

تاریخش گیاه گندم با استفاده از تفنگ ژنی به منظور انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز

نگین محمدی زاده^{*}، مسعود توحدی‌فر^۲، بهرام ملکی زنجانی^۳، مطهره محسن پور^۴

۱، ۲، ۴- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیاران، پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج

۳- استادیار دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

تولید گیاه‌چه تاریخته گندم (*Triticum aestivum*) با استفاده از ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز از طریق تفنگ ژنی و پلاسمید pBI121 نوترکیب حاوی ژن انتخابگر نومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشر NOS و ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز بررسی شدند. ریزنمونه‌های جنین نارس ۵ ژنو تپ از ارقام (مغان، آرتا، سایسون و گاسکوئن) و لاین A، پس از جداسازی، بر روی محیط کالوس‌دهی، تولید کالوس جنین‌زا نمودند. کالوس‌های جنین‌زا، با ذرات طلای اندود شده با پلاسمید حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز بمباران شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌دهی انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کاناامایسین و پس از آن جهت تولید شاخه و ریشه به محیط باززایی انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کاناامایسین منتقل شدند. بیشترین درصد تاریخش ۴/۸ درصد، مربوط به لاین A و کمترین آن مربوط بود به ارقام سایسون، گاسکوئن و آرتا که هیچ گیاه تاریخته‌ای در آن‌ها مشاهده نگردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنالیز لکه‌گذاری DNA نشان داد که گیاهان فرضی تاریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نیز نومایسین فسفوترانسفراز را در ژنوم خود دارا هستند.

واژه‌های کلیدی

تفنگ ژنی،
کاناامایسین،
کیتیناز،
گلوکاناز،
گندم تاریخته.

مقدمه

رشد جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه در ۵۰ سال آینده، در حالی اتفاق می‌افتد که هم اکنون سوء تغذیه پدیده‌ای شایع بوده و بالغ بر ۸۰۰ میلیون از مردم دنیا روزانه با گرسنگی و بی‌غذایی روبرو هستند. ۴۰ درصد از زمین‌های دنیا که در حال حاضر برای کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، با تخریب جدی مواجه‌اند و این در حالی است که باید پاسخگوی نیازهای غذایی این جمعیت در حال رشد باشند. از این رو افزایش تولید غلات به‌طور اعم و تولید گندم به‌طور اخص به میزان ۴۰ درصد در ۲۰ سال آینده مورد نیاز خواهد بود (Kole and Timothy 2008). گندم یکی از مهم‌ترین دانه‌های غذایی در ایران و جهان است.

مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیوارهای سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهاست سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند (Dahleen et al. 2001). یک گروه از این ژن‌ها پروتئین‌هایی مانند β -۱ و ۳ گلوکاناز و کیتیناز را رمز می‌کنند (Mackintosh et al. 2007). سوبسترای آنزیم کیتیناز، کیتین است. کیتین عبارت است از یک هموپلیمر خطی از واحدهای N-استیل-دی-گلوکز آمین که با پیوندهای β -۱، β -۴ از دو N-به‌هم متصل هستند. کیتیناز پیوند بین کربن‌های ۱ و ۴ از دو N-استیل گلوکز آمین متوالی در ساختمان کیتین را می‌شکند (Shin et al. 2005). Tohidfar et al. 2008 (al.). مقاومت به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی^۱ (*Verticillium dahliae*) به پنبه منتقل کردند، بررسی نسل سوم گیاهان پنبه تاریخت، بیان پایدار ژن کیتیناز را در ایجاد مقاومت به قارچ نشان داد. آنزیم β -۱ و ۳ گلوکاناز نیز، پیوند پلی‌ساقارید بین کربن‌های ۱ و ۳ در ساختمان گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ را تخریب می‌کند (Leah et al. 1991). در بافت‌های بیمار تجمع کیتینازها به ویژه به موازات تجمع β -۱ و ۳ گلوکانازها انجام می‌گیرد که این امر موجب ایجاد مقاومت افزایشی به قارچ‌ها می‌شود. بررسی‌ها نشان دادند هنگامی که آنزیم کیتیناز همراه با آنزیم β -۱ و ۳ گلوکاناز به کار برده می‌شوند اثر بازدارندگی آن‌ها روی قارچ‌ها بیشتر خواهد بود. آناند و همکاران در سال ۲۰۰۳، لاین‌های گندم تاریختی تولید کردنده که در تعداد محدودی از آن‌ها، بیان همزمان ژن‌های کیتیناز و β -۱ و ۳ گلوکاناز، مقاومت مناسبی را به فوزاریوم، تنها در آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد و در شرایط مزرعه موفقیتی در ایجاد مقاومت به بیماری حاصل نشد (Anand et al. 2003). بنابراین، در صورت وجود این دو آنزیم در گندم، این گیاه قادر خواهد بود مقاومت بهتر و پایداری را در برابر قارچ‌های عامل بیماری زنگ زرد، قهوه‌ای، سیاهک، سفیدک و فوزاریوم حدالامکان در شرایط گلخانه‌ای از خود نشان دهد. بنابراین مهندسی ژن‌های کدکننده کیتیناز به همراه سایر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی در گیاهان، حفاظت آن‌ها را در برابر

سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۲۰-۲۳۰ میلیون هکتار و در ایران در حدود ۶/۶ میلیون هکتار است (Maj 2011). و بیش از ۲۰ درصد کالری و پروتئین را در رژیم غذایی انسان فراهم می‌کند و غذای عمده بیش از ۴۰ کشور جهان می‌باشد که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (Kole and Timothy 2008). در ایران نیز این محصول تامین‌کننده بیشترین نیاز غذایی کشور بوده و روزانه حدود ۴۷ درصد از کالری مصرفی سرانه کشور را تامین می‌نماید (Safikhani 2007). بوته‌های گندم در تمام مراحل رشد و در تمام محیط‌های طبیعی در معرض تنش‌های گوناگون زیستی و غیر زیستی قرار دارند که رشد، عملکرد و تکامل طبیعی آن‌ها را مختل می‌سازد. تنش‌های زیستی شامل آفات و بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، کمبود یا زیاد بود محتوای مواد معدنی خاک، دمای نامناسب هوا و غیره می‌باشند. روش‌های اصلاحی مرسوم به دلیل پیچیده بودن صفات عملکردی گندم، وقت‌گیر بوده و همچنین نتیجه پایداری را به همراه ندارد. از دیگر اشکالات اساسی در اصلاح سنتی، محدودیت‌هایی است که برای انتقال ژن به واسطه ناسازگاری‌ها و تعاویت‌های بین گونه‌ای اتفاق می‌افتد. پیشرفت در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در ورود ژن‌های خارجی مطلوب برای غله بر مشکلات ناسازگاری جنسی و محدودیت‌های بین موجودات نتیجه بخش بوده است. فناوری نوین مهندسی ژنتیک قادر است نه تنها ورود یک ژن، بلکه چندین ژن را با روشی دقیق، قابل کنترل و قابل پیش‌بینی تر از آنچه در روش‌های مرسوم اصلاحی انجام می‌شده است، فراهم نماید. بنابراین تداوم روش‌های زیست فناوری و مهندسی ژنتیک برای فراهم آوردن غذا جهت رویارویی با نیازهای پیش‌روی بشر در آینده نزدیک مورد نیاز است و می‌توان پیشرفت‌های زیادی را در چارچوب زمانی کوتاه‌تر انجام داد (Kole and Timothy 2008). از آنجا که در ژرم پلاسم گندم مقاومت بسیار ناچیزی وجود دارد، مهندسی ژنتیک راه حل مناسبی برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی از جمله فوزاریوم خوش است، به همین علت، ورود ژن‌های آنتی‌توكسین و ضد قارچی منحصر به فرد از طریق تراریزش ژنتیکی، موجب افزایش پتانسیل مقاومت در ارقام گندم می‌شود. ژن‌های ضد قارچی، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های

^۱ Verticilliumic

کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده، توسط ذرات طلای اندوخته شده با پلازمید نوترکیب بمباران شدند. در این آزمایش، از تفونک ژنی مدل BioRad، PDS-1000/He مدل BioRad، PDS-1000/He، ذرات طلا دارای قطر ۱ میکرون و دیسک پاره‌شونده در دو نوع ۹۰۰ PSI و ۱۱۰۰ PSI استفاده شد. کالوس‌های بمباران شده پس از طی مدت ۱ روز نگهداری تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، به محیط کالوس‌دهی انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کاناامایسین منتقل شدند.

بازرگانی گیاهچه‌های تاریخته احتمالی

کالوس‌های فوق، پس از طی مدت یک هفته در محیط کالوس‌دهی انتخابی، به محیط بازرگانی انتخابی (نمک‌ها و ویتامین‌های MS، ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH=۵/۷)، حاوی ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کاناامایسین تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در فیتوترون با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد جهت تولید شاخه و ریشه منتقل شدند. گیاهچه‌های بازرگانی پس از تولید شاخه به محیط بازرگانی فاقد آنتی‌بیوتیک کاناامایسین حاوی ۱/۵ گرم بر لیتر ذغال فعال منتقل شدند. واکنش نمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام و فاکتورهایی نظری درصد شاخه‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زای شاخه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰)، درصد ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) و درصد ترازیریش (نسبت گیاهچه‌های تاریخت به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های بازرگانی در درون شیشه، ابتدا به گلدن‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدن‌های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند.

تائید مولکولی گیاهچه‌های تاریخته احتمالی

جهت تائید تاریختی، استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های بازرگانی شده به روش دلاپورتا (Della Porta et al. 1983) انجام گرفت. در ادامه به منظور اثبات تلفیق ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و nptII واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۲۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۰۰ میلی‌مولار)، ۰/۰۵ میکرولیتر MgCl₂ (۰/۰۵ میلی‌مولار) و ۰/۰۵ میکرولیتر بافر PCR و ۰/۰۵ نانوگرم از

پاتوژن‌های قارچی افزایش می‌دهد. این مسیر می‌تواند منجر به کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی گردد (Tohidfar et al. 2005). هدف از این تحقیق، انتقال ژن و تولید گندم تاریخته حاوی دو ژن کیتیناز و گلوکاناز برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی به ویژه فوزاریوم و سفیدک پودری می‌باشد که می‌تواند به کاهش مصرف سموم قارچکش منجر گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بدور ۴ رقم تجاری گندم نان شامل ارقام پائیزه (سايسون و گاسکوژن) و ارقام بهاره (آرتا و مغان) و نیز لاین A از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج از بخش غلات تهیه شد.

سازه ژنی

در این تحقیق از حامل دوگانه pBI121 نوترکیب حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز تحت کنترل پیشبرهای جداگانه CaMV35S و پایانبرهای جداگانه NOS موسوم به (pBI-ChiGlu(-) و نیز نشانگر انتخابی نومایسین فسفوتانسفراز (nptII) تحت کنترل پیشبر NOS و همچنین پایانبر NOS، جهت ترازیرش گیاه گندم استفاده شد (شکل ۱) (Mohsenpour et al. 2008).

آماده‌سازی ریزنمونه‌ها جهت بمباران

در ادامه، بذور مورد آزمایش در گلدان کشت و پس از طی کلیه مراحل داشت در گلخانه، بذور نارس آن‌ها در فاصله زمانی ۱۲ الی ۱۸ روز پس از گردهافشانی برداشت شد. ریزنمونه‌های جنین نارس گندم پس از ضد عفونی بذور در الكل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و نیز هیپوکلریت سدیم تجاری به مدت ۲۰ دقیقه، در زیر میکروسکوپ جدا شده و به مدت ۴۵ روز بر روی محیط کالوس‌دهی (نمک‌ها و ویتامین‌های MS، ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر تیامین، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوکاتامین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار و pH=۵/۸)، تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون، به منظور تولید کالوس جنین‌زا قرار گرفتند.

بمباران کالوس‌های جنین‌زا

از نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آزمون لکه‌گذاری DNA پاسخ مثبت نشان دادند (شکل ۸ و ۱۰). استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی اثرات سوئی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و فراوانی بالای زالی را به همراه داشت. نتایج حاصل از این مشاهدات نشان دادند که آنتی‌بیوتیک کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کالوس‌دهی و باززایی موجب عدم باززایی می‌شود. همچنین با استفاده از مقادیر ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین در محیط کالوس‌دهی و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کانامایسین در میزان بسیار کم دیده شد که این تعداد نیز پس از چند روز دچار رنگ‌پریدگی شده و در نهایت زالی را نشان دادند (شکل ۲). با حذف کانامایسین از محیط کالوس‌دهی و استفاده از غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه‌زایی بطور بارز مشاهده شد اما ریشه‌زایی دیده نشد. گیاهچه‌های فوق نیز پس از مدتی دچار رنگ‌پریدگی شدند. با انتقال گیاهچه‌ها به محیط باززایی فاقد کانامایسین و حاوی ۱/۵ گرم در لیتر ذغال فعل، رنگ سبز گیاهچه‌ها مجدداً پدیدار شد (شکل ۳-ب). بهمین علت، جهت جلوگیری از تاثیر سوء آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر باززایی ارقام آرتا، مغان، سایسون و گاسکوژن و نیز لاین^A، پس از بمباران، کالوس‌های جنین‌زا که دارای ظاهری ترد و شکننده و رنگ کرم روشن بودند، در محیط کالوس‌دهی و باززایی فاقد کانامایسین قرار گرفتند. مراحل مختلف رشد گیاهچه تاریخته احتمالی در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. از میان ریزنمونه‌های مورد آزمایش تنها ۱۵ گیاهچه شامل ۲ گیاهچه از رقم مغان و ۱۳ گیاهچه از لاین A بازرا شدند و همگی به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شکل ۵، ۶ و ۷) و نیز آزمون لکه‌گذاری DNA (شکل ۹ و ۱۰) پاسخ مثبت نشان دادند و تاریخته آن‌ها حداقل در وجود یک نسخه از هر کدام از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نئومایسین فسفو‌ترانسферاز تایید شد. در این تحقیق از پلاسمید نوترکیب pBI-ChiGlu که دارای ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، تحت پیشبرهای جداگانه CaMV35S و پایانبرهای جداگانه NOS، در ناحیه T-DNA خود بوده و ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) را به عنوان نشانگر انتخابی حمل می‌کند، استفاده گردید، لذا رونویسی و ترجمه هر یک از ژن‌های

آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. برای اثبات حضور ژن کیتیناز از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S استفاده شد. همچنین جهت اثبات حضور ژن گلوکاناز نیز از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S استفاده شد. برای هر دو ژن، واکنش در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۷ دقیقه) انجام شد. این برنامه، برای اثبات تلفیق ژن نشانگر انتخابی *nptII* در ژنوم گیاهان تاریخته احتمالی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب و رو به جلو ژن نئومایسین فسفو‌ترانسفراز، با دمای بهینه اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر سه واکنش از نمونه آب (فاقد هر گونه DNA) و DNA گیاه شاهد، به عنوان کنترل منفی و از نمونه پلاسمید به عنوان کنترل مثبت، برای تأیید تاریختی گیاه استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آکارز یک درصد، الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید. همچنین برای تایید بیشتر تلفیق ژن، آزمون لکه‌گذاری DNA با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن *nptII* و پیشبر CaMV35S براساس روش سمیروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد (Sambrook and Russell). عمل نشاندار کردن کاوشگرهای نیز به روش کیت DIG Labeling (شرکت Roche) انجام شد. تولی آغازگرها در زیر آمده است (جدول ۱).

نتایج و بحث

در این تحقیق ۱۵ گیاهچه، شامل ۲ گیاهچه از رقم مغان با درصد تاریزش ۰/۳ درصد و ۱۳ گیاهچه از لاین A با درصد تاریزش ۴/۸ درصد، تاریختی را نشان دادند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که ۱۵ گیاهچه تاریخته احتمالی در مقایسه با شاهد، حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نئومایسین فسفو‌ترانسفراز (*nptII*) را در ژنوم خود دارا هستند (شکل ۵، ۶ و ۷). تجزیه لکه‌گذاری DNA نیز تلفیق ژن‌های فوق را در ژنوم این ۱۵ گیاه در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد که تایید بیشتری بر نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود. این ۱۵ گیاه، همگی

تاریخیزش گیاه گندم با استفاده از تفک ژنی به منظور انتقال ...

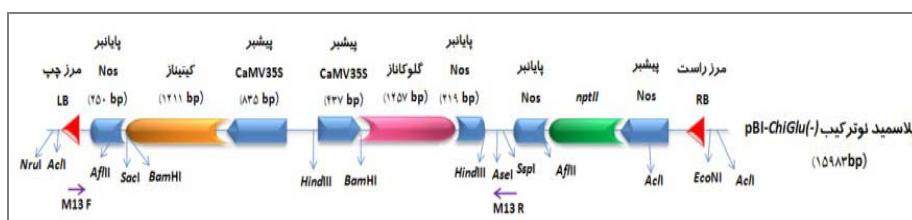
جدول ۱ - آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیرهای پلیمراز جهت تایید تاریخیزش گیاهان تاریخته احتمالی

دماه پهینه اتصال	قطعه تکثیری (bp)	آغازگرها	توالی
۶۰	۶۸۰	Forward : CAGGTCCAAGGGCATCAACG TCTCCGACACCACCCACCTTC : Reverse	گلوکاناز
۶۰	۸۷۲	GAGTGGTGTGGATGCTGTTG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA: Reverse	کیتیناز
۵۸	۷۸۶	GAACAAGATGGATTGCACGC : Forward GAAGAACTCGTCAAGAAGGC: Reverse	nptII
۶۰	۱۲۳	CCACGTCTCAAAGCAAGTGG : Forward TCCTCTCCAATGAAATGAACTTC: Reverse	پیشر 35S
۶۰	۱۰۹۶	CCACGTCTCAAAGCAAGTGG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA : Reverse	35S کیتیناز-
۶۰	۹۷۲	CCACGTCTCAAAGCAAGTGG : Forward TCTCCGACACCACCCACCTTC : Reverse	35S گلوکاناز-

جدول ۲ - فراوانی تاریخیزش گیاهچه‌های باززا شده از کالوس‌های جنین‌زا در ارقام پاییزه و بهاره

نوع بذر	نوع رقم	تعداد کالوس بمباران شده	درصد شاخه‌زایی	تعداد گیاهچه تواریخت	درصد ریشه‌زایی	درصد در تاریخ*
پائیزه	سایسون	۱۳۵
پائیزه	گاسکوئن	۹۰	۰/۸	۰	۰	.
بهاره	مغان	۶۷۵	۲/۷	۲	۳/۱	۰/۳
بهاره	آرتا	۱۱۲۵	۱/۴	۰	۲/۸	.
بهاره	A لاین	۲۷۰	۱۰/۲	۱۳	۱۱/۷	۴/۸

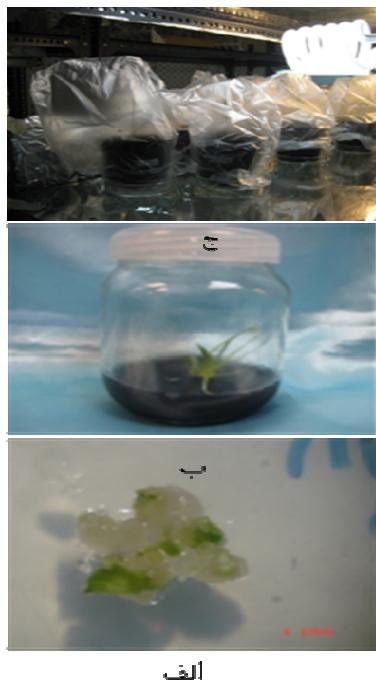
* فراوانی تاریخیزش از نسبت گیاهچه‌های تاریخت به تعداد کالوس‌های بمباران شده، بدست آمد.



شکل ۱ - نمای شماتیک پلاسمید نوترکیب (-).pBI-ChiGlu(-)

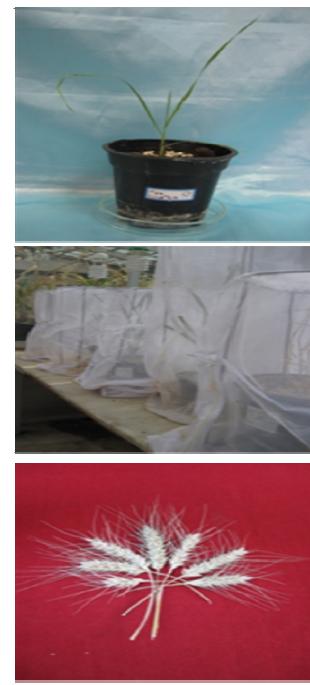


شکل ۲ - گیاهچه زال در محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک کاناماکسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر)

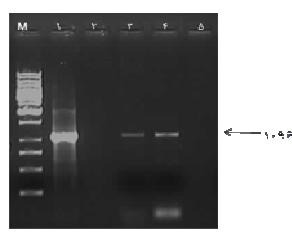


الف

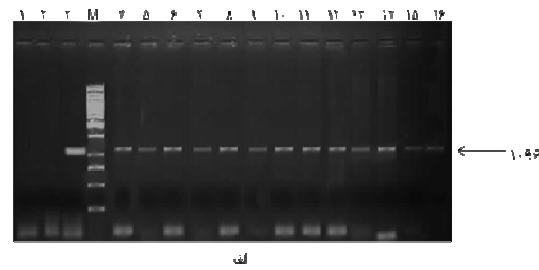
شکل ۳- بازرایی در محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک کانامایسین الف. کالوس جنین زا، ب. گیاهچه بازرا شده در شیشه، ج. گیاهچه‌های بازرا شده در گلدان



شکل ۴- گیاهان تراریخته الف. گیاهچه بازرا شده در گلدان، ب. انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، ج. بذر تراریخت احتمالی

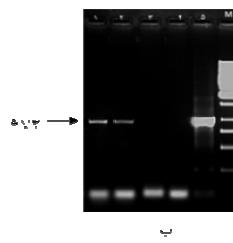


ب

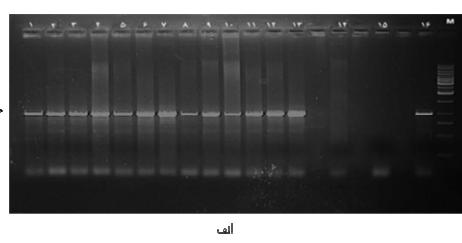


الف

شکل ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز، الف) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A، چاهک ۱) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۲) گیاه شاهد، چاهک ۳) پلاسمید (کنترل مثبت)، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb) (DNA ۱، ۲)، چاهک ۴- ۶) گیاهان تراریخته، ب. آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb) (چاهک ۱)، چاهک ۲) پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۳ و ۴) گیاهان تراریخته رقم مغان، چاهک ۵) نمونه آب (کنترل منفی)



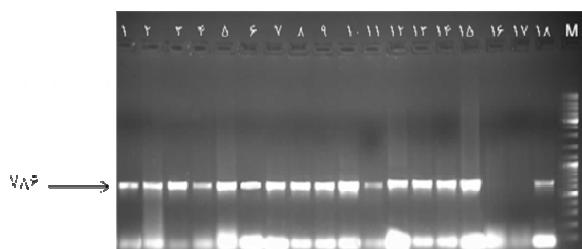
ب



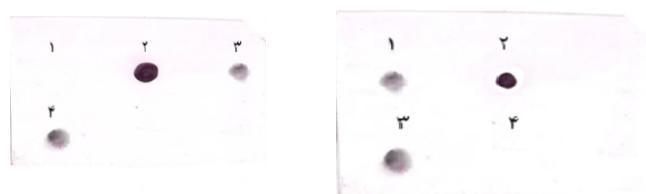
الف

شکل ۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاتاناز ، الف) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A، چاهک ۱-۱۳ (۱) گیاهان تراریخته، چاهک ۱۴ (۱) گیاه شاهد، چاهک ۱۵ (۱) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۱۶ (۱) پلاسمید(کنترل مثبت)، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb) (۱)، ب) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، چاهک ۱ و ۲ (۱) گیاهان تراریخته، چاهک ۳ (۱) گیاه شاهد، چاهک ۴ (۱) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۵ (۱) پلاسمید (کنترل مثبت)، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb) (۱)

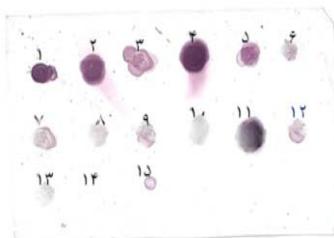
تواریزش گیاه گندم با استفاده از تفک ژنی به منظور انتقال ...



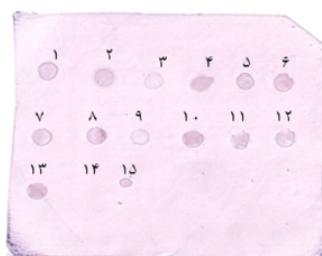
شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *nptII* برای اثبات تاریختی گیاهچه‌های لاین A و رقم مغان، چاهک ۱۳-۱) گیاهان تاریخته لاین A، چاهک ۱۴ و ۱۵) گیاهان تاریخته رقم مغان، چاهک ۱۶) نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۱۷) گیاه شاهد، چاهک ۱۸) پلاسمید (کنترل مثبت)، M، نشانگر وزن ملکولی (1 Kb plus) DNA



شکل ۸- الف: آزمون لکه‌گذاری گندم تاریخته برای پیشبر CaMV35S. نمونه ۱ و ۳) گیاهچه‌های تاریخته رقم مغان، نمونه ۲) پلاسمید (کنترل مثبت)، نمونه ۴) گیاه شاهد (کنترل منفی). ب: آزمون لکه‌گذاری گندم تاریخته برای ژن نومایسین فسفوترانسفراز. نمونه ۱) گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۲) پلاسمید (کنترل مثبت)، نمونه ۳ و ۴) گیاهچه‌های تاریخته رقم مغان



شکل ۹- آزمون لکه‌گذاری گندم تاریخته برای ژن نومایسین فسفوترانسفراز نمونه‌های ۱۳-۱. گیاهچه‌های تاریخته لاین A، نمونه ۱۴. گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسمید (کنترل مثبت)



شکل ۱۰- آزمون لکه‌گذاری گندم تاریخته برای پیشبر CaMV35S نمونه‌های ۱۳-۱. گیاهچه‌های تاریخته لاین A، نمونه ۱۴. گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسمید (کنترل مثبت) آزمون لکه‌گذاری RNA. حضور ژن نومایسین فسفوترانسفراز و پیشبر CaMV35S. را در ۱۵ گیاهچه تاریخته تایید کرد.

کیتیناز و گلوکاناز، پس از ادغام موفقیت‌آمیز در ژنوم گیاهی، با دارا بودن نواحی تنظیمی خود، به طور مستقل از هم، انجام می‌شوند. به همین منظور از پیشبر CaMV35S در دو اندازه مختلف استفاده گردید، پیشبر اول با طول ۸۳۵ جفت باز برای ژن کیتیناز و پیشبر دوم با طول ۴۲۵ جفت باز برای ژن گلوکاناز. پیشبر دوم از نظر توالی با انتهای ۳ پیشبر اول یکسان بوده و هر دو تمامی دامین‌های لازم برای بیان دائمی ژن تحت کنترل خود را دارا می‌باشند. به علت وجود شباهت توالی این دو پیشبر و قسمتی که با طول بیش از ۴۰۰ جفت باز همولوگ، احتمال وقوع کراسینگ آور و نوترکیبی را بالا می‌برد، لذا در این تحقیق از سازه‌ای استفاده گردید که جهت دو پیشبر مذکور نسبت به یکدیگر ناهمسو بوده و بنابراین در صورت وقوع نوترکیبی، قطعه میانی حذف نخواهد گردید. بلکه انتظار بر این است که وقوع نوترکیبی در چنین حالتی تنها باعث جابجایی قطعه شده و گلوکاناز را تحت پیشبری با طول بیشتر و کیتیناز را تحت پیشبری با طول کمتر قرار دهد، بدون اینکه در عملکرد پیشبرها اختلالی ایجاد گردد.

گاسکوژن، آرتا، مغان) و نیز لاین A، این نکته را بیان داشت که ارقام پائیزه در مقایسه با ارقام بهاره نسبت به کشت بافت پاسخ مناسبی از خود نشان ندادند. از دلایلی که می‌توان به آن اشاره کرد، نوع ژنوتیپ است. کشت بافت غلات، انواع مختلفی از کالوس را تولید می‌کند که ممکن است از نظر پتانسیل باززایی با هم متفاوت باشند، از این رو پاسخ کالوس و باززایی گیاه بستگی به نوع ژنوتیپ دارد (Baskaran et al. 2005).

به همین علت در ژنوتیپ‌های پائیزه نسبت به بهاره کالوس‌دهی و باززایی کمتری مشاهده شد. از نکات بسیار مهم در این تحقیق، مشابهت ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز با توالی‌هایی در ژنوم گیاه شاهد است که کاربرد این ژن‌ها را برای تشخیص تاریختی گیاه به علت دیده شدن باند مورد نظر برای ژن‌های فوق در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در گیاه شاهد، با مشکل مواجه خواهد ساخت. به همین دلیل، استفاده از آغازگرهای توالی‌های مجاور ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، نظیر توالی پیشبر، توالی پایانبر و نیز نشانگر انتخابی، به تنهایی و یا همراه با یکی از آغازگرهای ژن‌های فوق، به علت هم‌جواری آن‌ها در ناحیه T-DNA و در نتیجه عدم حضور این توالی‌ها در ژنوم گیاه شاهد، امکان اثبات تواریزش را ممکن می‌سازد. بدین منظور، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S، آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S و نیز آغازگرهای رو به عقب و رو به جلو نشانگر انتخابی nptII انجام شد. این توالی‌ها تنها در گیاه تاریخت موجود می‌باشند و در گیاه شاهد دیده نمی‌شوند. آزمون لکه‌گذاری DNA نیز با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز و پیشبر CaMV35S انجام و تلفیق ژن در ژنوم این گیاهان تائید شد. انتقال ژن به روش زیست‌پرتابی به طور رایج، بهترین انتخاب برای تولید مفید ژرم پلاسم گندم تاریخت است و به عنوان معمول‌ترین روش مورد استفاده در انتقال ژن به گندم به کاربرد می‌رود (Rakszegi et al. 2001). با وجود مزایای متعدد، این روش معایب بر جسته‌ای مانند ورود چندین نسخه از ژن خارجی و گرایش بالا برای خاموشی ژن به ویژه در نسل‌های بعد را به همراه دارد. خاموشی ژن در سطح رونویسی یا پس از آن اتفاق می‌افتد و این پدیده اغلب با تعداد

در روش انتقال ژن با تفنجک ژنی، تاریختی زمانی حاصل می‌شود که ژن خارجی در کروموزوم گیاه تلفیق شود. در این حالت می‌توان کالوس‌های تاریختی را به واسطه وجود نشانگر انتخابی در محیط شناسایی کرد. ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز (*nptII*، سبب مقاومت گیاه در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط کشت می‌شود. با این روش گیاهانی انتخاب می‌شوند که دارای ژن *nptII* هستند و به دلیل اینکه این ژن همراه با ژن‌های هدف کیتیناز و گلوکاناز بر روی یک پلاسمید قرار دارد، به طور غیر مستقیم نه با احتمال ۱۰۰ درصد، گیاهانی که حاوی ژن‌های هدف می‌باشند انتخاب می‌گردند. با این وجود در این تحقیق پس از اعمال آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی، رخدادهایی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و پدیده زالی به میزان بالایی بیش از حد انتظار دیده شد. مشاهدات نشان دادند که آنتی‌بیوتیک کانامایسین در مقادیر بسیار کم نیز موجب از بین رفتن سبزینه گیاه در مرحله شاخه‌زایی در ارقام مورد آزمایش شده و از ریشه‌زایی آن‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. در ادامه با حذف آنتی‌بیوتیک کانامایسین از محیط کشت باززایی، به تدریج شاخه‌زایی، و ریشه‌زایی مشاهده شد. بیشترین درصد شاخه‌زایی A ۱۰/۲ درصد و بیشترین درصد ریشه‌زایی ۱۱/۷ درصد در لاین ۱۰/۲ مشاهده شد، در حالی که در رقم سایسون هیچ‌گونه شاخه‌زایی و ریشه‌زایی دیده نشد. در رقم گاسکوژن نیز تنها ۰/۸ درصد شاخه‌زایی مشاهده شد اما هیچ یک از گیاهچه‌های شاخه‌دار شده، ریشه‌دار نشدنند. ارقام آرتا و مغان به ترتیب با ۱/۴ درصد و ۲/۷ درصد، شاخه‌زایی را نشان دادند همچنین درصد ریشه‌زایی در آن‌ها به ترتیب ۲/۸ درصد برای رقم آرتا و ۳/۱ درصد برای رقم مغان بود. در ادامه تنها ۲ گیاهچه از رقم مغان و ۱۳ گیاهچه از لاین A به طور کامل باززا شده و تاریختی آن‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنالیز لکه‌گذاری DNA بررسی شد. استفاده از ذغال فعل در محیط باززایی، علاوه بر جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی که موجب عدم ریشه‌زایی می‌شوند، محیطی کم‌نور، مناسب با رشد ریشه را نیز فراهم می‌آورد، از این رو استفاده از مقادیر مناسب ذغال فعل در محیط باززایی گیاه گندم، می‌تواند در تسريع فرایند رشد ریشه تاثیر بسزایی داشته باشد. ارزیابی صفات (شاخه‌زایی و ریشه‌زایی) در ارقام (سایسون،

بیماری‌های قارچی به‌ویژه فوزاریوم و ارایزیف‌گرامینیس بودند. انتظار می‌رود گیاهان حاصل با دریافت دو ژن کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی، مقاومت پایداری را نسبت به قارچ‌های فوق از خود نشان دهند. از این‌رو همانطور که گفته شد آنالیزهای بیشتری برای اثبات حضور و بیان ژن‌های وارد شده و نیز آزمایشات زیست‌سنگی جهت اثبات مقاومت به بیماری‌های قارچی و در نهایت آنالیز نسل‌های تاریخته برای اثبات پایداری ژن در آینده مورد نیاز خواهد بود.

سپاسگزاری

از بخش غلات مؤسسه تحقیقات و تهیه نهال و بذر کرج جهت تهیه بذور مورد نیاز در این تحقیق کمال تشکر و سپاس را دارم.

بالای نسخه‌های ژن وارد شده مرتبط است. (Shrawat 2007) به همین جهت انجام آزمایشات زیست‌سنگی در این نسل و نیز در نسل‌های آینده برای اثبات حضور ژن وارد شده و بیان پایدار آن همواره از سوی محققان این پژوهش مورد تأکید خواهد بود. از آن‌جا که بیماری‌های قارچی در گندم از جمله مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده محصول می‌باشند، تولید گیاه گندمی که بتواند در مقابل پاتوژن‌های قارچی مقاومت نشان دهد ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، با ایجاد مقاومت، مصرف سوموم قارچکش و هزینه‌های مربوط به سماپاشی و خرید این سوموم نیز کاهش می‌یابد. در این تحقیق، گیاهان گندمی تولید شدند که حاوی دو ژن ضدقارچی کیتیناز و گلوکاناز برای ایجاد مقاومت به

منابع

- Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill Bikram S, Bockus W, Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. Journal of Experimental Botany, Vol. 54, No. 384:1101-1111
- Baskaran P, Raja Rajeswari B, Jayabalan N (2005) A simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench for crop improvement. Journal of Agricultural Technology, 1 :179-192.
- Dahleen L, Okubara PA , Blech AE (2001) Transgenic Approaches to Combat Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. Crop Science, 41:628–637
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini preparation. version II. Plant Molecular Biology Report, 1:19-21.
- Kole C, Timothy C (2008) Compendium of Transgenic Crop Plants. Transgenic Cereals and Forage Grasses. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. Journal Biological Chemistry, 266:1464-1473.
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium Head Blight. Plant Cell Rep, 26:479–488.
- Maj website (accessed July 2011), www.maj.ir.
- Mohsenpour M, Babayan jelodar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008) Design and Construct of Four Recombinant Plasmid Vector for Plant transformation by Chitinase, Glucanase and Bt genes. Agri science and Natural resources of Gorgan, 15. 4: 68-80. (In Farsi)

- Rakszegi M, Tamas S, Szucs P, Tamas L, Bedo Z (2001) Current status of wheat transformation. Plant Biotechnology, 3:67-81
- Safikhani S (2007) Monthly of Domestic animal. Plant and Industry, 94: 58. (In Farsi)
- Sambrook J, Russel D (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, Vol 1, Chapter 6, 33-64
- Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill Macky R, Baldridge GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. Journal of Experimental Botany, 9:2371–2378
- Shrawat AK (2007) Genetic Transformation of Cereals Mediated by *Agrobacterium*. Plant Biotechnology Journal, 4:575-603
- Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue Organ and Culture, 83: 83–96. (In Farsi)