جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیان ژن GUS (بتا گلوکورونیداز) در گیاه اطلسی

علی اکبر احسانپور*، رویا رضوی زادهو حمید امامی***

* گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان

** گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

چکیده

اصلاح ژنتیکی گیاه معمولاً از طریق گرده افشانی صورت می گیرد. این روش گاهی بسیار وقت گیر ودر برخی موارد غیر ممکن است.با توجه به نیاز انسان به تولیدات گیاهی یکی از روش های مناسب انتقال ژن به گیاهان از طریق وکتور آگروباکتریوم می باشد. با این روش می توان در بسیاری از گیاهان دولپه ، ژن یا ژن های مناسب منتقل کرد. در مطالعه حاضر از پلاسمید pZM1047 واجد ژن های بتاگلوکورونیداز(GUS) و ژن NPTII استفاده شد. به منظور بررسی چگونگی فعالیت این وکتور و بیان ژن GUS آزمایشات ترانسفرماسیون بر روی گیاه اطلسی در شرایط این ویترو انجام گردید. بدین منظور شرایط بهینه در باززایی گیاه از اطلسی بدست آمد وبالاترین درصد باززایی در محیط کشت MS حاوی ۵/. میلی گرم در لیتر BAP تعیین گردید. درصد ترانسفرماسیون در نمونه های گیاهی حدود ۵ درصد بدست آمد .تکثیر DNA با استفاده از PCR حضور ژن GUS را در گیاهان ترانسژنیک تائید نمود.

واژه های کلیدی: ژن GUS ، اطلسی ، آگروباکتریوم

مقدمه

مطالعهٔ بیان ژن و تنظیم آن در گیاهان، با توانایی نفوذ قطعات DNA در سلول‌های گیاهی به میزان زیادی پیشرفت کرده است. سیستم‌های انتقال ژن گیاهی در مقایسه با سیستم‌های جانوری چندین تفاوت دارد. مهمترین تفاوت این است که اصولاً یک سلول گیاهی، پر توان (توتی پوتانت) است. یعنی یک سلول می‌تواند به یک موجود تمایز یافته و کامل تبدیل شود. چندین روش برای انتقال ژن در گیاهان وجود دارد. یکی از این روش‌ها جذب مستقیم DNA توسط پروتوپلاست می‌باشد. این عمل یا از طریق الکتروپوریشن (electroporation) و یا از طریق جذب القاء شده در اثر پلی‌اتیلن گلیکول (PEG Induced uptake) صورت می‌گیرد (۱۰).

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تفنگ بیولیستیک، (Biolistic gun) نیز یک روش نسبتا جدید برای انتقال ژن می باشد. روش سوم که تکنیک اصلی برای ورود ژن‌های خارجی به گیاهان می‌باشد، ترانسفورماسیون توسط باکتری آگروباکتریوم می‌باشد. اگروباکتریوم یک باکتری خاکزی معمول و متداول است که می‌تواند به سلول گیاهی آسیب دیده حمله کند و ژن‌های خارجی رابه ژنوم سلول گیاهی واردنماید (۹و۱۰و۱۳).

از نظر طبقه بندی *Agrobacterium tumefaciens* جزء باکتریهای میله‌ای گرم منفی هوازی در خانواده Rhizobiaceae طبقه‌بندی شده است. سلول‌های اگروباکتریوم میله‌ای شکل منفرد و یا دوتائی است و ابعاد آنها $۰/۵-۱\times۱/۵-۳\mu m$ می‌باشد. رنگ کلنی‌ها به رنگ سفید و در برخی موارد بژ یا قهوه‌ای کم‌رنگ‌اند. شکل کلنی اگروباکتر محدب، دایره‌ای، شفاف، بدون پیگمان و لعابی است. اگروباکتر متحرک است و دارای فلاژل‌های پیرامونی (Peritrichous) می‌باشند (۹).

در جریان ترانسفورماسیون بخشی از پلاسمید Ti که T-DNA (T-DNA=Tumer DNA) نامیده می‌شود وارد سلول گیاه می‌شود و سپس در ژنوم گیاه ادغام می‌گردد. T-DNA در سوشهای وحشی (wild type) حاوی ژنهای ایجاد کننده گال (gall) و همچنین تولید کننده اسیدآمینه‌های تغییر یافته ای به نام اوپین Opines می‌باشد. اوپین توسط سلولهای گیاهی ترانسفرم شده تولید می‌شود و منبع کربن و نتیروژن سلولهای اگروباکتریوم محسوب می‌گردد. (۱۰و۱۳)

بیان گروه دیگری از ژنها بنام Vir توسط مولکول‌های پیام رسان (Signal molecule) که توسط بافتهای گیاهی زخمی شده تولید می‌شوند، القاء می‌گردند. برخی از این القاء کننده‌ها که شناسایی شده‌اند عبارتند از: ترکیبات فنولیک استوسرینگون (acetosyringone) ، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید (P, hydroxy benzoic acid) و وانیلین (vaniline). ژن‌های Vir شامل VirA, VirG, VirD, VirE بوده و کلید انتقال T-DNA می‌باشند (۱۰و۱۳). انتقال T-DNA، طی فرایندی شبیه به Conjugation در باکتری‌ها انجام می‌گیرد، ادغام T-DNA در ژنوم گیاه در تمام جایگاههایی که تکرارهای معکوس و تکرارهای مستقیم (direcrt tandom) وجود دارد رخ می‌دهد (۶ و ۷).

برای انتقال ژن‌هایی به منظور از بین بردن علفهای هرز (علف کش‌ها یا herbicide) و ایجاد مقاومت در برابر کم آبی (drought stress) و یا تلاش برای اصلاح رژیم غذایی گیاه، و یا انتقال هر گونه ژن جدیدی به گیاه توسط آگروباکتریوم بعنوان وکتور از ژن‌های گزارشگر(reporter gene) در گیاه استفاده می‌گردد که این ژن‌ها به راحتی در گیاه بیان گردیده و علائم و نشانه‌های آن به راحتی قابل مشاهده است. برای مثال ژن بتا گلوکورونیداز یا GUS از جمله این ژنها می باشد(۱۲).

در بسیاری از گونه‌ها، برگ‌ها یک منبع از سلولهای یکسان ژنتیکی تولید می‌کنند که توانایی باززایی همهٔ گیاه را دارند، زمانی که دست کاری‌های ساده کشت بافت بر روی آنها انجام شود، لبهٔ زخمی یک دیسک برگی مستعد و حساس به تلقیح (injection) با باکتری آگروباکتریوم می‌باشد و بر روی یک محیط کشت مناسب، تقسیم سریع سلولی و القاء باززایی shoot (نوساقه) صورت می‌گیرد. این امر منجر به ترانس فورماسیون و باززایی مؤثر، همان گروه سلول‌ها در لبهٔ دیسک‌های برگی می‌شود (۵). فنوتیپ همراه با مقاومت به کانامایسین یک وسیلهٔ مؤثر برای انتخاب و باززایی نوساقه های ترانسفرم شده و یا رشد کالوس‌های ترانسفرم شده می‌باشد. بوسیلهٔ سیستم ترانس فورماسیون از دیسک‌های برگی، نوساقه‌های ترانسفرم‌شده طی ۲ تا ٤ هفته و گیاهان ریشه‌دار شده در ٤ تا ۷ هفته پس از تلقیح (inoculation)

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

می‌تواند بدست آید (٤). بهر حال ترانس فورماسیون ژنتیکی گیاه نیاز به پروتوکل‌های باززایی گیاه دارد (۱۰) و این موضوع اولین سئوالی است که بایستی در تحقیق پاسخ آن معلوم گردد. هدف این طرح پژوهشی بهینه سازی شرایط انتقال ژن مقاومت به کاناما یسین و ژن GUS از طریق آگروباکتریوم (این دو ژن با طراحی مولف به این پلاسمید منتقل شده است) و بررسی عملکرد پلاسمید pZM1047 در انتقال ژن به گیاه اطلسی بعنوان یک گیاه مدل می‌باشد. در مطالعات آینده از این مدل جهت انتقال سایر ژنها به این گیاه و سایر گیاهان استفاده خواهد شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام تمام آزمایشات مربوط به گیاه در این تحقیق از میحط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) (۸) استفاده گردید و مقدار ۳ درصد وزن به حجم ساکارز و هورمون BAP به مقدار/۲۵/. و ۰،۵و ۱ میلی گرم در لیتر به آن افزوده شد و پس از مخلوط نمودن حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد، آن گاه به کمک NaOH (۰/۱N) و یا HCL (۰/۱N) pH محیط کشت در حدود۵/۸ تنظیم گردید و سپس آگار (حدود ۱۰-۹ گرم در لیتر) به محیط کشت افزوده شد. سپس با حرارت ملایم محیط کشت حاوی آگار را ذوب کرده تا محیط کشت شفاف و یکنواختی به دست آمد. این محیط کشت به شیشه‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیده و سپس اتوکلاو شده و پس از خنک شدن آماده مصرف گردید.آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده کانامایسین و استرپتومایسین به میزان ۵۰میلی گرم در لیتربه محیط کشت ها پس از استریل سازی با فیلتر میلی پور ۲۲/ به آن اضافه گردید.

ابتدا بذر های گیاه اطلسی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰-۱۰ ثانیه وهیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه استریل گردید. سپس حداقل ٤-۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و پس از آن در محیط کشت جامد MS که حاوی ۱۰-۹ گرم در لیتر آگار بود کشت گردیدند . بذرهای کشت شده در شرایط اتاق کشت (با فتوپریود ١٦ ساعت نور و۸ ساعت تاریکی با شدت تقریبی ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. بذرها در اتاق کشت جوانه زده و رشد نمودند و پس از چند هفته به مرحلهٔ چند برگی رسیدند. سپس قطعات ساقه به همراه یک جوانه جانبی برای تولید انبوه گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

برای تعیین سیستم باززایی (regeneration) گیاه اطلسی از جدا کشت‌های (explant) برگ، قطعات برگ گیاه اطلسی در شرایط استریل در اندازهای تقریبی۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری برش داده شدند و سپس درمحیط کشتهای جامد MS حاوی۱ و ۰،۵ و ۰،۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA (بنزیل آمینوپورین) قرار گرفتند و در اتاق کشت نگهداری شدند. برای رشد و تکثیر و همچنین نگهداری آگروباکتریوم از محیط کشت LB (Yeast extract, 5g/lit, NaCl 10g/lit, Bactotrypton,10gr/lit) استفاده شد. در موارد لازم پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت در دمای ۱۲۱ و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در شرایط استریل ، آنتی‌بیوتیک کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از استریل کردن با فیلتر های میلی پور ۲۲ میکرونی به محیط کشت‌ها اضافه گردید. در این آزمایش از آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pZM1047 حاوی یک reporter gene بنام بتا گلوکورونیداز (GUS) که به ژن مقاومت به کانامایسین متصل شده و در فاصله بین RB

جدول ۱-مقایسه باززایی گیاه اطلسی در محیط کشتهای شماره ۱، قو ۳. تعداد قطعات دیسک برگی کشت شده در محیط کشت ۲۰ قطعه

محیط کشت	ترکیب	درصد باززائی گیاه
۱	MS+0.25mg/l BAP	۳۵
۲	MS+0. 5mg/l BAP	۹۵
۳	MS+1mg/l BAP	۹٤

(right border) و LB (left border) قرار گرفته استفاده شد. باکتریها در دمای حدود ۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد پس از ۳-۲ روز رشد و تکثیر یافته و تشکیل کلنی دادند.

جداسازی پلاسمید از باکتری

بر اساس Plasmid Prep Kit (Invitrogene) حدود یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته شد و به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری میکروسانتریفوژ منتقل گردید سپس مراحل جداسازی پلاسمید بر اساس دستورالعمل مندرج در کیت بکار گرفته شد

ترانسفورماسیون گیاهان اطلسی

برای انجام عمل ترانس فورماسیون، ابتدا دیسک‌هایی به ابعاد تقریبی۱-۵/. سانتی متر مربع از برگهای گیاه اطلسی رشد یافته در ظروف کشت تهیه شد. سپس دیسک‌های برگی در داخل سوسپانسیون باکتریایی حاوی آگروباکتریوم به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. در این مدت با تکان آرام و ملایم با شیکر همهٔ لبه‌های دیسک‌های برگی با باکتری آگروباکتریوم تلقیح شدند. پس از انجام این مرحله دیسک‌های برگی توسط کاغذ صافی استریل خشک شده و سپس بر روی محیط کشت باززایی گیاه اطلسی (MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر استرپتومایسین) قرارگرفتند. پس از دو روز دیسکهای برگی به همان محیط کشت قبلی ولی بدون آنتی بیوتیک استرپتومایسین منتقل گردیدند . در نهایت پس از ٦-٤ هفته نوساقه (shoot) های ترانسفرم شده روی محیط کشت MS حاوی کانامایسین رشد یافتند و برگهای غیر ترانسفرم زرد ونکروزه شدند.

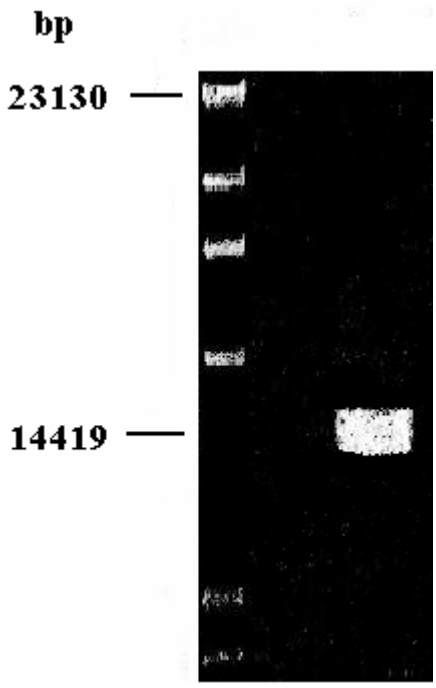
نتایج

بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی

در این مرحله از آزمایشات، همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها بدان اشاره شد، جدا کشت‌های (explant) برگ گیاه اطلسی در سه نوع محیط کشت MS با ۳ غلظت مختلف BAP (بنزیل آمینوپورین) قرار گرفت و در اتاق کشت نگهداری شدند. نتایج باززایی حاصل شده در این ۳ محیط کشت در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱ : مقایسه باززایی گیاه اطلسی در محیط کشتهای شماره ۱، ۲ و ۳. تعداد قطعات دیسک برگی کشت شده در محیط کشت ۲۰ قطعه می باشد. حدود ۱۰ روز پس از کشت جدا کشت‌های برگی، آثاری از ظهور کالوس‌های کوچک در لبهٔ زخمی قطعات برگی مشاهده شد، سپس از این کالوس‌ها، نوساقه‌ها (shoot) ظاهر

شدند و رشد کرده و ایجاد جوانهٔ جانبی و برگ نموده و در نهایت یک گیاه کامل باززایی شده از این جدا



شکل۱- نتایج جدا سازی پلاسمید(plasmid prep) حاصل از بررسی حضور پلاسمید pZM1047 در آگروباکتریوم روی ژل اگاروز ۱٪

کشت‌های برگی حاصل شد و سیستم باززایی کامل گردید. نتایج حاصل از باززایی از این سه محیط کشت، پس از ٤ تا ٦ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت.. همانطور که در جدول۱-۳ مشاهده می‌شود، درصد باززایی درمحیط کشت ۱ که حاوی **۲۵/. میلی گرو در لیتر**بنزیل آمیوپورین است، کمتر از محیط کشتهای دیگر می‌باشد، ولی با افزایش غلظت BAP با ۵/.(mg/L)، میزان باززایی به مقدار زیادی افزایش یافته و تقریباً ۳ برابر شده است. در محیط کشت ۳ نتایج مشابه با محیط کشت ۲ بدست آمد و درصد باززایی، بالا بود. بنابراین با توجه به عدم اختلاف معنی‌دار از نظر آماری بین محیط‌های ۲ و ۳ محیط ۲ بهترین محیط کشت جهت باززایی این گیاه برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

در بررسی آزمایشات مربوط به جدا سازی پلاسمید از آگروباکتریوم بطور واضح حضور پلاسمید حاوی ژن GUS با طول bp 14419 بر روی ژل اگاروز ۱٪ مورد تائید قرار گرفت (شکل۱).

ترانس فورماسیون و تولید گیاهان ترانس ژنتیک توسط آگروباکتریوم در گیاه اطلسی

در ادامهٔ آزمایشات، پس از کشت گیاه اطلسی در محیط کشت MS و بهینه‌سازی سیستم باززایی گیاه (Plant regeneration) این سیستم برای آزمایشات انتقال ژن یا Transformation مورد استفاده قرار گرفت. پس از اطمینان از حضور پلاسمید در آگروباکتریوم، ابتدا باکتری در محیط کشت مایع با حجم ۳۰ml-۲۰ کشت و پس از ٢٤ ساعت رشد باکتری بر روی شیکر، کشت توأم (coculture) باکتری‌ها با قطعات برگ گیاه اطلسی صورت گرفت. پس از مدت ۱۰ دقیقه، قطعات برگ به محیط کشت باززایی شماره ۲ حاوی mg/ml ۱۰-۵ کانامایسین منتقل گردید و در اتاق کشت نگهداری شدند.

پس از ٤ تا ٦ هفته، نتایج بدست آمده نشان داد که در محیط کشت باززایی حاوی کانامایسین، درصد بالایی از جداکشت‌ها نکروزه و زرد شدند و از بین رفتند و. تنها

قطعات برگی که عمل انتقال ژن در آنها صورت گرفته بود رشد کرده در محیط کشت باززایی به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین زنده ماندند. در این آزمایشات از حدود ۵۰۰ قطعه جداکشت برگ که در انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت در حدود ۲۰ قطعه موفق به ادامه فعالیت در محیط کشت حاوی کانامایسین شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که ۵ درصد نمونه‌های کشت شده ترانسفم شده و حاوی ژن GUS می باشند که آزمایشات تکمیلی از جمله amplification PCR از ناحیه ژن GUS این درصد را تائید نمود(شکل۲).

در شکل۳ گزینش نوساقه‌ای اطلسی حاوی ژن مقاومت به کانامایسین در محیط کشت حاوی این آنتی‌بیوتیک نشان داده شده است. قطعات نکروزه در این شکل، نشان دهندهٔ عدم انتقال ژن در این نمونه‌ها و نوساقه‌ای رشد یافته بیانگر انتقال موفق ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و به علت ترانس فورماسیون در این نمونه‌ها می‌باشد.

بررسی وجود ژن GUS در گیاهان ترانسفرم شده

به منظور تأیید وجود ژن در گیاهان ترانسژنیک قطعه کوچکی از برگ جدا ومطابق روش احسانپور و جونز (۱۹۹٦)(۲) پس از استخراج DNA و با استفاده از دو پرایمر با ترادف ذیل PCR گردید.

بحث

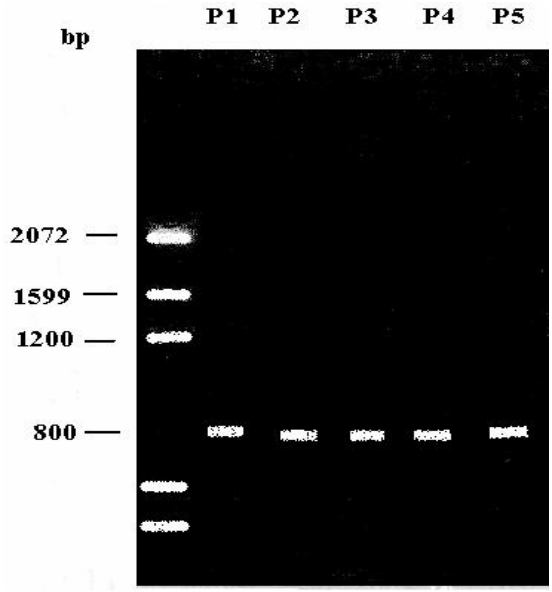
در این تحقیق، ابتدا شرایط بهینه به منظور کشت و باززائی گیاه اطلسی در شرایط کشت در شیشه بدست آمد. باززائی گیاه از قطعات برگ و یا ساقه گیاه می‌تواند از دو طریق صورت گیرد. یکی از روش غیرمستقیم یعنی ابتدا کالوس تولید می‌شود و سپس از کالوس و یا از سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس جنین سوماتیک تولید می‌گردد. سپس جنین تبدیل به یک گیاه کامل می‌شود دوم از روش مستقیم یا اندامزائی که بدین منظور قطعات ساقه و برگ در محیط کشت باززائی قرار می‌گیرد و از این قطعات ابتدا جوانه نوساقه و سپس نوساقه تولید می‌گردد. در مطالعات حاضر از روش دوم استفاده شد پس از بهینه سازی محیط کشت باززائی که در آن محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بکار رفت بالاترین درصد باززائی در گیاه اطلسی را بوجود آورد. این نتایج نشان می‌دهد برای هر گونه گیاهی و حتی برای هر نوع قطعه جدا کشت بعنوان مثال ساقه، برگ، پروتوپلاست و ریشه و امثال آن محیط کشت مناسب خاص خود بایستی استفاده شود و پاسخ نمونه گیاهی کاملاً وابسته به نوع ژنوتیپ است (۲). . در این محیط کشت تنها یک سیتوکینین (BAP) استفاده شده است. ازا آنجائیکه گیاه اطلسی بعنوان یک گیاه مدل محسوب می‌شود و از طرف دیگر با توجه به اینکه مسیر باززائی بصورت اندامزایی بوده و تولید کالوس مد نظر نبوده است" بنابراین هورمون اکسین به محیط کشت اضافه نشده است. این در حالیست که در برخی از گیاهان مانند قطعات برگ سیب‌زمینی رقم کوزیما برای باززائی گیاه لازم است مخلوطی از سیتوکسین، اکسین و جیبرلیک اسید استفاده شود(۱).

پس از تعیین سیستم باززائی، از این سیستم جهت

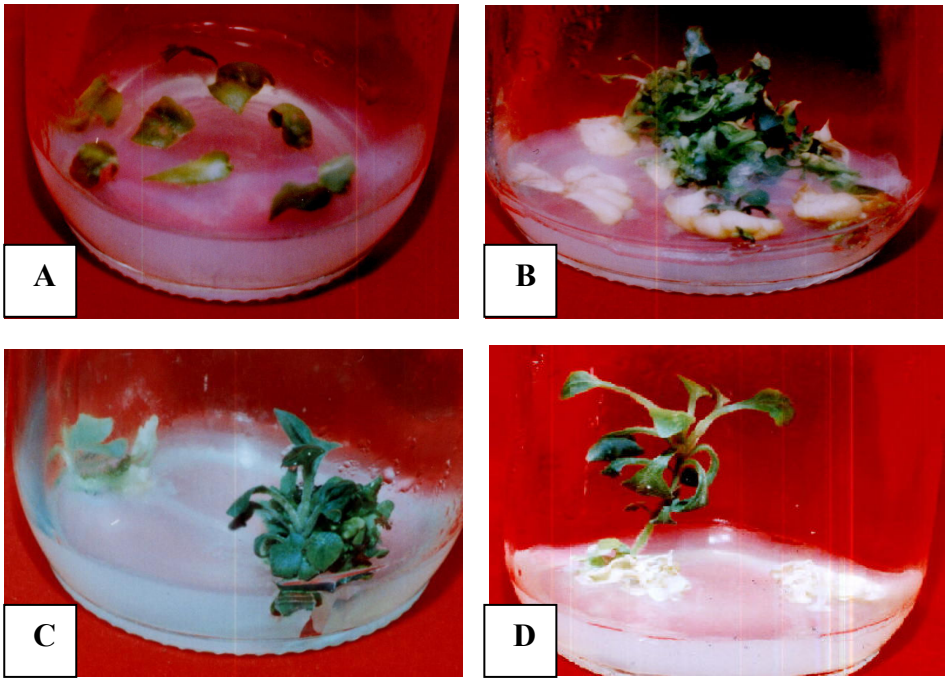
ترانسفورم نمودن گیاه استفاده شد از آنجائیکه در سیستم انتقال ژن به گیاه توسط اگروباکتریوم زخمی شدن بافت گیاهی لازم است بنابراین تکه شدن قطعات برگ این شرایط را فراهم می‌نماید. در اثر بریدن بافت، سلولهای آسیب دیده بعنوان یک پاسخ به این شرایط اقدام به تولید مشتقات فنلی می‌نمایند. برای اتصال باکتری به دیواره سلولی حاضر این ترکیبات فنلی لازم است. برخی از گیاهان علی‌رغم اینکه هنگام ترانسفرماسیون زخمی می‌شوند ولی باکتری نمی‌تواند در آنها انتقال ژن انجام دهد که این پدیده خود یک موضوع وابسته به ژنوتیپ است. بعنوان مثال خانواده لگومها و همچنین تک لپه ای ها از نظر ترانسفرم شدن با اگروباکتریوم بسیار دیر پاسخ هستند در حالیکه خانواده سیب‌زمینی برای مثال اطلسی، تنباکو و سیب‌زمینی نسبتاً راحت تر ترانسفرم می‌شوند.

5' CTG ATA GCG GAC AAA AA 3'

5' GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA 3'



شکل۲- نتایج حاصل از PCR بیانگر وجود ژن GUS با اندازه تقریبی bp ۸۰۰ در نمونه گیاهان اطلسی ترانس ژنیک p1,p2,p3,p4,p5 می باشد.



شکل۳-
A کشت قطعات برگ اطلسی در محیط کشت حاوی کانامایسین
B گزینش جوانه های مقاوم به کانامایسین و نکروزه شدن نمونه های غیر مقاوم
C ایجاد نوساقه (shoot)
D باززایی کامل گیاه مقاوم به کانامیسین

در بین این گیاهان گیاه اطلسی و گیاه تنباکو و همچنین گیاه *Arabidopsis thaliana* با راندمان بالاتری ترانسفرم می‌شوند که شاید از دلایل مهم آن ترشح ترکیبات فنلی خاص بعنوان یک سیگنال سلولی خاص و سازگاری اگروباکتریوم با این ترکیبات وهمچنین وجود گیرنده های خاص در سطح سلولهای این گیاهان باشد. بهرحال پس از انتقال ژن ازناحیه T-DNA تغییر یافته بعنوان مثال ژن GUS و ژن NPTII چندین حالت ممکن است بوجود آید. بعنوان مثال ممکن است ادغام چندگانه (Multiple insertion) که یکی از رایجترین آنهاست صورت گیرد. اگر چنین حالتی بوجود آید بیان یا (expression) ژن منتقل شده دچار مشکل خواهد شد. در آزمایشات ما با توجه به اینکه گیاه بخوبی در محیط کشت حاوی کانامایسین مقاومت نمود و ویژگیهای مورفولوژیک گیاهان باززائی شده طبیعی بود و همچنین نتایج PCR ثابت بود می توان نتیجه گرفت که حداقل در گیاهان مورد مطالعه چنین اتفاقی نیافتاده است.

در آزمایشات انجام شده حاضر درصد تولید گیاهان ترانس ژنیک حدود ۵٪ بود. اگر چه این میزان از نظر آماری پائین است ولی دو نکته بایستی مد نظر قرار گیرد.

اول اینکه برای ترانسفرم شدن حتی تولید یک گیاه ترانسفرم کامل برای اصلاح گیاه کافی است زیرا در مراحل بعدی می‌توان این گیاه را تکثیر و از آن بذر تهیه و استفاده نمود. دوم اینکه در مقایسه با سایر گیاهان که توسط محققین دیگر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، گیاه اطلسی با درصد بالاتری ترانسفرماسیون می‌دهد بنابراین بطور نسبی فراوانی انتقال ژن در گیاه اطلسی بسیار بالاتر از برخی از گیاهان بویژه خانواده لگومها می‌باشد. البته اگر گیاهان خانواده تک لپه‌ای‌ها را نیز در نظر بگیریم که امکان انتقال ژن توسط اگروباکتریوم در آنها بسیار سخت تراست این نسبت در گیاه اطلسی بسیار با ارزش تلقی می‌گردد.

منابع

۱- قاسم زاده "م . باز زائی گیاه از قطعات برگ و ساقه سیب زمینی رقم کوزیما. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه اصفهان. گروه زیست شناسی ، ۱۳۷۸.

2- A.A. Ehsanpour, and M.J.K. Jones Glucuronidase expression in transgenic tobacco roots with *Parasponia* promoter on infection with *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 28: 407-413. (1996).

3- H., Galliano, A.E., Muller, J.M. Lucht, and P. Meyer, The transformation booster sequence from *Petunia hybriada* is a retrotransposon derivative that binds to the nuclear scaffold. *Mol Gen Genet*. 247:614-622. (1995).

4- P.J. Hooykaas, and R.A. Schilperoot, Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*. 19: 15-38. (1992).

5- H,R.B., Horsc J.E., Fry, N.L, Hoffmann, D., Efichholtz, S.O. Rogers, and R.T. Fraley, A simple and general method for transferring genes into plants. *Biological sciences, Monsanto Campany, St. Louis, Missouri* 63167. (1984).

6- C., Kuhlemeier, P.J. Green, and N.H. chua, Regulation of gene expression in higher plants. Ann. Rev. *Plant Physiol*. 38: 221-57. (1987).

7- M.T., Madigam, J. M. Maotinko, and J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms.* Prentice Hall International, Inc, Eighth edition. New York. (1997).

8- T. Murashige, and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*.15: 473-479. (1962).

9- T. Micheal, Madigan, John M., Maotinko, Jack parker. *Brock Biology of microorganisms*. *Prentiee* Hall International, Ine. Eighth edition. UK. (1997).

10- A., Oietz – Pfeilstetter, N., Arndt, v. Kay, and J. Bode, Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in petunia. *Transgenic Res*. 12: 83-99. (2003).

11- J. S.C., Rockel, B., Danm, L.S. Melchers, and A. Hoekema. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Reports*. 12:644-467. (1993).

12- R.H. Smit, Agrobacterium – mediated transformation of plants. *Plant Tissue Culture.* Academic Press, CA. (1992).

13- S., Toth, P., Scott, S. Sorvari, and O. Toldi, Effective and reproducible protocols for *in vitro* culturing plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Seience*. 166: 1027-1034. (2004).