ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۶۳-۵۷

انتقال ژن جهش‌یافته *aroA* باکتریایی به کمک *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه گلرنگ

جواد معتمدی[۱]، علیرضا زبرجدی*[۲]، دانیال کهریزی[۳]، علی‌هاتف سلمانیان[٤]

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

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

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/٤- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

گیاهان روغنی بعد از غلات به‌عنوان دومین منبع تامین‌کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند. گیاه گلرنگ به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. به‌منظور بررسی امکان انتقال ژن جهش‌یافته *aroA* باکتریایی با واسطه *Agrobacterium tumefaciens* به گلرنگ که برای اولین بار در کشور و جهان گزارش شده است، پس از بهینه‌سازی 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 سویه‌های GV3101 و LBA4404 اگروباکتریوم در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین 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 معنی‌داری بین ارقام و سویه‌های اگروباکتریوم وجود دارد اما اثر متقابل بین این دو عامل از نظر آماری معنی‌دار نبود. تجزیه آماری نشان داد که بالاترین درصد باززایی گیاهچه‌های تراریخته در محیط انتخابی حاوی کانامایسین مربوط به رقم Dincer و سویه LBA4404 به میزان ۲۰/۶۱ درصد بوده در حالی‌که تجزیه PCR گیاهان تراریخته فراوانی تراریختگی در رقم Dincer را ۱۰ درصد نشان داد. در تجزیه PCR برای رقم سینا، هیچ باندی مبنی بر وجود ژن جهش یافته *aroA* (EPSPS) مشاهده نگردید. به علاوه، تکثیر قطعه bp ۱۳۰۰ (حاصل از آغازگرهای EPS1 و EPS2) نشان دهنده حضور این ژن در گیاهان تراریخته رقم Dincer می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم، تراریختگی، ژن جهش‌یافته باکتریایی *aroA*، گلرنگ.

مقدمه

گیاهان روغنی بعد از غلات به‌عنوان دومین منبع تامین‌کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند و از اهمیت اقتصادی زیادی نیز در کشاورزی برخوردار می‌باشند و بیشترین روغن خوراکی بشر را تامین می‌کنند (ERS 2001). در بین دانه‌های 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).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

از این رو، اصلاح این گیاه (خصوصاً از نظر مقاومت به تنش-های 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 ذخیره ای به کار گرفته شده است (Hooykaas and Schilperoort 1992). از این رو بهینه-شدن 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). علف-های هرز یکی از مهم‌ترین عوامل بر هم زننده تعادل غذایی برای گیاهان زراعی و تامین غذای جمعیت جهان به شمار می-آیند (Carlisle and Trevors 1988). با توجه به نگرانی‌های زیست محیطی به‌علت 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 بیوسنتز ترکیبات حلقوی در گیاهان، برخی از قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها توسط مسیر شیکیمات[1] به هم مرتبط می‌شوند. ششمین آنزیم در این مسیر یعنی EPSPS[2] (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 ژن *aroA*[3] کد می‌شود. برای استفاده از این سم در کنترل علف-های 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 *AROA* به گیاه و بالابردن غلظت آنزیم مذکور (Kishore and Shah 1988)، وارد نمودن ژنی که محصول آن باعث تجزیه گلایفوسیت شود (مانند ژن[4] *gox*) (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 اگروباکتریوم 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 *npt*II، 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 تنظیم کننده رشد را روی باززایی و کارآیی تراریختگی گلرنگ بررسی کردند. نتایج شمارش تراریخته‌های بیان کننده 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 ("A_1" و "A_{300}") با واسطه *A. tumefaciens* مورد آزمایش قرار گرفته است (Sankara Rao and Rohini 1999; Rohini and Sankara Rao 2000).

[1] Shikimate pathway
[2] 5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase
[3] Aromatic acid
[4] Glyphosate oxide reductase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

نشان داد که از ۱۰۰ ریز نمونه باززا شده به‌طور مستقیم و غیرمستقیم (از کالوس)، ۲۳ تا ۳٤ گیاه تراریخته حاصل گردیده است (Sankara Rao and Rohini 1999). فراوانی تراریختگی در رقم "A_1"، ۵/۳ و در رقم "A_{300}"، ۳ درصد گزارش گردید. آنالیز PCR هر دو ژن *udi A* و *npt* II نشان داد که کارآیی تراریختگی در رقم "A_1" بیشتر از "A_{300}" است (Rohini and Sankara Rao 2000). در ایران، اولین گزارش در مورد انتقال-سازه دستورزی شده آنزیم EPSPS به گیاه روغنی کلزا به‌منظور ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت گزارش شده است (Kahrizi 2005). ایشان در این تحقیق از باکتری *A. tumefaciens* برای انتقال‌سازه 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 بیان ژن را در گیاه اثبات کرد. در این مطالعه، برای کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت با این آنزیم دستورزی لازم روی ژن انجام شد. نتایج نشان داد که به کارگیری ژن‌های جهش‌یافته کدکننده آنزیم EPSPS باکتریایی در کلزا، باعث ایجاد گیاهان نسبتا مقاوم به گلایفوسیت 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 جهش‌یافته *aroA* باکتریایی و همچنین مقایسه دو نژاد *A. tumefaciens* (GV3101 و LBA4404) در خصوص توانایی انتقال ژن جهش‌یافته *aroA* باکتریایی به گیاه گلرنگ پرداخته می‌شود.

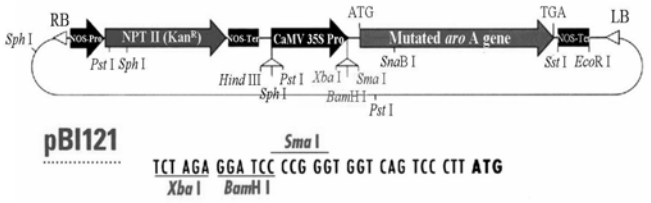
مواد و روش‌ها

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 جهش‌یافته *aroA* باکتریایی (کد کننده آنزیم EPSPS) تحت کنترل پیشبر CaMV 35S 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 گلایسین شماره ۹٦ به ترئونین جهت کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت تغییر یافته‌اند (Kahrizi et al. 2007). این ژن ۱۲۸٤ 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 اگروباکتریوم‌های دارای ناقل pBI121 که حاوی ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی 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. زمانی‌که تعداد سلول‌های باکتری در حدود $۱/۲\times۱۰^۹$ سلول در هر سانتی‌متر مکعب محیط کشت (OD_{600}=1)، جهت تراریختی استفاده شد.

جدول ۱- سویه‌های آگروباکتریوم مورد استفاده جهت تراریختگی گیاه گلرنگ

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



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

تیمارها، عملیات تراریختگی، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری

این آزمایش به‌صورت 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 اگروباکتریوم (LBA4404 و GV3101) حامل ژن جهش‌یافته *aroA* باکتریایی به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

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 به‌مدت ۲-۱ 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 ٤٨ ساعت در این محیط (محیط هم‌کشتی[1]) نگه داشته شدند تا اگروباکتریوم 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 اگروباکتریوم به کار برده شد (Zebarjadi 2005). ریزنمونه‌ها هر ۱۵ روز یکبار به محیط مشابه واکشت 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[2] CTAB انجام شد و برای استخراج پلاسمیدها از کلنی سویه‌های باکتری *A. tumefaciens* (LBA4404 و GV3101)، از روش لیز قلیایی در مقیاس کم[3] 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 اگروباکتریوم 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 ۲۰/٦۱، 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 ۸/٦۱ درصد مشاهده شد.

[1] Co-cultivation medium

[2] N,N,N, Cethyltrimethylammonium Bromide

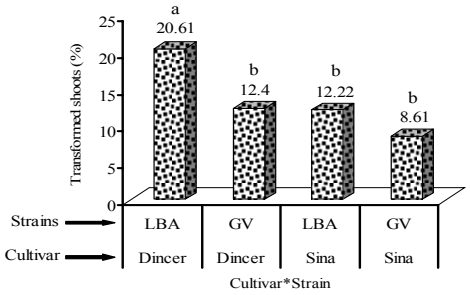
[3] Mini prepration

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس برای صفت باززایی گیاهچه‌های تراریخته

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
		باززایی گیاهچه‌های تراریخته
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 اگروباکتریوم.

رشد گیاهچه‌ها روی محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیترکانامایسین 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 جهش‌یافته *aro* A 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 ٤ گیاه تراریخته احتمالی از محیط انتخابی به دست آمده بود اما در تجزیه PCR هیچ باندی مبنی بر وجود ژن جهش‌یافته *aro* A باکتریایی مشاهده نگردید که نشان دهنده غیر تراریخته بودن گیاهان مورد آزمون می‌باشد. همچنین، تکثیر قطعه bp ۱۳۰۰ (حاصل از آغازگرهای EPS1 و EPS2) نشان دهنده حضور این ژن در گیاهان تراریخت می‌باشد (شکل ٤). همان طور که در شکل ٤ ملاحظه می‌شود ظهور باند ۱۳۰۰ جفت بازی در نمونه‌های ۱، ۲، ٤، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ١٤ و ۱۵ در مقایسه با کنترل‌های منفی و مثبت حاکی از تراریختگی آن‌ها با ژن جهش‌یافته *aro* A 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 *aro* A 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 اگروباکتریوم 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 (Zebarjadi 2005).Radke et al.(1992)، مزیت استفاده از هیپوکوتیل را آسان بودن برش و راحتی تلقیح آن‌ها با سوسپانسیون اگروباکتریوم گزارش نمودند (.Radke et al 1992). تاثیر رقم و پاسخ آن به کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه-های تراریخته و غیرتراریخته در این آزمایش کاملاً مشهود بود.

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 (*aroA* جهش‌یافته)		فراوانی تراریختگی* (٪)
		LBA4404	GV3101	LBA4404	GV3101	
Dincer	۹۰	۱۸/۴۵	۶/۴۵	۹/۴۵	۰	۱۰
سینا	۹۰	۲/۴۵	۲/۴۵	۰	۰	۰

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

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 Bhima، Grina، Manjira، S-144، HUS-305، A_1 و A_{300} 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 A_1 و A_{300} به تعداد محدود در مورد ژن‌های گزارش‌گر و گزینش‌گر مانند *GUS* و *NPT*II صورت گرفته است (Singh and Nimbkar, 2006). در این تحقیق از دو سویه *A. tumefaciens* (سویه‌های LBA4404 مقاوم به استرپتومایسین و C58 (pGV3101) مقاوم به ریفامپیسین) استفاده شد. نکته قابل توجه این است که این سویه‌ها دارای سرعت رشد و عادت رشدی متفاوت هستند، به طوری‌که سویه LBA4404 دارای سرعت رشد بالا بوده در حالی که سویه C58 (pGV3101) دارای سرعت رشد اولیه کمتری بوده ولی سوسپانسیون سلولی یکنواختی را ایجاد می‌کند (Zebarjadi 2005). با توجه به جدول ۳ و شکل ۲ برتری سویه LBA4404 نسبت به سویه GV3101 در تراریختگی گیاه گلرنگ کاملا مشهود است. در واقع، این سویه توانایی بیشتری نسبت به سویه GV3101 جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی داشته است. همان طور که قبلا اشاره شد، پس از تجزیه PCR فراوانی تراریختگی در رقم Dincer، کاهشی 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 دو سویه اگروباکتریوم با یکدیگر در کارآیی تراریختگی گیاه کلزا، برتری سویه LBA4404 با بیشترین میزان تراریختگی (۲۸/۹۵ درصد) نسبت به سویه GV3101 گزارش شده است (Zebarjadi 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 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، گزارش کردند (Zebarjadi et al. 2006a). در تحقیقی دیگر، مقایسه سویه‌های LBA4404 و GV3101 اگروباکتریوم در خصوص تراریختگی ۵ رقم کلزا انجام گردید (Zebarjadi 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 معنی‌دار شدن اثر سویه‌های اگروباکتریوم 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 (Zebarjadi et al. 2006b; Kahrizi et al. 2007) مغایرت داشت؛ زیرا آنان اثر متقابل معنی‌داری را بین سویه اگروباکتریوم و ارقام کلزا مشاهده کردند. به نظر می‌رسد که این نتیجه به علت محدودیت ژنوتیپ‌های مورد استفاده باشد. محققان گزارش نمودند که معنی‌دار شدن اثر متقابل سویه‌های اگروباکتریوم 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).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]

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 Biolology 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, Shilperoort 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 aro A 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 Horizos 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, Moeini 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 prepration of anti-sense constructs of FAE gene and its transference to rapeseed. Journal of Agricultural Science 37(2):257-271. (In Farsi).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.7.2]