نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۴۷-۱۳۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 139-147
ISSN: 2008 - 4730

بررسی امکان انتقال ژن به گیاهان خانواده چتریان با استفاده از روش غوطه‌وری گل

مهدی قبولی[۱]- احمدرضا بهرامی[۲*]- فرج ا... شهریاری[۳]- جعفر ذوالعلی[۴]- علی محمدی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱

چکیده

در روش‌های کلاسیک انتقال ژن به گیاهان، عموما از تکنیک‌های مختلف کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. استفاده از فنون کشت بافت، فرایند انتقال ژن به گیاهان را با مشکلات متعددی همچون صرف زمان و هزینه زیاد، نیاز به مهارت، تخصص و تجربه، و بروز تغییرات ژنتیکی ناشی از تنوع سوماتیکی، مواجه ساخته است. از این رو، در سال‌های اخیر، محققان به ابداع روش‌های تسهیل شده انتقال ژن اهتمام ورزیده‌اند که بی نیاز از فرایند کشت بافت بوده و پاسخگوی نیازهای تحقیقات نوین بیولوژی مولکولی باشند. در این بین، روش غوطه‌وری گل در سوسپانسیون آگروباکتریوم، توجه زیادی را به خود معطوف داشته است. در این تحقیق با هدف بررسی امکان انتقال ژن به گیاهان خانواده چتریان از طریق روش غوطه‌وری گل، گیاهان یکساله (شوید، رازیانه و گشنیز) و گیاهان دوساله (جعفری، هویج و کرفس) مورد آزمایش قرار گرفتند. گیاه آرابیدوپسیس نیز به عنوان گیاه مدل برای کنترل روش آزمایشی استفاده شد. گل‌های گیاهان موردنظر در مراحل مختلف نمو گل‌آذین در سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم حامل پلاسمید ناقل دوگانه PBI121 حاوی ژن گزارشگر گیاهی uidA (gus) و نشانگر گزینشگر گیاهی nptII غوطه‌ور شدند. اگرچه تولید گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته و حصول نرخ تراریزش بسیار مطلوب برای این گیاه مبین صحت روش آزمایشی بود، ولی موفقیت چندانی در گیاهان خانواده چتریان حاصل نشد. پس از گزینش و آنالیز بیش از ۱۰۰۰۰ بذر از شش گونه گیاهی مورد آزمایش، تنها یک گیاهچه کرفس تراریخته شناسایی گردید. با استفاده از واکنش PCR، حضور ژن nptII در تنها گیاهچه کرفس تراریخته حاصل مشخص گردید، اما فعالیت ژن گزارشگر gus در آن تائید نشد. گیاهچه‌های تراریخته آرابیدوپسیس بیان کننده ژن گزارشگر gus با استفاده از تست هیستوشیمیایی X-Gluc و واکنش PCR تائید شدند.

واژه‌های کلیدی: غوطه‌وری گل، انتقال ژن، خانواده چتریان، آرابیدوپسیس، اگروباکتریوم

مقدمه

اگرچه کشت بافت گیاهی به عنوان یک فناوری پایه برای انتقال ژن به گیاهان محسوب می‌شود، لیکن استفاده از این فناوری با برخی مشکلات مواجه است که در بعضی موارد به عنوان مهمترین عامل محدود کننده مهندسی ژنتیک در گیاهان محسوب می‌شود. تولید گیاهان تراریخته از طریق کشت بافت مستلزم آماده‌سازی دقیق بافت‌های گیاهی، انتخاب روش مناسب برای تراریزش سلول‌های انفرادی گیاه و اتخاذ یک سیستم گزینشگر مناسب برای انتخاب گیاهان تراریخته می‌باشد. از سوی دیگر، بروز تنوع سوماتیکی ناخواسته در بین گیاهان تراریخته باززایی شده ناشی از جهش‌های ژنتیکی القا شده در شرایط کشت بافت، کارایی فناوری انتقال ژن را در زمینه‌های کاربردی و تحقیقی کاهش می‌دهد. تغییرات ژنتیکی ناخواسته نظیر تغییر نمایه متیلاسیون ژنوم، القای جهش‌های نقطه‌ای و تغییر در تعداد و ساختمان کروموزوم‌ها، بطور معمول در گیاهان تولید شده از طریق کشت بافت مشاهده می‌شود (۱۱).

در برخی گیاهان، حداقل یک سیستم کشت بافت خوب برای تولید مؤثر گیاهان تراریخته با راندمان مطلوب تراریزش تثبیت شده است، در حالی که برای بسیاری از گونه‌های گیاهی سیستم چندان موثری برای باززایی گیاهان در شرایط این‌ویترو وجود ندارد (۳). این امر امکان انتقال ژن به بسیاری از گیاهان مهم را با محدودیت مواجه نموده است. در سال‌های اخیر، روش های تسهیل شده انتقال ژن که بی نیاز از فرایند کشت بافت می باشند، مورد توجه محققان مهندسی ژنتیک قرار گرفته‌اند. روش‌های تراریزش بی نیاز از مراحل کشت

۱- استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ar-bahrami@ferdowsi.um.ac.ir)
۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴ و ۵- به ترتیب استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

بافت را روش های "تراریزش در سطح گیاه" (*in planta*) می نامند. روشهای انتقال ژن در سطح گیاه، در آغاز راه خود قرار دارند. در چند سالی که از مطرح شدن این روش‌ها می‌گذرد، گزارش‌های کمی از کاربرد موفقیت‌آمیز آنها در گیاهان زراعی در دسترس می‌باشد. با این حال، تحقیقات متعددی برای گسترش کاربرد این روش‌ها در حال انجام است. در بین مهمترین روش‌های انتقال ژن در سطح گیاه که تا کنون معرفی شده‌اند، دو روش نفوذپذیری با مکش و غوطه‌وری گل بیشترین توجه را به خود معطوف داشته‌اند (۳ و ۶). این دو روش مبتنی بر تیمار گل‌های جوان گیاهان هدف با باکتری آگروباکتریوم حامل ترانسژن و غربالگری در بذرهای حاصل از این گیاهان برای شناسایی افراد تراریخته می‌باشند. استفاده از این روش‌ها برای تراریزش گیاه مدل آرابیدوپسیس بسیار موفقیت آمیز بوده است و موفقیت‌هایی نیز که اخیرا در استفاده از این روش‌ها برای تعدادی از گیاهان زراعی از جمله کلزا، یونجه، تربچه و سیب‌زمینی بدست آمده است، آینده نویدبخشی را فراهم آورده است (۷، ۹ و ۱۰).

گیاهان خانواده چتریان، تیره بزرگی از گیاهان گلدار جدا گلبرگ هستند که گل‌آذین چتری پوشیده شده با گل‌های فراوان، مهمترین ویژگی متمایز کننده آنها از سایر گیاهان است. در بین گیاهان تیره چتریان، گونه‌های دارویی فراوانی وجود دارد که اغلب آنها برای مردم شناخته شده و در طبابت مورد استفاده قرار می‌گیرند. بعضی از آنها نیز مانند جعفری، شوید، کرفس، رازیانه، گشنیز و هویج، برگ یا میوه خوراکی داشته و در زمره سبزیجات بسیار محبوب قرار دارند. گیاهان خانواده چتریان از یک سو به دلیل چرخه زندگی کوتاه، سهولت در دسترسی به گل‌آذین، تعداد بذر فراوان و پرورش آسان از خصوصیات یک گیاه مدل برخوردار هستند و از سوی دیگر به دلیل کشت و کار آنها برای مصارف غذایی و دارویی به عنوان گیاه زراعی مطرح می‌باشند. چنانچه بتوان این گیاهان را با استفاده از روش غوطه‌وری گل تراریخته نمود، گامی موثر به سوی کاربردی شدن این روش انتقال ژن در عرصه کشاورزی برداشته خواهد شد. از این رو، در این تحقیق به منظور دستیابی به روشی ساده و تسهیل شده برای انتقال ژن در خانواده چتریان، اقدام به تراریزش گیاهان شوید (*Anethum graveolens*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، گشنیز (*Coriandrum sativum*)، جعفری (*Petroselium sativum*)، هویج (*Daucus carota*) و کرفس (*Apium graveolens*) توسط روش غوطه‌وری گل شد. همچنین گیاه آرابیدوپسیس واریته کلمبیا (*Arabidopsis thaliana* var. *colombia*) نیز به عنوان گیاه مدل برای کنترل روش آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و کاشت و پرورش گیاهان

گیاهان یکساله (شوید، رازیانه و گشنیز) و گیاهان دوساله (جعفری، هویج و کرفس) در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفتند. بذرهای شوید و جعفری از شرکت مام گل تهران، کرفس، گشنیز و رازیانه از شرکت خاک تهران و هویج از شرکت آوند تهران تهیه شدند. تعداد ۱۰-۵ عدد بذر از هر گیاه در گلدان‌های حاوی خاک سبک و غنی کاشته شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها و تثبیت گیاهچه‌ها، گیاهان تا مرحله گلدهی در گلخانه با شرایط ۱۴ ساعت روشنایی در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد، پرورش داده شدند.

گیاهان آرابیدوپسیس واریته کلمبیا نیز به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. بذرهای این گیاه پس از استریلیزاسیون سطحی در سطح کاغذ صافی استریل یا محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (1/2MS) جوانه زدند و گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به خاک انتقال داده شدند. این گیاهان تا مرحله گلدهی در شرایط مشابه با گیاهان چتریان پرورش داده شدند.

سویه‌های باکتری و ساختار ژنی

سازه ژنی شامل پلاسمید ناقل دوگانه pBI121 حامل ژن گزارشگر گیاهی بتاگلوکورونیدار (*gus*) *uid*A و ژن گزینشگر نئومایسین فسفوترانسفراز (*npt*II) رمزکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین استفاده شد. در این پلاسمید، ژن *gus* توسط راه‌انداز 35S ویروس موزائیک گل کلم (CaMV)، و ژن *npt*II تحت راه‌انداز NOS (از ژن نوپالین سنتاز باکتری آگروباکتریوم) هدایت می‌شوند. باکتری‌های *Agrobacterium tumefaciens* سویه نوپالینی C58C1، سویه آگروپینی LBA4404 و سویه مانوپینی EHA105 برای غوطه‌وری گل‌ها و انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی تلقیح

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی تلقیح، بر اساس گزارش‌های کلاف و بنت (۱۹۹۸) و کرتیس و نام (۲۰۰۱) عمل شد. یک کلنی باکتری آگروباکتریوم ترانسفورم شده حامل ناقل دوگانه موردنظر در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین و کانامایسین کشت داده شد. کشت‌ها در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی رشدیافته به حجم ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع فاقد آنتی‌بیوتیک کانامایسین و حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتر افزوده شد و به مدت ۸-۶ ساعت در شرایط مشابه انکوبه شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۱/۲ - ۰/۸ برسد. سلول‌های باکتری به

لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتر منتقل گردیده و با استفاده از سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق از محیط کشت جداسازی شدند و پلت باکتری در ۴۰ میلی‌لیتر محلول تلقیح حل شد. محیط کشت معدنی MS $\frac{1}{2}$ مایع، حاوی ۵ درصد ساکارز و ۰/۰۳-۰/۰۵ درصد سورفکتانت Silwet L-77 یا Tween 20، با pH = ۵/۲-۵/۷ به عنوان محلول تلقیح در تیمارهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در بعضی تیمارها، از هورمون بنزیل‌آمینوپورین به مقدار ۴۴ نانومولار نیز در محلول تلقیح استفاده شد.

غوطه‌وری گل‌ها در سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم

گل‌های گیاهان چتریان در سه مرحله ظهور گل‌آذین اولیه، گل‌آذین با گل‌های بسته و گل‌آذین قبل از باز شدن کامل گل‌ها، با تیمارهای زمانی مختلف (۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ ثانیه) در سوسپانسیون باکتریایی غوطه‌ور شدند (شکل ۱). تلقیح و غوطه‌وری گل‌های گیاهان مورد آزمایش اکثرا پس از غروب آفتاب انجام شد و بعد از غوطه‌وری گل‌ها، گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در زیر خیمه‌ای از پلاستیک سیاه رنگ قرار داده شدند. در مدت ۲۴ ساعت پس از غوطه‌وری گل‌ها، گلدان‌ها و فضای بین آنها در چند نوبت آبیاری کامل شد تا رطوبت محیط در اطراف گیاهان بالا رود. گیاهان تلقیح شده تا مرحله نمو کامل و رسیدگی بذرها در شرایط گلخانه نگهداری شدند و پس از برداشت بذرها از گلخانه خارج و معدوم گردیدند. بذرهای برداشت شده از گیاهان تلقیح شده تا زمان بررسی‌های آزمایشگاهی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. گیاهان در مدت دو سال و در سه نوبت کشت شدند و در مجموع در هر یک از گیاهان شوید، رازیانه و گشنیز گل‌آذین‌های ۴۵ گیاه، در هویج گل‌آذین‌های ۲۴ گیاه، و در کرفس و جعفری گل‌آذین‌های ۱۰ گیاه با ترکیبات مختلف باکتری و محلول تلقیح، تیمار شدند.

گیاهان آرابیدوپسیس پس از ورود به مرحله رشد زایشی، گل‌آذین اولیه آنها حذف گردیده و پس از ظهور گل‌آذین‌های ثانویه، گل‌ها در مراحل مختلف شامل غنچه و مراحل اولیه بازشدن با سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم تلقیح شدند (شکل ۲). به دلیل کوچک بودن گل‌ها و گیاهان، با استفاده از قطره چکانهای کوچک یک قطره از سوسپانسیون باکتری در روی هر گل قرار داده شد. سطح خاک با فویل‌های آلومینیومی پوشانده شد تا از ریخته شدن قطره‌های باکتری بر روی خاک و آلودگی‌های بعدی جلوگیری شود. پس از تلقیح گیاهان، گلدان‌ها با لیوان‌های پلاستیکی تیره رنگ به مدت ۲۴ ساعت پوشانده شدند تا از تماس نور با باکتری‌های تلقیح شده جلوگیری شود. در این مدت سعی شد تا با آبیاری گلدان‌ها رطوبت نسبی در اطراف آنها بالا باشد. سپس شرایط به حالت نرمال بازگردانده شد. گیاهان تلقیح شده در شرایط اتاق رشد، تا زمان تکمیل دوره رشد و بذردهی نگهداری شدند. بذرهای برداشت شده از گیاهان آرابیدوپسیس در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۶).

گزینش بذرها و پرورش گیاهان تراریخته احتمالی

برای گزینش بذرها و شناسایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از روش جوانه‌زنی و تثبیت گیاهچه در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (1/2MS) حاوی کانامایسین به عنوان عامل گزینشگر استفاده شد. غلظتی از کانامایسین که ۹۰-۷۰ درصد بذرهای کاشته شده یا گیاهچه‌های جوانه زده را برای هر گونه متاثر می‌نماید، قبلا تعیین شده بود. در مورد هر گونه از گیاهان خانواده چتریان، گیاهچه‌هایی که در محیط گزینش از وضعیت سبزینگی و رشد بهتری برخوردار بودند، پس از تثبیت در محیط کشت گزینش در مرحله ۸ - ۴ برگی به گلدان منتقل شدند. این گیاهان در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۵ و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی : ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. در مورد گیاهچه‌های کرفس، به دلیل رشد بسیار کند آنها در شرایط کشت استریل و تاثیرپذیری بسیار زیاد ریشه آنها از حضور کانامایسین در محیط کشت، گیاهچه‌هایی که موفق به تولید ریشه شدند، در مرحله دو برگچه‌ای از محیط کشت گزینش خارج گردیده و به سطح محیط کشت مشابه فاقد آنتی‌بیوتیک برای ادامه رشد منتقل شدند. بذرهای بدست آمده از گیاهان آرابیدوپسیس نیز پس از ضد عفونی سطحی در سطح محیط کشت گزینش 1/2MS حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. گیاهچه‌هایی که اثرات کانامایسین بر روی آنها کمتر مشهود بود، انتخاب و به گلدان منتقل گردیدند.

تائید مولکولی گیاهان تراریخته

به منظور بررسی انتقال و بیان ژن گزارشگر در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، قطعات جدا شده از این گیاهچه‌ها در محلول X-Gluc غوطه‌ور گردیده و با استفاده از تیمار الکل ۷۰ درصد کلروفیل‌زدایی گردید. توسعه رنگ آبی در نمونه‌ها به عنوان شاخص بیان ژن *gus* در نظر گرفته شد. برای بررسی ماهیت تراریخته گیاهانی که آزمایش هیستوشیمیایی GUS در آنها مثبت شده بود، از تکنیک PCR بر روی DNAی ژنومی برای تکثیر بخشی از ژن‌های *gus* و *npt*II بطور اختصاصی استفاده شد.

براساس مقاله چن و همکاران (۲۰۰۳)، الیگونوکلئوتیدهای ۲۰ مری با توالی ´۳ – GATGTGATATCTCCACTTAC – ´۵ و ´۳ – CCCGCTTCGAAACCAATGCC – ´۵ برای تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۲۴۷ bp از ژن *gus* طراحی شدند. همچنین الیگونوکلئوتیدهای ۱۹ و ۲۰ مری با توالی ´۳ – GGTGCCCTGAATGAACTGC – ´۵ و ´۳ –

AATATCACGGGTAGCCAACG – ´۵ برای تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۵۲۲ bp از ژن *npt*II مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه باند DNA تکثیر شده در واکنش PCR، در مقایسه با نشانگر اندازه 1 kb DNA ladder تعیین گردید.

نتایج و بحث

کاشت و پرورش گیاهان

بذرهای شوید و رازیانه در طی ۱۰ – ۷ روز و گشنیز و هویج در طی ۲ هفته پس از کاشت جوانه زدند. جوانه‌زنی بذرهای جعفری در طی ۲۰ روز و کرفس در طی ۶ – ۵ هفته پس از کاشت صورت گرفت. تثبیت گیاهچه‌ها در ترکیب خاک انتخاب شده بخوبی صورت گرفت و گیاهچه‌ها رشد خود را آغاز کردند. گیاهان یک‌ساله شوید، رازیانه و گشنیز در شرایط روزبلند بهار و تابستان در مدت ۴۰ – ۳۰ روز و در شرایط روزبلند با نور مصنوعی در مدت ۵۰ – ۳۰ روز پس از جوانه‌زنی به مرحله گل‌دهی رسیدند. رشد و نمو این گیاهان، در مدت ۴۰ – ۳۰ روز پس از شروع گل‌دهی با عبور از دوره‌های گل‌دهی، گرده‌افشانی، و توسعه و رسیدگی بذرها تکمیل شد. گیاهان دوساله جعفری، هویج و کرفس در بهار و تابستان سال اول فقط به رشد رویشی پرداختند و پس از عبور از دوره سرمای پائیزه و زمستانه، پس از برگرداندن به شرایط گلخانه، در اواخر بهار سال بعد به مرحله گل‌دهی رسیدند (شکل ۱).

در گیاه آرابیدوپسیس مشاهده شد که انتقال گیاهچه‌های جوانه‌زده در سطح کاغذ صافی و محیط کشت در مرحله دو برگی به خاک، باعث تلف شدن آنها می‌گردد. همچنین گیاهچه‌هایی که در مرحله شش برگی به خاک منتقل شدند نیز قابلیت چندانی برای تثبیت و رشد نشان ندادند. بهترین زمان برای انتقال گیاهچه‌ها به خاک، مرحله چهار برگی بود که گیاهچه‌ها پس از انتقال از قابلیت مطلوبی برای تثبیت و زنده‌مانی برخوردار بودند. همچنین مشاهده شد که نور و دما تاثیر مهمی بر رشد رویشی و توانایی گل‌دهی آرابیدوپسیس دارد. در مواردی که نوسانات دما و افزایش آن از سطح ۲۵ درجه سانتیگراد در محیط رشد این گیاه زیاد بود، گل‌دهی زودرس مشاهده شد و گل‌آذین‌های حاصل، ضعیف بودند. در شرایط رشد بهینه، گیاهان آرابیدوپسیس، از اوایل هفته سوم تا اواخر هفته چهارم، دوره گل‌دهی را به پایان رسانده و در طی ۶ تا ۷ هفته دوره رشد خود را تکمیل کردند (شکل ۲).

شکل ۱- گیاهان پرورش یافته در شرایط گلخانه در مرحله گلدهی

شکل ۲- گیاه آرابیدوپسیس در مرحله گلدهی

تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید و نگهداری آن‌ها

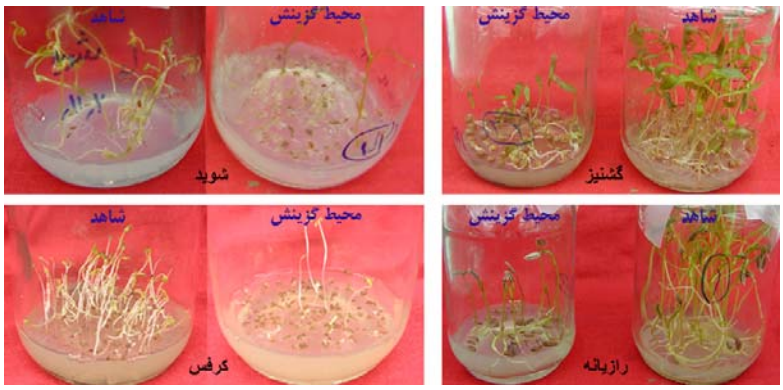
اثر متفاوت نوع سورفکتانت بر بقای گل‌های گیاهان مورد آزمایش مشاهده گردید. در هنگام استفاده از سورفکتانت Silwet L-77 در گیاه رازیانه، گل‌های آن به سورفکتانت واکنش نشان داده و دچار سوختگی شدند. از سوی دیگر، تیمار با سوسپانسیون باکتری حاوی سورفکتانت Tween 20 در گیاه شوید باعث چسبندگی و کپه‌ای شدن گل‌ها گردید. در گیاه آرابیدوپسیس استفاده از غلظت ۰/۰۵-۰/۰۳ درصد سورفکتانت Silwet L-77 باعث نکروز و خشکیدگی محور گل‌آذین، ۲۴ ساعت پس از تلقیح شد. از این رو، در تکرارهای بعدی برای غوطه‌وری گل‌های آرابیدوپسیس، غلظت سورفکتانت به ۰/۰۲ درصد کاهش داده شد. کلیه گیاهان پس از تیمار با آگروباکتریوم به استثنای موارد ذکر شده فوق به رشد و نمو خود در شرایط گلخانه ادامه داده و دوره رشد و نمو خود را با رسیدگی بذرها به پایان رساندند.

گزینش بذرهای گیاهان تلقیح شده و پرورش گیاهان تراریخته احتمالی

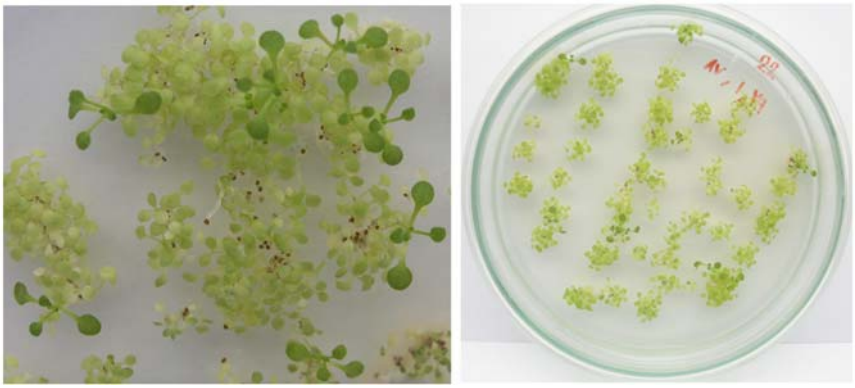
آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان یک ترکیب مهارکننده سیستم ترجمه در سلول، با اثر بر بافت‌های سبز گیاه و همچنین اثر بر ریشه باعث اختلال در رشد آن می‌شود. اکثر گیاهان کم و بیش نسبت به کانامایسین حساس بوده و به آن واکنش نشان می‌دهند. این آنتی‌بیوتیک عموما باعث نکروزه شدن برگ‌ها و جلوگیری از گسترش و نمو ریشه‌ها شده و در مراحل پیشرفته باعث مرگ گیاه می‌شود. این در حالی است که بیان ژن نشانگر گزینشگر نئومایسین‌فسفوترانسفراز در گیاهان تراریخته، اثرات کانامایسین را خنثی کرده و این گیاهان قادر به رشد در محیط انتخابی خواهند بود.

غلظت موثره کانامایسین برای گیاهان مختلف متفاوت است، به گونه‌ای که غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر برای آرابیدوپسیس، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای کرفس و جعفری، غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای شوید و گشنیز و غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای رازیانه و هویج در نظر گرفته شدند. بسته به گونه گیاه، یک تا چهار هفته پس از جوانه‌زنی بذرها در سطح محیط کشت گزینش، اثرات کانامایسین به صورت عدم ریشه‌زایی یا ریشه‌زایی اندک، زردی برگ‌ها و رشد کاهش یافته در گیاهچه‌ها مشاهده گردید. در این بین گیاهچه‌هایی که تحت تاثیر کانامایسین قرار نگرفته بودند، به عنوان گیاهچه‌های تراریخته احتمالی انتخاب شدند. بافت‌های برگ و ساقه در این گیاهان، سبزی و شادابی خود را حفظ کرده و ریشه از گسترش مناسبی در محیط کشت حاوی کانامایسین برخوردار بود (شکل ۳ و ۴).

برای هر یک از گیاهان شوید، رازیانه، گشنیز، جعفری، هویج و آرابیدوپسیس، به ترتیب ۳۰۰۰ ، ۳۰۰۰ ، ۲۰۰۰ ، ۶۰۰ ، ۲۵۰۰ و ۷۰۰ عدد بذر در محیط گزینشگر کشت شده و تعداد ۱۸ گیاه شوید، ۲۴ گیاه رازیانه، ۱۲ گیاه گشنیز، ۱۴ گیاه هویج به محیط خاک گلدان منتقل شدند. تعداد ۳۸ گیاهچه آرابیدوپسیس نیز انتخاب شدند که تعدادی از آنها بطور مستقیم جهت آزمایش هیستوشیمیایی GUS مورد استفاده قرار گرفتند و تعدادی نیز به محیط خاک گلدان منتقل شدند. از مجموع بذرهای جعفری کشت شده در محیط گزینش، گیاهی که از استعداد انتقال به خاک برخوردار باشد، بدست نیامد. کلیه گیاهچه‌های منتقل شده، در محیط خاک تثبیت شده و به رشد خود ادامه دادند.



شکل ۳- گزینش بذرهای حاصل از گیاهان گشنیز، شوید، رازیانه و کرفس با آگروباکتریوم حامل ناقل pBI121 (جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت گزینش در مقایسه با محیط کشت شاهد نشان داده شده است)



شکل ٤- گزینش بذرهای حاصل از گیاهان آرابیدوپسیس تلقیح شده با آگروباکتریوم حامل ناقل pBI121. (گیاهچه‌های تراریخته در حال رشد اندام‌های هوایی و توسعه ریشه در بین گیاهچه‌های غیرتراریخته که رشد آنها متوقف شده است، مشهود می‌باشند.)

به دلیل نیاز دمایی متفاوت بذرهای کرفس برای جوانه‌زنی، ظروف کشت محتوی بذرهای این گیاه در دمای کمتر از ۱۸ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. از مجموع ۸۰۰ بذر بدست آمده از دو گیاه کرفس که از سورفکتانت Tween 20 در محلول تلقیح آنها استفاده شده بود، نزدیک به ۵۰ درصد آنها جوانه زدند که فقط یکی از گیاهچه‌های حاصل موفق به اندکی رشد ریشه در محیط گزینشگر شد. از مجموع ۶۰۰ عدد بذر بدست آمده از سه گیاه کرفس که از سورفکتانت Silwet-L77 در محلول تلقیح باکتری آنها استفاده شده بود، نیز تقریبا ۵۰ درصد آنها جوانه زدند که در این بین، تعداد هفت گیاهچه بطور بارز قابلیت ایجاد ساختار ریشه و نفوذ آن در محیط کشت گزینش را نشان دادند (شکل ۵).

از سه سویه باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش، تنها سویه نوپالینی C58C1 باعث انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت در آرابیدوپسیس گردید. همچنین تنها گیاهچه تراریخت کرفس نیز با استفاده از این سویه باکتری بدست آمد.

به دلیل مشاهده روند کند رشد این گیاهان در محیط گزینش، این گیاهچه‌ها از شرایط محیط گزینش خارج شده و به ظروف کشت حاوی محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک منتقل شدند.

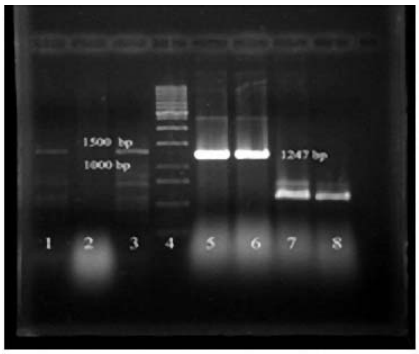
تائید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته

قطعاتی از کلیه گیاهچه‌های گونه‌های چتریان و همچنین گیاهچه‌های آرابیدوپسیس انتخاب شده در محیط گزینش تحت آزمایش هیستوشیمیایی برای توسعه رنگ آبی ناشی از بیان ژن گزارشگر بتاگلوکرونیداز قرار گرفتند. پس از رنگ‌بری کلروفیل، توسعه رنگ آبی به وضوح در ۲۷ نمونه از تعداد ۳۸ گیاهچه آرابیدوپسیس آزمایش شده مشاهده گردید که مبین نرخ انتقال ژن ۳/۸ برای این گیاه می‌باشد (شکل ۶). با این حال، هیچ یک از نمونه‌های مربوط به گیاهچه‌های هویج، گشنیز، شوید، رازیانه و کرفس از نظر بیان ژن گزارشگر GUS مثبت نبودند که مبین عدم موفقیت روش غوطه‌وری گل برای تراریزش این گونه‌های گیاهی بود.

شکل ۵- گزینش بذرهای کرفس در محیط کشت گزینش. الف) عدم قابلیت گیاهچه‌های غیرتراریخته برای ریشه‌زایی، ب) تشکیل ساختار ریشه در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

جهت تائید نتایج بدست آمده از آزمایش هیستوشیمیایی GUS، آزمایشات PCR به منظور ردیابی حضور ژن گزارشگر *gus* و همچنین ژن نشانگر گزینشگر *npt*II در گیاهچه‌های مورد نظر انجام شد. در واکنش‌های PCR بر روی نمونه‌های DNAی ژنومی از گیاهان آرابیدوپسیسی که در آزمایش GUS مثبت شده بودند، تکثیر قطعات منطبق بر اندازه مورد انتظار ۱۲۴۸ bp و ۵۲۲ bp به ترتیب برای ژن‌های *gus* و *npt*II مشاهده گردیدند. واکنش‌های PCR با استفاده از نمونه‌های DNAی ژنومی گیاهچه‌های چتریان، جز در یک مورد با نتیجه منفی همراه شدند که مبین تائید نتایج آزمایش هیستوشیمیایی مبنی بر غیرتراریخته بودن آنها بود. در یک مورد از گیاهچه‌های کرفس گزینش شده، فقط قطعه منطبق بر اندازه مورد انتظار ۵۲۲ bp مربوط به ژن *npt*II تکثیر گردید که مبین انتقال ناقص T-DNA پلاسمید در محدوده ژن نشانگر گزینشگر به این گیاه بود (شکل ۷).

شکل ٦- توسعه رنگ آبی در اندام‌های مختلف گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته پس از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS



شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تایید حضور ژن *gus* در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته (چاهک‌های ۱، ۳ و ٦: قطعه تکثیر شده منطبق بر اندازه مورد انتظار (۱۲٤۸ bp) مربوط به ژن *gus* با غلظت‌های مختلف از نمونه‌های DNA گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته، چاهک ۲: گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی)، چاهک ٤: سایز مارکر 1 kb DNA Ladder، چاهک ۵: پلاسمید pBI121 (کنترل مثبت)، چاهک‌های ۷ و ۸: قطعه تکثیر شده منطبق بر اندازه مورد انتظار (۵۲۲ bp) مربوط به ژن *npt*II به ترتیب با استفاده از نمونه DNA گیاهچه آرابیدوپسیس و کرفس تراریخته).

در این تحقیق سعی شد که با اعمال تیمارهای مختلف آزمایشی و استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم تومفاشینس، ژن گزارشگر *gus* به گیاهان مختلف خانواده چتریان منتقل شود. پس از گزینش تعداد زیادی بذر بدست آمده از روش غوطه‌وری گل، اگرچه تعدادی گیاه گزینش شد، ولی حضور ترانسژن مورد نظر در هیچ یک از این گیاهان (بجز یک گیاه کرفس) تایید نگردید. عبور موفق تعدادی از گیاهان غیرتراریخته از مرحله گزینش بذر را می‌توان به نوعی فرار آنها از شرایط گزینش به دلیل پتانسیل ذاتی تحمل تنش آنتی‌بیوتیک و یا رشد ریشه در سطح محیط کشت یا در حد فاصل محیط کشت و جداره ویال کشت دانست. البته به این نکته نیز بایستی توجه نمود که برای گزینش بذرهای هر یک از این گونه‌های گیاهی، از غلظت حداکثر ۹۰ درصد کشندگی کانامایسین استفاده شده بود که بطور طبیعی امکان زنده‌مانی ۱۰ درصد از یک جمعیت گیاه شاهد را در شرایط محیط گزینش فراهم می‌نماید. استفاده از دز زیرکشندگی عامل گزینشگر در محیط کشت‌های گزینش مواد گیاهی تراریخته از این جهت حائز اهمیت است که امکان انتخاب آن دسته از مواد گیاهی تراریخته که سطح بیان ترانسژن نشانگر گزینشگر در آنها پائین است، نیز فراهم شود. از این رو، می‌توان ادعا کرد که روش غوطه‌وری گل برای گیاهان شوید، رازیانه، گشنیز، هویج و جعفری کارایی نداشته است. این عدم کارایی را از جهات مختلف می‌توان مورد بررسی قرار داد.

روش انتقال ژن غوطه‌وری گل، اولین بار در گیاه آرابیدوپسیس به عنوان یک گیاه از خانواده *Cruciferae* معرفی گردید. در این تحقیق از گیاه آرابیدوپسیس به عنوان گیاه شاهد جهت بررسی صحت و کارایی روش آزمایشی استفاده شد و متوسط نرخ انتقال ژن در مورد آن حدودا ۳/۸ درصد بود. این مقدار، نسبت به سطح ۴ – ۰/۸ درصد گزارش شده در مقالات مرتبط، بسیار مطلوب می‌باشد (۶). دستیابی به این نرخ انتقال ژن در گیاه آرابیدوپسیس نتیجه کنترل دقیق شرایط آزمایشی نظیر دما، رطوبت و نوع سورفکتانت می‌باشد (۴ و ۷). در این تحقیق پس از چند دوره تلقیح و آزمایش سطوح مختلف سورفکتانت، از ترکیب ۰/۰۲ درصد سورفکتانت Silwet L77 در سوسپانسیون تلقیح استفاده شد. به نظر می‌رسد کارایی روش غوطه‌وری گل منحصر به گیاهان خانواده *Cruciferae* باشد، زیرا دو گیاه کلزا و تربچه نیز که این روش انتقال ژن در آنها موفق بوده است از خانواده آرابیدوپسیس می‌باشند (۷ و ۱۰). محققان خصوصیات گل‌دهی و فرایند نمو گل را در این امر بسیار مهم می‌دانند.

در این روش انتقال ژن به گیاه، تخمک بارور نشده گل‌های تیمار شده را قبل از باروری تراریخته می‌نماید. از این رو، باز بودن گل‌ها و در دسترس بودن تخمک در هنگام تلقیح باکتری نقش غیر قابل انکاری در موفقیت این روش دارد. نگاهی به ساختار گل در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که مادگی این گیاه کوزه‌مانند بوده و در طول دو هفته نمو پیدا می‌کند و تا زمانی که کلاله، مادگی را مسدود کند، زمان نسبتا زیادی طول می‌کشد و همین امر فرصت خوبی را در اختیار آگروباکتریوم قرار می‌دهد تا بتواند وارد تخمدان شده و به تخمک دسترسی پیدا کند. از طرفی چون در این روش آگروباکتریوم ژن را به تخمک منتقل می‌نماید، تعداد تخمک‌های موجود در تخمدان گل‌های گیاه می‌تواند به عنوان یک عامل اثرگذار در تعیین کارایی تراریزش مطرح باشد (۸). در مورد گیاهان خانواده چتریان که مد نظر این تحقیق بودند، تعداد گل‌ها نسبتا زیاد است که این امر یک فاکتور مثبت در استفاده از این روش می‌باشد. لیکن، شاید مهمترین دلیل عدم موفقیت روش مذکور در این گیاهان نیز ساختار متفاوت گل آنها باشد. تمایز سریع گل، عدم شکل کوزه مانند، فشرده بودن گلبرگ و کاسبرگ، وجود پوشش بر روی تخمک و همچنین تعداد کم تخمکی که در هر تخمدان به بذر تبدیل می‌شوند (۱ و ۲)، همگی از عوامل مهم و تاثیرگذار در عدم موفقیت این روش در گیاهان مورد آزمایش می‌باشند.

در بین گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق، گیاه کرفس به عنوان تنها گیاهی شناخته شد که تولید گیاهچه تراریخته در آن محقق گردید. با این وجود، احتمالا تنها گیاهچه تراریخته بدست آمده بخش محدودی از T-DNA آگروباکتریوم را دریافت نموده باشد. به نظر می‌رسد که نوع سورفکتانت مورد استفاده در محلول تلقیح، به عنوان یک عامل تکنیکی نقش بسزایی در تراریزش گیاه کرفس نیز داشته باشد. در بین بذرهای گیاهان کرفسی که از سورفکتانت Tween 20 در محلول تلقیح آنها استفاده شده بود، هیچ گیاهچه تراریخته‌ای بدست نیامد. این در حالی بود که با استفاده از سورفکتانت Silwet L-77، یک گیاهچه تراریخته بدست آمد. اهمیت و تاثیرگذاری نوع سورفکتانت مورد استفاده به عنوان یک عامل کلیدی در موفقیت روش غوطه‌وری گل در گیاهان دیگر شامل آرابیدوپسیس و تربچه نیز قبلا مورد تاکید قرار گرفته بود. ماده سورفکتانت با کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی محلول باعث چسبیدن و رسوخ سوسپانسیون باکتریایی در منافذ گل گیاهان می‌شود (۶ و ۷). لازم به ذکر است که نرخ تراریزش بدست آمده برای کرفس در این تحقیق در مقایسه با گزارش‌های موجود در مورد گیاهانی نظیر آرابیدوپسیس و تربچه بسیار اندک است. با این حال، در این تحقیق برای اولین بار مشخص شد که می‌توان گیاه کرفس را با استفاده از روش غوطه‌وری گل تراریخته کرد. این نتیجه اولیه، با توجه به محدودیت‌ها و مشکلات موجود برای تراریزش گیاه کرفس و ارزش‌های فراوانی که این گیاه به عنوان یک سبزی سالادی می‌تواند در عرصه زراعت مولکولی در گیاهان داشته باشد، بسیار حائز اهمیت است. بدیهی است که می‌توان با بهینه‌سازی روش آزمایشی، کارایی این روش را در کرفس افزایش داد و روش

غوطه‌وری گل را در این گیاه تثبیت و معرفی نمود. بدین منظور بایستی روش آزمایشی با ایجاد شرایط مناسب برای گل‌دهی مطلوب گیاهان مورد آزمایش، استفاده از واریته‌های مختلف کرفس، و بکارگیری غلظت‌های مختلف سورفکتانت Silwet L-77 بهینه‌سازی شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به انجام رسید.

منابع

۱- سعیدی ح.ا. ۱۳۸۲. سیستماتیک گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان، اصفهان.

۲- مظفریان و.۱۳۸۳، رده بندی گیاهی جلد دوم، انتشارات امیر کبیر تهران، تهران.

3- Bechtold N., Ellis, J. and Pelletier G. 1993. In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris. 316:1194-1199.

4- Bent A.F. 2000. Arabidopsis in planta transformation: uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. Plant Physiology, 124: 1540-1547.

5- Chen P.Y., Wang C.K., Soong, S.C. and To K.Y. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding, 11: 287-293.

6- Clough S.J. and Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 16: 735-743.

7- Curtis I.S. and Nam H.G. 2001. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral dip method, plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. Transgenic Research, 10: 363-371.

8- Desfeux C., Clough, S.J. and Bent A.F. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium* mediated transformation by the *Arabidopsis* floral dip method. Plant Physiology, 123: 895-904.

9- Kojima M., Shioiri H., Nogawa M., Nozue M., Matsumoto D., Wada A., Saiki, Y., and Kiguchi K. 2004. In planta transformation of Kenaf plants (*Hibiscus cannabinus*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Bioscience and Bioengineering Journal. 98(2): 136-139.

10- Liu F., Cao M.Q., Yao L., Li Y., Robaglia, C. and Tourneur C. 1998. In planta transformation of packoli (*Brassica campestris* L. spp. *Chinensis*) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium*. Acta Horticultura, 467: 187-192.

11- Phillips R.L., Kaeppler, S.M. and Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91: 5222-5226.