تاثیر پیش‌تیمار سرما، طول دوره پیش کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح *Agrobacterium tumefaciens* بر فراوانی تراریختی کلزا

Effect of Cold Pretreatment and Period of Preconditioning Inoculation on Transformation Frequency in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

دانیال کهریزی[۱*]، علیرضا زبرجدی[۱] و علی هاتف سلمانیان[۲]

چکیده

به‌کارگیری مهندسی ژنتیک در کلزا منجر به تولید واریته‌هایی شده که از نظر صفات با ارزش زراعی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. بیش‌ترین انتقال ژن به کلزا از طریق اگروباکتریوم انجام شده است. جهت انتقال ژن موفق با این روش، پارامترهای مختلفی باید بهینه سازی شود. در این پژوهش عوامل پیش تیمار سرما با قرار دادن گیاهچه‌های ۵ روزه در دمای $4^{o}C$ در دو سطح (شاهد و ۱۲ ساعت)، مدت زمان پیش کشت کوتیلدون در ۳ سطح (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم در ۴ سطح (۲، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه) بر فراوانی تراریختی کلزا از طریق انتقال ژن گزارش‌گر *gus* بررسی شده است. این عوامل در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از رقم تجاری کلزا PF-7045-91 و سویه باکتری LBA4404 استفاده گردید. حضور و بیان ژن از طریق آزمون‌های PCR و *gus* اثبات شد. نتایج تجزیه آماری نشان داد که بین پیش‌تیمار سرما و شاهد برای فراوانی تراریختی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید، اما بین سطوح مختلف مدت پیش کشت و مدت زمان تلقیح برای این صفت اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که مدت زمان‌های پیش‌کشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدون اختلاف در بین خود و به‌ترتیب با متوسط ۲۴/۲۱ و ۲۳/۵۵ درصد و مدت زمان‌های تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه، بدون اختلاف در بین خود و به‌ترتیب با متوسط ۲۱/۵۲، ۳۰/۸۵ و ۲۱/۰۸ درصد دارای بیش‌ترین فراوانی تراریختی بودند. هم‌چنین تجزیه واریانس، اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه را معنی‌دار نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، پیش تیمار سرما، *Agrobacterium tumefaciens*، پیش کشت ریزنمونه

۱. استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران

*: نویسنده مسوول

مقدمه

سیستم اگروباکتریوم اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان بود که موانع موجود در مهندسی ژنتیک گیاهی را کاهش داد. غلبه بر موانع دستورزی ژن‌های گیاهی با شناخت خصوصیات و بهره‌برداری از پلاسمیدها به‌واسطه باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، محقق گردید. این پلاسمیدها امکان انتقال طبیعی ژن، بیان ژن و سیستم‌های گزینش را فراهم می‌آورند. گونه *A. tumefaciens* به‌عنوان موثرترین مهندس ژنتیک گیاهی در طبیعت مطرح شده است. انتقال با واسطه آگروباکتریوم در مقایسه با ناقلین ویروسی موجب انتقال پایدار ژن شده و می‌تواند بخش مشخصی از DNA به نام T-DNA را از پلاسمید ایجاد کننده تومور (Ti) به هسته سلول گیاه، به گونه‌ای پایدار در ژنوم، منتقل کند (De Block *et al*. 1989).

در رابطه با استفاده از سیستم اگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاه کلزا گزارش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال: قطعات ساقه‌ی گیاه کلزای ۵ تا ۶ هفته‌ای را با اگروباکتریوم دارای پلاسمید Ti خلع سلاح شده حاوی ژن مقاومت به کانامایسین تلقیح و از آن حدود ۲۰۰ گیاه تراریخت تولید شد (Fry *et al*. 1987).

هم‌چنین با استفاده از هیپوکوتیل‌های کلزا از طریق اگروباکتریوم سویه EHA101 اقدام به تولید گیاهان تراریخت گردید. تراریختی با بررسی، مقاومت به کانامایسین و ساترن بلات (Southern blot) مورد تایید قرار گرفت. فراوانی تراریختی از ۰/۴ تا ۲/۵٪ گزارش گردید (Radke *et al*. 1988).

با استفاده از کوتیلدون‌های کلزا از طریق اگروباکتریوم سویه EHA101، تراریختی کلزا بهینه‌سازی شد (Moloney *et al*. 1989). از هیپوکوتیل‌های کلزا از طریق اگروباکتریوم سویه EHA101، اقدام به تولید گیاهان تراریخت شد. از ناقل دوتایی دارای ژنهای *npt*II، *gus* و ژن مقاومت به هیگرومایسین استفاده گردید. بررسی هیستوشیمیایی *gus*، ساترن‌بلات و بررسی مقاومت به کانامایسین نتاج تراریختی و بیان ژن را تایید نمودند (Takasaki *et al*. 1997).

جنوبی (۲۰۰۴) شرایط باززایی گیاهچه را برای انتقال کاراتر ژن به دو رقم گیاه *B. napus* از طریق اگروباکتریوم بهبود بخشید و از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل برای باززایی و تراریختی استفاده نمود. فراوانی تراریختی، از طریق مقاومت به کانامایسین، از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱۱/۳٪ و در هیپوکوتیل ۸/۲٪ گزارش شد. با استفاده از مقاومت به کانامایسین، PCR، RT-PCR، لکه‌گذاری نقطه‌ای و آزمون *gus* تراریخت بودن گیاهچه‌های به دست آمده را تایید کردند (Jonobi 2004).

زبرجدی و همکاران (Zebarjadi *et al*. 2006) و *کهریزی* و همکاران (Kahrizi *et al*. 2007c) که به‌ترتیب ژن‌های β-ketoacyl-CoA synthase و EPSPS را به گیاه *B. napus* انتقال داده بودند، بهترین باززایی گیاهان تراریخت را از طریق اگروباکتریوم سویه LBA4404 و ریزنمونه کوتیلدون گزارش کردند. آن‌ها تراریختی را از طریق PCR، لکه‌گذاری نقطه‌ای و ساترن‌بلات تایید کردند.

تاثیر ژنوتیپ گیاه، ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم تومه فاشینس بر کارایی تراریختی گیاه کلزا در ایران بررسی گردید. گزارش شد که بین ارقام کلزا، ریزنمونه‌ها و سویه‌های اگروباکتریوم تومه‌فاشینس برای فراوانی تراریختی گیاه کلزا اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. مطابق با نتایج این پژوهش، رقم کلزا PF-7045-91 (با متوسط تراریختی ۱۰/۶۴٪)، ریزنمونه کوتیلدون (با متوسط تراریختی ۱۳/۵۳٪) و سویه LBA4404 (با متوسط تراریختی ۸/۷۸٪) برتری معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشته‌اند (Kahrizi *et al*. 2007a).

در مهندسی ژنتیک کلزا گزارش‌های متعدد دیگری هم وجود دارد. در اکثر این گزارش‌ها به بررسی کارایی دریافت ژن از سوی یک ژنوتیپ یا ریزنمونه خاص از کلزا (Moloney *et al*, 1989; Fry *et al*, 1987; Kahrizi *et al*, 2007; Takasaki *et al*, 1997) و یا کارایی یک سویه خاص از اگروباکتریوم برای انتقال ژن (Moloney *et al*, 1989, Kahrizi and Salmanian, 2008, Bhalla and Smith, 1998; Radke *et al*., 1988; Takasaki *et al*., 1997; Zebarjadi *et al*., 2006) پرداخته شده است.

برخی از پژوهش‌گران در پژوهش‌ها انتقال ژن به گیاهان مادری را مدتی تحت شوک سرمایی قرار می‌دهند تا ضمن هم‌زمان سازی چرخه سلولی، فراوانی تراریختی را هم افزایش دهند (مذاکره خصوصی با پژوهش‌گران) ولی هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر تاثیر مثبت شوک سرمایی بر روی فراوانی تراریختی در هیچ گیاهی وجود ندارد. هم‌چنین برای نگهداری مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم هم زمان دقیقی مشخص نگردیده و فقط برخی پژوهش‌گران (Moloney *et al*. 1989; Takasaki *et al*. 1997) به "چند لحظه" اشاره شده است. برخی نیز جهت تسریع کار فقط در حد ۲ ثانیه کوتیلدون را در محلول اگروباکتریوم نگه می‌دارند (مذاکره خصوصی با پژوهش‌گران). مسائل گفته شده در

رابطه با طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه هم صادق است. به‌طوری‌که برخی از پیش کشت استفاده کرده‌اند (Moloney *et al*. 1989; Kahrizi *et al*. 2007) و برخی مستقیماً کار تلقیح را انجام داده‌اند (Radke *et al*. 1988; Takasaki *et al*. 1997). پس با توجه به این‌که در پژوهش‌های انجام شده تاثیر پیش تیمار سرمایی گیاهچه‌های مادری کلزا، مدت زمان تلقیح ریزنمونه در محلول اگروباکتریوم تومه‌فاشینس و طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه بررسی نشده است، در این پژوهش ضمن بررسی اثرات اصلی تیمارها (پیش‌تیمار سرمایی، طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس) به اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه آن‌ها بر روی انتقال ژن *gus* پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه DH5α به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد (Competent cells) و نگهداری پلاسمیدها استفاده شد. از باکتری خاکزی *Agrobacterium tumefaciens*، سویه LBA4404، جهت انتقال ژن به سلول‌های کلزا استفاده گردید. پلاسمید pBI121 (حامل ژن *gus*) به‌عنوان ناقل برای بیان ژن مورد نظر در سلول‌های گیاهی استفاده شد. شکل ۱ نمایی از بخش‌های مختلف پلاسمید pBI121 و نیز محل کلون کردن چندگانه (Multiple Cloning Site) آن‌را نشان می‌دهد.

سویه اگروباکتریوم LBA4404 در ساختار ژنوم خود دارای ژن مقاوم به استرپتومایسین و می‌باشد که از این آنتی‌بیوتیک نیز به عنوان نشان‌گر انتخابی این دو سویه آگروباکتریوم استفاده شد. محیط کشت گیاهی پایه مورد استفاده، محیط MS (Murashige & Skoog 1962) بود.

بذور کلزا (*Brassica napus*) رقم تجاری PF-7045-91 (رقم بهاره) مواد گیاهی این پژوهش را شامل می‌شود که از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. چون در تحقیقات قبلی بهترین رقم کلزا (PF-7045-91)، ریزنمونه (کوتیلدون) و سویه اگروباکتریوم (LBA4404) مشخص شده (Kahrizi *et al*. 2007a)، در این پژوهش هم از مواد فوق استفاده گردیده است.

به‌منظور تهیه DNAی ژنومی، از برگ‌های جوان و سبز گیاه کلزا استفاده شد. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Murray and Thampson 1980) انجام گـــردید. جهت آنالیز گیاهان تراریخت و اثبات حضور ساختار مورد نظر از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی مناسب استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده به شرح ذیل می‌باشد:

آغازگرهای رفتی (GUSF) و برگشتی (GUSR) با توالی‌های زیر برای تکثیر بخشی از ژن *gus*.

GUS F:Tm=62 ºC, 23 mer 5′ -GGT GGT CAG TCC CTT ATG TTA CG –3′
GUSR:Tm=57 ºC, 23 mer 5′ –CCG GCA TAG TTA AAG AAA TCA TG –3′

آغازگرهای رفتی (NPTF) و برگشتی (NPTR) با توالی زیر برای تکثیر ژن *npt*II.

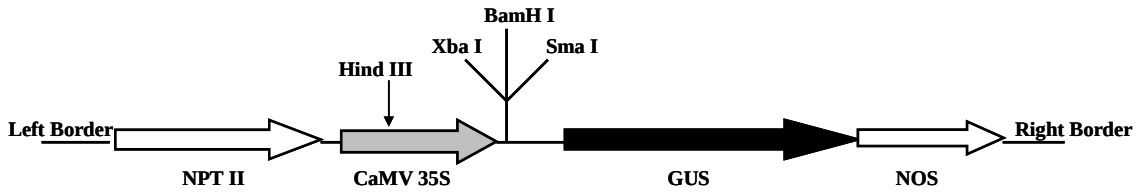
NPTF:Tm= 66.4 ºC, 26 mer 5′ -GTC GCC TAA GGT CAC TAT CAG CTA GC –3′
NPTR: Tm= 61.1 ºC, 24 mer 5′ –ATG TTT GAA CGA TCG GGG ATC ATG –3′

برای تراریختی باکتری، روش استاندارد انجماد و ذوب (Freeze and Thaw) و با استفاده از ۲۰mM CaCl2 و ازت مایع به کار گرفته شد (Sambrook & Russell 2001).

از آن‌جا که هر کدام از این باکتری‌ها در محیط دارای دو آنتی‌بیوتیک کشت داده شده‌اند، تا حدود زیادی می‌توان به دریافت پلاسمید pBI121 از سوی باکتری مطمئن شد، اما برای حصول اطمینان بیشتر چندین آزمون PCR نیز با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. به‌منظور اطمینان از بیان ژن انتقالی، سنجش بیوشیمیایی *gus* انجام شد.

تهیه گیاه و عملیات کشت بافت

قبل از شروع عملیات انتقال ژن، سیستم کشت بافت بهینه‌سازی شد. در این پژوهش از ریزنمونه کوتیلدون استفاده شد. برای این منظور بذور با استفاده از محلول هیپو کلریت سدیم ۱/۵٪ به علاوه چند قطره تریتون (X-100) ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه با تکان دادن، استریل شدند. بذور پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت جامد جوانه‌زنی حاوی نصف نمک‌های محیط MS کشت و در اتاق رشد با زمان نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۵°C نگهداری شدند. کوتیلدون‌های گیاهچه‌های ۵ روزه با حذف جوانه انتهایی، جدا شدند. سپس دمبرگ‌ها در عمق ۲ mm محیط القاء نوساقه با محیط پایه MS با ۴/۵ mg/l BAP، ۳۰ g/l ساکارز، pH ۸ و میزان ۸ g/l آگار کشت شدند.



شکل ۱: پلاسمید pBI121، خصوصیات کلی و محل کلون کردن چندگانه آن (Kahrizi and Salmanian, 2008)
Fig. 1 T-DNA and multiple cloning site regions in pBI121 plasmid (Kahrizi & Salmanian, 2008)

جهت رشد بهتر، ریزنمونه‌های کوتیلدون کشت شده به فاصله زمانی هر ۱۰ روز یک‌بار به محیط کشت جدید واکشت شدند. به فاصله حداقل دو هفته پس از کشت کوتیلدون‌ها در محیط MS حاوی BAP، نوساقه‌های متعددی از آن‌ها تشکیل گردید. نوساقه‌ها پس از شمارش، به محیط‌های کشت طویل شدن که فاقد هورمون می-باشد (شامل محیط پایه MS، ۲۰ g/l ساکارز، pH ۸ و میزان g/l ۷ آگار) منتقل شدند. پس از این‌که طول نوساقه به اندازه مناسب رسید، به محیط ریشه‌زایی نوساقه منتقل شدند. این محیط نیز شامل محیط پایه MS، ۲ mg/l IBA، ۲۰ g/l ساکارز، pH ۸ و میزان g/l ۷ آگار بود.

انتقال ژن به گیاه کلزا به روش اگروباکتریوم

از کشت شبانه اگروباکتریوم حامل پلاسمید مورد نظر (OD650=1)، از طریق سانتریفیوژ (۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) رسوب تهیه و در محیط همکشتی (MS مایع، ۳۰ g/l ساکارز و pH ۵/۲) حل گردید. گیاهچه‌های ۵ روزه قبل از تهیه ریزنمونه از آن‌ها به صورت بدون پیش‌تیمار سرمایی (شاهد) و پیش‌تیمار سرمایی در دمای ۴°C به مدت ۱۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند.، ابتدا کوتیلدون‌ها به مدت زمان‌های صفر (شاهد)، ۲۴ یا ۴۸ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (MS، ۴/۵ mg/l BAP، ۳۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار) پیش کشت شده و سپس دمبرگ آن‌ها به مدت زمان‌های ۲، ۱۰، ۲۰ یا ۴۰ ثانیه در محیط هم‌کشتی حاوی اگروباکتریوم قرار داده شد. سپس این کوتیلدون‌ها در محیط القای نوساقه کشت داده شدند و به مدت زمان ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفت. پس از شستشوهای لازم ریزنمونه‌ها، با آب مقطر استریل، به محیط گزینش‌گر القاء نوساقه (MS، ۴/۵ g/l BAP، ۳۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار)، که حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم بود، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز یک‌بار به محیط مشابه واکشت شدند. تعدادی از نوساقه‌های تولید شده بر روی محیط گزینش‌گر فوق، سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به‌علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند. به‌نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده، پلاسمید pBI121 را دریافت نموده‌اند.

پس از شمارش و ثبت اطلاعات مربوط به درصد باززایی گیاه سبز، نوساقه‌های سبز باززایی شده بر روی محیط گزینش‌گر جدا شده و به محیط طویل شدن منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه ها، نمونه‌ها به محیط القاء ریشه (MS، ۲ mg/l IBA، ۲۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار به علاوه آنتی‌بیوتیک‌های فوق) انتقال داده شدند.

برای محاسبه فراوانی تراریختی از نسبت تعداد گیاهان تراریخت فرضی (Putative transgenic plant) به کل ریزنمونه‌های به‌کار رفته، استفاده شد. در بین گیاهان سبز باززایی شده که به-نظر تراریخت بودند، آزمون‌های PCR با پرایمرهای تخصصی و سنجش بیوشیمیایی gus انجام شد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با ارتفاع حدود ۱۰cm، به گلدان‌های کوچک با خاک استریل (ترکیب یکسانی از پیت، ورمی‌کولیت و پرلیت) منتقل شدند. نمونه‌های تراریخت تا زمان استقرار کامل و سازگاری با شرایط گلدانی، با محیط مایع حاوی نصف نمک‌های MS آبیاری شدند. پس از سازگاری تدریجی، به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند. این گیاهچه در گلخانه کنترل شده با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و دمای ۲۵°C در روز و ۱۵°C در شب منتقل شدند و تا زمان بذرگیری در همان شرایط باقی ماندند. در این پژوهش از آزمون‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی برای اثبات انتقال ژن و از سنجش بیوشیمیایی *gus* (Jefferson *et al*. 1987) به منظور آنالیز باکتری حاوی پلاسمید و گیاهان تراریخت و اطمینان از بیان ژن انتقالی استفاده گردید.

تیمارها، طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای مورد استفاده

عبارتند از: فاکتور اول: پیش تیمار سرمایی گیاهچه‌های ۵ روزه در دمای $4^{o}C$، در دو سطح (شاهد و ۱۲ ساعت). فاکتور دوم: مدت زمان پیش‌کشت کوتیلدون در محیط کشت نوساقه زایی در ۳ سطح (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) که این فاکتور قبل از آلودگی با اگروباکتریوم اعمال شد. فاکتور سوم: مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم در ۴ سطح (۲، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه). متغیر وابسته در این پژوهش فراوانی تراریختی گیاه کلزا از طریق انتقال ژن گزارش‌گر *gus* بود.

کلیه داده‌های به‌دست آمده، با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه آماری شدند. برای تبدیل داده‌ها و نرمال نمودن توزیع آن‌ها از داده زاویه‌ای Arcsin $\sqrt{X}$ استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

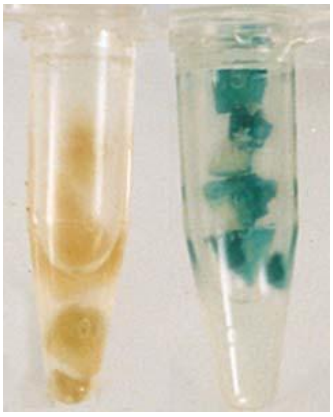
نتایج و بحث

آزمون سنجش بیوشیمیایی *gus* جهت اثبات حضور و بیان این ژن در گیاه کلزا

برای اثبات حضور و بیان ژن *gus* در گیاهان تراریخت، از آزمون PCR و سنجش بیوشیمیایی *gus* استفاده شد. نتیجه آزمون سنجش بیوشیمیایی *gus* در باکتری اگروباکتریوم و بافت گیاه به‌صورت مشاهده رنگ آبی (در بافت گیاه تراریخت) و رنگ شفاف یا شیری (در گیاه شاهد) بود (شکل ۲). این آزمون برای ده گیاه تراریخت فرضی مثبت نشان داده شد. نتیجه آزمون PCR در انتهای مقاله آورده شده است.

با بیان ژن *gus* در اگروباکتریوم، می‌توان مطمئن شد که پروموتر CaMV 35S و ترمیناتور nos مشکلی نداشته و از فعالیت خوبی برخوردار است. پلاسمیدpBI121 یک ناقل دوگانه، واجد ژن گزارش‌گر *gus* (یا β-گلوکورونیداز) و پروموتر قوی CaMV 35S می‌باشد. هم‌چنین pBI121 واجد دو محل همانندسازی برای *E. coli* و *Agrobacterium* است. بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک ناقل دوگانه نیز عمل کند (Chen *et al* 2003).

در سنجش بیوشیمیایی *gus* در برگ گیاهان تراریخت، آبی شدن بافت برگ‌ها مشاهده گردید ولی در برگ گیاه شاهد، این واکنش رخ نداد. با این سنجش بیوشیمیایی، می‌توان از روش انتقال ژن (که با میانجی‌گری اگروباکتریوم بوده) اطمینان حاصل نمود.



شکل ۲: سنجش بیوشیمیایی *gus* جهت اطمینان از بیان این ژن در گیاه کلزا تراریخت (راست) و عدم بیان آن در گیاه شاهد (چپ)

Fig 2: Biochemical *gus* assays. Gene expression and no gene expression in transformed (right) and non-transformed (left) rapeseed respectively

نتایج حاصل از طرح آزمایشی

جدول ۱ نتیجه حاصل از آزمون تجزیه واریانس با حداقل خطا (C.V. = %۱) برای پیش تیمار سرمایی، مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه-فاشینس و طول دوره پیش-کشت ریزنمونه و اثرات متقابل آن-ها، برای فراوانی باززایی گیاه تراریخت نشان می‌دهد. نتایج این تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین گیاهان شوک سرمایی دیده با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. این نتیجه نشان می‌دهد که پیش تیمار سرمایی با وجود این‌که باعث هم‌زمان سازی چرخه سلولی سلول‌ها می‌شود و باعث بهبود پاسخ در بسیاری از آزمایش‌های کشت بافت گیاهی می‌شود (Kahrizi *et al*. 2007b)، ولی این هم‌زمان سازی تاثیری بر فراوانی تراریختی ندارد.

تجزیه واریانس نشان‌داد که بین سطوح مختلف عوامل طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه و مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد، ولی بین اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه سطوح مختلف عوامل مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. با توجه به این‌که تا کنون گزارشی در این زمینه ارائه نشده، امکان مطابقت این نتایج وجود ندارد.

مقایسه میانگین‌های سطوح عوامل مورد بررسی، توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین پیش تیمار سرمایی و شاهد برای فراوانی تراریختی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید که با نتایج تجزیه واریانس مطابقت دارد.

در بخش مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان پیش کشت در محیط کشت نوساقه زایی، نتایج نشان داد که دلیل اختلاف معنی دار بین سطوح مختلف این عامل، استفاده از سطح بدون پیش کشت (شاهد) می باشد که فراوانی تراریختی بسیار پایین تری (۲/۷۰٪) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۲۳٪) دارد. بین مدت زمان نگهداری ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری برای فراوانی تراریختی وجود ندارد. گرچه این دو مدت زمان، بیشترین تاثیر را بر فراوانی تراریختی دارند. پس بهتر است برای صرفه‌جویی در وقت و انجام کار بیشتر از مدت زمان ۲۴ ساعت استفاده شود.

دلیل پایین بودن فراوانی تراریختی در حالتی‌که بلافاصله پس از برش کوتیلدون، وارد فرآیند آلودگی و انتقال ژن می‌شود (بدون پیش‌کشت) را می‌توان به صورت ذیل بحث نمود. چنان‌چه پس از قطع کردن کوتیلدون، مستقیماً توسط اگروباکتریوم آلوده شود، با توجه به این‌که میزان مواد فنولیک ترشح شده از ریزنمونه به حد لازم نبوده، در نتیجه اثر متقابل قابل قبولی بین مواد و عوامل اگروباکتریوم و مواد فنولیک وجود نخواهد داشت، در نتیجه فراوانی تراریختی بسیار کاهش می‌یابد. وجود بافت زخمی و ترشح مواد فنولیک (به‌ویژه استوسیرینگون) شرط اولیه تراریختی به‌واسطه اگروباکتریوم می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که فرصت بیش از ۲۴ ساعت به کوتیلدون، باعث افزایش تراریختی نمی‌شود و کوتیلدون در همان زمان ۲۴ ساعت میزان مواد فنولیک مورد نیاز جهت تراریختی با اگروباکتریوم را بیوسنتز می‌کند. در برخی گزارش‌ها استوسیرینگون را به محیط کشت اضافه نموده‌اند (جنوبی، ۱۳۸۳)، این در حالی است که طبق نتایج این پژوهش با یک فرصت ۲۴ ساعته به ریزنمونه، نیازی به صرف هزینه برای این مواد نمی‌باشد.

در قسمت مقایسه میانگین سطوح مختلف عامل مدت زمان تلقیح کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم مشاهده می‌گردد علت معنی‌دار شدن این عامل، استفاده از سطح ۲ ثانیه می‌باشد که فراوانی تراریختی بسیار پایین‌تری (۴/۴۳٪) نسبت به سایر سطوح (بیش از ۲۰٪) دارد. بین سه سطح تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. این نشان دهنده این است که اگروباکتریوم جهت اتصال و هجوم به بافت بریده شده اگروباکتریوم یک حد آستانه حداقل نیاز دارد که ۲ ثانیه برای آن بهینه نمی‌باشد ولی پس از ۱۰ ثانیه این امر اتفاق می‌افتد. با توجه به این که بین سطوح تلقیح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ثانیه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، می توان نتیجه گرفت که چنان‌چه از ۱۰ ثانیه استفاده شود به دلایلی هم‌چون هر چه زمان کم‌تر مورد استفاد قرار گیرد، علاوه بر صرفه‌جویی در زمان، امکان آلودگی کشت‌ها به سایر عوامل پاتوژن کاهش می‌یابد.

جدول ۱: تجزیه واریانس پیش‌تیمار سرمایی، مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس و طول دوره پیش کشت ریزنمونه برای فراوانی باززایی گیاه تراریخت

Table 1. Analysis of variance of transformation frequency in different cold pretreatments, *Agrobacterium* inoculation periods and preconditioning in rapeseed

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)	1	0.033 ^{ns}
مدت زمان پیش کشت (Preconditioning periods)	2	180.200 **
مدت زمان تلقیح (Inoculation periods)	3	188.200 **
CP ×PP	2	0.080 ^{ns}
CP × IP	3	0.072 ^{ns}
IP × PP	6	0.058 ^{ns}
CP × IP × PP	6	0.061 ^{ns}
خطای آزمایش Error	72	0.028
پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)	95	%C.V. = 1%

**: دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ (Significant P<0.1) ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار (Non-significant)

جدول ۲: مقایسه میانگین سطوح مختلف عوامل مدت زمان تلقیح در اگروباکتریوم تومه‌فاشینس و طول دوره پیش کشت کوتیلدون برای فراوانی تراریختی کلزا

Table2: Mean comparison of different cold pretreatments, *Agrobacterium* inoculation periods and preconditioning on transformation frequency in rapeseed

تیمار (Treatment)	فراوانی تراریختی (Transformation frequency)
پیش تیمار سرمایی (Cold pretreatment)	
بدون پیش تیمار (Control)	17.00 a
۱۲ ساعت (12 h)	16.66 a
مدت زمان پیش کشت (Preconditioning period)	
بدون پیش کشت (Control)	2.70 b
۲۴ ساعت (24 h)	24.21 a
۴۸ ساعت (48 h)	23.55 a
مدت زمان تلقیح (Inoculation periods)	
۲ ثانیه (2 s)	5.76 b
۱۰ ثانیه (10 s)	20.50 a
۲۰ ثانیه (20 s)	20.63 a
۴۰ ثانیه (40 s)	20.54 a

حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است.

Means in each column, followed by the different letters are not significantly different at the 1% probability

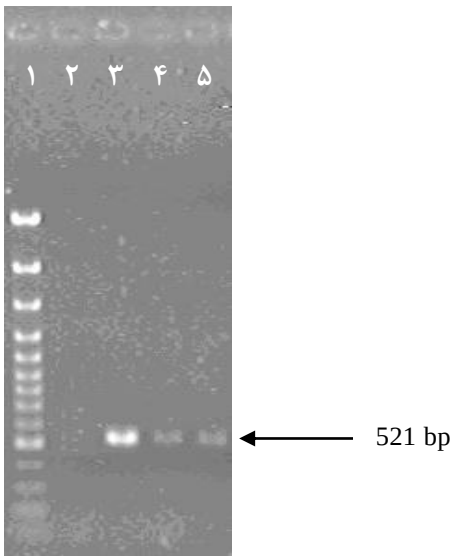
با مدت زمان کم‌تر، امکان آسیب‌های وارده به بافت ریزنمونه (به دلیل فشار پنس برای نگهداری آن) کم‌تر شده و در یک مدت محدود، تعداد ریزنمونه بیشتری را می‌توان تلقیح نمود. علاوه بر این موارد، هنگام تلقیح کوتیلدون به محلول اگروباکتریوم باید توجه نمود که فقط انتهای بریده آن آلوده شود، چون‌که آلوده شدن برگ لپه‌ای شکل، منجر به نکروزه شدن و خشک شدن آن می‌شود. با مدت زمان تلقیح کمتر، آلودگی ریزنمونه به اگروباکتریوم کم‌تر شده و نیازی جهت شستشوی مرتب با محلول سفوتاکسیم نمی‌باشد. چنان‌چه مدت زمان زیادتری در اختیار اگروباکتریوم-ها قرار داده شود، احتمال تراریختی یک سلول توسط چند اگروباکتریوم یا احتمال تراریختی مجدد توسط همان اگروباکتریوم، افزایش یافته و در این صورت تعداد نسخه‌ها انتقالی بیش از یک ژن شده و ممکن است باعث کاهش بیان شود (Bhalla & Smith 1998).

آزمون PCR جهت اثبات حضور ژن در گیاه کلزا

پس از تولید گیاهچه‌های ریشه‌دار نسل T0 و چندین مرتبه گزینش بر روی محیط‌های کشت حاوی کانامایسین، آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت انجام شد. برای اثبات حضور در گیاهان تراریخت، از آزمون PCR استفاده شد. در واکنش PCR، همان‌طور که انتظار می‌رفت، قطعه ۵۲۱ bp مشاهده گردید (شکل ۳).

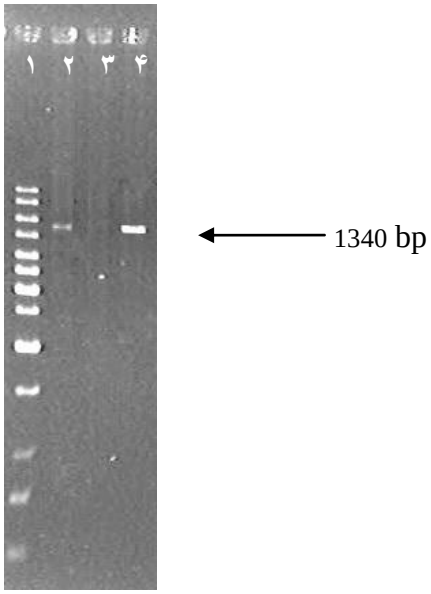
به‌منظور اثبات تراریختی گیاه شاهد با پلاسمید pBI121، علاوه بر حضور ژن *gus*، وجود ژن مقاومت به کانامایسین نیز در گیاه ارزیابی شد. به این منظور با استفاده از PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی (NPTF, NPTR)، حضور این قطعه از پلاسمید pBI121 در گیاه اثبات شد. این آزمون برای ده گیاه تراریخت فرضی مثبت نشان داده شد. نتیجه این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است.

اگر چه حضور و بیان این ژن قبلاً از طریق رشد گیاهچه‌های سبز بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین تا حدودی به اثبات رسیده بود ولی در گزینش گیاهان بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار گیاهچه‌های غیرتراریخت وجود دارد. برای این منظور از آزمون فوق استفاده شد.



شکل ۳: محصول آزمون PCR برای اثبات حضور ژن *gus* و پلاسمید pBI121 در گیاه کلزا.
خط۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط۲: محصول PCR گیاه غیر تراریخت (کنترل منفی). خط۳: محصول PCR از پلاسمید pBI121 (کنترل مثبت)، خطوط۴ و ۵: محصول PCR گیاهان تراریخت (۵۲۱ bp)

Fig 3: PCR product for *gus* gene and pBI121 in repeseed. Lanes include:1: 100 bp size marker, 2: PCR product in non-transgenic plant (negative control) and 3: PCR product in pBI121 (positive control). 4 and 5: PCR product (521 bp) in transgenic plants.



شکل ۴: اثبات حضور ژن *npt*II از طریق آزمون PCR
خط ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. خط۲: گیاه تراریخت با pBI121 تنها (۱۳۴۰ bp). خط ۳: شاهد منفی (DNA گیاه غیر تراریخت). خط۴: شاهد مثبت (پلاسمید pBI121)

Fig 4. PCR analysis for *npt*II. Lanes include:1: 100 bp size marker, 2: PCR product (1340 bp) in transgenic plant. 3: PCR product in non-transgenic plant (negative control), and 4: PCR product in pBI121 (positive control)

نکته قابل توجه در تراریختی کلزا، به‌کار گیری مقادیر بسیار محدودی از آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای گزینش گیاهان تراریخت است. تجربیات اولیه نشان می‌دهد که محدوده بین ۳۰-۱۵ mg/l، برای این گیاه کافی است. افزایش این مقدار حتی موجب حذف گیاهان تراریخت نیز می‌گردد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵۷-۵۸ متن انگلیسی مراجعه شود.

Effect of Cold Pretreatment and Period of Preconditioning Inoculation on Transformation Frequency in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

Kahrizi[1]*, D., Zebarjadi[1], A. R. and Salmanian[2], A. H.

Absteract

Genetic engineering in rapeseed will lead to the generation of plant varieties possessing more agriculturally and economically viable genetic traits. The most gene transformations to rapeseed have been done through *Agrobacterium tumeifaciens* method. *Agrobacterium* mediated transformation is depend on many parameters that must be optimized. The purpose of this study was to determine the effect of cold pretreatment (control and 12 h) among a 5 day old-plantlets with preconditioning period (0, 24 and 48 h) and inoculation period of explants in *Agrobacterium* solutions (2, 10, 20 and 40 s) on the *gus* reporter gene transformation frequency in Rapeseed. The experimental design was factorial on basis of completely randomized design (CRD) with four replications. The gene was transferred to a commercial cultivar rapeseed (PF-7045-91) via *A. tumeifaciens* (LBA4404 strain) mediated transformation method. Moreover, using PCR technique and *gus* assay, the presence and expression of genes in plants were confirmed. Statistical analysis revealed that there was no significant difference between cold pretreatment and control group. Moreover, the all interaction effects were not significant. Results also demonstrated that there was a significant difference among preconditioning and inoculation period levels for transformation efficiency. The highest effect on transformation efficiency was observed through 24 and 48 h preconditioning periods (with same effects and means 24.21 and 23.55%) and 10, 20 and 40 s inoculation periods (with same effects and means 20.50, 20.63 and 20.54%) respectively.

Keywords: Rape, Cold pretreatment, *Agrobacterium tumeifaciens*, Explants preconditioning

References

Bhalla, P. L. and Smith, N. 1998. Agrobactrium tumefaciens-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. botrytis. Molecular breeding 4: 531-541.

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

De Block M., De Brouwer, D. and Tenning, P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and Brassica oleracea using Agrobacterium tumeifaciens and the expression of bar and neo genes in transgenic plants. Plant Physiology 91: 694-701.

Fry, J., Barnason, A. and Horsch, R. 1987. Transformation of Brassica napus with *Agrobacterium* based vectors. Plant Cell Reports 6: 321-325.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. V. 1987. Gus fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal 6: 3901-3907.

Jonobi, P.2003. In vitro optimization and transformation of EPSPS gene to rapeseed via Agrobacterium. Ph. D. Thesis. Tarbiat Moalem University. P 194.

Kahrizi D., Arminian, A., and Masomi Asl A. 2007b. B. In Vitro Plant Breeding. Razi University Publications.

Kahrizi, D. and Salmanian, A.H. 2008. Substitution of Ala183Thr in aroA Product of E. coli (k12) and Transformation of Rapeseed (*Brassica napus*) with Altered Gene Confers Tolerance to Roundup. Transgenic Plant Journal 2(2): 170-175.

Kahrizi, D., Salmanian, A.H and Zebarjadi A. 2007a. A. Effect of plant genotype, explant and *Agrobacteriun* strain on transformation efficiency in rapeseed (*Brassica napus* L.). Modern Genetics Journal. 2(3): 53-62.

Kahrizi, D., Salmanian, A.H., Afshari, A., Moieni, A. and Mousavi, A. 2007c. 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 Rep 26: 95-104.

Moloney, M. M., Walker, J. M. and Sharma, K. K. 1989. High efficiency of *Brassica napus* using Agrobacterium vectors. Plant Cell Reports 8: 238-242.

Murashige, T. and skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology., 15: 473-497.

Murray, M.G. and Thampson, W.F.1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research 8: 4321-4325.

Radke, S. E., Andrew, B. M., Moloney, M. M., Crouch, M. L., Kridl, J. C. and Knauf, V. C. 1988. Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*: development regulated expression of reintroduced napin gene. Theoretical Applied Genetics 75: 685-694.

1. Assistant Professors, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah

2. Associate Professor, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Tehran

∗: Corresponding author

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Pp 12.1-12.114.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Ojima, K., Watanabe, M., Toriama, K. and Hinata, K. 1997. Factors influencing *Agrobacterium* –mediated transformation of *Brassica napus* L. Breeding Sciences 47: 127-134.

Zebarjadi, A. R., Jalali, J. M,. Karimzadeh, Gh., Moeini, A., Mousavi, A. and Salmanian, A. H. 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.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 27-34= ۲۷-۳۴).