

ترازیش گیاه گندم با استفاده از تفنگ ژنی به منظور انتقال

ژن های کیتیناز و گلوکاناز

نگین محمدی زاده^{۱*}، مسعود توحیدفر^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 تراریخته گندم (*Triticum aestivum*) با استفاده از ژن های کیتیناز و گلوکاناز از طریق تفنگ ژنی و پلاسمید pBI121 نو ترکیب حاوی ژن انتخابگر نئومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشبر NOS و ژن های کیتیناز و گلوکاناز بررسی شدند. ریزنمونه های جنین نارس ۵ ژنوتیپ از ارقام (مغان، آرتا، سایسون و گاسکوژن) و لاین A، پس از جداسازی، بر روی محیط کالوس دهی، تولید کالوس جنین را نمودند. کالوس های جنین را، با ذرات طلای اندود شده با پلاسمید حاوی ژن های کیتیناز و گلوکاناز بمباران شدند. سپس ریزنمونه ها به محیط کالوس دهی انتخابی حاوی ۲۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و پس از آن جهت تولید شاخه و ریشه به محیط باززایی انتخابی حاوی ۲۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین منتقل شدند. بیشترین درصد تراریزش ۴/۸ درصد، مربوط به لاین A و کمترین آن مربوط بود به ارقام سایسون، گاسکوژن و آرتا که هیچ گیاه تراریخته ای در آن ها مشاهده نگردید. واکنش زنجیره ای پلیمرز و آنالیز لکه گذاری DNA نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن های کیتیناز، گلوکاناز و نیز نئومایسین فسفوترانسفراز را در ژنوم خود دارا هستند.

مقدمه

رشد جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه در ۵۰ سال آینده، در حالی اتفاق می افتد که هم اکنون سوء تغذیه پدیده ای شایع بوده و بالغ بر ۸۰۰ میلیون از مردم دنیا روزانه با گرسنگی و بی غذایی روبه رو هستند. ۴۰ درصد از زمین های دنیا که در حال حاضر برای کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته اند، با تخریب جدی مواجه اند و این در حالی است که باید پاسخگوی نیازهای غذایی این جمعیت در حال رشد باشند. از این رو افزایش تولید غلات به طور اعم و تولید گندم به طور اخص به میزان ۴۰ درصد در ۲۰ سال آینده مورد نیاز خواهد بود (Kole and Timothy 2008). گندم یکی از مهم ترین دانه های غذایی در ایران و جهان است.

واژه های کلیدی

تفنگ ژنی،
کانامایسین،
کیتیناز،
گلوکاناز،
گندم تراریخته.

سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ 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 تفاوت‌های بین‌گونه‌ای اتفاق می‌افتد. پیشرفت در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در ورود ژن‌های خارجی مطلوب برای غلبه 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 پیش‌بینی‌تر 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 پلاسما گندم مقاومت بسیار ناچیزی وجود دارد، مهندسی ژنتیک راه حل مناسبی برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی از جمله فوزاریوم خوشه است، به همین علت، ورود ژن‌های آنتی‌توکسین و ضد قارچی منحصر به فرد از طریق تراپزش ژنتیکی، موجب افزایش پتانسیل مقاومت در ارقام گندم می‌شود. ژن‌های ضد قارچی، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های

مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای 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، ۴ به هم متصل هستند. کیتیناز پیوند بین کربن‌های ۴ و ۵ از دو N - استیل گلوکز آمین متوالی در ساختمان کیتین را می‌شکند (Shin et al. 2008). Tohidfar et al. 2005، ژن کیتیناز را برای ایجاد مقاومت به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی^۱ (*Verticillium dahlia*) به پنبه منتقل کردند، بررسی نسل سوم گیاهان پنبه تراریخت، بیان پایدار ژن کیتیناز را در ایجاد مقاومت به قارچ (*Verticillium dahlia*) نشان داد. آنزیم β -۱ و ۳ گلوکاناز نیز، پیوند پلی‌ساکارید 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 تراریختی تولید کردند 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 حداکثر در شرایط گلخانه‌ای از خود نشان دهد. بنابراین مهندسی ژن‌های کدکننده کیتیناز به همراه سایر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضد قارچی در گیاهان، حفاظت آن‌ها را در برابر

^۱ Verticillium

کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده، توسط ذرات طلای اندود شده با پلازمید نوترکیب بمباران شدند. در این آزمایش، از تفنگ ژنی 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 میلی گرم بر لیتر کانامایسین منتقل شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

کالوس‌های فوق، پس از طی مدت یک هفته در محیط کالوس‌دهی انتخابی، به محیط باززایی 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 کانامایسین 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 باززاده پس از تولید شاخه به محیط باززایی فاقد آنتی بیوتیک کانامایسین حاوی ۱/۵ گرم بر لیتر ذغال فعال منتقل شدند. واکنش نمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام و فاکتورهای نظیر درصد شاخه‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زای شاخه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده $\times 100$)، درصد ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده $\times 100$) و درصد تراریزش (نسبت گیاهچه‌های تراریخت به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده $\times 100$) اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های باززاده در درون شیشه، ابتدا به گلدان‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدان‌های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند.

تائید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

جهت تائید تراریختی، استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های باززا شده به روش دلاپورتا (Dellaporta et al. 1983) انجام گرفت. در ادامه به منظور اثبات تلفیق ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *nptII* واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq، ۲۵ نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی مولار) و ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR و ۴۰ 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 تراریخته 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

بذور ۴ رقم تجاری گندم نان شامل ارقام پائیزه (سایسون 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 پایانبه‌های جداگانه NOS موسوم به pBI-ChiGlu(-) و نیز نشانگر انتخابی نوئومایسین فسفوترانسفراز (*nptII*) تحت کنترل پیشبر NOS و همچنین پایانبر NOS، جهت تراریزش 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 ضدعفونی بذور در الکل 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 میلی گرم بر لیتر توفوردی، ۴۰ میلی گرم بر لیتر تیامین، ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کازئین، ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر گلوتامین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار و pH=۵/۸)، تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون، به‌منظور تولید کالوس جنین‌زا قرار گرفتند.

بمباران کالوس‌های جنین‌زا

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 سانتی گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۷ دقیقه) انجام شد. این برنامه، برای اثبات تلفیق ژن نشانگر انتخابی *nptII* در ژنوم گیاهان تراریخته احتمالی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به عقب و رو به جلو ژن نوامایسین فسفوترانسفراز، با دمای بهینه اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد 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 تراریختی گیاه استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس برداری گردید. همچنین برای تأیید بیشتر تلفیق ژن، آزمون لکه گذاری DNA با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن *nptII* و پیشبر CaMV35S براساس روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد (Sambrook and Russell, 2001). عمل نشاندار کردن کاوشگرها نیز به روش کیت DIG Labeling (شرکت Roche) انجام شد. توالی آغازگرها در زیر آمده است (جدول ۱).

نتایج و بحث

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

از نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آزمون لکه گذاری DNA پاسخ مثبت نشان دادند (شکل ۸، ۹ و ۱۰). استفاده از آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی در محیطهای کشت کالوس دهی و باززایی اثرات سوئی نظیر عدم شاخه زایی، عدم ریشه زایی و فراوانی بالای زالی را به همراه داشت. نتایج حاصل از این مشاهدات نشان دادند که آنتی بیوتیک کانامایسین به میزان ۵۰ میلی گرم بر لیتر در محیط کالوس دهی و باززایی موجب عدم باززایی می شود. همچنین با استفاده از مقادیر ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین در محیط کالوس دهی و ۲۵ میلی گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه زایی به میزان بسیار کم دیده شد که این تعداد نیز پس از چند روز دچار رنگ پریدگی شده و در نهایت زالی را نشان دادند (شکل ۲). با حذف کانامایسین از محیط کالوس دهی و استفاده از غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه زایی بطور بارز مشاهده شد اما ریشه زایی دیده نشد. گیاهچه های فوق نیز پس از مدتی دچار رنگ پریدگی شدند. با انتقال گیاهچه ها به محیط باززایی فاقد کانامایسین و حاوی ۱/۵ گرم در لیتر ذغال فعال، رنگ سبز گیاهچه ها مجدداً پدیدار شد (شکل ۳- ب). به همین علت، جهت جلوگیری از تأثیر سوء آنتی بیوتیک کانامایسین بر باززایی ارقام آرتا، مغان، سایسون و گاسکوژن و نیز لاین A، پس از بمباران، کالوس های جنین زا که دارای ظاهری ترد و شکننده و رنگ کرم روشن بودند، در محیط کالوس دهی و باززایی فاقد کانامایسین قرار گرفتند. مراحل مختلف رشد گیاهچه تراریخته احتمالی در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. از میان ریزنمونه های مورد آزمایش تنها ۱۵ گیاهچه شامل ۲ گیاهچه از رقم مغان و ۱۳ گیاهچه از لاین A باززا شدند و همگی به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (شکل ۵، ۶ و ۷) و نیز آزمون لکه گذاری DNA (شکل ۸، ۹ و ۱۰) پاسخ مثبت نشان دادند و تراریختی آنها حداقل در وجود یک نسخه از هر کدام از ژنهای کیتیناز، گلوکاناز و نوامایسین فسفو ترانسفراز تأیید شد. در این تحقیق از پلاسمید نو ترکیب pBI-ChiGlu که دارای ژنهای کیتیناز و گلوکاناز، تحت پیشبرهای جداگانه CaMV35S و پایانبه های جداگانه NOS، در ناحیه T-DNA ی خود بوده و ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) را به عنوان نشانگر انتخابی حمل می کند، استفاده گردید، لذا رونویسی و ترجمه هر یک از ژنهای

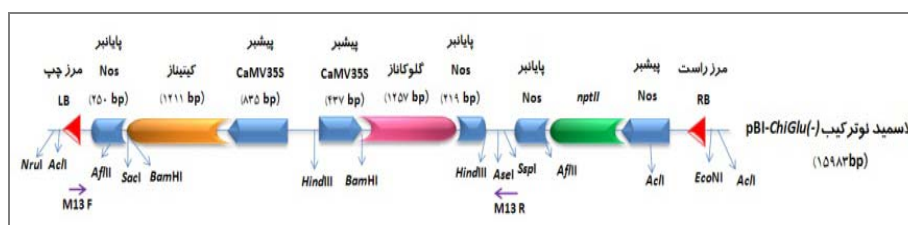
جدول ۱ - آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تایید تراریش گیاهان تراریخته احتمالی

توالی	آغازگرها	قطعه تکثیری (bp)	دمای بهینه اتصال
گلوکاناز	Forward : CAGGTCCAAGGGCATCAACG TCTCCGACACCACCACCTTC : Reverse	۶۸۰	۶۰
کتینیناز	GAGTGGTGTGGATGCTGTTG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA : Reverse	۸۷۲	۶۰
<i>nptII</i>	GAACAAGATGGATTGCACGC : Forward GAAGAACTCGTCAAGAAGGC : Reverse	۷۸۶	۵۸
۳۵S پیشبر	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC : Reverse	۱۲۳	۶۰
۳۵S کتینیناز -	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward GCCATAACCGACTCCAAGCA : Reverse	۱۰۹۶	۶۰
۳۵S گلوکاناز -	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG : Forward TCTCCGACACCACCACCTTC : Reverse	۹۷۲	۶۰

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

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

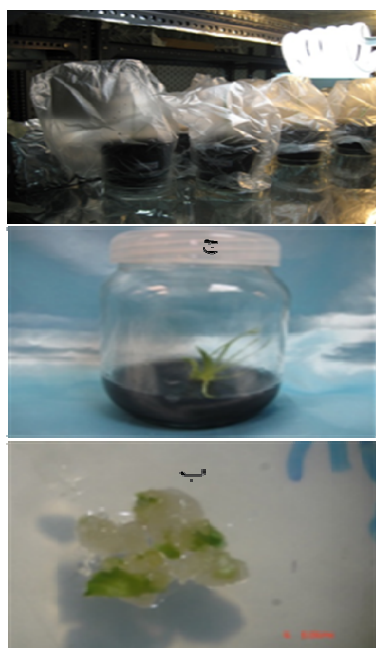
* فراوانی تراریش از نسبت گیاهچه‌های تراریخت به تعداد کالوس‌های بمباران شده، بدست آمد.



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



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

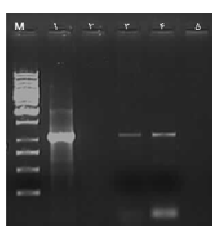


الف

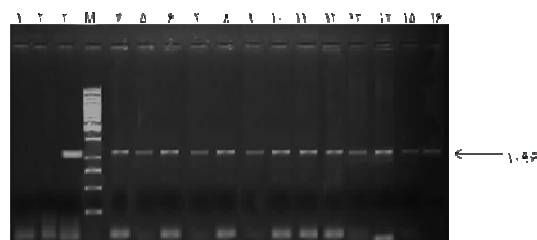
شکل ۳- باززایی در محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک کانامایسین الف. کالوس
جنین‌زا، ب. گیاهچه باززا شده در شیشه، ج. گیاهچه‌های باززا شده در گلدان



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

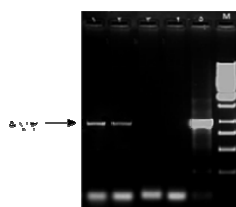


ب

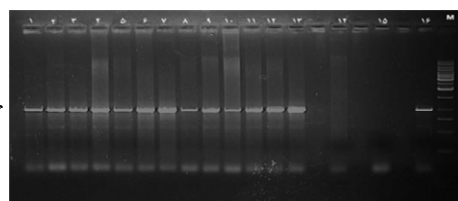


الف

شکل ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلوی پیشبر 35S CaMV و 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)، (چاهک ۱۶) - گیاهان تراریخته، ب. آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، (چاهک ۱) پلاسمید (کنترل مثبت)، (چاهک ۲) گیاه شاهد، (چاهک ۳ و ۴) گیاهان تراریخته رقم مغان، (چاهک ۵) نمونه آب (کنترل منفی)

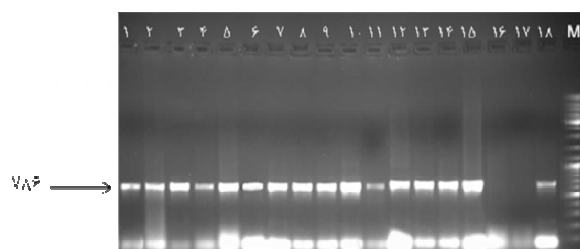


ب

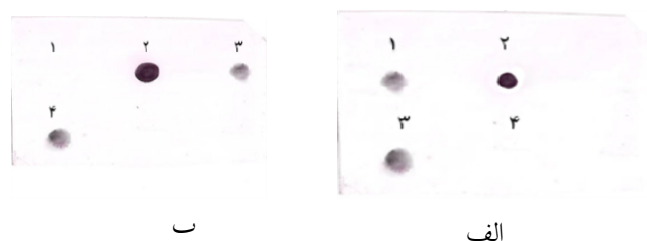


الف

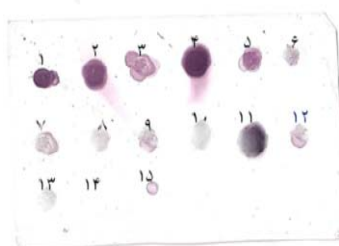
شکل ۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلوی پیشبر 35S CaMV و رو به عقب ژن گلوکاناز، الف) آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A، (چاهک ۱۳-۱) گیاهان تراریخته، (چاهک ۱۴) گیاه شاهد، (چاهک ۱۵) نمونه آب (کنترل منفی)، (چاهک ۱۶) پلاسمید (کنترل مثبت)، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، ب. آنالیز PCR برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های رقم مغان، (چاهک ۱ و ۲) گیاهان تراریخته، (چاهک ۳) گیاه شاهد، (چاهک ۴) نمونه آب (کنترل منفی)، (چاهک ۵) پلاسمید (کنترل مثبت)، (M) نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)



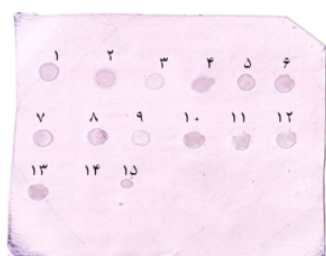
شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *nptII* برای اثبات تراریختی گیاهچه‌های لاین A و رقم مغان، چاهک ۱-۱۳ (گیاهان تراریخته لاین A، چاهک ۱۴ و ۱۵) گیاهان تراریخته رقم مغان، چاهک ۱۶ (نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۱۷) گیاه شاهد، چاهک ۱۸) پلاسמיד (کنترل مثبت)،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



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



شکل ۹- آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای ژن *نئومایسین فسفوترانسفراز* نمونه های ۱-۱۳. گیاهچه‌های تراریخته لاین A، نمونه ۱۴. گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسמיד (کنترل مثبت)



شکل ۱۰- آزمون لکه‌گذاری گندم تراریخته برای پیشبر *CaMV35S* نمونه های ۱-۱۳. گیاهچه‌های تراریخته لاین A، نمونه ۱۴. گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه ۱۵. پلاسמיד (کنترل مثبت) آزمون لکه‌گذاری DNA، حضور ژن *نئومایسین فسفوترانسفراز* و پیشبر *CaMV35S* را در ۱۵ گیاهچه تراریخته تایید کرد.

کیتیناز و گلوکاناز، پس از ادغام موفقیت‌آمیز در ژنوم گیاهی، با دارا بودن نواحی تنظیمی خود، به‌طور 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. به‌علت وجود شباهت توالی این دو پیشبر و قسمتی که با طول بیش از ۴۰۰ جفت باز همولوگ، احتمال وقوع کراسینگ‌آور 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.

در روش انتقال ژن با تفنگ ژنی، تراریختی زمانی حاصل می شود که ژن خارجی در کروموزوم گیاه تلفیق شود. در این حالت می توان کالوس های تراریخته را به واسطه وجود نشانگر انتخابی در محیط شناسایی کرد. ژن *nptII* نئومایسین فسفو ترانسفراز (*nptII*)، سبب مقاومت گیاه در برابر آنتی بیوتیک کانامایسین در محیط کشت می شود. با این روش گیاهانی انتخاب می شوند که دارای ژن *nptII* هستند و به دلیل اینکه این ژن همراه با ژن های هدف کیتیناز و گلوکاناز بر روی یک پلاسمید قرار دارد، به طور غیر مستقیم نه با احتمال ۱۰۰ درصد، گیاهانی که حاوی ژن های هدف می باشند انتخاب می گردند. با این وجود در این تحقیق پس از اعمال آنتی بیوتیک کانامایسین در محیط های کشت کالوس دهی و باززایی، رخدادهایی نظیر عدم شاخه زایی، عدم ریشه زایی و پدیده زالی به میزان بالایی بیش از حد انتظار دیده شد. مشاهدات نشان دادند که آنتی بیوتیک کانامایسین در مقادیر بسیار کم نیز موجب از بین رفتن سبزینه گیاه در مرحله شاخه زایی در ارقام مورد آزمایش شده و از ریشه زایی آن ها جلوگیری به عمل می آورد. در ادامه با حذف آنتی بیوتیک کانامایسین از محیط کشت باززایی، به تدریج شاخه زایی، و ریشه زایی مشاهده شد. بیشترین درصد شاخه زایی ۱۰/۲ درصد و بیشترین درصد ریشه زایی ۱۱/۷ درصد در لاین A مشاهده شد، در حالی که در رقم سایسون هیچ گونه شاخه زایی و ریشه زایی دیده نشد. در رقم گاسکوژن نیز تنها ۰/۸ درصد شاخه زایی مشاهده شد اما هیچ یک از گیاهچه های شاخه دار شده، ریشه دار نشدند. ارقام آرتا و مغان به ترتیب با ۱/۴ درصد و ۲/۷ درصد، شاخه زایی را نشان دادند همچنین درصد ریشه زایی در آن ها 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 تراریختی آن ها از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز و آنالیز لکه گذاری DNA بررسی شد. استفاده از ذغال فعال در محیط باززایی، علاوه بر جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی که موجب عدم ریشه زایی می شوند، محیطی کم نور، مناسب با رشد ریشه را نیز فراهم می آورد، از این رو استفاده از مقادیر مناسب ذغال فعال در محیط باززایی گیاه گندم، می تواند در تسریع فرایند رشد ریشه تاثیر بسزایی داشته باشد. ارزیابی صفات (شاخه زایی و ریشه زایی) در ارقام (سایسون،

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 می توان به آن اشاره کرد، نوع ژنوتیپ است. کشت بافت غلات، انواع مختلفی از کالوس را تولید می کند 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 ژنوتیپ های پائیزه نسبت به بهاره کالوس دهی و باززایی کمتری مشاهده شد. از نکات بسیار مهم در این تحقیق، مشابهت ژن های کیتیناز و گلوکاناز با توالی هایی در ژنوم گیاه شاهد است که کاربرد این ژن ها را برای تشخیص تراریختی گیاه به علت دیده شدن باند مورد نظر برای ژن های فوق در واکنش زنجیره ای پلیمرز در گیاه شاهد، با مشکل مواجه خواهد ساخت. به همین دلیل، استفاده از آغازگرهای توالی های مجاور ژن های کیتیناز و گلوکاناز، نظیر توالی پیشبر، توالی پایانبور و نیز نشانگر انتخابی، به تنهایی و یا همراه با یکی از آغازگرهای ژن های فوق، به علت هم جواری آن ها در ناحیه T-DNA و در نتیجه عدم حضور این توالی ها در ژنوم گیاه شاهد، امکان اثبات تراریزش را ممکن می سازد. بدین منظور، واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 توالی ها تنها در گیاه تراریخت موجود می باشند و در گیاه شاهد دیده نمی شوند. آزمون لکه گذاری DNA نیز با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز و پیشبر CaMV35S انجام و تلفیق ژن در ژنوم این گیاهان تأیید شد. انتقال ژن به روش زیست پرتابی به طور رایج، بهترین انتخاب برای تولید مفید ژرم پلاسم گندم تراریخت است و به عنوان معمول ترین روش مورد استفاده در انتقال ژن به گندم به کاربرد می رود (Rakszegi et al. 2001). با وجود مزایای متعدد، این روش معایب برجسته ای مانند ورود چندین نسخه از ژن خارجی و گرایش بالا برای خاموشی ژن به ویژه در نسل های بعد را به همراه دارد. خاموشی ژن در سطح رونویسی یا پس از آن اتفاق می افتد و این پدیده اغلب با تعداد

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 زیست‌سنجی جهت اثبات مقاومت به بیماری‌های قارچی و در نهایت آنالیز نسل‌های تراریخته 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.

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)

بالای نسخه‌های ژن وارد شده مرتبط است. (Shrawat 2007) به همین جهت انجام آزمایشات زیست‌سنجی 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 تاکید 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 به‌نظر می‌رسد. همچنین، با ایجاد مقاومت، مصرف سموم قارچکش و هزینه‌های مربوط به سمپاشی و خرید این سموم نیز کاهش می‌یابد. در این تحقیق، گیاهان گندمی تولید شدند که حاوی دو ژن ضدقارچی کیتیناز و گلوکاناز برای ایجاد مقاومت به

- 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, Baldrige 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)