جهت تهیه فایل WORD 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

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤

مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسي برخي فاكتورهاي موثر در انتقال ژن به گياه گوجه‌فرنگي (*Licopersicon esculentum*)

بهمن حسيني*[1]، فرج الله شهرياري[2]، هاله هاشمي[3]، حسن مرعشي[2] و محمد فارسي[2]**
۱- دانشجوي كارشناسي ارشد بيوتكنولوژي دانشگاه فردوسي مشهد pbhosseini@yahoo.com
۲- اعضاي هيئت علمي دانشكده كشاورزي دانشگاه فردوسي مشهد، ميدان آزادي، دانشگاه فردوسي، دانشكده كشاورزي
۳- عضو هيئت علمي پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و بيوتكنولوژي ، صندوق پستي -۶۳۴۳-۱۴۱۵۵ تهران، ايران

چكيده
در اين مطالعه از سويه GV3850 آگروباكتريوم تومفسينس جهت انتقال ژن به گياه گوجه‌فرنگي(*Licopersicon esculentum*) استفاده و برخي از فاكتورهاي كاربردي موثر در انتقال ژن مورد بررسي قرار گرفت. بدين منظور در طي يک آزمايش مقدماتي ژنوتيپ KalG گوجه‌فرنگي و ريزنمونه‌هاي كوتيلدوني و هيپوكوتيلي و محيط MS حاوي ۲ميلي‌گرم در ليتر BAP و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر NAA به ترتيب به عنوان بهترين ژنوتيپ ، ريزنمونه و محيط كشت باززايي شناسائي گرديدند . همچنين در همين آزمايش مقدماتي معلوم گرديد كه محيط انتخابي حاوي۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين و۱۵۰ ميلي‌گرم در ليتر سفوتاكسيم به عنوان مناسبترين سطوح جهت انتخاب تراريختها ميتواند مورد استفاده قرار گيرد. ماهيت تراريختي گياهان از دو طريق رنگ‌آميزي هيستوشيميايي و واكنش زنجيره‌اي پليمراز تأييد گرديد. با توجه به شرايط بهينه شده فوق الذكر تأثير مدت زمانهاي مختلف تلقيح ("۵،"۳۰، ۱، ۳ و ۵ دقيقه) با OD= ۰/۸ مورد ارزيابي قرار گرفت. بيشترين باززايي در محيطهاي انتخابي با تيمارهاي ۳ و ۵ دقيقه بدست آمد.
واژه هاي كليدي: انتقال ژن، آگروباكتريوم، گوجه‌فرنگي

مقدمه:

گوجه‌فرنگي زراعي (*Lycopersicon esculentum*) به عنوان گياه مدل جهت اصلاح ساير گياهان دوليه‌اي مورد استفاده قرار مي گيرد. با اين حال روش تراريختي گوجه‌فرنگي هنوز يك روش معمول و قابل تكرار براي همه ارقام آن نيست. فقدان روش تراريختي و باززايي با كارايي بالا مهمترين مانع در كاربرد فن‌آوري انتقال ژن در ارقام اقتصادي گوجه‌فرنگي مي‌باشد. جهت تراريختي گوجه‌فرنگي تاكنون از ريزنمونه‌هاي مختلفي نظير، ديسك برگي (مك كورميك و همكاران، ۱۹۸٦)، كوتيلدون (وان روكل و همكاران، ۱۹۹۳) و پروتوپلاست (روزت و گيليسن، ۱۹۸۹) استفاده شده است. تراريختي مؤفق اغلب وابسته به فاكتورهاي مربوط به استرين باكتريايي و غلظت باكتري (دروري و آلتمن، ۲۰۰۱)، شرايط همكشتي و باززايي سلولهاي تراريخته (كوستا و همكاران، ۲۰۰۰)، و سيستم موثر انتخاب گياهان تراريخته مي‌باشد (ولچوا و همكاران، ۲۰۰٤). بنابراين توسعه روش تراريختي موثر و مستقل از ژنوتيپ ضروري مي‌باشد. از عوامل ديگر افزايش ميزان تراريختي، بهينه‌شدن غلظت كانامايسين در دوره آغازش ساقه، طويل‌شدن و ريشه‌زايي گياهچه‌هاي باززايي شده مي‌باشد (هو و فيليپس، ۲۰۰۱). رومرو وهمكاران، ۲۰۰۱، پس از تلقيح ريزنمونه‌ها با آگروباكتريوم در محيط انتخابي حاوي كانامايسين به روش موثر باززايي دست يافتند ولي تنها ۱/٤ درصد گياهان بازيزا شده تراريخت بودند. در بعضي از آزمايشات غلظت كانامايسين در خلال طويل‌شدن ساقه بيش از ۲۰۰ ميلي‌گرم در ليتر گزارش شده است (هو و فيليپس، ۲۰۰۱).
هدف از اين مطالعه، بررسي شرايط موثر در افزايش تراريختي گوجه‌فرنگي نظير غلظت مناسب كانامايسين، غلظت مناسب باكتري و مدت زمانهاي تلقيح ريزنمونه و محيط باززايي با توجه به ژنوتيپهاي مورد استفاده بود.

مواد و روشها

از گياهچه‌هاي حاصل از كشت بذور ژنوتيپ KalG، كه قبلا" توسط ميرشمسي، (۱۳۸۲) مورد مطالعه قرار گرفته بود به عنوان مواد گياهي استفاده گرديد. با توجه به نتايج بهينه‌سازي كشت بافت اين گياه از ريزنمونه‌هاي كوتيلدوني و هيپوكوتيلي و محيط MS حاوي ۲ميلي‌گرم در ليتر BAP و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر NAA به عنوان بهترين ريزنمونه و محيط كشت باززايي استفاده شد. براي بهينه‌سازي انتقال ژن از آگروباكتريوم سويه GV3850 داراي پلاسميد pBI121 حاوي ژن *NPTII* تحت كنترل پيش‌بر NOS به عنوان ژن انتخابگر و ژن *uidA* (*gus*) تحت كنترل پيش‌بر CaMV35S به عنوان ژن گزارشگر استفاده گرديد.

تعيين سطح موثر كانامايسين

به منظور بررسي اثر غلظتهاي متفاوت كانامايسين (sigma) بر روي باززايي و رشد گياهچه‌ها، ريزنمونه‌ها به مدت ۳ هفته در محيط باززايي حاوي غلظتهاي مختلف كانامايسين شامل ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ميلي‌گرم در ليتر و ۱۵۰ ميلي‌گرم در ليتر سفوتاكسيم (sigma) قرار گرفتند. اثرآنتي‌بيوتيك بر روي ريزنمونه‌ها در قالب طرح كاملا" تصادفي با ۳ تكرار بررسي گرديد.

تلقيح ريزنمونه‌ها با آگروباكتريوم

به منظور تعيين مناسبترين زمان تلقيح و غلظت باكتريايي براي ريزنمونه‌ها، آزمايشات تلقيح با غلظت باكتري OD= ۰/۸ در پنج زمان ("۵، "۳۰، ۱، ۳ و ۵ دقيقه) در قالب يک طرح كاملا" تصادفي با سه تكرار به اجرا گذاشته شد. بدين منظور تك كلوني‌هاي باكتري در محيط LB حاوي ۱۰۰ ميلي‌گرم در ليتر از كانامايسين كشت و پس ازرسي‌دن به OD مورد نظر، تيمارهاي مختلف آزمايش اعمال گرديد. پس از دو روز همكشتي، كليه ريزنمونه‌ها جهت حذف آگروباكتريوم به محيط انتخابي حاوي ۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين و ۱۵۰ ميلي‌گرم در ليتر سفوتاكسيم منتقل شدند. ريزنمونه‌هاي زنده هر دو هفته يكبار واكشت گرديد. روند القاي كالوس و فراواني باززايي هر يك از تيمارها ثبت و جهت القاي ريشه گياهچه‌هايي كه حداقل ۵ سانتي‌متر طول داشتند به محيط MS بدون هورمون منتقل گرديدند. گياهچه‌هاي زنده در محيط انتخابي جهت تأييد انتقال ژن بتاگلوكورونيداز از طريق دو آزمون *gus* سنجي پس از ۲و٤ هفته به روش جفرسون، (۱۹۸۷) و پي‌سي‌آر پس از ۱۰ هفته با استفاده از پرايمرهاي اختصاصي ژن *gus* انجام گرديد.

جهت تهیه فایل WORD 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

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات تعیین سطح موثر کانامایسین بر اساس آنالیز واریانس نشان داد که، تیمارهاي مختلف از نظر آماري با یکدیگر تفاوت معني داري داشتند ($P<\%٥$). کمترین تعداد ریز نمونه از بین رفته در شرایط صفر (کنترل) مشاهده شد. در سطح ۲۵ میلي‌گرم در لیتر ۷۰ درصد نمونه‌ها زنده مانده و وارد مرحله کالوس‌زایي شدند. . در سطح ۵۰ میلي‌گرم در لیتر نیز نزدیك به ۵۰ درصد نمونه‌ها پس از ۳ هفته تشکیل کالوس نمودند. در سطوح بالاتر از ۵۰ میلي‌گرم در لیتر کانامایسین، اکثر بافتها پس از ۳ هفته کاملا" سفید شده و از بین رفتند (شکل-۱). سه غلظت انتهایي از نظر تعداد ریز نمونه ازبین رفته با یکدیگر تفاوت معني دار نداشتند لذا غلظت ۵۰ میلي‌گرم در لیتر کانامایسین جهت استفاده در محیط انتخابي تعیین شد. با توجه به گزارشات مختلف (اکتام و همکاران، ۱۹۹۹و پارك وهمکاران، ۲۰۰۳) میزان غلظت کانامایسین به کار رفته بین ۱۰۰-۵۰ میلي‌گرم در لیتر متفاوت بود که این تفاوت احتمال"مي‌تواند در ارتباط با نوع رقم و خلوص کانامایسین به کار رفته باشد. مشکلي که در استفاده از نژاد GV3850 آگروباکتریوم وجود داشت، تکثیر زیاد آن در اطراف ریزنمونه‌ها باعث مي‌شد که اکثر تلقیح‌ها با شکست مواجه و ریزنموه‌ها از بین بروند. در ابتدا از ۱۵ دقیقه تا ۳۰ دقیقه با ۱/۲- ۱ = OD جهت تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده گردید که به علت تکثیر سریع باکتري باعث نکروزه‌شدن بافتها گردید. براي اجتناب از این مشکل مدت زمانهاي مختلف براي تلقیح باکتري درنظر گرفته شد. آزمایشات نشان داد که در اکثر پتري‌هایي که ریزنمونه‌ها به مدت ٥ ثانیه با ۰/۸ =OD در سوسپانسیون باکتري غوطه‌ور شدند ریزنمونه‌ها در محیط انتخابي از بین رفته و هیچ گیاهچه‌اي بازرا نشد. میانگین کالوس‌زایي در ۳۰ ثانیه ۳ مورد و باززایي مستقیم بطور میانگین کمتر از ۱ مورد مشاهده گردید. با افزایش مدت زمان تلقیح میزان کالوس‌زایي و باززایي گیاهچه ها افزایش یافت به نحویکه بیشترین تعداد کالوس و گیاهچه در مدت زمان ۳ و ٥ دقیقه مشاهده گردید. بین ٥ و ۳ دقیقه از نظر کالوس‌زایي و تولید شاخساره با یکدیگر تفاوت معني داري در سطح ($P<\%٥$) وجود نداشت (جدول-۱). پارك و همکاران (۲۰۰۳) از OD=۱ جهت تلقیح ریزنمونه‌هاي ٥ رقم گوجه‌فرنگي مورد آزمایش، استفاده نمودند. به نظر مي‌رسد با توجه به استرین باکتریایي، گونه گیاهي، ژنوتیپ و ریزنمونه‌هاي مورد آزمایش OD باکتري فرق خواهد کرد. شستشوي ریزنمونه‌ها در سه مرحله مختلف توسط MS مایع به همراه ۵۰۰ میلي‌گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث حذف پرگنه‌هاي باکتري از ریزنمونه‌ها گردید. ریشه‌زایي گیاهچه‌هاي تراریخت احتمالي در محیط MS فاقد هورمون حاوي ۵۰ میلي‌گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلي‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بخوبي صورت گرفت. پارك و همکاران (۲۰۰۳)، از هورمون IAA به میزان۱ میلي‌گرم در لیتر جهت القاي ریشه‌زایي استفاده نمودند. نتایج رنگ‌آمیزي هیستوشیمیایي (شکل-۲) نشان داد که نقاط *gus* مثبت در حاشیه‌هاي بریده شده پس از ۲ هفته قابل مشاهده مي‌باشد. نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌اي پلیمراز با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي ژن بتا-گلوکورونیداز یك باند ۵۲۵ کیلوبازي را در گیاهان تراریخته احتمالي نمایان ساخت. در حالیکه در گیاهان غیرتراریخته و آب به عنوان شاهدهاي منفي باندي تکثیر نگردید (شکل-۳). به نظر مي‌رسد با توجه به داده‌ها و آنالیزهاي انجام گرفته در این آزمایشات، استفاده از OD پایین، واکشتهاي مکرر و روش شستشوي ۳ مرحله‌اي جهت حذف به موقع باکتري از محیط کشت بهتر باشد. بدون استفاده از محیط کشتهاي مختلف و تنها در دو مرحله امکان باززایي و القاي ریشه وجود دارد. میزان تراریختي با بیان ژن *gus* در این تیمارها ۱۰ درصد ثبت گردید.

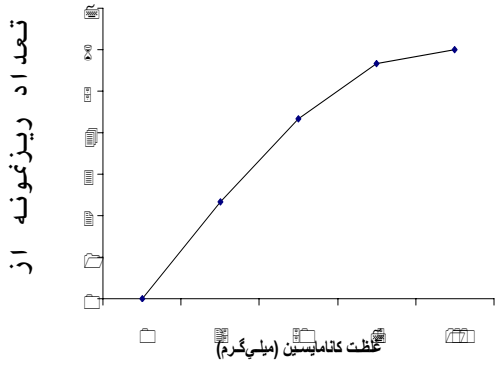
تشکر و قدرداني

بدینوسیله از مهندس امین میر شمسي ، خانم بوستاني وخانم مهندس جورابچي صمیمانه قدرداني بعمل مي‌آید.

جدول-۱): اثر سطوح مختلف مدت زمان تلقیح ریز نمونه‌ها در کالوس‌زایي و باززایي ژنوتیپ KalG

زمان	کالوس	گیاهچه	ریزنمونه از ازبین رفته
	میانگین		
۵ ثانیه	۰/۰^{c}	۰/۰^{b}	۱۰/۰^{a}
۳۰ ثانیه	۲/۷^{b}	۰/۳^{b}	۷/۰^{b}
۱ دقیقه	۱/۷^{bc}	۰/۳^{b}	۸/۰^{b}
۳ دقیقه	۵/۳^{a}	۳/۰^{a}	۱/۷^{c}
۵ دقیقه	۵/۳^{a}	۴/۰^{a}	۰/۷^{c}

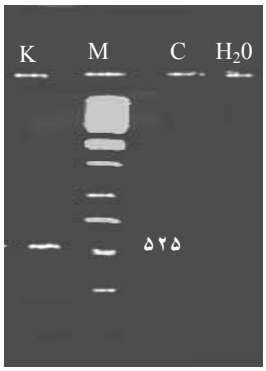
میانگین‌هایي که داراي حرف یا حروف مشترك هستند از نظر اماري با هم اختلاف معني‌داري ندارند ($\alpha = \%٥$)



شکل(۱): اثر غلظت کانامایسین بر روي ریزنمونه ها

جهت تهیه فایل WORD 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

شکل-۲) : نتایج رنگ‌آمیزي گیاه گوجه‌فرنگي تراریخت:
الف : پس از ۱۵، ب: پس از ۳۰



شکل-۳) : الکتروفورز محصولات PCR گوجه‌فرنگي با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي ژن gus: K: KalG ، M: مارکر Fermentase 1 kb ، C

منابع

۱. میر شمسي، ا. ۱۳۸۲، بررسي قابلیت ترکیب‌پذیري ده لاین گوجه‌فرنگي به منظور تولید بذر هیبرید با عملکرد بالا. پایان نامه کارشناسي ارشد دانشکده کشاورزي دانشگاه فردوسي مشهد. ۱۳۸۲

2. Costa, M.G.C., Noguera, F.T.S., and Cecon, P.R., 2000. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell Rep. 19, 327-332.
3. Drorri, E., and A., Altman., (2001). Transformation of tomato with the *betaA* gene to confer osmotic stress tolerance (glycine-betaine production). Plant Sci. 49, 152-153.
4. Hu, w., and Philips, G.C., 2001. A combination of overgrowth-control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). *In vitro* Cell Biol-Plant. 37, 12-18.
5. Jefferson, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep. 5, 387-405.
6. McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., Fraley, R., 1986. Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 5, 81-84.
7. Oktem, H.A., Bulbul, Y., Oktem, E., Yucel, M., 1999. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation studies in tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller). J of Botany.23, 345-348.
8. Park, S.H., Morris, J.L., Park, J.E., Hirschi, K.D., Smith, R.H., 2003. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation. Plant Physiol. 200-257.
9. Romero, J.P., Houlne, G., Canas, L., Schantz, R., and Chamarro, J., 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell, Ttissue and Organ Culture 67, 173-180.
10. Velcheva, M., Faltin, Z., Flaishman, M., Eshdat, Y., and Perl, A., 2004. A liquid culture system for Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.). Plant Science, in press.