط کشت اولیه (MS حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر BAP، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۷ گرم بر لیتر آگار) کشت شدند. پس از یک روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی جهت همکشتی با آگروباکتریوم حاوی ژن هدف مورد استفاده قرار گرفتند.

از کشت آگروباکتریوم حاوی ژن هدف در غلظت‌های مختلف (۱، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲) (OD_{600nm}) رسوب (۳۰۰۰rpm، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) تهیه شد و پس از حل مجدد رسوب در محیط تلقیح (MS مایع و ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز) دمبرگ کوتیلدون‌های پیش تیمار شده به مدت ۴۰ ثانیه (۲) در این محیط قرار داده شدند. همچنین غلظت‌های مختلف (۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ میلی مولار) استوسیرینگون جهت تحریک آگروباکتریوم در افزایش میزان تراریختی گیاه، مورد ارزیابی قرار گرفت. کوتیلدون های آلوده به آگروباکتریوم، به محیط های مختلف همکشتی (MS حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر BAP، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۷ گرم بر لیتر آگار و ۵ میلی گرم بر لیتر AgNO₃) منتقل شد. در این مرحله ترکیب

گیاه بهینه شود. در این روش از ترکیبات مختلف محیط کشت، غلظت تنظیم شده نترات نقره برای ممانعت از اثر اتیلن، غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین، سیتوکینین و ماده القا کننده استوسیرینگون جهت بهینه سازی تراریختی استفاده شد. همچنین افزایش غلظت عامل انتخاب کننده کانامایسین به صورت پلکانی از صفر تا ۱۵ میلی گرم در لیتر جهت غربالگری مؤثر گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذور رقم تجاری ۹۱-۷۰۴۵-PF کلزای بهاره از بخش تحقیقات دانه های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جهت ضد عفونی بذر ها ابتدا از الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. سپس بذور با محلول حاوی هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد و تریتون X-۱۰۰ با نسبت ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در شرایط استریل کاملاً مخلوط گردید به منظور حذف مواد شیمیایی ضد عفونی کننده، با استفاده از آب مقطر استریل ۳ مرتبه شستشو داده شد. سپس بذرها را بر روی کاغذ صافی استریل خشک و در محیط MS ۱/۲ حاوی ۱۵ گرم بر لیتر سوکروز و ۸ گرم بر لیتر آگار با گسترش ۵۰-۴۰ دانه در هر شیشه کشت داده شد. بذور کشت داده شده به مدت ۴ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱ و ۲۳).

پلاسمیدها و سویه باکتری: آگرو باکتریوم توم فاشینس سویه GV3850, GV3101, LBA4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بخش بیوتکنولوژی گیاهی تهیه شد. به منظور انتقال ژن همچنین از ناقل pBI121 حاوی ژن جهش یافته EPSPS (۳) که تحت کنترل عمومی پروموتور CaMV-35S می باشد، استفاده شد.

شدند. جهت تعیین میزان تراریختی و مقایسه با نتایج قبلی، میزان باززایی گیاهان در هر یک از غلظت‌های ثابت کانامایسین (۸ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر) به تنهایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری: فراوانی باززایی نوساقه (R)، طبق تعریف با شمارش تعداد نوساقه تولید شده (P) به تعداد ریزنمونه کشت شده (N) به صورت درصد در هر پتری دیش محاسبه گردید. برای هر آزمایش ۱۰۰ ریز نمونه انتخاب شد و هر آزمایش نیز در ۳ تکرار کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS12 تجزیه و تحلیل شد.

تأیید تراریختی گیاهان کلزا از طریق PCR: با استفاده از روش استخراج سریع ژنوم از گیاه (۶) DNA ژنومی استخراج و مورد استفاده قرار گرفت. برای آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت آزمایش PCR، از جفت پرایمرهای زیر که ژن EPSPS انتقال یافته به گیاهان تراریخت با اندازه تقریبی ۱۳۰۰bp را تکثیر می‌کند، استفاده شد.

EPS1: 5'-CGGGATCCATCGAATCCCTGACGTTACAA-3'
EPS2: 5'-GCGGATCCTCAGGCTGCCTGGCTAATC-3'

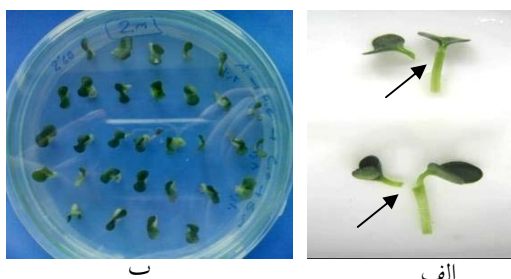
واکنش PCR با استفاده از ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی به عنوان الگو و در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. در این واکنش از ۲ mM Mg⁺ و ۰/۳ μl از آنزیم Taq DNA polymerase (5U/μl) استفاده شد و برنامه مورد استفاده برای انجام واکنش فوق طبق شرایط زیر انجام گرفت:

۵ دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: یک دقیقه دمای واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه دمای اتصال در ۵۸ درجه سانتی گراد، یک دقیقه دمای طولی سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طولی سازی انتهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده

محیط کشت کامل MS به صورت ثابت و یا با حذف ترکیبات مختلف از قبیل KNO₃، CaCl₂، KH₂PO₄ و NH₄NO₃ از محیط کشت MS جهت بررسی میزان تراریختی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌های تراریخت در محیط‌های ذکر شده به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۲۱). پس از این مدت کوتیلدون‌ها به محیط القای نوساقه (MS حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر BAP، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۷ گرم بر لیتر آگار و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و بدون گزینشگر انتخابی کانامایسین) منتقل و به مدت یک هفته نیز در این محیط قرار گرفتند. در این شرایط همه گیاهچه‌ها (اعم از تراریخت و غیر تراریخت) قادر به باززایی بر روی محیط هستند. در مراحل بعد کوتیلدون‌ها به محیط اولیه گزینشگر القا نوساقه حاوی مقادیر کم کانامایسین (۸ میلی گرم بر لیتر) منتقل و به مدت ۱۰ روز در این محیط نگهداری شدند. ریز نمونه‌های رشد یافته در محیط اولیه گزینشگر هر ۱۰ روز یک بار به محیط جدید حاوی همان ترکیبات قبلی و کانامایسین با غلظت افزایشی (۸ سپس ۱۵ میلی گرم بر لیتر) واکنش شدند. نوساقه‌های سبز باززا شده بر روی محیط گزینشگر نهایی (با غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین) جداسازی شده و به محیط طولی شدن نوساقه (دارای همان ترکیبات قبلی بدون هیچ نوع تنظیم کننده رشد) منتقل گردیدند. پس از رشد کافی و تشکیل مریستم فعال، گیاهچه به محیط القای ریشه (نمک‌های MS حاوی ۱۵ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IBA و ۷ گرم بر لیتر آگار) انتقال یافتند. گیاهچه‌های ریشه دار شده با ارتفاع حدود ۱۰ سانتیمتر به گلدانهای کوچک با خاک استریل (ترکیب مساوی از پیت، ورمیکولیت و پرلیت) انتقال یافته و برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوشهای شفاف پلاستیکی با امکان تبادل هوا با محیط استفاده گردید. پس از سازگاری سرپوشها برداشته شده و گیاهان به شرایط طبیعی منتقل

تیمارهای ۵،۶،۷،۸ بیشترین میزان فراوانی باززایی مشاهده شد و این تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معناداری را در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن با سایر تیمارها نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که حضور نترات نقره و هورمون NAA باعث افزایش میزان باززایی در ریز نمونه‌ها می‌گردد.

تراکم مناسب ریز نمونه‌ها و غلظت آگروباکتریوم برای آلوده کردن کوتیلدون‌های کلزا: در این مرحله از تراکم ۲۵ تا ۳۰ ریزنمونه کوتیلدونی در هر پلیت استفاده شد. ریزنمونه‌ها از برش دقیق در قاعده دمبرگ، برگهای پهای و حذف مریستم انتهایی بدست آمدند. در تهیه این ریزنمونه‌ها باید دقت کرد تا بخشی از توده مریستم انتهایی در قاعده دمبرگ باقی نماند. در صورت عدم حذف کامل مریستم انتهایی پس از چند روز این بخش رشد یافته و شاخه‌هایی را به وجود خواهند آورد که تراریخت نبوده و در حضور کانامایسین محیط سفید می‌شوند. از سوی دیگر عدم دقت کافی و حذف سلولهای قاعده دمبرگ که از توان باززایی بالایی برخوردار بودند نیز می‌تواند باعث عدم شاخه‌زایی و کاهش تراریختی گردد. چگونگی ایجاد برش در ریز نمونه‌های کوتیلدونی و چیدمان در محیط پیش کشت در شکل (۱) ارائه شده است.



شکل ۱- الف) جایگاه مناسب ایجاد برش ریز نمونه مناسب در دو نمای روبرو و کنار ب) کشت تعداد مشخص ریزنمونه‌های کوتیلدونی (۲۵-۳۰) بر روی محیط پیش‌کشت

پس از ۲۴ ساعت پیش‌کشت، ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون آگروباکتریوم نوترکیب که دارای OD های متفاوتی بودند

و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

جدول ۱- تأثیر غلظتهای مختلف 6-BAP، NAA و غلظت ثابت $AgNO_3$ بر روی باززایی گیاه غیر تراریخت کلزا - در صد باززایی حاصل از تعداد گیاهچه‌های بازاز شده نسبت به کوتیلدون‌های مورد آزمایش می‌باشد.

تیمار	6-BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	$AgNO_3$ (mg/L)	میانگین درصد گیاهان باز شده
۱	۱	-	-	۳۰ ^C
۲	۲	-	-	۴۰ ^C
۳	۴	-	-	۷۵ ^b
۴	۶	-	-	۷۰ ^b
۵	۴	۰/۰۱	۵	۸۰ ^a
۶	۴	۰/۰۲	۵	۸۵ ^a
۷	۴	۰/۰۴	۵	۹۵ ^a
۸	۴	۰/۰۶	۵	۹۰ ^a

نتایج

تنظیم غلظت هورمونهای مختلف جهت باززایی مناسب: در این تحقیق جهت آزمایش باززایی گیاهچه‌های کلزا وبدون تراریختی، از دو هورمون BAP و NAA و نیز ترکیب $AgNO_3$ جهت جلوگیری از نکروز شدن بافتها استفاده گردید. هورمون BAP با غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر بهترین نتیجه در باززایی را حاصل می‌کند. در روشهای قبلی برای باززایی فقط هورمون سیتوکینینی BAP به عنوان هورمون باززا کننده استفاده می‌شد، دراین تحقیق از غلظتهای مختلف یک اکسین (NAA) به منظور ایجاد تعادل هورمونی و تکثیر بهتر سلولها استفاده شد که بهترین غلظت برای این اکسین ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. علاوه بر آن جهت جلوگیری از تولید گاز اتیلن و متعاقب آن نکروز شدن ریز نمونه‌ها از غلظت ثابت ۵ میلی گرم بر لیتر نترات نقره (۲۱) استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از اثر سه عامل فوق، بهترین شرایط برای باززایی گیاه کلزا در جدول (۱) ارائه شده است. در

تعدادی از گونه‌های گیاهی (۲۸، ۱۸، ۹، ۴)، ترکیبات مختلف محیط کشت مورد آزمون قرار گرفت. اثر افزایشی حذف برخی از ترکیبات نظیر فسفات (۹)، نیترات آمونیوم (۱۸) و کلرید کلسیم (۱۸) از محیط همکشتی بر میزان تراریختی گزارش شده است. بر این اساس محیط‌های همکشتی تغییر یافته‌ای بر پایه محیط MS به شرحی که در جدول (۴) ارائه شده با حذف برخی ترکیبات آماده و تأثیر آن بر میزان تراریختی در گیاه کلزا ارزیابی شد. در این بررسی بهترین شرایط مجاورت باکتری با ریز نمونه‌های کوتیلدون‌ی در تیمار شماره ۶ (محیط MS پایه که ترکیبات KH_2PO_4 ، KNO_3 و NH_4NO_3 و $CaCl_2$ از آن حذف شده بود) حاصل گردید که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می‌دهد.

جدول ۳- تأثیرات میزان غلظت استوسیرینگون بر روی میزان تراریختی گیاه کلزا - در صد گیاهان باز زار شده شامل گیاهان PCR مثبت نسبت به کوتیلدون‌های آزمایش شده می‌باشد.

تیمار	زمان آلوده سازی	جذب نوری آگروباکتریوم در ۶۰۰ نانومتر	استوسیرینگون (mM)	میانگین درصد گیاهان PCR مثبت
۷	۴۰ ثانیه	۰/۸	۰/۱	۸ ^b
۸	۴۰ ثانیه	۰/۸	۰/۲	۱۰ ^a
۹	۴۰ ثانیه	۰/۸	۰/۴	۷ ^b
۱۰	۴۰ ثانیه	۰/۸	۰/۶	۶ ^c
۱۱	۴۰ ثانیه	۰/۸	۰/۸	۵ ^c

گزینش و شناسایی گیاهان تراریخت با استفاده از غلظت‌های مختلف کانامایسین: پس از تراریختی کوتیلدون‌های کلزا و حذف آگروباکتریوم با اثر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ریزنمونه‌ها به محیط القای نوساقه منتقل شدند. این مرحله به رشد بیشتر ریزنمونه‌ها در محیط جدید و افزایش مقاومت سلول‌های تراریخت در مقابل عامل انتخابی کانامایسین در مراحل بعدی کمک می‌نماید.

آغشته شده و سپس در محیط کشت توأم و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طبق گزارشات ارائه شده، طول زمان مجاورت ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم ۴۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۳). با توجه به جدول (۲) نتایج نشان داد که مناسب‌ترین تراکم آگروباکتریوم برای آلوده سازی ریز نمونه‌های کوتیلدون در تیمار شماره ۴ (OD_{600nm}: ۰/۸) می‌باشد که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می‌دهد.

جدول ۲- تأثیرات زمان‌های مختلف رشد آگروباکتریوم بر روی میزان تراریختی گیاه کلزا - در صد گیاهان باز زار شده شامل گیاهان PCR مثبت نسبت به کوتیلدون‌های آزمایش شده می‌باشد.

تیمار	زمان آلوده سازی	جذب نوری آگروباکتریوم در ۶۰۰ نانومتر	میانگین درصد گیاهان PCR مثبت
۱	۴۰ ثانیه	۰/۲	۱ ^c
۲	۴۰ ثانیه	۰/۴	۱ ^c
۳	۴۰ ثانیه	۰/۶	۲ ^c
۴	۴۰ ثانیه	۰/۸	۶ ^a
۵	۴۰ ثانیه	۱	۴ ^b
۶	۴۰ ثانیه	۲	۲ ^c

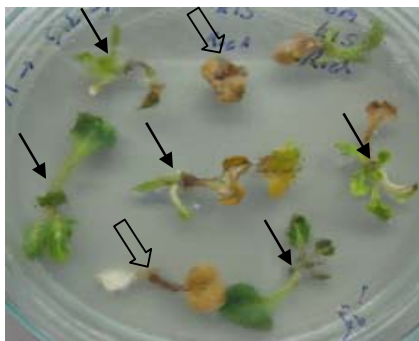
همچنین با توجه به جدول (۳) بهترین غلظت ماده استوسیرینگون به عنوان محرک کننده ژنهای *vir* در آگروباکتریوم برای تراریختی در تیمار شماره ۴ (۰/۲ میلی‌مولار) به دست آمد که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می‌دهد.

ارزیابی ترکیبات مختلف محیط همکشتی بر میزان تراریختی: در این تحقیق جهت بررسی اثر ترکیب محیط همکشتی بر تراریختی گیاه کلزا، محیط کشت MS و نیز محیط‌های تغییر یافته با حذف برخی از نمک‌های محیط کشت MS مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به گزارش‌های موجود مبنی بر تأثیر افزایشی و یا کاهش غلظت برخی عناصر موجود در محیط همکشتی بر میزان تراریختی در

جدول ۴- تأثیر محیط کشت MS پایه و MS با حذف برخی ترکیبات شیمیایی در دوره همکشتی بر میزان تراریختی

تیمار	محیط کشت پایه	مواد شیمیایی که از محیط پایه حذف شدند	میانگین درصد گیاهان تراریخت
۱	MS+ Sucrose	-----	۵ ^c
۲	Agar + Sucrose	کلیه نمک‌های موجود در محیط MS	۱۱ ^b
۳	MS + Sucrose	KH ₂ PO ₄	۶ ^c
۴	MS+ Sucrose	KH ₂ PO ₄ + CaCl ₂	۷ ^c
۵	MS + Sucrose	KH ₂ PO ₄ +NH ₄ NO ₃ + KNO ₃	۱۱ ^b
۶	MS + Sucrose	KH ₂ PO ₄ +NH ₄ NO ₃ + KNO ₃ + CaCl ₂	۱۵ ^a

نمونه‌ها در محیط گزینشگر القای نوساقه در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل ۳- باززایی ریز نمونه‌ها کلزا در محیط القای نوساقه حاوی ۸ mg/L کانامایسین ریز نمونه‌های باززاشده به رنگ سبز (فلش توپر) و ریز نمونه‌های باززاشده (فلش تو خالی) به رنگ قهوه‌ای (نکروز) مشاهده می‌شود.

آنالیز داده‌ها برای غلظت‌های ثابت و متغیر کانامایسین مشخص کرد که افزایش پلکانی کانامایسین می‌تواند درصد تراریختی را در حد مطلوبی افزایش دهد (جدول ۵).

بررسی قدرت تراریختی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم با استفاده از شرایط بهینه شده قبلی: سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در این مرحله مورد ارزیابی قرار گرفت که طبق نتایج به دست آمده سویه GV3850 از LBA4404 دارای درصد تراریختی بالاتری بود ولی آلودگی بالاتری را نیز ایجاد می‌کند (جدول ۶).

در این مرحله چگونگی ایجاد برش در کوتیلدون‌ها نتایج خود را نشان می‌دهد، اگر برش و حذف سلولهای مرستمی به درستی انجام شده باشد طی یک هفته تعدادی از ریز نمونه‌ها به طور کامل باززا شده و در تعدادی نیز باززایی به میزان کم مشاهده خواهد شد. حضور سلولهای مرستمی همراه با ریز نمونه‌ها باعث افزایش باززایی کاذب در این مرحله می‌گردد ولی به دلیل مقاوم بودن سلولهای مرستمی در برابر تراریختی در نهایت منجر به کاهش درصد تراریختی در بین گیاهان باززا شده خواهد شد.

پس از گذشت ۷ روز ریزنمونه‌ها به محیط اولیه گزینشگر (دارای ۸ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. در این وضعیت تعدادی از ریز نمونه‌ها باززایی را شروع کرده، در تعداد دیگری انتهای بریده شده متورم می‌گردد و تعدادی نیز نکروز شده و از بین می‌روند. پس از رشد بیشتر ریزنمونه‌ها و به منظور حذف گیاهان غیر تراریخت، این گیاهان به محیط انتخابی با غلظت بالاتری از کانامایسین (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. سلولهای تراریخت قاعده دمبرگ در مقابل غلظت بالاتر کانامایسین محیط مقاومت کرده و سبز باقی ماندند. حالت‌های مختلف ساقه‌زایی از انتهای ریز-

جدول ۵- تأثیر غلظت‌های ثابت و افزایشی کاناماسین بر روی باززایی گیاه کلزا - در صد گیاهان باز زاده شامل گیاهان PCR مثبت نسبت به کوتیلدون های آزمایش شده می باشد.

کاناماسین (mg/L)	تعداد کوتیلدون های آزمایش شده	تعداد گیاهان باز زاده در محیط انتخابی	تعداد گیاهچه های PCR مثبت و در صد تراریختی
۸	۱۰۰	۳۰	۶
۱۵	۱۰۰	۱۵	۴
۲۰	۱۰۰	۱۰	۱
۰-۸-۱۵*	۱۰۰	۲۵	۱۵

*افزایش تدریجی غلظت کاناماسین در واکشتهای ریزنمونه ها در محیطهای گزینشگر به ترتیب با غلظتهای ۰، ۸ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر

جدول ۶- بررسی اثر سویه های مختلف آگروباکتریوم در تراریختی کلزا با استفاده از شرایط بهینه شده قبلی.

سویه آگروباکتریوم	تعداد ریز نمونه کوتیلدونی	تعداد گیاهان باز زاده در محیط انتخابی	تعداد گیاهان PCR مثبت و در صد تراریختی
LBA4404	۱۰۰	۳۰	۱۶
GV3850	۱۰۰	۳۵	۲۰
GV3101	۱۰۰	۴۰	۱۰

نمونه کوتیلدونی جدا شده و به محیط ریشه زایی انتقال یافت. پس از ریشه زایی، گیاهچه ها آمادگی لازم را برای انتقال به شرایط خاک را دارند (شکل ۴ الف). گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدانهای کوچک با خاک استریل منتقل شدند. رشد در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ در روز و ۱۵ درجه سانتی گراد شب انجام شد (شکل ۴ ب) و این گیاهان به مرحله بذر دهی نیز رسیدند (شکل ۴ ج).

نمونه ها پس از باززایی و رسیدن به اندازه حدود یک تا دو سانتیمتر به محیط طویل شدن نوساقه منتقل شدند. در این محیط که میزان کاناماسین آن ۱۵ میلی گرم بر لیتر است تعدادی از ریز نمونه ها سبز باقی ماندند (مقاوم) و تعداد دیگری همزمان با رشد سفید و یا بنفش شدند که این وضعیت نشانه غیر تراریخت بودن یا قرار گیری ژن در مکانهای نامناسب است. پس از رشد گیاهچه تراریخت به شکل یک گیاه مستقل، گیاهچه از محل ساقه از بقایای ریز



ج

ب

الف

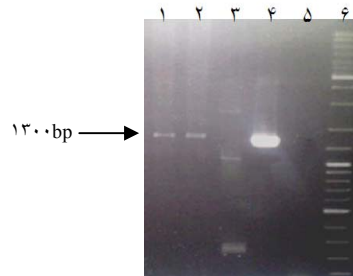
شکل (۴) گیاهچه کلزای تراریخت باززاده شده آماده و چگونگی انتقال به خاک و شرایط گلخانه ای (الف) گیاهچه ریشه دار شده در محیط ریشه زایی (ب، ج) مراحل مختلف رشد گیاه در شرایط فیتوترون

اروسیک پایین می‌باشد استفاده شد. با توجه به اینکه میزان باززایی یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در انجام تراریختی و کشت بافت است و این عامل در گیاه کلزا به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه مورد نظر است (۳۳). به همین دلیل و به منظور کاهش اثر ژنوتیپ در باززایی از رقمی استفاده شد که در مطالعات قبلی باززایی مناسبی از آن گزارش شده بود (۱).

در این پژوهش از ریز نمونه کوتیلدون برای انتقال ژن استفاده شد. استفاده از این نمونه نسبت به ریز نمونه هیپو کوتیل دارای این مزیت است که نوساقه‌های حاصل از کشت لپه ناشی از اندام زایی مستقیم از انتهای بریده شده بوده و کمترین تنوع سوماکلونال (Somaclonal variation) را دارند. به عبارت دیگر انتظار می‌رود گیاهچه‌های ایجاد شده دارای یکنواختی ژنتیکی بالایی باشند. اما نوساقه‌هایی که از کشت محور زیر لپه ایجاد می‌شوند، ابتدا مرحله کالوس زایی را طی کرده و پس از استقرار در محیط‌های مناسب گیاهچه‌های سبز ایجاد می‌کنند. به عبارت دیگر گیاهچه‌ها در اثر باززایی غیر مستقیم تشکیل شده و سبب تنوع سوماکلونال و تولید گیاهچه‌هایی با ساختار ژنتیکی متفاوت می‌شود. علاوه بر باززایی مستقیم، امکان باززایی چندین نوساقه از یک لپه نیز وجود دارد که این مسئله اهمیت زیادی در ریز ازدیادی و مهندسی ژنتیک کلزا دارد (۱).

چگونگی ایجاد برش در کوتیلدون‌ها برای تهیه ریزنمونه از مراحل بسیار حساس در کشت بافت است که می‌تواند در بازده تراریختی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. در زمان بریدن کوتیلدون چنانچه از ناحیه مرستمی خیلی فاصله گرفته شود میزان باززایی به میزان بسیار زیادی کاهش می‌یابد و بر عکس چنانچه در این مرحله توده مرستمی زیادی همراه کوتیلدون باشد به سرعت در محیط القای نوساقه باززا می‌شوند. به عبارت دیگر علی‌رغم مشاهده باززایی زیاد، نمونه‌های باززا شده که باززایی آنها نیز

بررسی مولکولی گیاهان تراریخت: پس از انتخاب و رشد کامل گیاهان تراریخت، بررسی مولکولی بر روی آنها انجام گرفت. DNA ژنومی گیاهان مورد بررسی از برگهای جوان و سبز گیاه کلزای تراریخت استخراج گردید. به منظور ارزیابی خلوص و کیفیت DNA استخراج شده، از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. برای استفاده از DNA استخراج شده در PCR، بعد از تعیین غلظت DNA حدود ۵۰ نانوگرم به عنوان الگو در واکنش PCR به کار رفت. PCR با شرایط قبل انجام شد. محصول PCR با طول تقریبی ۱۳۰۰ bp بر روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیزگردید (شکل ۵).



شکل (۵) آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای EPS1, EPS2

آزمون PCR برای DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای EPS1, EPS2: چاهک ۱، محصول PCR حاصل از DNA گیاه تراریخت، چاهک ۳: محصول PCR گیاه غیر تراریخت (کنترل منفی)، چاهک ۴: محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، چاهک ۵: محصول PCR بدون الگو (کنترل منفی)، چاهک ۶: نشانگر وزن مولکولی (Mix (Fermentas

بحث

استفاده از آگروباکتریوم به عنوان یک ناقل طبیعی در تراریختی گیاهان روشی مرسوم و کارآمد است که در مورد بسیاری از گیاهان کاربرد دارد. در این تحقیق نیز به منظور انتقال ناقل پلاسمیدی نوترکیب به گیاه کلزا از سویه‌های مختلف این باکتری استفاده شد. در اکثر تحقیقات، برای انتقال ژن به کلزا ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل را موفق‌تر از سایر ریزنمونه‌ها ارزیابی کرده‌اند (۷)، در این تحقیق از رقم PF704591 که یک رقم بهاره با اسید

می‌تواند موجب افزایش انتقال T-DNA گردد (۳۷) برای بهینه‌سازی شرایط تراریختی در مرحله آلوده‌سازی به آگروباکتریوم استفاده شد. عامل دیگری که جهت بهینه‌سازی تراریختی با آگروباکتریوم بایستی مورد توجه قرار بگیرد، دمای محیط در هنگام تراریختی است. دمای مناسب برای القای ژنهای *vir* بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد ذکر شده که کمتر از دمای بهینه برای رشد آگروباکتریوم (۲۸ درجه سانتی‌گراد) است (۵، ۱۹ و ۳۹). در خصوص تراریختی گیاه کلزا نیز بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که دما در زمان القای ژنهای *vir* در سوسپانسیون آگروباکتریوم و نیز در مدت زمان همکشتی با ریزنمونه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگاه داشته شد.

در تراریختی با آگروباکتریوم مجموعه عواملی که شرایط بهینه اتصال به میزبان و تحریک ژنهای *vir* را فراهم می‌آورد می‌تواند در افزایش انتقال ژن با واسطه این باکتری مؤثر باشد (۴). محیط همکشتی مکانی است که آگروباکتریوم در مجاورت گیاه وظیفه انتقال ژن را به انجام می‌رساند. به نظر می‌رسد غلظت یونهای محیط همکشتی اگر بتواند شرایط بهینه را برای باکتری فراهم نماید هر چند برای گیاه بهینه نباشد، با توجه به کوتاه بودن این دوره برای گیاه مشکلی به وجود نمی‌آورد ولی می‌تواند منجر به افزایش میزان تراریختی گردد (۴). استفاده از محیطهای همکشتی با غلظت نمک کمتر نظیر محیط MS با غلظتهای نصف و یک دهم (۱۷) و نیز محیطهای تغییر یافته که به طور مشخص به بررسی اثر ترکیبات مختلف چون کلسیم (۲۸) یا سایر موارد موجود در محیط کشت پرداخته است، نشان می‌دهد که غلظت یونها در محیط همکشتی در میزان تراریختی مؤثر است (۴، ۹ و ۱۸). یافته‌های این تحقیق نیز نشان می‌دهد که حذف برخی از ترکیبات محیط همکشتی با پایه محیط MS می‌تواند میزان تراریختی را افزایش دهد. بهترین نتیجه از حذف همزمان ترکیبات KNO_3 ، NH_4NO_3 و CaCl_2 به دست آمد. نکته قابل توجه این است که حتی استفاده از محیط حاوی

اغلب در کمتر از یک هفته پس از انتقال به محیط اختصاصی صورت می‌گیرد، تراریخت نبوده و در محیطهای انتخابی و تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک کانامایسین از بین خواهند رفت. سن ریزنمونه نیز از موارد مهمی است که باید در تراریختی کلزا آن را مد نظر قرار داد. ریزنمونه‌های جوان تر (۴ الی ۵ روزه) نسبت به ریزنمونه‌هایی با سن بیشتر قابلیت بیشتری برای تراریختی دارند (۷ و ۲۷).

گزارشهای اولیه درباره تراریختی کلزا نشان می‌دهد که حضور هورمون سیتوکینینی نظیر BAP برای باززایی ریزنمونه کوتیلدونی ضروری می‌باشد (۲۷) گزارشهای جدیدتر بیانگر این نکته است که حضور یک هورمون اکسینی در کنار BAP منجر به نتایج بهتری برای باززایی ریزنمونه‌ها می‌گردد (۷ و ۲۱). با توجه به این موارد، برای دستیابی به سطح مناسب باززایی بایستی قبل از تراریختی غلظت هورمونهای مختلف مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. این ارزیابی نشان داد که غلظتهای مختلف هورمونهای اکسین و سیتوکینین می‌تواند بر روی میزان باززایی بسیار تأثیر گذار باشد همچنین باید ذکر کرد که اضافه نمودن هورمون NAA به میزان ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند به میزان قابل توجهی میزان تراریختی را افزایش دهد.

میزان رشد آگروباکتریوم (غلظت باکتری) در کشت شبانه نیز از موارد مؤثر در تراریختی است. بهترین پاسخ زمانی به دست آمد که OD_{600} کشت باکتری در حدود ۰/۸ باشد. در OD_{600} بالاتر از ۰/۸ با مرگ سلولهای باکتری و تجمع آنها مواجه شده که منجر به کاهش تراریختی ریزنمونه‌ها می‌شود. در همین شرایط، غلظتهای کمتری از باکتری می‌تواند منجر به کاهش اتصال مناسب باکتری به سلول گیاهی گردد (۲۱). از طرف دیگر مشخص شده است که ژنهای ناحیه بیماریزا (*vir gene*) در آگروباکتریوم به وسیله مواد فنلی آزاد شده از محل زخم گیاه، فقر فسفات، مونوساکاریدها و pH پایین فعال می‌شوند (۳۵ و ۴۱)، در این تحقیق نیز از استوسرینگون به عنوان یک ماده فنلی که

میلی گرم بر لیتر این گیاهچه‌ها حذف می‌شوند. در همین شرایط گیاهچه‌هایی که از باززایی و تکثیر سلول‌های تراریخت حاصل شده‌اند سبز باقی می‌مانند. در صورتی‌که از همان ابتدا از غلظت بالای کانامایسین استفاده شود، احتمال دارد که سلول‌های غیرتراریخت و سلول‌هایی که تعداد نسخه‌های وارد شده به درون ژنوم آنها کمتر است، مرده و ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئله‌ها به محیط بیرون منتقل گردد. همین امر می‌تواند بر روی سلول‌های دیگر و حتی سلول‌های تراریخت اثر گذاشته و باعث مرگ آنها شود (۳۳).

عامل مهاری دیگری که می‌تواند میزان تراریختی ریز نمونه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد تولید گاز اتیلن توسط سلول‌های گیاهی است. گاز اتیلن تولید شده توسط ریزنمونه‌ها و حتی خود ترکیبات محیط کشت، اثرات نامطلوبی بر روی ریزنمونه‌های تراریخت سالم گذاشته و از باززایی آنها جلوگیری می‌نماید (۳۱). حذف اتیلن از طریق واکشت نمودن متوالی نمونه‌ها، یکی از راه‌های متداول برای مقابله با این عامل مهاری است. علاوه بر انتقال نمونه‌ها به محیط کشت جدید، روش دیگر استفاده از نیترات نقره در محیط کشت است که به عنوان یک مهار کننده عمل اتیلن به خوبی شناخته شده است. گرچه مکانیزم مهاری آن هنوز به خوبی روشن نشده است (۳۰). در این آزمایش مشخص گردید، استفاده از نیترات نقره باعث افزایش باززایی و تراریختی در ریز نمونه‌های گیاه کلزا می‌شود، که با نتایج تحقیقات پیشین (۲۴، ۳۰ و ۳۱) نیز مطابقت دارد.

در رابطه با ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده در منابع مختلف به طور عمده برای ریشه‌زایی در کلزا از دو عامل کاهش قند محیط کشت و استفاده از هورمون IBA (Indole-3-butyric acid) استفاده می‌شود. در تحقیقات قبلی، برای IBA غلظت‌های ۰/۱ میلی گرم تا ۵ میلی گرم بر

آب، آگار و قند که منابع یونی آن محدود به یون‌های موجود در آگار و مقادیر ناچیز آب مقطر است نیز شرایط بهتری را برای تراریختی نسبت به محیط MS کامل فراهم می‌آورد. هر چند گزارش‌هایی مبنی بر اثر کاهشی حذف برخی یونها نظیر منیزیم و آهن بر میزان تراریختی وجود دارد (۴). به طور کلی به نظر می‌رسد که غلظت پایین یونی شرایط بهتری را برای تحریک آگروباکتریوم و تراریختی فراهم می‌آورد. البته احتمالاً نوع آگار به کار رفته در محیط کشت و میزان یون‌های موجود در آن می‌تواند در این امر مهم باشد.

به طور معمول در تراریخت کردن و باززایی گیاه کلزا، از آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان عامل گزینشگر استفاده می‌شود. کانامایسین قادر است با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین سازی و با اتصال به بخش ۳۰S ریبوزوم، که در اندامکها (نظیر کلروپلاست) وجود دارد، سلول تحت اثر را از بین ببرد. بیشترین زنی که در کشت بافت برای انتخاب گیاهان تراریخت استفاده می‌شود، ژن نئومایسین فسفوترانسفراز می‌باشد که از طریق فسفریلاسیون گروه هیدروکسیل این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها به گیاهان اجازه مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوزیدی مانند کانامایسین را می‌دهد (۳۱). در این بررسی از استراتژی چند مرحله‌ای در افزودن آنتی‌بیوتیک کانامایسین استفاده شد. ابتدا ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم به مدت یک هفته در محیط باززایی فاقد کانامایسین قرار داده شدند. در مرحله بعد آنتی‌بیوتیک با غلظت پایین و ۸ میلی گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت و بازکشت‌های بعدی با افزایش غلظت، مقدار آنتی‌بیوتیک به ۱۵ میلی گرم بر لیتر رسانده شد. به نظر می‌رسد طی این افزایش تدریجی، به سلول‌های تراریخت اجازه سازگار شدن با محیط کشت و بیان سطح مناسبی از ژن نئومایسین فسفوترانسفراز داده می‌شود. هر چند برخی سلول‌های غیر تراریخت نیز در مرحله اول از عامل انتخابی عبور کرده و باززا می‌شوند، ولی طی افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک به ۱۵

این ممانعت‌کننده‌ها بافت خود گیاه و برخی نیز ناشی از مواد به کار رفته در مراحل تخلیص ژنوم است. در روش‌های معمول استخراج DNA گیاهی از ترکیب دترجنت CTAB یا SDS استفاده می‌شود. حضور هر یک از این ترکیبات به میزان بسیار جزئی (در حد ۰/۰۰۵ درصد) نیز می‌تواند به طور کلی از انجام واکنش‌هایی نظیر PCR ممانعت به عمل آورد. از دیگر ناخالصی‌ها که ناشی از روش تخلیص است، می‌توان به الکل، فنل، NaCl و EDTA اشاره کرد که بازدارندگی به مراتب کمتری نسبت به دترجنت‌های ذکر شده دارند. ترکیبات پلی‌ساکارییدی بافت‌های گیاهی به خصوص انواع اسیدی آنها نیز به شدت بازدارنده واکنش PCR است (۲۴ و ۳۶).

با توجه به موارد مذکور به نظر می‌رسد می‌توان با استفاده از کیت‌های تخلیص ژنوم مشکل مذکور را تا حدی کاهش داد. در صورت عدم امکان بهره‌برداری از این کیت‌ها با توجه به اجتناب ناپذیر بودن برخی ناخالصی‌ها روش‌هایی برای به حداقل رساندن آنها لازم است. در این تحقیق با به حداقل رساندن بافت مورد نیاز برای تخلیص ژنوم (در حد ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از بافت‌های جوان تر گیاه) و همچنین رقیق‌سازی ژنوم تخلیص شده برای کاهش این مواد بازدارنده نتایج مناسبی حاصل شد (۳۲،۶). به طور خلاصه می‌توان با افزایش تدریجی عامل انتخاب‌کننده، ممانعت از تولید اتیلن و اعطای فرصت (زمان) مناسب برای بیان سازه ژنی وارد شده به گیاه و جلوگیری از مراحل مرگ سلولی (نکروز)، در کنار کنترل سایر عوامل به نتایج مطلوبی در میزان باززایی و تراریختی در گیاه کلزا دست یافت.

لیتر (یعنی ۵۰ برابر غلیظ تر) نیز گزارش شده است (۷ و ۲۵).

به نظر می‌رسد نوع ژنوتیپ‌های مختلف، سایر ترکیبات به کار رفته در محیط کشت، شرایط محیطی و کیفیت هورمون مصرفی می‌تواند توجه‌کننده این دامنه وسیع غلظت باشد. با توجه به اینکه اکسینها تحریک‌کننده ریشه‌زایی بوده و غلظت‌های بالاتر آن پس از تحریک ریشه‌زایی اثر ممانعت‌کنندگی بر ریشه‌زایی دارد. علاوه بر آن نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA منجر به القای کالوس می‌گردد. به همین دلیل از غلظت‌های پایین این هورمون استفاده شد. بهترین نتایج برای ریشه‌زایی در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با کاستن قند محیط به ۱۵ گرم بر لیتر (نیمی از غلظت قند در محیط استاندارد MS) به دست آمد.

در آنالیز گیاهان تراریخت آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یکی از روش‌های مرسوم است. با استفاده از آغازگرهای مناسب و انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شرایط کاملاً اختصاصی، می‌توان حضور بخش‌های مختلف ناقل و ژن مورد نظر را در گیاه به اثبات رساند. نکته قابل توجه این است که در این زمینه وجود دارد تهیه DNA ژنومی مناسب است. اصولاً وجود ناخالصی در اسید نوکلئیک استخراج شده منجر به کاهش بازده و یا کاهش در تکرارپذیری فرآیندهای بعدی نظیر هضم آنزیمی، PCR و RT-PCR می‌شود. DNA ژنومی تخلیص شده از بافت‌های گیاهی معمولاً نتایج متغیری را در بر دارد که به طور عمده به دلیل ممانعت‌کننده‌های آنزیمی است که در مراحل خالص‌سازی به همراه DNA تخلیص می‌شود. منشاء برخی از

منابع

۲- کهریزی، د.، سلمانیان، ع.ه.، زبردی، ع.، ۱۳۸۷، تاثیر پیش تیمار سرما طول دوره پیش کشت ریز نمونه و مدت زمان تلقیح *Agrobacterium tumefaciens* بر فراوانی تراریختی کلزا. مجله پژوهش کشاورزی: آب، خاک و گیاه در کشاورزی، جلد هشتم، شماره اول (ب)، صفحه ۱۱۱-۱۰۱

۱- سلمانیان، ع.ه.، کهریزی، د.، ۱۳۸۶، مطالعه تأثیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بر روی باززایی نوساقه گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست‌شناسی ایران جلد ۲۰، شماره ۳، صفحه ۱۷۱-۱۷۹.

- علف کش گلایفوسیت در گیاه تریخت کلزا (*Brassica napus* L.). مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، شماره ۷۹، صفحه ۱۵۲-۱۵۹.
4. Azadi, P., Chin, D.P., Kuroda, K., Sher K.R., Mii, M., 2010, Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:201-209
 5. Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., von Lintig, J., and Schroder, J., 1988, Temperature-sensitive step in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria*. *Mol. Gen. Genet.* 213, 1-8.
 6. Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A., Salmanian, A.H., 2011, A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for PCR analysis. *Iranian journal of Biotechnology*, 9(1): 1-3.
 7. Bhalla, P. and Singh, B., 2008, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature protocols*, 3(2):181-189.
 8. Biddington, N.L., 1992, The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant growth regulation*. 11:173-189.
 9. Brencic, A., Winans, S.C., 2005, Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:155-194
 10. Cardoza, V. and Stewart, C.N., 2003, Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep* 21:599-604.
 11. Cegielska-Taras, T., Pniewski, T., Szala, L., 2008, Transformation of microspore-derived embryos of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Appl Genet*, 49(4):343-347.
 12. Chi, G.L., Barfield, D.,G., Sim, G.E. and Pua, E.C., 1990, Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Reports* 9: 195-198
 13. De Block, M., De Brower, D., Tenning, P., 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in transgenic plants. *Plant Physiol.* 91: 694-701.
 14. Fiola, J.A., Hassan, M.A., Swartz, H.J., Bors, R.H., McNikols, R., 1990, Effect of thiodiazuron, light fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 20:223-228
 15. Fry, J., Barnason, A., Horsch, R.B., 1987, Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* - based vectors. *Plant Cell Rep*, 6: 321-325.
 16. Halfhill, M.D., Richards, H.A., Mabon, S.A., Stewart, C.N. Jr., 2001, Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet.* 103:659-667
 17. Hooykass, P.J.J. and Schilperoort, R.A., 1992, *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19: 15-38.
 18. Hoshi, Y., Kondo, M., Mori, S., Adachi, Y., Nakano, M., Kobayashi, H., 2004, Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22:359-364
 19. Jelili, T.O., 2006, *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (1): 12-20
 20. Kahrizi, D., Salmanian, A.H., Afshari, A., Moieni, A., Mousavi, A., 2007, Simultaneous substitution of Gly96Ala and Ala183Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*B. napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Rep.* 26(1): 95-104.
 21. Kong, F., Li, J., Tan, X., Zhang, L., Zhang, Z., Qi, C. and Ma, X., 2009, A new time-saving transformation system for *Brassica napus*. *African Journal of Biotechnology* 8 (11): 2497-2502.
 22. Koronfel, M., 1998, Effect of the antibiotics kanamycin, cefotaxime and carbenicillin on the differentiation of flax hypocotyls. *Arab Journal of Biotechnology*, Vol 1. No (1) Dec. 93-98.
 23. Kumar, P., Lakshmanan P. and Thorpe T.A., 1998, Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:94-103
 24. Kumar V., Parvatam G., Ravishankar G. A., 2008, AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic*

- Journal of Biotechnology. Vol.12 No.2, Issue of April 15
25. Mashayekhi, M., Shakib, A.M., Ahmad-Raji, M. and Ghasemi Bezdi, K., 2008, Gene transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (24), pp. 4459-4463, 17 December,
 26. Moghaieb, R.E.A., El-Awady, M.A., Mergawy, R.G.E., Youssef S.S. and El-Sharkawy A.M., 2006, A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.) African Journal of Biotechnology, 5 (2): 143-148.
 27. Moloney, M.M., Walker, J.M., Sharma, K.K., 1989, High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports, 8: 238-242.
 28. Montoro, P., Teinseree, N., Rattana, W., Kongsawadworakul, P., Michaux-Ferriere, N., 2000, Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Rep 19:851-855
 29. Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan, A. K., Gupta, V. and Pental, D., 1992, *Agrobacterium* mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by mode of shoot regeneration. Plant Cell Reports, 11: 506-513.
 30. Nonaka, S., Yuhashi, K.I., Takada, K., Sugawara, M., Minamisawa, K., and Ezura, H., 2008, Ethylene production in plants during transformation suppresses vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. New Phytologist 178: 647-656
 31. Pandian, A., Hurlstone, C., Liu Q., Singh S., Salisbury P. And Green A., 2006 , *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol To Overcome Necrosis In Elite Australian Brassica Juncea Lines, Plant Mol. Bio. Rep. 24:103a-103i
 32. Peist, R., Dorothee, H., Gundula, T. and Dirk, L., 2001, PCR inhibitors in plant DNA preparations, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, www.qiagen.com, Issue No. 3
 33. Phogat, SK., Burma, PK. and Pental., D., 2000, High frequency regeneration of *Brassica napus* varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restore genes of two cytoplasmic male sterility systems. J plant Biochem Biotechnol, 9: 73-79
 34. Radke, S.E., Andrews, B.M., Moloney, M.M., Crouch, M.L., Krid, J.C., Knauf, V.C., 1988, Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. Theor. Appl. Genet. 75: 685-694.
 35. Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. and Machida, Y., 1990, Control of expression of *Agrobacterium* vir gene by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6680-6688.
 36. Sharma A. D., Prabhjot K.G. and Prabhjeet S., 2002, DNA Isolation From Dry and Fresh Samples of Polysaccharide-Rich Plants, Plant Molecular Biology Reporter 20: 415a-415f
 37. Stachel, S.E., Messense, E., Van, Montagu M. and Zambrysk, P., 1985, Identification of the signal molecular produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 318: 624-629.
 38. Stewart, C.N.J., Adang, M.J., All, J.A., Raymer, P.L., Ramachandran, S., Parrott, W.A., 1996, Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis-cryIAC* gene. Plant Physiol. 112:115-120.
 39. Turk, S. C. H. J., Melchers, L. S., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A. J. A., and Hooykass, P. J. J., 1991, Environmental conditions differentially affect vir gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. Plant Mol. Biol. 16, 1051-1059
 40. USDA Economics, Statistics and Market Information System (ESMIS), 2010, Oil Crops Outlook Report and Yearbook 2010, Table 25 Canola oil: Supply and disappearance, U.S., 1991/92-2009/10, <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewStaticPage>
 41. Vernade, D.A., Herrera, A., Wang, K. and Montagu, M., 1988, Glycine betaine allow enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. J. Bacteriol, 170: 5822-5829.
 42. Zhang B.H., Liu F., Liu Z.H., Wang H.M. & Yao C.B., 2001, Effects of kanamycin on tissue

culture and somatic embryogenesis in cotton.

Plant Growth Regulation 33: 137–149.

Optimization of transformation in canola (*B.napus* L.) with control of ethylene production and gradual increase in concentration of selection element

Kazemi R.A.¹, Amani J.², Sharafi A.^{1,3}, Abbasi A.R.³ and Salmanian A.H.¹

¹ Plant Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I. R. of Iran

² Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah Medical Science University, Tehran, I. R. of Iran

³ Pharmaceutical Biotechnology Dpt., School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I. R. of Iran

⁴ Faculty of Agriculture and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, I. R. of Iran

Abstract

Canola (*Brassica napus* L.) is one of the most important oil producing plants in the world. In recent years, in spite of transformation in canola via *Agrobacterium*, the efficiency of this method is still low. To consider the effect of plant genotype and cultivation medium composition on transformation and regeneration in canola and the high toxicity of kanamycin for growth of this plant, it is necessary to develop more appropriate and efficient method for transformation of this oily plant. Here we used cotyledon explants and *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404, GV3850, GV3101 harboring mutated gene EPSPS (pBI121+EPSPS) for transformation of canola PF7045-91 cultivar. After induction with *agrobacterium*, explants were placed in different cocultivation medium under dark condition at 25 degree centigrade. In regeneration process, to prevent necrosis of explants, the fixed amount of silver nitrate (5mg/L) was used for blocking ethylene production. The regeneration and selection procedure were started in medium containing silver nitrate without kanamycin and this carried on for one week. Subsequently, the kanamycin was added (5 mg/L) and its concentration was increased up to 15 mg/L in a ten days period. For root induction, the regenerated shoots were transferred to medium containing the MS salt with 15 g/L sucrose and 0.2 mg/L IBA. Transformation was confirmed by molecular analysis. Our data showed that gradually increasing kanamycin concentration and blocking ethylene production could improve the transformation of *B. napus*.

Key words: *Brassica napus* – *Agrobacterium tumefaciens* – cocultivation – Control of ethylene production –increase in kanamycin