فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2017.13899.1348

بهینه‌سازی متغیرهای انتقال ژن توسط تفنگ ژنی با انتقال ژن کدکننده‌ی موتان‌سوکراز (*gtf*I) به نیشکر

Optimization of Biolistic-mediated Gene Transfer Parameters by Transferring a Mutansucrase (*gtf*I) Coding Gene in Sugarcane

مریم احمدی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲*]، احمد اسماعیلی[۳] و بیژن باجلان[۴]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۲۱

چکیده

نیشکر (*Saccharum officinarum*) مهم‌ترین گیاه صنعتی تولیدکننده‌ی ساکارز در دنیا می‌باشد. کشت بافت و تراریختی این گیاه با چالش‌هایی مواجه است که نیازمند بهینه‌سازی است. در این تحقیق، ژن کدکننده‌ی موتان‌سوکراز (*gtfI*) از باکتری *Streptococcus downei* جداسازی، همسانه‌سازی و به نیشکر انتقال داده شد. در روش تفنگ ژنی فاصله ۹ سانتی‌متر پرتاب ژن از ریزنمونه نسبت به فاصله ۱۲ سانتی‌متر بهتر و اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) را نشان داد. هم‌چنین استفاده از ترکیب سوربیتول و مانیتول برای حفظ فشار اسمزی کالوس‌ها درصد تراریختی را به‌طور معنی‌داری ($P\leq0.01$) بالا برد. ترکیب هورمونی IBA و NAA بهترین کارآیی را در ریشه‌دار کردن گیاهان تراریخت نشان داد. تجزیه قند گیاهان تراریخت حاصل از دو مرحله زیرکشت، نشان داد که میانگین پارامتر پل (میزان ساکارز) در هر دو لاین تراریخت نسبت به شاهدهای مربوطه با کاهش قابل ملاحظه‌ای در حدود ۳۰ درصد همراه بود. این موضوع نشان می‌دهد که آنزیم موتان‌سوکراز به خوبی در لاین‌های تراریخت نیشکر بیان شده و توانسته است این میزان قند را مصرف کند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه قند، تراریختی، نیشکر، انتقال ژن، گلیکوزیل ترانسفراز

۱، ۲، ۳ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
*: نویسنده مسوول Email: nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

نیشکر (*Saccharum officinarum*) گیاهی تک‌لپه، صنعتی و مهم از خانواده گرامینه و یکی از ده گیاه زراعی مهم دنیا است *اینگلبرچت* و همکاران (Ingelbrecht *et al*., 1999) که عموماً در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری برای تولید شکر، کاغذ، خوراک دام، کود، اتانول زیستی و مالچ کشت می‌شود. نیشکر گیاهی C_4 است که ساکارز بیش از ۲۰ درصد وزن تر یا بیش از ۵۰ درصد وزن خشک بافت میان‌گره‌ای ساقه آن را تشکیل می‌دهد *کومور* و همکاران؛ *را* و همکاران (Komor *et al*., 1981; Rae *et al*., 2005) و بر این اساس بین ۷۰-۶۰ درصد از شکر تولیدی جهان را تأمین می‌کند *مینگ* و همکاران (Ming *et al*., 2006). در مقایسه با سایر گیاهان زراعی مهم، میزان پیشرفت به‌نژادی به روش‌های سنتی در این گیاه به دلایلی چون خزانه ژنی فقیر، تولید و باروری جنسی اندک، ماهیت پیچیده‌ی پلی‌پلوئیدی و زمان ۱۲-۱۵ ساله اصلاح به روش سنتی، بسیار پایین است *لاکش مانان* و همکاران (Lakshmanan *et al*., 2005).

بیوتکنولوژی گیاهی، به‌ویژه روش‌های انتقال ژن، در دو دهه اخیر گام‌های قابل‌توجهی برای به‌نژادی گیاهان زراعی به‌خصوص گیاهان تک‌لپه‌ای برداشته است. اگرچه گزارش‌هایی از انتقال ژن به روش اگروباکتری (*Agrobacterium*) در گیاه نیشکر وجود دارد، اما تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از این روش در این گیاه مشکل و وابسته به ژنوتیپ است *جویس* و همکاران؛ *جکسون* و همکاران (Joyce *et al*., 2014; Jackson *et al*., 2013). بنابراین به نظر می‌رسد که انتقال ژن به‌وسیله تفنگ ژنی (Biolistic) در گیاهان سرسخت (Recalcitrant) در مقابل آلودگی آگروباکتری و در گیاهان تک‌لپه مانند ذرت، *فریم* و همکاران(Frame *et al*., 2000)، گندم *ژائو* و همکاران (Zhao *et al*., 2000)، برنج *کارسونو و یوشیدا* (Carsono and Yoshida, 2008)، جو *منگ* و همکاران (Meng *et al*., 2009) و نیشکر *باور* و همکاران (Bauer *et al*., 2012) کارآیی بهتری از خود نشان دهد.

ارقام نیشکر هتروژن، پلی‌پلوئید و گاهی انیوپلوئید هستند و ازاین‌رو تنها توسط قلمه تکثیر می‌شوند *بهرا و ساهو* (Behera and Sahoo, 2009). یکی از مزیت‌های کشت بافت به‌عنوان یک روش تکثیر غیرجنسی این است که گیاهانی با کیفیت بالا و یک‌دست تولید و تحت شرایط استریل تکثیر می‌شوند *مرکل* (Merkle, 1990). از ریزنمونه‌های متعددی از جمله نوک مریستم *وو* و همکاران (Wu *et al*., 2015)، کالوس جنین‌زا *فالکو* و همکاران (Falco *et al*., 2000)، برش‌های نارس ساقه *تاپاریا* و همکاران (Taparia *et al*., 2012) برای تولید گیاهان تراریخت با استفاده از روش تفنگ ژنی استفاده شده است. با این حال، به نظر می‌رسد که میزان باززایی در مقایسه با گیاهان دولپه پایین است. فاکتورهای متعددی روی میزان کارآیی تراریختی مؤثر هستند. ژنوتیپ منبع ریزنمونه یکی از فاکتورهای مهم در باززایی گیاهان است *ژاله* و همکاران (Zale *et al*., 2004). به‌عنوان مثال، تحقیقات نشان می‌دهد که میزان موفقیت تراریختی تا حد زیادی به ژنوتیپ وابسته است و در صورت استفاده از آگروباکتری باید ژنوتیپ‌ها و نژادهای متعددی از آگروباکتری را مورد بررسی قرار داد *آرنسیبیا* و همکاران؛ *جویس* و همکاران (Arencibia *et al*., 1998; Joyce *et al*., 2010). بااین‌حال، برای تولید گیاه تراریخت در نیشکر تفنگ ژنی برای بسیاری از ژنوتیپ‌ها کاربرد دارد، اما استفاده از این روش نیازمند بهینه‌سازی برای ژنوتیپ‌های خاص است *آلپتر و اورابی* (Altpeter and Oraby, 2010).

نیشکر یکی از مهم‌ترین گیاهان ایران است که سهم مهمی در تغذیه جامعه بازی می‌کند. بر اساس آمار سال زراعی-۱۳۹۳ ۱۳۹۴، از کل محصول تولید شکر کشور نیشکر با ۵۵/۰۳ درصد در رتبه نخست است *بی‌نام* (Anonymous, 2016). میزان شکر تولیدی از این گیاه در سال ۱۳۹۴ در حدود ۸۰۰ هزار تن بوده است که با احتساب هر تن ۷۰۰ دلار، ارزشی معادل ۵۶۰ میلیون دلار داشته است. بدیهی است به دلایل مشکلات به‌نژادی سنتی، برای بهبود ژنتیکی این گیاه، باید از راهکارهای انتقال ژن سود برد. برای سود جستن از هرگونه روش انتقال ژن، بهینه‌سازی یک دستورکار کارآمد و قابل تکرار با استفاده از ارقام مهم زراعی کشور، ضروری است و ازاین‌رو هدف اصلی این مطالعه است. در این مطالعه برای اولین بار از یک ژن کدکننده‌ی گلیکوزیل ترانسفراز باکتریایی استفاده شد که آنزیمی برای تولید بیوپلیمر موتان تولید می‌کند. ازآنجایی‌که این آنزیم برای تولید این بیوپلیمر از ساکارز به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند، سنجش میزان قند می‌تواند محک خوبی برای ارزیابی کارآیی روش تفنگ ژنی باشد.

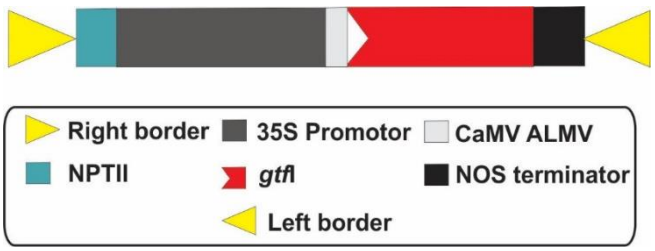
مواد و روش‌ها

همسانه‌سازی ژن

سازه بیانی *pBINPLUS/gtfI* به‌ترتیب از سر '۵ حاوی راه‌انداز عمومی (×3) 35S ویروس موزاییک گل‌کلم (CaMV)، توالی هدایت‌کننده‌ی ترجمه موسوم به ALMV مربوط به ویروس موزاییک یونجه؛ *تومر* و همکاران (Tumer *et al*., 1991)، توالی پایان‌دهنده NOS و توالی کامل ژن کدکننده‌ی موتان‌سوکراز (*gtfI*) از باکتری استرپتوکوکوس داونی (*Streptococcus*

downei) سویه *Mfe28* به شرح ذیل همسانه‌سازی شد (شکل ۱).

ابتدا ژن *gtfI* با آغازگرهای (رفت: 5`-CGCACCCGGGT CATATGACTGAAACTG-3` و برگشت: 5`-TTTCCCG GGTTAGTTCCAGCCACGGTA-3`) به کمک PCR تکثیر شد. هر دو آغازگر دارای جایگاه برش آنزیم *Sma*I، آغازگر رفت دارای کدون شروع ATG و آغازگر برگشت شامل کدون خاتمه TGA بودند. از آنزیم *Pfu* (2.5u/µl, Stratagene, UK) برای تکثیر ژن استفاده شد. محصول PCR در جایگاه برش *Sma*I/ ناقل pRAP33 همسانه‌سازی شد *شرفی* (Sharafi, 2012). پس از همسانه‌سازی ژن *gtfI* در ناقل همسانه‌سازی pRAP33 ، برای اطمینان از صحت همسانه‌سازی، توالی‌یابی به روش سانگر صورت گرفت. سپس ناقل pRAP33/*gtfI* حاوی ژن *gtfI* توسط دو آنزیم *Asc*I و*Eco*RI به‌گونه‌ای برش داده شد تا کل قطعه حاوی راه‌انداز، ژن *gtfI* و خاتمه‌دهنده‌ی NOS را در برگیرد. در مرحله بعد قطعه فوق در جایگاه *Sma*I/*Sma*I ناقل بیانی pBINPLUS *ون انگلن* و همکاران (van Engelen *et al*., 1995) همسانه‌سازی گردید تا ناقل بیانی *pBINPLUS/gtfI* تولید شود.



شکل ۱: تصویر شماتیک سازه بیانی *pBINPLUS/gtfI*. از این سامانه برای تراریختی استفاده شد. از مرز چپ تا مرز راست عناصر متعددی قرار دارند که مشخصات آن‌ها در کادر مشخص شده است. اندازه عناصر با اندازه واقعی آن‌ها تطابق ندارد

Fig. 1: Schematic representation of the construct and the T-DNA region of the pBINPLUS binary expression vectors used in this study. The T-DNA from the right border (RB) to the left border (LB) consists of different elements shown in the box. The relative size of the different components presented in the Fig do not reflect their actual relative sizes

مواد گیاهی

در این پژوهش از قلمه‌های دو رقم CP 57-614 و CP 48-103 مرکز تحقیقات امیرکبیر خوزستان استفاده شد. این دو رقم تجاری در سطح وسیع برای استخراج شکر در ایران و دنیا کشت می‌شوند. شجره این ارقام پیچیده و شامل تعداد زیادی والد و نسل‌های بسیاری است *هینز* (Heinz, 1987).

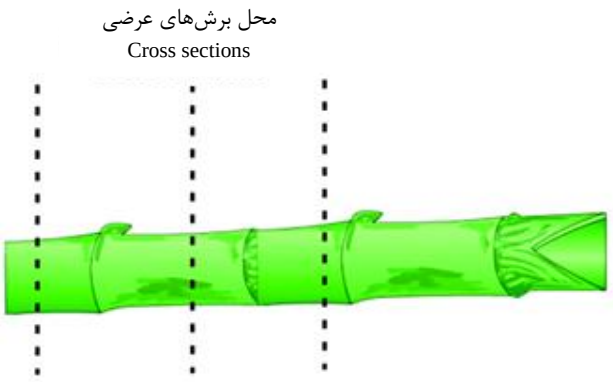
کشت بافت و تهیه ریزنمونه

قلمه‌ها از گیاهان جوان با عمر شش ماه تهیه شدند. برگ‌های اضافی این قلمه‌ها چیده شدند. سپس، قلمه‌های حاوی مریستم انتهایی فعال و برگ‌های اطراف آن، با آب استریل شستشو داده شدند. در مرحله بعد، قلمه‌ها در هیپوکلرید سدیم چهار درصد برای مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و در ادامه سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. لایه‌های برگی اطراف قلمه‌ها حذف شدند تا قسمت لوله‌ای برگ قابل مشاهده شود. برای حذف مواد فنولی، قلمه‌ها به مدت دو ساعت در یک محلول آنتی‌اکسیدان (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک) تیمار شدند. در ادامه ریزنمونه‌های لوله برگی در زیر هود در کلراید جیوه ($HgCl_2$) برای ۱۲-۱۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس قلمه‌ها سه بار با آب استریل شستشو و با کاغذ صافی استریل خشک شدند. ریزنمونه‌ها به قطر دو میلی‌متر از ۱۰ سانتی‌متر بالاتر از مریستم رأسی تهیه شدند (شکل ۲). ریزنمونه‌ها به محیط‌کشت *موراشیگ* و *اسکوگ* (MS)، *موراشیگ* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای القای کالوس‌زایی منتقل شدند. ریزنمونه‌ها در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه در تاریکی نگهداری شدند. بعد از ظهور کالوس‌های جنین‌زا، از آن‌ها برای انتقال ژن توسط تفنگ ژنی (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) و یا اگروباکتری استفاده شد.

انتقال ژن به روش اگروباکتری

پلاسمید *pBINPLUS/gtfI* به آگروباکتری‌های دو سویه LBA-4404 و GV-3101 به روش شوک کلسیمی (Freeze- thaw method) *مانیاتیز* و همکاران (Maniatis *et al*., 1982) منتقل شد. ابتدا مقدار ۴ میکرولیتر پلاسمید (۱۵ng/µl) با مقدار ۵۰ میکرولیتر اگروباکتری روی یخ اضافه شد و مخلوط برای ۳۰ دقیقه رها شد. سپس مخلوط باکتری و پلاسمید به‌مدت دو دقیقه در حمام آب گرم ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک داده شد و بلافاصله به مدت دو دقیقه روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد

به این مخلوط مقدار یک میلی‌لیتر محیط LB اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس آگروباکتری‌های حاوی سامانه ژنی، در محیط‌کشت جامد LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین کشت شدند. از این آگروباکتری‌ها برای انتقال ژن به ریزنمونه‌ها استفاده شد. یک تک کلنی از کشت جامد هر کدام از آگروباکتری‌ها انتخاب و در فالکن حاوی ده میلی‌لیتر محیط مایع LB کشت داده شد. فالکن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر نگه داشته شد. بعد از ۳۰ ساعت، محیط‌کشت حاوی باکتری با ۴۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ته‌نشین در محیط مایع MS حل شد و تا رسیدن به OD حدوداً ۰/۶ تا ۰/۷ در داخل شیکر قرار داده شد. کالوس‌های جنین‌زا در محیط MS مایع حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس کالوس‌های آلوده به آگروباکتری بر روی کاغذ صافی استریل خشک و به محیط‌کشت انتخابی MS حاوی ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. ریزنمونه‌ها به محیطی با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای باززایی و گزینش منتقل شدند.



شکل ۲: یک قلمه جوان نیشکر همراه با محل تهیه ریزنمونه‌های ساقه
Fig. 2: A young sugarcane stem showing the position of dissected leaf role explants

انتقال ژن به روش تفنگ ژنی

ذرات طلا (با قطر ۱ میکرومتر) با DNA پلاسمیدی (*pBINPLUS/gtfI*) توسط دستورکار پیشنهادی شرکت بایورد (BioRad, USA) پوشش داده شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی ذرات طلا (۶۰ میلی‌گرم در لیتر طلا در گلیسرول ۵۰ درصد)، به همراه ۵۰ میکرولیتر $CaCl_2$ (۲/۵ مولار) و ۲۰ میکرولیتر اسپرمیدین (۰/۱ مولار)، در حال ورتکس به یک میکروگرم DNAی پلاسمید *pBINPLUS/gtfI* اضافه شد. محلول ایجادشده برای یک دقیقه به حالت سکون قرار داده شد و سپس دو ثانیه ورتکس شد. بعد از انتقال محلول رویی، ته‌نشین دوبار به ترتیب با ۱۴۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱۴۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد شسته شد. بعد از اضافه کردن ۴۸ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد و حل کردن ته‌نشین با ورتکس، شش میکرولیتر از محلول حاوی DNA در مرکز ماکروکریر قرار گرفت و اجازه داده شد تا خشک شود. جهت بمباران ریزنمونه‌ها از این محلول خشک شده در مرکز ماکروکریر طبق دستورالعمل شرکت بایوراد ولی با اعمال تغییرات موردنظر برای بهینه‌سازی استفاده شد.

بهینه سازی فوا صل بمباران ؛ سبت به ریزنمونه و نوع محیط اسمزی

به‌منظور بهینه‌سازی فواصل بمباران و نوع محیط اسمزی، در هنگام بمباران کالوس‌ها، فواصل ۹ و ۱۲ سانتی‌متر نسبت به آن‌ها در نظر گرفته شد. هم‌چنین چهار ساعت قبل از بمباران و یک روز بعد از بمباران، کالوس‌ها به محیط‌کشت MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و محیط‌های اسمزی متفاوت (۰/۲ مولار سوربیتول + ۰/۲ مولار مانیتول، ۰/۴ مولار سوربیتول، ۰/۴ مولار مانیتول) منتقل شدند. این بخش از مطالعه با یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (پتری‌دیش) و سه فاکتور: الف) ژنوتیپ شامل دو رقم CP48-103 و CP57-614، ب) فاصله تا ریزنمونه شامل ۹ سانتی‌متر و ۱۲ سانتی‌متر، ج) نوع محیط اسمزی شامل ۰/۴ مولار سوربیتول، ۰/۴ مولار مانیتول و ۰/۲ مولار سوربیتول + ۰/۲ مولار مانیتول صورت گرفت.

انتقال کالوس‌ها به محیط گزینش

دو روز بعد از بمباران، کالوس‌ها به محیط‌کشت MS حاوی ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر

IBA (Indole-3-Butyric Acid)، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (Butyric Acid) و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. ریزنمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار واکشت شدند و میزان کانامایسین برای کالوس‌های باززایی شده در هفته‌های آخر به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت.

بهینه‌سازی محیط‌کشت برای تولید ریشه

پس از سپری‌شدن دو ماه، گیاهچه‌های حاصل از بافت کالوس با طول حدود سه تا پنج سانتی‌متر برای ریشه‌زایی به سه محیط‌کشت به شرح زیر منتقل شدند: محیط ۱ (۵ mg/L NAA (Naphthalene Acetic Acid))؛ محیط ۲ (۵ mg/L IBA) و محیط ۳ (۵ mg/L NAA و ۵ mg/L IBA) منتقل شدند. در تمام محیط‌ها از ۴/۴ گرم در لیتر MS، ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۳ گرم زغال فعال و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده شد. این بخش از تحقیق با یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار (گلدان شیشه‌ای کوچک) اجرا شد و اثر ترکیبات مختلف محیط‌کشت بر میزان ریشه‌دهی گیاهچه‌ها مطالعه شد. هر تکرار شامل پنج گیاهچه بود. بعد از گذشت پنج هفته، تعداد گیاهان ریشه‌دار و طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. در طی این مدت نیز تعداد روز تا ظهور ریشه‌چه در هر گیاه یادداشت‌برداری گردید. بعد از ریشه‌دهی، گیاهان برای استقرار، به خاک استریل حاوی کوکوپیت (الیاف نارگیل)، پرلایت، خاک برگ و ماسه منتقل شدند.

استخراج DNA و انجام PCR

پس از انتقال گیاهچه‌های تراریخت احتمالی به خاک، استخراج DNA ژنومی کل از برگ‌های جوان به روش CTAB انجام شد *پوربسکی* و همکاران (Porebski *et al*., 1997). ردیابی ژن *gtfI* در ژنوم گیاهان تراریخت احتمالی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای (رفت: 5`-GTAGTGGATGG TATGAAACAGCAGAGC-3` و برگشت: 5`-TTTCCC GGGTTAGTTCCAGCCACGGTA -3`) صورت گرفت.

تجزیه قند

سیزده ماه پس از انتقال گیاهان تراریخت و شاهد به خاک، تجزیه قند به این شرح انجام شد. در هر برداشت پنج ساقه نیشکر از هر گلدان آزمایش به‌طور تصادفی برای تعیین میزان قند انتخاب شد. شربت پنج ساقه با استفاده از دستگاه خردکن استخراج شد. درصد پل (Polarization (Pol)) با استفاده از پلاریمتر اندازه‌گیری شد، درصد بریکس (Brix) با استفاده از رفرکتومتر *والی* (Whalley, 1964)، هم‌چنین درصد شکر اینورت توسط روش تیتریمتریک رین اندازه‌گیری شد *رین* (Rein, 2007). برای مقایسه گیاهان شاهد و تراریخت از آزمون تی- استیودنت *اکونور* و *ربرتسون* (O'Connor and Robertson, 2003) استفاده شد.

تجزیه‌های آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ver. 20 و SAS ver. 9 انجام شد. پیش از انجام تجزیه واریانس، دو فرض اصلی تجزیه واریانس داده‌ها شامل نرمال بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون‌های کلموگروف-اسمیرنوف و شاپیر-ویلک و یکنواخت بودن واریانس خطاهای آزمایشی با کمک آزمون بارتلت بررسی شد.

نتایج و بحث

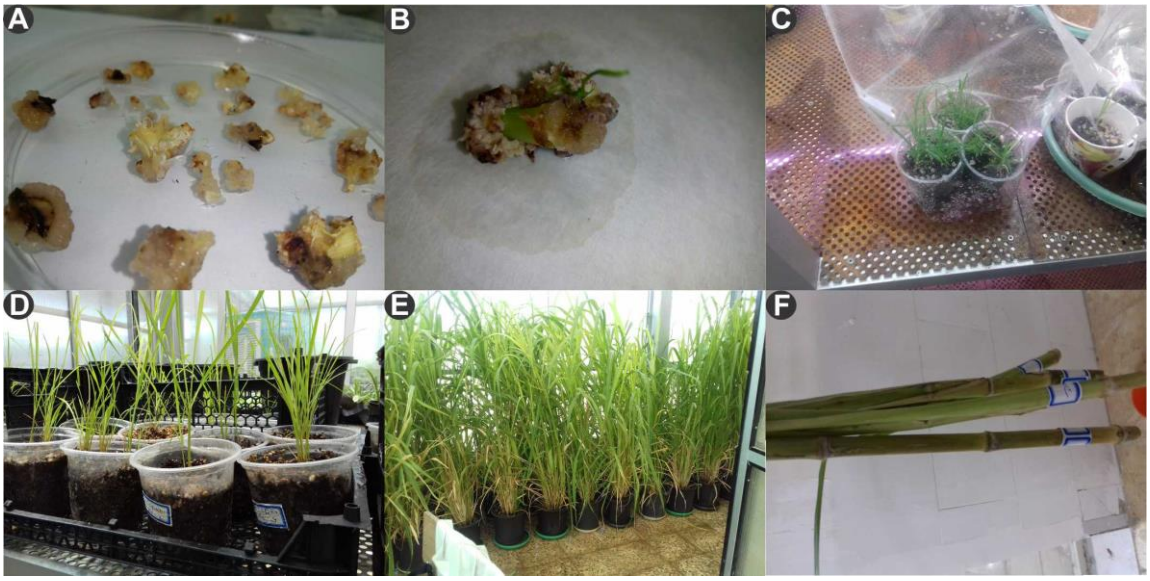
غربالگری گیاهان تراریخت

اگرچه انتقال ژن به روش اگروباکتریوم نسبت به روش تفنگ ژنی، دارای مزیت‌هایی چون: صرفه اقتصادی، الحاق تعداد کپی‌های محدود از ژن موردنظر و انتقال سامانه‌های ژنی بزرگ‌تر بدون شکستگی است *وی* و همکاران؛ *مانیکاواساگام* و همکاران؛ *سانتوسا* و همکاران (Wei *et al*., 2003; Manickavasagam *et al*., 2004; Santosa *et al*., 2004) است، با این‌حال در این مطالعه، روش اخیر علی‌رغم تغییر برخی از پارامترهای مهم، موفقیت‌آمیز نبود. باوجود آنکه سه مرتبه به روش‌های متفاوتی مانند تغییر مدت زمان هم‌کشتی، تغییر سطوح آنتی‌بیوتیک و استفاده از دوسویه متفاوت، مبادرت به انتقال ژن به‌وسیله اگروباکتری گردید، متأسفانه هیچ‌یک از ارقام این مطالعه قادر به باززایی گیاهچه‌ها نشدند. تمام گیاهچه‌ها یا نکروزه شدند یا در مراحل آغاز گزینش پس از سفید شدن از بین رفتند. نتایج مشابهی از عدم موفقیت به این روش گزارش شده است. برای مثال، *جویس* و همکاران (2010, 2014) و *جکسون* و همکاران (2013) نشان دادند که ژنوتیپ گیاه منشأ ریزنمونه، اهمیت زیادی در موفقیت تراریختی در نیشکر دارد. در این مطالعات، استفاده از دوسویه متفاوت آگروباکتری همراه با تغییراتی در محیط‌کشت، روش هم کشتی و مدت هم‌کشتی برای تراریختی گزارش شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، *جویس* و همکاران پیشنهاد کردند که در تراریختی به روش آگروباکتری، باید سویه مناسب آگروباکتری برای هر ژنوتیپ را پیدا کرد. ازاین‌رو، لازم

است تا برای موفقیت در این زمینه، یک آزمایش مقدماتی با یکی از ژن‌های گزارشگر به همراه تعداد متعددی از سویه‌های مهاجم اگروباکتری صورت گیرد و ژنوتیپ‌های امیدبخش و مهم هر کشور مورد آزمون قرار بگیرند.

روش انتقال ژن به کمک تفنگ ژنی در این مطالعه موفقیت‌آمیز بود و منجر به تولید تعداد زیادی گیاه تراریخت گردید که با موفقیت به خاک و سپس به گلدان‌های بزرگ منتقل شدند که در نهایت از آن‌ها قلمه تهیه شد (شکل ۳).

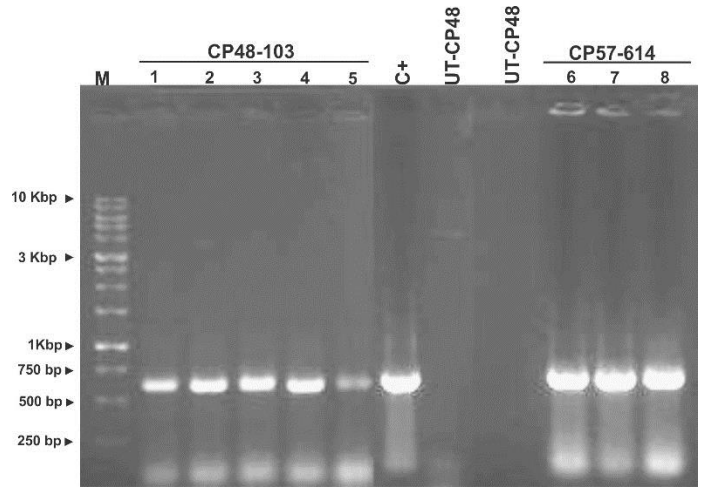
.



شکل ۳: مراحل مختلف کشت بافت نیشکر. (A و B) گیاهان حاصل از کالوس بعد از انتقال ژن. (C) گیاهان ریشه‌دار در گلدان‌های پلاستیکی (D و E) انتقال گیاهان ریشه‌دار به گلخانه و (F) برداشت قلمه‌های تراریخت ۱۳ ماهه

Fig. 3: Different sugarcane tissue culture steps. (A and B) Bombarded sugarcane calli. (C) Rotted transgenic sugarcane plants in plastic pots (D and E) Transgenic sugarcane plants in green house and (F) Harvested thirteen months old transgenic stems

پس از استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخت احتمالی و شاهد، واکنش PCR روی گیاهان تراریخت احتمالی و شاهد با آغازگرهای اختصاصی ژن *gtfI* برای تأیید تراریختی و انجام تجزیه‌های آماری انجام شد. یک باند در حدود ۶۰۰ جفت باز مربوط به بخشی از ژن *gtfI* در گیاهان تراریخت تکثیر شد، اما چنین قطعه‌ای در گیاه شاهد مشاهده نشد. این موضوع نشان داد که ژن موردنظر در ژنوم گیاهان تراریخت وارد شده است (شکل ۴). از تعداد ۱۴۴ ریزنمونه اولیه هر دو رقم که به روش تفنگ ژنی تراریختی شده بودند، تعداد ۳۷ ریزنمونه به گیاهچه تبدیل شدند و به ظاهر تراریخت بودند. این موضوع نشان می‌دهد که میزان کارآیی این روش حدود ۲۵/۷ درصد بود. ازآنجایی‌که در مجموع ۱۸ شلیک به ریزنمونه‌های کالوس صورت گرفت، میزان کارآیی تراریختی صرف‌نظر از نوع رقم و فاصله شلیک، ۲/۰۵ گیاه تراریخت به ازای هر شلیک بود.



شکل ۴: واکنش PCR روی گیاهان به ظاهر تراریخت ژن موتان سوکراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. اعداد شماره لاین‌های تراریخت را نشان می‌دهند. از پلاسمید بیانی *pBINPLUS/gtfI* در چاهک C^+ به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. از DNA گیاهان غیرتراریخت به‌عنوان شاهد در چاهک‌های UT-CP48 وUT-CP57 استفاده شد. M: بیانگر نشانگر اندازه‌ی 1Kb است

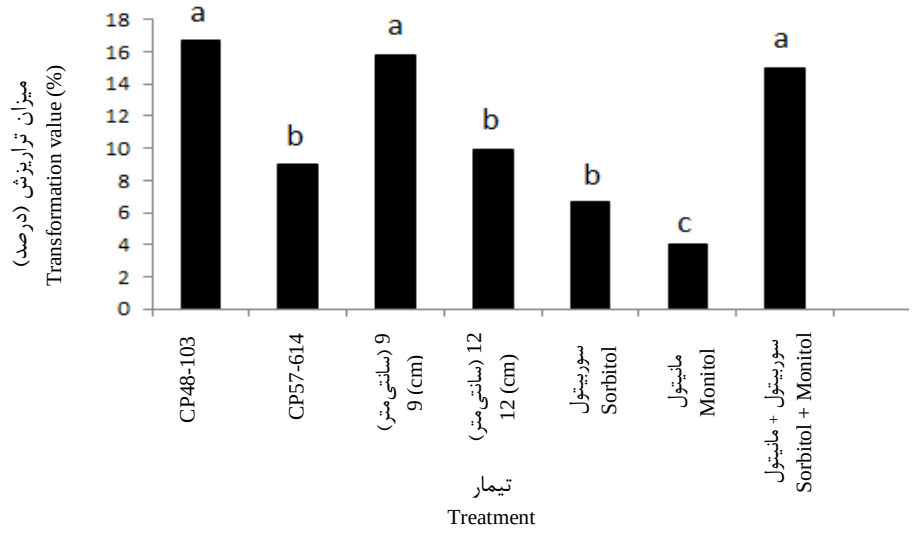
Fig. 4: PCR test using *gtfI* specific primers on putative transgenic sugarcane plants. Numbers represent different transgenic lines. In lane C^+ *pBINPLUS/gtfI* plasmid was used as template. Genomic DNA from untransformed control plants (UT-CP48 and UT-CP57) was used as negative control

تاپاریا و همکاران (Taparia *et al*., 2012) بیش‌ترین کارآیی تراریختی برای ریزنمونه‌های نیشکر را ۲/۲ گیاه تراریخت به ازای هر شلیک گزارش کردند. این درحالی است که *کیم* و همکاران (Kim *et al*., 2012) با بهینه‌سازی میزان DNA در جریان شلیک، میزان گیاه تراریخت را بین ۳/۴۰-۰/۹۶ به ازای هر شلیک گزارش نموده‌اند. این موضوع نشان می‌دهد که دو رقم این مطالعه از آمادگی لازم برای تراریختی به روش تفنگ ژنی برخوردارند و لذا به‌خوبی می‌توان به این روش مبادرت به تراریختی آن‌ها نمود.

تأثیر فواصل پرتاب ژن و محیط اسمزی

ازآنجایی‌که فاصله پرتاب DNA تا ریزنمونه می‌تواند میزان کارآیی تراریختی را تحت تأثیر قرار دهد *موسوی* و همکاران؛ *پتریلو* و همکاران (Mousavi *et al*., 2009; Petrillo *et al*., 2008)، این موضوع در این مطالعه موردتوجه قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کشت بافت (جدول ۱) نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین ارقام ($P \leq 0.01$)، فواصل پرتاب ژن تا ریز نمونه ($P \leq 0.01$) و محیط اسمزی ($P \leq 0.01$) وجود دارد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که رقم CP48-103 دارای درصد تراریختی بالاتری (۱۶/۶۷ درصد) نسبت به رقم CP57-614 (۹/۰۳ درصد) بود. تجزیه‌وتحلیل داده‌های فاصله پرتاب ژن تا ریزنمونه نشان داد که فاصله ۹ سانتی‌متری پرتاب از ریزنمونه درصد تراریختی بیشتری (۱۵/۸ درصد) نسبت به فاصله ۱۲ سانتی‌متر (۹/۹ درصد) ایجاد می‌کند (شکل ۵). صرف‌نظر از فاصله، تعداد گیاه تراریخت برای رقم‌های CP48-103 و CP57-614 به‌ترتیب ۱/۳۳ و ۰/۷۲ گیاه تراریخت به ازای هر شلیک بود. *کور* و همکاران (Kaur *et al*., 2007) فواصل ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ سانتی‌متری شلیک را موردبررسی قرار دادند و نشان داده شد که بیش‌ترین میزان تراریختی در فاصله پنج سانتی‌متری به‌دست آمد. *تادس* و همکاران (Tadesse *et al*., 2003) در گیاه گرامینه‌ی سورگوم نیز با مقایسه دو فاصله شش و ۱۲ سانتی‌متری نشان دادند که فاصله شش سانتی‌متری کارآیی بهتری دارد، هرچند که نوع ریزنمونه تأثیر معنی‌داری روی میزان تراریختی داشت. همان‌طوری‌که ذکر شد در این مطالعه نیز فاصله کم‌تر (۹ سانتی‌متری) نتیجه بهتری به همراه داشت. این موضوع نشان می‌دهد که برای هر ژنوتیپ و هر نوع ریزنمونه، باید فاصله فیزیکی مناسب را مطالعه و به‌دست آورد.



شکل ۵: مقایسه میانگین‌ها (به روش دانکن) رقم، فاصله پرتاب و محیط اسمزی

Fig. 5: Mean comparisons (Duncan multiple test) for cultivar, shooting distance and type of osmoticum medium

جدول ۱: تجزیه واریانس بررسی فاصله پرتاب و نوع محیط اسمزی

Table 1: Analysis of variance of shooting distance and type of osmoticum medium

میانگین مربعات MS	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variations
4^{**}	1	رقم Cultivar
1.78^{**}	1	فاصله پرتاب Shooting distance
6.33^{**}	2	محیط اسمزی Osmoticum medium
0.11^{ns}	1	رقم×فاصله Cultivar × Shooting distance
2.33^{**}	2	رقم×محیط اسمزی Cultivar× Osmoticum medium
0.78^{**}	2	فاصله پرتاب×محیط اسمزی Shooting distance× Osmoticum medium
0.11^{ns}	2	رقم×فاصله پرتاب×محیط اسمزی Cultivar× Shooting distance× Osmoticum medium
0.08	24	خطا Error
19		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

ns and **: Non significant and significant at α=0.01 probability level, respectively

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس صفات مرتبط با تولید ریشه در دو رقم نیشکر تحت تیمارهای مختلف هورمونی

Table 2: Mean comparisons (Duncan multiple test) for root related traits in two sugarcane cultivars influenced by different phytohormone treatments

تعداد روز تا ریشه‌دهی No. of days to rooting	طول ریشه Root length	تعداد گیاهان به ریشه رفته No. rooted plants	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variations
1027.04**	19.26**	1.5*	1	رقم Cultivar
178.89**	1.28**	5.54**	2	محیط ریشه‌زایی Rooting medium
14.29*	0.02ns	0.38ns	2	رقم × محیط ریشه‌زایی Cultivar× Rooting medium
3.71	0.07	0.22	18	خطا Error
16.12	10.27	16.57		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and **: Non significant and significant at α=0.05 and α=0.01 probability level, respectively

جدول ۳: مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن ($P\leq0.01$) در بررسی اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر طول ریشه، تعداد گیاهان ریشه‌دار شده و تعداد روز تا ریشه‌زایی

Table 3: Mean comparisons (Duncan multiple test) the effect of different phytohormone treatments on root length, number of rooted plants and number of days to rooting

3	2	1	محیط Medium / صفات Trait
2.96a	2.19c	2.4b	طول ریشه Root length
3.57a	2.13c	2.60b	تعداد گیاهان ریشه دار شده Number of rooted plants
15.88a	24b	24.25b	تعداد روز تا ریشه‌زایی Number of days to rooting

جدول ۴: نتایج تجزیه قند با استفاده از دستگاه پلاریمتر و رفرکتومتر در گیاه شاهد و گیاه تراریخت دو رقم نیشکر

Table 4: Sugar analysis of reprehensive of transgenic sugarcane and their corresponding untransformed control plants using polarimeter and refractometer

لاین‌های تراریخت و شاهد Transformed and control lines				میانگین (درصد) Mean (%)
تراریخت-cp48 cp48-103	شاهد-cp48 UT-CP48	تراریخت-cp57 CP57-614	شاهد-CP57 UT-CP57	
8.70±1.40	13.2±0.91	10.2±1.30	0.82±14.3	پل Pol
68.18±0.74	72.30±0.29	71.12±0.10	74.01±0.01	خلوص Purity
12.06±0.76	18.0±0.12	14.1±0.65	20.02±0.14	بریکس Brix
4.13±0.27	6.84±0.02	4.19±0.05	7.1±0.07	قند مانده[a] Residual sugar[a]

a: قندی که پس از تخمیر باقی می‌ماند

a: Remain sugar after fermentation

محیط اسمزی یکی دیگر از فاکتورهایی است که میزان کارآیی تراریختی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. وجود یک محیط اسمزی مناسب، میزان آسیب‌های وارد در اثر برخورد ذرات پرانرژی را به حداقل رسانده و به سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا با موضوع پلاسمولیز کنار آمده و سریع‌تر التیام پیدا کنند. *باور* (Bower, 1994) در مطالعه‌ای که بر روی کارآیی تراریختی گیاه نیشکر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تیمار اسمزی ریزنمونه‌ها تعداد سلول‌های تراریخت را افزایش داد و با اعمال

تیمار اسمزی از صفر تا ۱۶ ساعت، مشخص گردید که نگه‌داشتن ریزنمونه‌ها به مدت چهار ساعت قبل و چهار ساعت بعد از بمباران، کارآیی تراریختی را افزایش می‌دهد. بررسی داده‌های این مطالعه نشان داد که کشت کالوس بر روی محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۲ مولار سوربیتول + ۰/۲ مولار مانیتول به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) درصد تراریختی را در مقایسه با کشت کالوس بر روی ۰/۴ مولار سوربیتول و یا ۰/۴ مولار مانیتول بالا برد (شکل ۵). اثرات متقابل رقم × محیط اسمزی و اثر متقابل فاصله × محیط اسمزی معنی‌دار شدند. این داده‌ها ممکن است نشان‌دهنده این موضوع باشند که بین رقم و محیط اسمزی و هم‌چنین فاصله و محیط اسمزی ارتباط معنی‌دار وجود دارد؛ به عبارت دیگر، با انتخاب بهترین رقم (CP48-103) و بهترین فاصله (۹ سانتی‌متر) و هم‌چنین بهترین محیط اسمزی (۰/۲ مولار سوربیتول + ۰/۲ مولار مانیتول) می‌توان کارآیی تراریختی را به‌طور معنی‌داری بالا برد. گرچه در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین سوربیتول و مانیتول به‌تنهایی روی میزان کارآیی تراریختی مشاهده نشد (شکل ۵)، گزارش‌هایی از برتری سوربیتول نسبت به سایر تنظیم‌کننده‌های فشار اسمزی (مانیتول و ساکارز) در گیاه ارزن وجود دارد *جاگا-چوق* و همکاران (Jagga-Chugh *et al*., 2012). *مطرودی* و همکاران (Matroodi *et al*., 2013) در بررسی انتقال موقت ژن گزارشگر *gus* در نیشکر نشان دادند که ترکیب اسمزی سوربیتول و مانیتول به‌طور معنی‌داری درصد لکه‌های آبی را بالا می‌برد (۵۳ لکه آبی)، درحالی‌که بین سوربیتول و مانیتول تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

تأثیر نوع محیط ریشه‌زایی

به‌طورکلی پاسخ گیاهان تک‌لپه و از آن جمله گرامینه‌ها به کشت بافت چندان زیاد نیست و نیازمند بهینه‌سازی‌های مختلف به‌ویژه بررسی نوع هورمون‌ها است. ازاین‌رو مطالعات متعددی در زمینه کشت بافت نیشکر وجود دارد که همگی به نیاز متفاوت ارقام مختلف و ریزنمونه‌های گوناگون اشاره کرده‌اند *شوکلا* و همکاران؛ *پاتک* و همکاران؛ *لال* و *سینق* (Shukla *et al*., 1994; Pathak *et al*., 2009; Lal and Singh 1994). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های این مطالعه برای محیط ریشه‌زایی در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که از جدول ۲ مشخص است، بین ارقام ($P \leq 0.05$) و محیط‌ها ($P \leq 0.01$)، در صفت تعداد روز تا ظهور ریشه تفاوت معنی‌داری وجود دارد. رقم CP48-103 با میانگین ۱۵ روز تا ریشه‌دهی نسبت به رقم CP57-614 با میانگین ۲۸ روز تا ریشه‌دهی برتری داشت. هم‌چنین محیط سه اختلاف معنی‌داری با محیط یک و محیط دو نشان داد.

اثر متقابل بین رقم و محیط ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$) به این معنی که با انتخاب رقم و محیط ریشه‌زایی مناسب می‌توان تعداد روز تا ریشه‌دهی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. رقم CP48-103 در محیط سه با میانگین ۱۱ روز تا ریشه‌زایی نسبت به این رقم در دو محیط دیگر و رقم CP57-614 برتری نشان داد. رقم CP57-614 در محیط دو با میانگین ۳۱ روز بیش‌ترین تعداد روز تا ریشه‌زایی را داشت. قدرت باززایی و ریشه‌دهی در کشت بافت صفات ژنتیکی هستند که ممکن است ژن یا گروهی از ژن‌ها آن را کنترل کنند (Iwase *et al*., 2017). رقم CP57-614 باوجود این‌که رقمی زودرس به شمار می‌آید اما در محیط‌کشت بافت خوب عمل نکرده است. *گندونو* و همکاران (Gandonou *et al*., 2005) با بررسی ۹ ژنوتیپ از نیشکر به این نتیجه رسیدند که رقم CP57-614 در محیط‌کشت بافت از نظر باززایی و ریشه‌دهی رقم متوسطی است.

طول ریشه در محیط سه تفاوت معنی‌داری با محیط یک و محیط دو نشان داد و محیط یک و دو تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند. از نظر تعداد گیاهان ریشه‌دار محیط سه اختلاف معنی‌داری نسبت به محیط یک و دو نشان داد هم‌چنین محیط یک اختلاف معنی‌داری را نسبت به محیط دو نشان داد (جدول ۳). از نظر طول ریشه رقم CP48-103 با میانگین ۳/۴۱ سانتی‌متر با رقم CP57-614 با میانگین ۱/۶۲ سانتی‌متر اختلاف معنی‌دار نشان داد و هم‌چنین تعداد گیاهان ریشه‌دار شده صرف‌نظر از نوع محیط، در رقم CP48-103 با میانگین ۳ با رقم CP57-614 با میانگین ۲/۵ اختلاف معنی‌داری داشت. *کلانترهرمزی* و همکاران (Kalantarhormozi *et al*., 2015) در مطالعه‌ای که بر روی دو رقم تجاری نیشکر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که رقم CP69-1062 با میانگین ۱۳/۱۴ روز نسبت به رقم CP48-103 با میانگین ۱۱/۹ روز دیرتر تولید ریشه کرده است. هم‌چنین رقم CP48-103 با میانگین ۴/۷ سانتی‌متر طول ریشه بلندتری نسبت به رقم CP69-1062 داشته است.

تجزیه قند گیاهان تراریخت و شاهد

آنزیم موتان‌سوکراز، یکی از اعضای خانواده بزرگ گلیکوزیل ترانسفرازها (Glycosyl transferases) است که از ساکارز برای سنتز پلی‌مرهای مهم استفاده می‌کند. بیان این آنزیم در نیشکر می‌تواند بخشی از ساکارز تولیدی را مصرف و آن را به پلیمرهای زیستی ارزشمند تبدیل کند. نتایج تجزیه قند تعدادی از گیاهان تراریخت به همراه شاهد در جدول ۴ آورده شده است.

همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، بین دو رقم موردمطالعه از نظر درصد پل (ساکارز)، درصد خلوص شربت در ساقه، درصد بریکس (درصد مواد جامد محلول) و درصد قند قابل استحصال اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود دارد. در گیاه شاهد رقم CP57-614 درصد پل، درصد خلوص شربت در ساقه، درصد بریکس (درصد مواد جامد محلول) و درصد قند باقی‌مانده دارای اختلاف معنی‌داری($P\leq0.01$) نسبت به گیاهان تراریخت رقم CP57-614 بود. درصد پارامتر پل که بیانگر میزان ساکارز موجود در ساقه نیشکر است در هر دو لاین تراریخت نسبت به شاهدهای مربوطه کاهش قابل‌ملاحظه‌ای را نشان داد (جدول ۴). همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود میزان کاهش قند (ساکارز) در هر دو لاین تراریخت نسبت به شاهدهای مربوطه در حدود ۳۰ درصد است. *باور* و همکاران (Bauer *et al*., 2012) نشان دادند که انتقال ژن‌های کدکننده‌ی ریوتران سوکراز و لوان سوکراز به گیاه نیشکر، همانند نتایج این مطالعه سبب کاهش معنی‌دار محتوای ساکارز قلمه‌ها به تقریباً دوسوم گیاه شاهد گردید. هم‌راستا با کاهش میزان قند ساکارز، میانگین بریکس شیره نیشکر لاین‌های تراریخت این مطالعه نیز به همان نسبت کاهش یافت. این موضوع به‌خوبی نشان می‌دهد که آنزیم موتان‌سوکراز توانسته است همین میزان قند را مصرف کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با اندازه‌گیری پارامترهای شیره نیشکر به‌راحتی می‌توان شاخصه‌ای از تراریختی را به‌دست آورد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۵-۷ متن انگلیسی مراجعه شود.