بهینه سازی تراریختی در گیاه کلزا (*B.napus* L.) با کنترل تولید گاز اتیلن وافزایش تدریجی عامل انتخاب کننده

روح اله کاظمی[۱]، جعفر امانی[۲] ، علی شرفی[۱،۳]، علیرضا عباسی[۴]، علی هاتف سلمانیان[۱*]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، 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 مهم ترین گیاهان روغنی جهان به شمار می رود. علی رغم تولید گیاهان تراریخته کلزا کارآیی انتقال به این گیاه پایین می باشد. 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 ریزنمونه های برگهای لپه ای با استفاده از آگروباکتریوم تومی فاشینس سویه های حاوی ژن EPSPS برای تراریخت نمودن رقم PF 7045-91 استفاده شد. ریز نمونه ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم محیطهای مختلف همکشتی ، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تاریکی قرارداده شد. طی باززایی به منظور جلوگیری از نکروز شدن ریز نمونه ها و گزینش مؤثر از نیترات نقره به عنوان ممانعت کننده تولید اتیلن و افزایش پلکانی غلظت کانامایسین به عنوان ماده انتخاب کننده استفاده شد. برای این منظور ابتدا ریزنمونه ها در محیط باززایی حاوی نیترات نقره و بدون حضور کانامایسین نگهداری شدند. پس از آن با حفظ غلظت ثابتی از نیترات نقره (۵ میلی گرم بر لیتر)، کانامایسین در یک فاصله ۱۰ روزه به غلظت ۱۵میلی گرم بر لیتر افزایش داده شد. نوساقه های باززا شده به منظور القای ریشه زایی به محیط پایه MS حاوی ۱۵گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۰/۲ میلی گرم 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 می یابد.

واژه های 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

گیاه کلزا یکی از مهم ترین گیاهان تولید کننده روغن محسوب شده و بعد از سویا و نخل روغنی به عنوان سومین گیاه تولید کننده این ماده غذایی به شمار می آید. 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 این گیاه به دلیل کیفیت بالای روغن و کنجاله غنی از پروتئین یکی از مهمترین گیاهان زراعی به شمار می رود. بر اساس این نکات سطح زیر کشت جهانی این گیاه در چند سال گذشته توسعه چشمگیری داشته است (۴۰).

از طرف دیگر به کار گیری روشهای مهندسی ژنتیک باعث تولید واریته های جدیدی از گیاه کلزا شده است که از نظر

صفات با ارزش کشاورزی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می باشند. 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، علف کشها، عوامل فساد بعد از برداشت و افزایش فرآورده های ذخیره ای 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 علف کشها، افزایش کمیت و کیفیت روغن وهمچنین استفاده از این گیاه به عنوان ذخیره کننده پروتئین وجود دارد (۱۰ و ۲۱). از طرف دیگر در کشت بافت گیاهی و آزمایشات تراریختی، عوامل متعدد و پیچیده ای دخالت می کنند که از مهم ترین آنها می توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود. تا کنون در کشت بافت و انتقال ژن به کلزا از ریزنمونه های مختلفی استفاده شده است که از مهم ترین آنها می توان به میکروسپورهای جدا شده (۱۱) ، قطعات ریشه (۱۵)، محور زیر لپه (هیپوکوتیل) (۱۳، ۳۴ و ۳۸) و برگهای لپه ای (کوتیلدون) (۲۷) اشاره کرد. در انتقال ژن به گیاه کلزا هنگامی که از ریشه استفاده می شود ۴ هفته زمان برای باززایی گیاه مورد نیاز می باشد و در صورت استفاده از هیپوکوتیل باید ۷–۸ هفته جهت باز زایی زمان صرف نمود. به همین دلیل استفاده از کوتلیدون برای انتقال ژن یک روش مناسب از لحاظ صرف زمان و ساده و ارزان از لحاظ تجهیزات و مواد آزمایشگاهی می باشد. اگرچه این روش نیز نیاز به تنظیم و بهینه سازی 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 آگروباکتریوم به گونه های مختلف گیاه کلزا نظیر *B.juncea*، *B.carinata*، *B.napus*، *B.oleracea* و *B.campestris* نیز بهینه شده است (۲۱).

بین عوامل انتخاب کننده، آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان یک گزینشگر انتخابی به طور معمول در آزمایشهای تراریختی به کار می رود. این گزینشگر انتخابی با تداخل در ساخت پروتئین در پلاستید ها (نظیر کلروپلاست) منجر به مرگ سلولهای غیر تراریخت که فاقد ژن نئومایسین فسفوترانسفراز تراژن هستند، می شود. اثر این آنتی بیوتیک به شکل بی رنگ شدن ریزنمونه ها و ممانعت از ساقه زایی و ریشه زایی 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 می باشد. بر این اساس بایستی تراریختی هر گیاه در شرایط موجود بهینه سازی شود(۱۴). با توجه به اینکه اتیلن به عنوان یک هورمون گازی شکل، در کشت بافت گیاهی و در طی فرآیندهای گیاهی با منابع دیگری نظیر آگار تولید شده و در ظروف کشت تجمع می یابد، تجمع اتیلن در ظروف کشت به عنوان یکی از عوامل مهاری رشد و ممانعت کننده باززایی مطرح است(۸ و ۲۳). همچنین اثر مهاری اتیلن در تراریختی گیاهان با آگروباکتریوم به واسطه ممانعت از بیان ژنهای بیماریزایی(*vir*) این باکتری نیز گزارش شده است (۳۰). به کار گیری موادی که مانع از عمل یا تولید اتیلن می شوند نظیر نیترات نقره و AVG (آمینو اتوکسی وینیل گلیسین) منجر به افزایش میزان تراریختی گیاهان مختلف می گردد (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 کارآیی تراریختی با استفاده از ۳ سویه مختلف آگروباکتریوم مورد ارزیابی و سپس با استفاده از ریز نمونه کوتیلدونی گیاه کلزا و تنظیم چند عامل مؤثر در تراریختی، انتقال ژن به این

گیاه بهینه شود. در این روش از ترکیبات مختلف محیط کشت ، غلظت تنظیم شده نیترات 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 وتا 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 شرایط۱۶ 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 LBA4404 ، GV3850, GV3101 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 پروموتر CaMV-35S می باشد، استفاده شد. این ناقل حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بوده که توسط پروموتر و خاتمه دهنده NOS (nopaline synthase) کنترل می شود.

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 ۴میلی گرم بر لیتر BAP ، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و۷ 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 اگروباکتریوم 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 ۳۰گرم 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 اگروباکتریوم 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 لیترBAP ، ۳۰گرم بر لیتر سوکروز ، ۷ گرم بر لیتر آگار و ۵ میلی گرم بر لیتر$AgNO_3$) منتقل شد. در این مرحله ترکیب

محیط کشت کامل MS به صورت ثابت و یا با حذف ترکیبات مختلف از قبیل KH_2PO_4 ، $CaCl_2$ ، KNO_3 وNH_4NO_3 ازمحیط کشت MS جهت بررسی میزان تراریختی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه های 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 کوتیلدون ها به محیط القای نوساقه (MS حاوی ۴میلی گرم بر لیترBAP ، ۳۰گرم بر لیتر سوکروز، ۷ گرم بر لیتر آگار و ۲۰۰میلی 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 گیاهچه ها (اعم از تراریخت و غیر تراریخت) قادر به باززایی بر روی محیط هستند. در مراحل بعد کوتیلدون ها 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 نمونه های 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) واکشت شدند. نوساقه های سبز باززا شده بر روی محیط گزینشگر نهایی (با غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین) جداسازی شده و به محیط طویل شدن نو ساقه (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 ۱۵گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۲ میلی گرم بر لیترIBA و ۷ گرم بر لیتر آگار) انتقال یافتند. گیاهچه های 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 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. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزارSPSS12 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 می کند، استفاده شد.

EPS1: 5'-CGGGATCCATGGAATCCCTGACGTTACAA-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 $2\ mM\ Mg^+$ و ۰/۳ µl ازآنزیم *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 طویل سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طویل سازی انتهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده

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

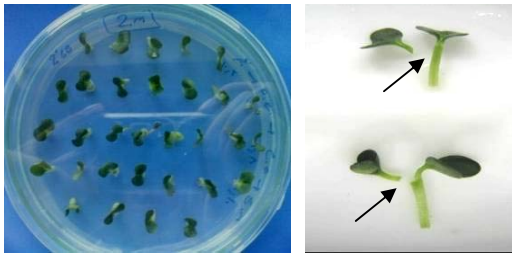
جدول ۱- تأثیرغلظتهای مختلف 6-BAP ، NAA و غلظت ثابت $AgNO_3$ بر روی باززایی گیاه غیر تراریخت کلزا – در صد باززایی حاصل از تعداد گیاهچه های بازاز شده نسبت به کوتیلدون های مورد آزمایش می باشد.

تیمار	6-BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	$AgNO_3$ (mg/L)	میانگین درصد گیاهان باز زا 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 گیاهچه های 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 می کند. در روشهای قبلی برای باززایی فقط هورمون سیتوکینینیBAP به عنوان هورمون باززا کننده استفاده می شد، 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 نمونه ها از غلظت ثابت ۵ میلی گرم بر لیتر نیترات 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 تیمارهای ۵،۶،۷،۸ بیشترین میزان فراوانی باززایی مشاهده شد و این تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معنا داری را در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن با سایر تیمارها نشان دادند. این نتایج نشان می دهد که حضور نیترات نقره و هورمون NAA باعث افزایش میزان باززایی در ریز نمونه ها می گردد.

تراکم مناسب ریز نمونه ها و غلظت آگروباکتریوم برای آلوده کردن کوتیلدون های کلزا: در این مرحله از تراکم ۲۵ تا ۳۰ ریزنمونه کوتیلدونی در هرپلیت استفاده شد. ریزنمونه ها از برش دقیق در قاعده دمبرگ، برگهای لپه‌ای 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 درحضور کانامایسین محیط سفید می‌شوند. از سوی دیگر عدم دقت کافی و حذف سلولهای قاعده دمبرگ که از توان باززایی بالایی برخوردار بودند نیز می تواند باعث عدم شاخه‌زایی وکاهش تراریختی گردد. چگونگی ایجاد برش در ریز نمونه های کوتیلدونی و چیدمان در محیط پیش کشت در شکل(۱) ارائه شده است.



ب الف

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

آغشته شده و سپس در محیط کشت توأم و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. طبق گزارشات ارائه شده، طول زمان مجاورت ریزنمونه ها با آگروباکتریوم ۴۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۳). با توجه به جدول (۲) نتایج نشان داد که مناسب ترین تراکم آگروباکتریوم برای آلوده سازی ریز نمونه های کوتیلدون در تیمار شماره ۴ (OD_{600nm}:۰/۸) می باشد که تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می دهد.

جدول ۲- تأثیرات زمانهای مختلف رشد آگروباکتریوم بر روی میزان تراریختی گیاه کلزا – در صد گیاهان باز زا شده شامل گیاهان PCR مثبت نسبت به کوتیلدون های آزمایش شده می باشد.

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 تحریک کننده ژنهای *vir* در اگروباکتریوم برای تراریختی در تیمار شماره ۴(۰/۲ میلی مولار) به دست آمد که تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می دهد.

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 کاهشی غلظت برخی عناصر موجود در محیط همکشتی بر میزان تراریختی در تعدادی از گونه های 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 یافته ای 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 نمونه های 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 معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن نسبت به سایر تیمارها نشان می دهد.

جدول ۳- تأثیرات میزان غلظت استوسیرینگون بر روی میزان تراریختی گیاه کلزا – در صد گیاهان باز زا شده شامل گیاهان PCR مثبت نسبت به کوتیلدون های آزمایش شده می باشد.

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]

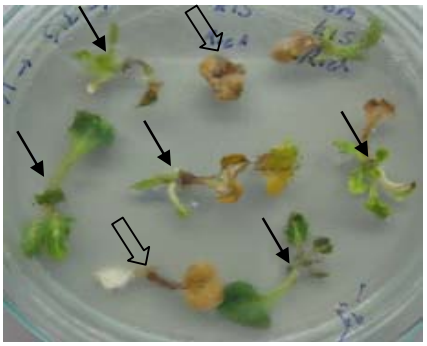
گزینش و شناسایی گیاهان تراریخت با استفاده از غلظتهای مختلف کانامایسین: پس ازتراریختی کوتیلدونهای کلزا و حذف آگروباکتریوم با اثر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۲۰۰میلی گرم بر لیتر)، ریزنمونه ها به محیط القای نوساقه منتقل شدند. این مرحله به رشد بیشتر ریزنمونه‌ها در محیط جدید و افزایش مقاومت سلولهای تراریخت در مقابل عامل انتخابی کانامایسین در مراحل بعدی کمک می نماید.

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 نمک های موجود در محیط MS	۱۱[b]
۳	MS + Sucrose	KH_2PO_4	۶[c]
۴	MS+ Sucrose	KH_2PO_4+ $CaCl_2$	۷[c]
۵	MS + Sucrose	KH_2PO_4+NH_4NO_3+ KNO_3	۱۱[b]
۶	MS + Sucrose	KH_2PO_4+NH_4NO_3+ KNO_3+ $CaCl_2$	۱۵[a]

در این مرحله چگونگی ایجاد برش در کوتیلدون ها نتایج خود را نشان می دهد، اگر برش و حذف سلولهای مریستمی به درستی انجام شده باشد طی یک هفته تعدادی از ریز نمونه ها به طور کامل باززا شده و در تعدادی نیز باززایی به میزان کم مشاهده خواهد شد. حضور سلولهای مریستمی همراه با ریز نمونه ها باعث افزایش باززایی کاذب در این مرحله می گردد ولی به دلیل مقاوم بودن سلولهای مریستمی 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 میلی گرم بر لیترکانامایسین و۲۰۰میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. در این وضعیت تعدادی از ریز نمونه ها باززایی را شروع کرده، در تعداد دیگری انتهای بریده شده متورم می گردد و تعدادی نیز نکروز شده و از بین می روند. پس از رشد بیشتر ریزنمونه ها و به منظور حذف گیاهان غیر تراریخت، این گیاهان به محیط انتخابی با غلظت بالاتری از کانامایسین (۱۵میلی گرم 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-نمونه‌ها در محیط گزینشگر القای نوساقه در شکل(۳) نشان داده شده است.



شکل ۳- باززایی ریز نمونه ها کلزا در محیط القای نوساقه حاوی ۸ mg/L کانامایسین ریز نمونه های باززاشده به رنگ سبز(فلش تو پر) و ریز زنمونه باززا نشده(فلش تو خالی)به رنگ قهوه ای(نکروز) مشاهده می شود.

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

بررسی قدرت تراریختی سویه های مختلف آگروباکتریوم با استفاده از شرایط بهینه شده قبلی: سویه های 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 می کند (جدول۶).

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

کانامایسین (mg/L)	تعداد کوتیلدون های آزمایش شده	تعداد گیاهان باز زا شده در محیط اتخابی	تعدادگیاهچه 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 کانامایسین در واکشتهای ریزنمونه ها در محیطهای گزینشگر به ترتیب با غلظتهای ۰ ، ۸ و۱۵ 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 زا شده در محیط انتخابی	تعدادگیاهان PCR مثبت و در صد تراریختی
LBA4404	۱۰۰	۳۰	۱۶
GV3850	۱۰۰	۳۵	۲۰
GV3101	۱۰۰	۴۰	۱۰

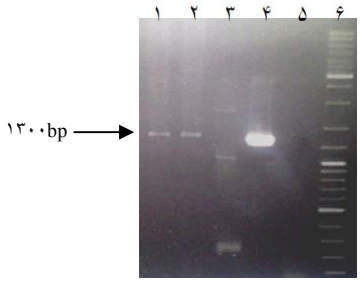
نمونه ها پس از باززایی ورسیدن به اندازه حدود یک تا دو سانتیمتر به محیط طویل شدن نوساقه منتقل شدند. در این محیط که میزان کانامایسین آن ۱۵ میلی گرم بر لیتر است تعدادی از ریز نمونه ها سبز باقی ماندند (مقاوم) و تعداد دیگری همزمان با رشد سفید و یا بنفش شدند که این وضعیت نشانه غیر تراریخت بودن یا قرار گیری ژن در مکانهای نامناسب است. پس از رشد گیاهچه تراریخت به شکل یک گیاه مستقل ، گیاهچه از محل ساقه از بقایای ریز 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 (شکل۴ 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 ۱۵درجه سانتی گراد شب انجام شد(شکل۴ب) و این گیاهان به مرحله بذر دهی نیز رسیدند(شکل۴ج).

الف ب ج

شکل (۴) گیاهچه کلزای تراریخت باززا شده آماده و چگونگی انتقال به خاک وشرایط گلخانه ای

الف) گیاهچه ریشه دار شده در محیط ریشه زایی ب ، ج) مراحل مختلف رشد گیاه در شرایط فیتوترون

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 استخـراج گـــردید. 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 bp ۱۳۰۰ بر روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیزگردید(شکل۵).



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

آزمون PCR برای DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای EPS1,EPS2 : چاهک ۲,۱ : 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 ملکولی Mix (Fermentas)

بحث

استفاده از اگروباکتریوم 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 سویه های 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 اروسیک پایین می‌باشد استفاده شد. با توجه به اینکه میزان باززایی یکی از مهم ترین 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 نوساقه های 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 می رود گیاهچه های ایجاد شده دارای یکنواختی ژنتیکی بالایی باشند. اما نوساقه هایی که از کشت محور زیر لپه ایجاد می شوند، ابتدا مرحله کالوس زایی را طی کرده و پس از استقرار درمحیطهای مناسب گیاهچه های سبز ایجاد می کنند. به عبارت دیگر گیاهچه ها دراثر باززایی غیر مستقیم تشکیل شده و سبب تنوع سوماکلونال و تولید گیاهچه هایی با ساختار ژنتیکی متفاوت می شود. 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 کوتیلدون ها برای تهیه ریزنمونه از مراحل بسیار حساس در کشت بافت است که می تواند در بازده تراریختی تأثیر به سزایی داشته باشد. در زمان بریدن کوتیلدون چنانچه از ناحیه مریستمی خیلی فاصله گرفته شود میزان باززایی به میزان بسیار زیادی کاهش می یابد و بر عکس چنانچه در این مرحله توده مریستمی زیادی همراه کوتیلدون باشد به سرعت در محیط القای نوساقه باززا می شوند. به عبارت دیگر علی رغم مشاهده باززایی زیاد، نمونه های باززا شده که باززایی آنها نیز

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

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

میزان رشد اگروباکتریوم (غلظت باکتری) در کشت شبانه نیز از موارد موثر در تراریختی است. بهترین پاسخ زمانی به دست آمد که OD_{600} کشت باکتری در حدود ۰/۸ باشد. در OD_{600} بالاتراز ۰/۸ با مرگ سلولهای باکتری و تجمع آنها مواجه شده که منجر به کاهش تراریختی ریز نمونه ها می شود. در همین شرایط، غلظتهای کمتری از باکتری می تواند منجر به کاهش اتصال مناسب باکتری به سلول گیاهی گردد (۲۱). از طرف دیگر مشخص شده است که ژنهای ناحیه بیماریزا (*vir* gene) در اگروباکتریوم به وسیله مواد فنلی آزاد شده از محل زخم گیاه، فقر فسفات، مونوساکارید ها وpH پایین فعال می شوند (۳۵ و ۴۱) ، در این تحقیق نیز از استوسرینگون به عنوان یک ماده فنلی که می تواند موجب افزایش انتقال T-DNA گردد (۳۷) برای بهینه سازی شرایط تراریختی در مرحله آلوده سازی به اگروباکتریوم استفاده شد. عامل دیگری که جهت بهینه سازی تراریختی با اگروباکتریوم بایستی مورد توجه قرار بگیرد، دمای محیط در هنگام تراریختی است . دمای مناسب برای القای ژنهای *vir* بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد ذکر شده که کمتر از دمای بهینه برای رشد اگروباکتریوم (۲۸درجه سانتی گراد) 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 اگروباکتریوم ونیز در مدت زمان همکشتی با ریز نمونه در ۲۵ درجه سانتی گراد ثابت نگاه داشته شد.

در تراریختی با اگروباکتریوم مجموعه عواملی که شرایط بهینه اتصال به میزبان و تحریک ژنهای *vir* را فراهم می آورد می تواند در افزایش انتقال ژن با واسطه این باکتری مؤثر باشد(۴). محیط همکشتی مکانی است که اگروباکتریوم در مجاورت گیاه وظیفه انتقال ژن را به انجام می رساند. به نظر می رسد 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 نمی آورد ولی می تواند 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 می دهد که غلظت یونها در محیط همکشتی در میزان تراریختی مؤثر است (۴ ، ۹ و ۱۸). یافته های این تحقیق نیز نشان می دهد که حذف برخی از ترکیبات محیط همکشتی با پایه محیط MS می تواند میزان تراریختی را افزایش دهد. بهترین نتیجه از حذف همزمان ترکیبات KH_2PO_4 ، KNO_3 وNH_4NO_3 و$CaCl_2$ به دست آمد. نکته قابل توجه این است که حتی استفاده از محیط حاوی

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 می آورد. 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 می رسد که غلظت پایین یونی شرایط بهتری را برای تحریک اگروباکتریوم و تراریختی فراهم می آورد. البته احتمالاً نوع آگار به کار رفته در محیط کشت و میزان یونهای موجود در آن می تواند در این امر مهم باشد.

به طور معمول در تراریخت کردن و باززایی گیاه کلزا، از آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان عامل گزینشگر استفاده می شود. 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 ژنی که در کشت بافت برای انتخاب گیاهان تراریخت استفاده می شود، 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 می دهد (۳۱). در این بررسی از استراتژی چند مرحله‌ای در افزودن آنتی بیوتیک کانامایسین استفاده شد. ابتدا ریزنمونه های تلقیح شده با اگروباکتریوم به مدت یک هفته در محیط باززایی فاقد کانامایسین قرار داده شدند. در مرحله بعد آنتی بیوتیک با غلظت پایین و ۸ میلی گرم بر لیترمورد استفاده قرار گرفت و بازکشتهای بعدی با افزایش غلظت، مقدار آنتی بیوتیک به ۱۵میلی گرم بر لیتر رسانده شد. به نظرمی رسد طی این افزایش تدریجی، به سلولهای تراریخت اجازه سازگار شدن با محیط کشت و بیان سطح مناسبی از ژن نئومایسین فسفوترانسفراز داده می شود. هر چند برخی سلولهای غیر تراریخت نیز در مرحله اول از عامل انتخابی عبور کرده و باززا می شوند، ولی طی افزایش غلظت آنتی بیوتیک به ۱۵ میلی گرم بر لیتر این گیاهچه ها حذف می شوند. در همین شرایط گیاهچه هایی که از باززایی وتکثیر سلولهای تراریخت حاصل شده اند سبز باقی می مانند. در صورتی‌که از همان ابتدا از غلظت بالای کانامایسین استفاده شود، احتمال دارد که سلولهای غیرتراریخت و سلولهایی که تعداد نسخه های واردشده به درون ژنوم آنها کمتر است، مرده و ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئلها به محیط بیرون منتقل گردد. همین امر می تواند بر روی سلولهای دیگر و حتی سلولهای تراریخت اثر گذاشته و باعث مرگ آنها شود (۳۳).

عامل مهاری دیگری که می تواند میزان تراریختی ریز نمونه ها را تحت تأثیر قرار دهد تولید گاز اتیلن توسط سلولهای گیاهی است. گاز اتیلن تولید شده توسط ریزنمونه ها و حتی خود ترکیبات محیط کشت، اثرات نامطلوبی بر روی ریزنمونه های تراریخت سالم گذاشته و از باززایی آنها جلوگیری می نماید (۳۱). حذف اتیلن از طریق واکشت نمودن متوالی نمونه ها ، یکی از راههای متداول برای مقابله با این عامل مهاری است. علاوه بر انتقال نمونه ها 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 نمونه های گیاه کلزا می شود، که با نتایج تحقیقات پیشین (۲۴، ۳۰ و ۳۱) نیز مطابقت دارد.

در رابطه با ریشه زایی گیاهچه های باززا شده در منابع مختلف به طورعمده برای ریشه زایی در کلزا از دو عامل کاهش قند محیط کشت و استفاده از هورمون IBA (Indole-3-butyric acid) استفاده می شود. در تحقیقات قبلی، برای IBA غلظتهای ۰/۱ میلی گرم تا ۵ میلی گرم بر

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

به نظر می رسد نوع ژنوتیپهای مختلف، سایر ترکیبات به کار رفته در محیط کشت، شرایط محیطی و کیفیت هورمون مصرفی می تواند توجیه کننده این دامنه وسیع غلظت باشد. با توجه به اینکه اکسینها تحریک کننده ریشه زایی بوده و غلظتهای بالاتر آن پس از تحریک ریشه زایی اثر ممانعت کنندگی برریشه زایی دارد. علاوه بر آن نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت ۲ میلی گرم بر لیترIBA منجر به القای کالوس می گردد. به همین دلیل از غلظتهای پایین این هورمون استفاده شد. بهترین نتایج برای ریشه زایی در غلظت ۰/۲ میلی گرم بر لیتراز IBA همراه با کاستن قند محیط به ۱۵ گرم بر لیتر(نیمی از غلظت قند در محیط استانداردMS) به دست آمد.

در آنالیز گیاهان تراریخت آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکی از روشهای مرسوم است. با استفاده از آغازگرهای مناسب و انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط کاملاً اختصاصی، می‌توان حضور بخشهای مختلف ناقل و ژن مورد نظر را در گیاه به اثبات رساند. نکته قابل توجه ای که در این زمینه وجود دارد تهیه DNA ژنومی مناسب است. اصولا وجود ناخالصی در اسید نوکلئیک استخراج شده منجر به کاهش بازده ویا کاهش در تکرارپذیری فرآیندهای بعدی نظیرهضم آنزیمی، PCR و RT-PCR می شود. DNA ژنومی تخلیص شده از بافتهای گیاهی معمولاً نتایج متغیری را در بر دارد که به طور عمده به دلیل ممانعت کننده های آنزیمی است که در مراحل خالص سازی به همراه DNA تخلیص می شود. منشاء برخی از این ممانعت کننده ها 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 می شود. حضور هر یک از این ترکیبات به میزان بسیار جزیی (در حد ۰/۰۰۵ درصد) نیز می تواند به طور کلی از انجام واکنشهایی نظیر PCR ممانعت به عمل آورد. از دیگر ناخالصیها که ناشی از روش تخلیص است، می توان به الکل، فنل، NaCl و EDTA اشاره کرد که بازدارندگی به مراتب کمتری نسبت به دترجنت های ذکر شده دارند. ترکیبات پلی ساکاریدی بافتهای گیاهی به خصوص انواع اسیدی آنها نیز به شدت بازدانده واکنش PCR است (۲۴ و ۳۶).

با توجه به موارد مذکور به نظر می رسد می توان با استفاده از کیتهای تخلیص ژنوم مشکل مذکور را تا حدی کاهش داد. در صورت عدم امکان بهره برداری 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 میلی گرم از بافتهای جوان تر گیاه) وهمچنین رقیق سازی ژنوم تخلیص شده برای کاهش این مواد بازدانده نتایج مناسبی حاصل شد (۳۲،۶). به طور خلاصه می توان با افزایش تدریجی عامل انتخاب کننده، 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.

منابع

۱- سلمانیان، ع. ه.، کهریزی، د. ۱۳۸۶، مطالعه تأثیر ژنوتیپ ونوع ریزنمونه بر روی باززایی نوساقه گیاهچه های کلزا (*Brassica napus* L.) . مجله زیست شناسی ایران جلد ۲۰ ، شماره ۳، صفحه۱۷۱-۱۷۹.

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

۳- کهریزی، د.، سلمانیان، ع.ه.، موسوی، ا.، معینی، ا.، کریم زاده، ق.، ۱۳۸۷، تغییر اسیدآمینه آلانین ۱۸۳ به تروئونین در آنزیم۵- انول پیرویل شیکیمات-۳-فسفات سنتاز به منظور ایجاد مقاومت به 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., Sugaware, 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 , Agrobactrium-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 monosacarides. 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, Table25 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 enganced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. J. Bacteriul, 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