

انتقال ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی به کمک *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه گلرنگ

جواد معتمدی^۱، علیرضا زبرجدی^{۲*}، دانیال کهریزی^۳، علی هاتف سلمانیان^۴

۱، ۲ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیاران دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

۴- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zebarjadiali@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۴- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

گیاهان روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می شوند. گیاه گلرنگ به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب، در سال- های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. به منظور بررسی امکان انتقال ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی با واسطه *Agrobacterium tumefaciens* به گلرنگ که برای اولین بار در کشور و جهان گزارش شده است، پس از بهینه سازی کشت بافت و انتخاب بهترین ترکیب هورمونی و بهترین ریزنمونه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، انجام گرفت. در این آزمایش، کارآیی و فراوانی تراریختگی ارقام Dincer و سینا با سویه های GV3101 و LBA4404 آگروباکتریوم در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کاناماسین مورد ارزیابی گرفت و در نهایت به منظور تأیید تراریختگی گیاهان باززا شده، آنالیزهای PCR با آغازگرهای اختصاصی روی گیاهان انتخابی انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بسیار معنی- داری بین ارقام و سویه های آگروباکتریوم وجود دارد اما اثر متقابل بین این دو عامل از نظر آماری معنی دار نبود. تجزیه آماری نشان داد که بالاترین درصد باززایی گیاهچه های تراریخته در محیط انتخابی حاوی کاناماسین مربوط به رقم Dincer و سویه LBA4404 به میزان ۲۰/۶۱ درصد بوده در حالی که تجزیه PCR گیاهان تراریخته فراوانی تراریختگی در رقم Dincer را ۱۰ درصد نشان داد. در تجزیه PCR برای رقم سینا، هیچ باندهایی مبنی بر وجود ژن جهش یافته *aroA* (EPSPS) مشاهده نگردید. به علاوه، تکثیر قطعه ۱۳۰۰ bp (حاصل از آغازگرهای EPS1 و EPS2) نشان دهنده حضور این ژن در گیاهان تراریخته رقم Dincer می باشد.

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم،
تراریختگی،
ژن جهش یافته باکتریایی *aroA*
گلرنگ.

مقدمه

گیاهان روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می شوند و از اهمیت اقتصادی زیادی نیز در کشاورزی برخوردار می باشند و بیشترین روغن خوراکی بشر را تامین می کنند (ERS 2001). در بین دانه های روغنی موجود، گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع تک زنجیره و چند زنجیره، مورد توجه قرار گرفته است (Singh and Nimbkar 2006).

ژن *aroA*³ کد می‌شود. برای استفاده از این سم در کنترل علف‌های هرز باید گیاهان زراعی را تا حد امکان نسبت به این علف‌کش مقاوم ساخت. برای دستیابی به این هدف از سه روش یا تلفیقی از آن‌ها می‌توان استفاده کرد که شامل وارد نمودن نسخه‌ای دیگر از ژن *ARO*A به گیاه و بالابردن غلظت آنزیم مذکور (Kishore and Shah 1988)، وارد نمودن ژنی که محصول آن باعث تجزیه گلایفوسیت شود (مانند ژن *gox*⁴) (Barry et al. 1992) و وارد کردن ژن کدکننده آنزیم هدف با میل ترکیبی پایین با علف‌کش گلایفوسیت به گیاه. استفاده از روش سوم یعنی جهش‌زایی نقطه‌ای برای اولین بار در گیاه توتون گزارش شده است (Comai et al. 1985). کاربرد این روش در کلزا (Kahrizi et al. 2007; Kahrizi and Salmanian 2008) نیز گزارش شده است. در رابطه با استفاده از سیستم انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم به گیاه گلرنگ گزارش‌های اندکی وجود دارد. اولین مطالعه در خصوص تراریختگی گلرنگ با واسطه *A. tumefaciens* توسط Ying et al. (1992)، در رقم آمریکایی "Centennial" گزارش شد. آن‌ها با استفاده از سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 و ژن گزارشگر *gus* و ژن *nptII* اقدام به تراریخته کردن این رقم کردند. فعالیت ژن *gus* در نیمی از کالوس‌های مقاوم به کانامایسین مشاهده شد. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های باززا شده از کالوس‌های تراریخته مشتق شده از برگ، فراوانی در حدود ۱۵ درصد داشته‌اند. Orlikowska et al. 1995، تاثیر سویه‌های آگروباکتریوم (p35GUSInt و LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121)، نوع آنتی‌بیوتیک، عامل انتخابی و هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد را روی باززایی و کارایی تراریختگی گلرنگ بررسی کردند. نتایج شمارش تراریخته‌های بیان‌کننده آنزیم بتا گلوکورونیداز نشان داد که سویه EHA105/ p35GUSInt بسیار موثرتر از سویه LBA4404/pBI121 عمل کرده است. در مطالعات دیگر، انتقال ژن به ارقام هندی گلرنگ ("A₁" و "A₃₀₀") با واسطه *A. tumefaciens* مورد آزمایش قرار گرفته است (Sankara Rao 1999; Rohini and Sankara Rao 2000) و نتایج

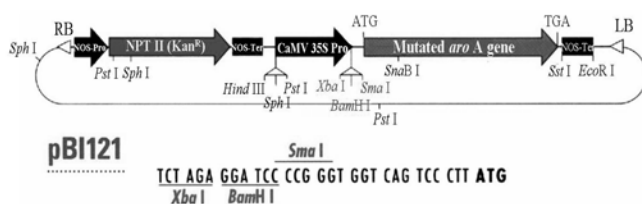
از این رو، اصلاح این گیاه (خصوصاً از نظر مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی)، سبب توسعه کشت آن خواهد شد (Sujatha 2002). روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در بهبود گیاهان زراعی و باغی به منظور تولید گیاهان تراریخته با توانایی بیان ژن‌های خارجی برای ایجاد مقاومت به عواملی مانند ویروس‌ها، حشرات، علف‌کش‌ها، عوامل فساد بعد از برداشت و افزایش فرآورده‌های ذخیره‌ای به کار گرفته شده است (Hooykaas and Schilperoort 1992). از این رو بهینه‌شدن سیستم کشت بافت این گیاهان و انتقال ژن و ایجاد گیاهان زراعی با خصوصیات جدید ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی امری ضروری است (Cheng et al. 2001). علف‌های هرز یکی از مهم‌ترین عوامل بر هم زننده تعادل غذایی برای گیاهان زراعی و تامین غذای جمعیت جهان به شمار می‌آیند (Carlisle and Trevors 1988). با توجه به نگرانی‌های زیست محیطی به علت کاربرد علف‌کش‌های شیمیایی در کشاورزی و همچنین مقاوم شدن علف‌های هرز نسبت به این علف‌کش‌ها، ابداع روش‌هایی برای رفع این مشکلات ضروری است. در این راستا، علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک برای القاء مقاومت به علف‌کش‌ها در گیاهان مختلف، توجه محققان را به خود جلب کرده است (Schulz et al. 1990). گلایفوسیت یا N-فسفونومتیل گلایسین علف‌کشی وسیع الطیف و غیرانتخابی است که به آسانی در خاک به اجزاء غیر سمی تجزیه شده و پس از استفاده سریعاً در خاک جذب می‌شود، از این رو اثرات سوء زیست محیطی کمتری به دنبال دارد (Schuette 1998). متابولیسم کربوهیدرات‌ها و بیوستز ترکیبات حلقوی در گیاهان، برخی از قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها توسط مسیر شیکیمات¹ به هم مرتبط می‌شوند. ششمین آنزیم در این مسیر یعنی EPSPS² (آنزیم کلیدی در این مسیر) هدف اصلی علف‌کش گلایفوسیت می‌باشد. این علف‌کش با اتصال به کمپلکس EPSPS-S3P، منجر به غیرفعال شدن آن می‌گردد (Herrmann 1995). لازم به ذکر است که آنزیم EPSPS توسط

³ Aromatic acid⁴ Glyphosate oxide reductase¹ Shikimate pathway² 5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase

کنترل پیشبر 35S CaMV و خاتمه دهنده NOS قرار گرفته است (شکل ۱). در واقع، پلاسمید pBI121 به عنوان ناقل بیانی گیاهی مورد استفاده قرار گرفت و به منظور بیان قطعات کلون شده در گیاه استفاده شد. منشاء این ژن از باکتری *E. coli* (K12)، بوده که اسیدهای آمینه آلانین شماره ۱۸۳ و گلايسین شماره ۹۶ به ترتیب جهت کاهش میل ترکیبی گلايفوسیت تغییر یافته‌اند (Kahrizi et al. 2007). این ژن ۱۲۸۴ جفت باز طول داشته که اطلاعات مربوط به آن در بانک ژن با آدرس (www.ncbi.nlm.nih.gov) و شماره دسترسی X00557 موجود است. از آگروباکتریوم‌های دارای ناقل pBI121 که حاوی ژن جهش یافته *aroA* باکتریابی بودند، کشت شبانه در محیط LB مایع دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در دمای ۲۸ °C بر روی شیکر ۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. زمانی که تعداد سلول‌های باکتری در حدود $10^9 \times 1/2$ سلول در هر سانتی‌متر مکعب محیط کشت ($OD_{600}=1$)، جهت تراریختی استفاده شد.

جدول ۱- سویه‌های آگروباکتریوم مورد استفاده جهت تراریختی گیاه گلرنگ

منبع	مقاومت به آنتی‌بیوتیک	سویه
Hoekema et al., 1983	استرپتومایسین	LBA4404
Koncz and Schell, 1986	ریفامپیسین	C58(pGV3101)



شکل ۱- پلاسمید pBI121 حاوی ژن جهش یافته *aroA* (Kahrizi 2005).

تیمارها، عملیات تراریختگی، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور در ۳ تکرار اجرا شد. ارقام گلرنگ (Dincer و سینا) به عنوان فاکتور اول و سویه‌های آگروباکتریوم (LBA4404 و GV3101) حامل ژن جهش یافته *aroA* باکتریابی به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند.

نشان داد که از ۱۰۰ ریز نمونه باززا شده به طور مستقیم و غیرمستقیم (از کالوس)، ۲۳ تا ۳۴ گیاه تراریخته حاصل گردیده است (Sankara Rao and Rohini 1999). فراوانی تراریختگی در رقم "A₁"، ۵/۳ و در رقم "A₃₀₀"، ۳ درصد گزارش گردید. آنالیز PCR هر دو ژن *udi A* و *npt II* نشان داد که کارایی تراریختگی در رقم "A₁" بیشتر از "A₃₀₀" است (Rohini and Sankara Rao 2000). در ایران، اولین گزارش در مورد انتقال-سازه دستورزی شده آنزیم EPSPS به گیاه روغنی کلزا به منظور ایجاد مقاومت به علف‌کش گلايفوسیت گزارش شده است (Kahrizi 2005). ایشان در این تحقیق از باکتری *A. tumefaciens* برای انتقال سازه فوق استفاده کرده و با آنالیزهای مولکولی حضور ژن در پلاسمید، با آزمون PCR حضور ژن، با آزمون لکه‌گذاری سادرن تعداد نسخه‌ها و با تیمار علف‌کش میزان لکه‌گذاری را در گیاه اثبات کرد. در این مطالعه، برای کاهش میل ترکیبی گلايفوسیت با این آنزیم دستورزی لازم روی ژن انجام شد. نتایج نشان داد که به کارگیری ژن‌های جهش یافته کدکننده آنزیم EPSPS باکتریابی در کلزا، باعث ایجاد گیاهان نسبتاً مقاوم به گلايفوسیت می‌شود. با توجه به این که هیچ‌گونه گزارشی در خصوص تراریختگی ارقام گلرنگ در ایران منتشر نشده است، از این رو برای اولین بار در این تحقیق پس از بهینه‌شدن سیستم کشت بافت، به مقایسه دو رقم از گیاه گلرنگ نسبت به باززایی و انتقال ژن جهش یافته *aroA* باکتریابی و همچنین مقایسه دو نژاد *A. tumefaciens* (GV3101 و LBA4404) در خصوص توانایی انتقال ژن جهش یافته *aroA* باکتریابی به گیاه گلرنگ پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سازه پلاسمید و باکتری مورد استفاده در این تحقیق از دو رقم گلرنگ، "Dincer" با عملکرد بالا و بومی کشور ترکیه و رقم اصلاح شده "سینا" استفاده شد. برای انتقال سازه ژنی به گلرنگ از سویه‌های *A. tumefaciens* طبق جدول ۱ استفاده شد. سازه ژنی در پلاسمید pBI121 همسانه شده است. در این سازه به جای ژن *gus* در پلاسمید pBI121، ژن جهش یافته *aroA* باکتریابی (کدکننده آنزیم EPSPS) تحت

عملیات تراریختگی

در این آزمایش، پس از بدست آمدن محیط بهینه برای باززایی گیاهچه‌ها یعنی ترکیب (BAP ۲ و NAA ۰/۱) میلی‌گرم در لیتر و همچنین بهترین ریزنمونه (کوتیلدون) (داده‌ها نشان داده نشدند)، مراحل انتقال ژن روی این محیط و ریزنمونه انجام گرفت. جهت آلوده سازی ریزنمونه‌های کوتیلدون هر دو رقم، مقداری از سوسپانسیون هر دو سویه باکتری ($OD_{600}=1$)، را در زیر هود لامینار در دو پتری دیش استریل جداگانه ریخته و برگ‌های کوتیلدونی استریل را پس از برش و ایجاد زخم به مدت ۱-۲ دقیقه در سوسپانسیون‌ها نگه داشته و سپس روی کاغذهای صافی استریل گذاشته تا باکتری‌های آغشته شده به آن خشک شوند. در مرحله بعد، کوتیلدون‌ها به محیط کشت بهینه باززایی MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند. کوتیلدون‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این محیط (محیط هم‌کشتی^۱) نگه داشته شدند تا اگر باکتریوم بتواند در این فاصله زمانی T-DNA خود را به گیاه منتقل کند. در مرحله بعد، ریز نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفاتوکسیم و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین (Rohini and Sankara Rao 2000; Ying et al. 1992) منتقل شدند که آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی پلاسمید pBI121 و جهت انتخاب گیاهچه‌های تراریخته و سفاتوکسیم به منظور حذف آگروباکتریوم به کار برده شد (Zebarjadi 2005). ریزنمونه‌ها هر ۱۵ روز یکبار به محیط مشابه واگشت شدند. برخی از ریزنمونه‌ها روی محیط انتخابی به گیاهچه‌های سبز باززا شدند که تعداد آن‌ها یادداشت گردید. برای افزایش تعداد گیاهچه‌ها و متعاقب آن گیاهچه‌های تراریخته، مراحل فوق چندین بار تکرار گردید. فراوانی تراریختگی (عبارت از تعداد گیاهچه باززایی شده سبز بر روی محیط گزینش‌گر به تعداد ریزنمونه کشت شده) یادداشت شد. بررسی‌های ژنومیک جهت بررسی گیاهان تراریخته و اثبات حضور ژن مورد نظر از آزمون PCR، با آغازگرهای اختصاصی معرفی شده توسط (Kahrizi et al. 2007) استفاده شد. آغازگرهای EPS1 و EPS2 با توالی‌های زیر برای تکثیر ژن

جهش یافته *aroA* باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. انتظار می‌رود که این آغازگرها سبب تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۳۰۰ جفت باز شوند.

5'-CGG,GAT,CCA,TGG,AAT,CCC,TGA,CGT,TAC,AA-3'
Tm= 68.2 °C, 29 mer: EPS1F

3'-GCG,GAT,CCT,CAG,GCT,GCC,TGG,CTA,ATC-5'
Tm=71 °C, 27 mer: EPS2R

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گلرنگ به روش^۲ CTAB انجام شد و برای استخراج پلاسمیدها از کلنی سویه‌های باکتری *A. tumefaciens* (LBA4404 و GV3101)، از روش لیز قلیایی در مقیاس کم^۳ استفاده گردید (Zebarjadi 2005). برای تعیین کمی و کیفی DNA از اسپکتوفتومتر استفاده شد. محصولات پی‌سی‌آر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام گرفت و قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسات میانگین از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری (جدول ۲) و مقایسه میانگین برای صفت باززایی گیاهچه‌های سبز (درصد تراریختگی) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین ارقام و سویه‌های آگروباکتریوم وجود دارد. همچنین، اثر متقابل بین این دو عامل غیر معنی‌دار شده است که مستقل بودن ارقام و سویه‌ها در پاسخ به باززایی گیاهچه‌های تراریخته را آشکار می‌سازد. در خصوص مقایسه میانگین‌ها، رقم Dincer در سویه LBA4404 با میانگین ۲۰/۶۱، بالاترین فراوانی تراریختگی را داشته است (شکل ۲). به عبارتی دیگر در این آزمایش، سویه LBA4404 توانایی بیشتری نسبت به سویه GV3101 جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی گلرنگ داشته است. از طرفی پایین‌ترین درصد باززایی گیاهچه‌های تراریخته در رقم سینا و سویه GV3101 به میزان ۸/۶۱ درصد مشاهده شد.

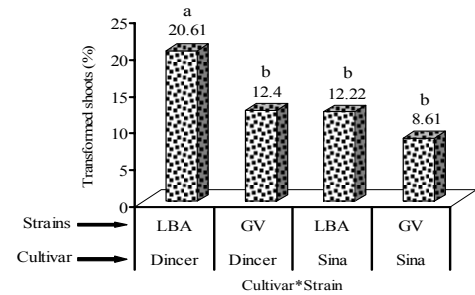
² N,N,N, Cethyltrimethylammonium Bromide

³ Mini prepration

¹ Co-cultivation medium

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس برای صفت باززایی گیاهچه‌های تراریخته

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
فاکتور A (رقم)	۱	۱۵۰/۸۷۵ **
فاکتور B (سویه‌های آگروباکتریوم)	۱	۱۴۳/۰۳۷ **
AB	۱	۳۲/۷۰۳ ns
اشتباه آزمایشی	۸	۱۱/۲۱۶
ضریب تغییرات (% CV)		۱۵/۶۷



شکل ۲- میزان باززایی گیاهچه‌های تراریخته ارقام گلرنگ در پاسخ به سویه‌های آگروباکتریوم.

رشد گیاهچه‌ها روی محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین می‌تواند تایید اولیه‌ای بر تراریخته بودن آن‌ها باشد (شکل ۳- الف، ب، پ و ت). با وجود این، به‌منظور اطمینان از تراریختگی گیاهچه‌های باززا شده، تجزیه PCR با آغازگرهای اختصاصی برای ژن جهش یافته *aroA* روی گیاهان مثبت حاصل از محیط انتخابی کانامایسین انجام شد (جدول ۳). با توجه به جدول ۳، پس از آنالیز PCR، فراوانی تراریختگی در رقم Dincer، ۱۰ درصد مشاهده گردید. در مورد رقم سینا با این که ۴ گیاه تراریخته احتمالی از محیط انتخابی به دست آمده بود اما در تجزیه PCR هیچ باندهایی مبنی بر وجود ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی مشاهده نگردید که نشان دهنده غیر تراریخته بودن گیاهان مورد آزمون می‌باشد. همچنین، تکثیر قطعه bp

جدول ۳- نمایش شماتیک مراحل تراریختگی در گیاه گلرنگ

ارقام گلرنگ	تعداد کوتیلدون‌های آلوده شده	نسبت گیاهان تراریخته فرضی به دست آمده از محیط انتخابی		تجزیه PCR (<i>aroA</i> جهش یافته)	فراوانی تراریختگی (%)
		GV3101	LBA4404		
Dincer	۹۰	۱۸/۴۵	۶/۴۵	۹/۴۵	۱۰
سینا	۹۰	۲/۴۵	۲/۴۵	.	.

* فراوانی تراریختگی از گیاهانی که تجزیه PCR برای هر دو سویه آگروباکتریوم مثبت شده، محاسبه شد.

۱۳۰۰ (حاصل از آغازگرهای EPS1 و EPS2) نشان دهنده حضور این ژن در گیاهان تراریخت می‌باشد (شکل ۴). همان طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود ظهور باند ۱۳۰۰ جفت بازی در نمونه‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۱۵ در مقایسه با کنترل‌های منفی و مثبت حاکی از تراریختگی آن‌ها با ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی است. عدم ظهور باند در کنترل‌های منفی یعنی آب حاکی از عدم وجود هر گونه آلودگی و در گیاه شاهد حاکی از عدم وجود نسخه‌ای از ژن با توالی ژن جهش- یافته *aroA* در آن می‌باشد. در حالی که ظهور باند با وضوح بیشتر در کنترل مثبت یعنی پلاسمید pBI121 مهندسی شده حاوی EPSPS جهش یافته، تایید کننده اتصال آغازگرها و آزمون PCR است. لازمه هر فرایند تراریختگی موفق، قابلیت باززایی گیاهچه‌ها از سلول‌های منفردی است که DNA خارجی به طور پایدار وارد ژنوم آن شده باشد. نکته قابل توجه در به‌کارگیری ریزنمونه کوتیلدون، وجود مریستم انتهایی در بین برگ‌های اولیه است در صورتی که این بخش کاملاً حذف نگردد، پس از آلوده سازی با آگروباکتریوم و کشت گیاه بر روی محیط‌های کشت جوانه اصلی سریعاً رشد نموده و محقق دچار اشتباه می‌شود. هرچند، این گیاهچه‌های اولیه پس از نگهداری بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین حذف می‌گردند (Zabarjadi 2005). (Radke et al. 1992)، مزیت استفاده از هیپوکوتیل را آسان بودن برش و راحتی تلقیح آن‌ها با سوسپانسیون آگروباکتریوم گزارش نمودند (Radke et al. 1992). تاثیر رقم و پاسخ آن به کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه- های تراریخته و غیر تراریخته در این آزمایش کاملاً مشهود بود.

دو سویه آگروباکتریوم با یکدیگر در کارایی تراریختگی گیاه کلزا، برتری سویه LBA4404 با بیشترین میزان تراریختگی (۲۸/۹۵ درصد) نسبت به سویه GV3101 گزارش شده است (Zabarjadi et al. 2006 Kahrizi et al. 2007). نیز تحقیقی را در خصوص تراریختگی با سویه LBA4404، جهت تغییر ترکیب اسید چرب اروسیک کلزا، انجام دادند. آنان در این تحقیق، فراوانی تراریختگی را حدود ۲۹ درصد در محیط انتخابی حاوی ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین، گزارش کردند (Zabarjadi et al. 2006a). در تحقیقی دیگر، مقایسه سویه‌های LBA4404 و GV3101 آگروباکتریوم در خصوص تراریختگی ۵ رقم کلزا انجام گردید (Zabarjadi et al. 2006b). در این تحقیق، برتری سویه LBA4404 را با میزان تراریختگی ۱۴/۲۶ درصد نسبت به سویه GV3101 (۷/۰۶ درصد) گزارش گردید. با توجه به معنی دار شدن اثر سویه‌های آگروباکتریوم در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، به نظر می‌رسد که علیرغم قدرت بالای بیماری‌زایی که سویه GV3101 در مقایسه با LBA4404 دارا می‌باشد، میزان گیاهان تراریخته و باززایی شده در آن برتری ندارد. علت آن را حذف سلول‌های تراریخته و در نهایت حذف گیاهچه‌های تراریخته در محیط کشت به خاطر قدرت بالای بیماری‌زایی این سویه گزارش کرده‌اند (Kahrizi et al. 2007). به علاوه، معنی دار نشدن اثر متقابل رقم و سویه در تحقیق حاضر، با نتایج به دست آمده توسط این محققان (Zabarjadi et al. 2006b; Kahrizi et al. 2007) مغایرت داشت؛ زیرا آنان اثر متقابل معنی‌داری را بین سویه آگروباکتریوم و ارقام کلزا مشاهده کردند. به نظر می‌رسد که این نتیجه به علت محدودیت ژنوتیپ‌های مورد استفاده باشد. محققان گزارش نمودند که معنی دار شدن اثر متقابل سویه‌های آگروباکتریوم با سایر عوامل به علت تنوعی است که بین سویه‌های *A. tumefaciens* وجود دارد و چنانچه برای انتقال ژن از سویه‌های *A. rhizogenes* استفاده شود ممکن است اثرات متقابل معنی‌دار نشود (Menze and Mollers 1999). سویه‌های *A. tumefaciens* شدیداً وابسته به ژنوتیپ گیاه مورد استفاده هستند ولی در *A. rhizogenes* این وابستگی وجود ندارد (Menze and Mollers 1999; Stefanov et al. 1994).

تاثیر رقم و پاسخ آن به کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه‌های تراریخته و غیرتراریخته در این آزمایش کاملاً مشهود بود. تا سال‌های اخیر، تحقیقات در زمینه کشت بافت گلرنگ تنها روی ارقام خاصی از این گیاه انجام شده است که عمدتاً محدود به ارقامی مانند *Manjira*, *Grina*, *Bhima*, *S-144*, *HUS-305*, *A₁* و *A₃₀₀* بوده که اکثر آن‌ها بومی هندوستان می‌باشند (Singh and Nimbkar 2006). همچنین، مطالعه در زمینه مهندسی ژنتیک و انتقال ژن فقط روی رقم آمریکایی *Centennial* و ارقام هندی *A₁* و *A₃₀₀* به تعداد محدود در مورد ژن‌های گزارش‌گر و گزینش‌گر مانند *GUS* و *NPTII* صورت گرفته است (Singh and Nimbkar, 2006). در این تحقیق از دو سویه *A. tumefaciens* (سویه‌های LBA4404 مقاوم به استرپتومایسین و GV3101 (pGV3101) مقاوم به ریفامپیسین) استفاده شد. نکته قابل توجه این است که این سویه‌ها دارای سرعت رشد و عادت رشدی متفاوت هستند، به طوری که سویه LBA4404 دارای سرعت رشد بالا بوده در حالی که سویه GV3101 (pGV3101) دارای سرعت رشد اولیه کمتری بوده ولی سوسپانسیون سلولی یکنواختی را ایجاد می‌کند (Zabarjadi 2005). با توجه به جدول ۳ و شکل ۲ برتری سویه LBA4404 نسبت به سویه GV3101 در تراریختگی گیاه گلرنگ کاملاً مشهود است. در واقع، این سویه توانایی بیشتری نسبت به سویه GV3101 جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی داشته است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، پس از تجزیه PCR فراوانی تراریختگی در رقم *Dincer*، کاهش در حدود ۷ درصد نشان داده است. کاهش در باززایی گیاهچه‌های تراریخته ممکن است به علت اثرات بازدارنده کانامایسین در محیط انتخابی یا اثرات نامطلوب T-DNA پلاسمید باشد (Ying et al. 1992). این در حالی است که در مطالعه Ying et al. (1992)، فراوانی گیاهچه‌های باززاشده از کالوس‌های تراریخته با سویه LBA4404 حاصل از ریزنمونه برگ در رقم *Centennial* حدود ۱۵ درصد در مقایسه با ۲۶ درصد باززایی از کالوس‌های غیرتراریخته بوده است. در مطالعه ای دیگر، فراوانی تراریختگی با سویه LBA4404 در ریزنمونه‌های گلرنگ ۳۴-۲۳ درصد گزارش شده است (Sankaea Rao and Rohini 1999). همچنین، در مقایسه این

منابع

- Barry G, Kishore G, Padgette S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Re D, Eichholtz D, Fincher K, Hallas L (1992) Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Singh, BK (Ed.) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, 139-145.
- Carlisle SM, Trevors JT (1988) Glyphosate in the environment. Water, Air and Soil Pollution 39:409-420.
- Cheng PK, Lakshmanan P, Swarup S (2001) High frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling Brassica oleracea in in vitro. In Vitro Cell Biology and Development Plant 37:592-598.
- Comai LD, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM (1985) Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature 317:741-744.
- Economic Research Service (ERS) (2001) Oil crops situation and outlook. OCS-2000, ERS, USDA, 66.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7:907-919.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature 303:179-180.
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19:15-38.
- Kahrizi D (2005) Transferring altered construct of EPSPS enzyme to rapeseed (*Brassica napus* L.) to confer glyphosate herbicide and its molecular analysis. Ph.D thesis, Tarbiat Modares University. (In Farsi).
- Kahrizi D, Salmanian AH (2008) Substitution of Ala183Thr in *aroA* product of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) with altered gene confers tolerance to Roundup. Transgenic Plant Journal 2(2):170-175.
- Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Moieni A, Mousavi A (2007) Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Reports 26:95-104.
- Kahrizi D, Salmanian AH, Zebarjadi AR (2007) Effect of plant genotype, explant and *Agrobacterium* strain on transformation efficiency in rapeseed (*Brassica napus* L.). Modern Genetic Journal 2(3):53-63. (In Farsi).
- Kishore GM, Shah DM (1988) Amino acids biosynthesis inhibitors as herbicides. Annual Review Biochemistry 57:627-663.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel types of *Agrobacterium* binary vector. Molecular Genetic Genomics 204:383-396.
- Menze A, Mollers C (1999) Transformation of different Brassica napus cultivars with three different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. New Horizons for an old crop, In: Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.
- Orlikowska TK, Cranston HJ, Dyer WE (1995) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar centennial. Plant Cell Tissue Organ Culture 40(1):85-92.
- Radke SE, Turner JC, Facciotti C (1992) Transformation and regeneration of Brassica rapa using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 11: 499-505.
- Rohini VK, Sankara Rao K (2000) Embryo transformation, a practical approach for realizing transgenic plants of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Annals of Botany 86:1043-1049.
- Sankara Rao K, Rohini VK (1999) Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology 16:201-206.
- Schuette J (1998) Environmental fate of glyphosate, Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, 1-13.
- Schulz A, Wengenmayer F, Goodman HM (1990) Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. CRC Review, Plant Science 9:1-5.
- Singh V and Nimbkar N (2006) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Chapter 6, 167-194.
- Stefanov I, Fekets S, Bogre L, Pauk J, Feher A, Dudits D (1994) Differential activity of the mannopine synthase and CaMV 35S promoters during development of transgenic rapeseed plants. Plant Science 95:175-186.
- Sujatha M (2002) Current status and future prospects of in vitro techniques and biotechnology in safflower breeding. Sesame and safflower Newsletter, 17:92-97.
- Ying M, Dyer WE, Bergman JW (1992) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv. Centennial. Plant Cell Reports 11:581-585.
- Zebarjadi AR (2005) The effect of transferred sense and anti-sense constructs of gene encoding β -ketoacyl CoA synthase on production of erucic acid in rapeseed. Ph.D thesis, Tarbiat Modares University. (In Farsi).
- Zebarjadi AR, Jalali Javaran M, Karimzadeh GH, Moieni A, Mousavi A, Salmanian AH (2006) Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. Iranian Journal of Biotechnology 4 (2):79-87.
- Zebarjadi AR, Jalali Javaran M, Salmanian AH, Karimzadeh GH, Moieni A, Mousavi, A (2006b) Isolation and preparation of anti-sense constructs of FAE gene and its transference to rapeseed. Journal of Agricultural Science 37(2):257-271. (In Farsi).