

تراریزش گیاه گندم بواسطه آگروباکتریوم به منظور انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز

نگین محمدی زاده^{1*}، مسعود توحیدفر²، مطهره محسن‌پور³

¹ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج

² عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج

³ دانشجوی دکتری دانشگاه مازندران

چکیده

به منظور تولید گیاهچه تراریخته گندم (*Triticum aestivum*) مقاوم به قارچ‌های فوزاریوم و ارایزیف، از 4 سویه آگروباکتریوم EHA101، AGL، LBA4404، C58 و حامل پلاسمید pBI121 نوترکیب، حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز هر کدام به طور جداگانه تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* و نیز ژن انتخابگر نئومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشبر *NOS* استفاده شد. ریزنمونه‌های جنین نارس 5 ژنوتیپ از ارقام (مغان، آرتا، سایسون و گاسکوژن) و لاین A، پس از هم‌کشتی با سوسپانسیون باکتری به محیط‌گزینشی کالوس‌دهی حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا پس از رشد در محیط‌گزینشی، انتخاب و به محیط‌باززایی حاوی 25 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین انتقال یافتند. در این پژوهش دو گیاهچه حاصل از تلقیح با سویه C58 با درصد تراریزش (0/31) درصد و 1 گیاهچه حاصل از تلقیح با سویه LBA4404 با درصد تراریزش (0/074) درصد از رقم آرتا حاصل شد. در سایر ارقام و سویه‌ها هیچ گیاهچه تراریخته‌ای مشاهده نشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آنالیز لکه‌گذاری DNA نشان داد که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نیز نئومایسین فسفوترانسفراز را در ژنوم خود دارا هستند.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم، کیتیناز، گلوکاناز، گندم تراریخته.

مقدمه

گندم مهمترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر 220-230 میلیون هکتار و در ایران در حدود 6/5 میلیون هکتار است که از سایر غلات بیشتر و برابر 22 درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (Kazemi Arbat, 2005). تولید کل غلات در جهان برابر با 1/8 میلیارد تن می باشد که بیشترین میزان آن (حدود 500 تا 600 میلیون تن) به گندم اختصاص دارد و از نظر سطح زیر کشت و تولید سالانه نیز گندم در درجه اول اهمیت قرار دارد (Safikhani, 2007). به همین علت غذای عمده بیش از 40 کشور جهان می باشد که جوابگوی 35 درصد جمعیت دنیاست (Bushuk, 1998). در ایران نیز این محصول تامین کننده بیشترین نیاز غذایی کشور بوده و روزانه حدود 47 درصد از کالری مصرفی سرانه کشور را تامین می نماید (Safikhani, 2007). بوته های گندم در تمام مراحل رشد و در تمام محیط های طبیعی در معرض تنش های گوناگون مکانیکی، فیزیولوژیکی و زیستی قرار دارند که رشد، عملکرد و تکامل طبیعی آنها را مختل می سازد. از جمله عوامل عمده زنده در کاهش عملکرد، بیماری های قارچی هستند که بزرگترین و قدیمی ترین گروه پاتوژن های گندم اند (Shahcheraghi and

Masoumi, 1997) و از آن جمله می توان به قارچ فوزاریوم¹ و ارایزیف گرامینیس² اشاره کرد. با وجود پیشرفت هایی که از طریق روش های اصلاحی استاندارد صورت گرفته، اما اصلاح مقاومت به روش های مرسوم، یک فرایند سخت، وقت گیر و مداوم است، بدان علت که، در اکثر موارد، صفات تحت کنترل چندین ژن بروز یافته و حتی هنگامی که ارقام مقاوم حاصل می شوند، به علت نمو دائمی و نیز موتاسیون پاتوژن ها، این ارقام نمی توانند برای مدت زمان طولانی، مقاومت پایداری از خود نشان دهند (Friesen et al., 2006). در سال های اخیر، بیوتکنولوژی گیاهی منبعی سرشار از ابداع و خلاقیت بوده و انتقال ژن های مطلوب ویژه را، بدون همراهی با هیچ ژن نامطلوبی، به گیاه زراعی میسر ساخته است (Farsi and Zolala, 2006). ارزیابی ژرم پلاسم گندم مقدار بسیار ناچیزی از مقاومت به قارچ را نشان می دهد، به همین علت، ورود ژن های آنتی توکسین و ضد قارچی منحصر به فرد از طریق تراریزش ژنتیکی، موجب افزایش پتانسیل مقاومت در ارقام گندم می شود. ژن های ضد قارچی، گروهی از پروتئین ها به نام پروتئین های مربوط به بیماریزایی را رمز می کنند که موجب تخریب دیواره های سلول قارچی، ایجاد اختلال

¹ Fusarium

² Erysiph graminis

افزایش می‌دهد (Tohidfar et al., 2005). این مسیر می‌تواند منجر به کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی گردد (Mauch et al., 1988). تکنولوژی نوین مهندسی ژنتیک، ورود نه تنها یک ژن، بلکه چندین ژن را، با روش‌های دقیق، قابل کنترل و قابل پیش‌بینی‌تر از آنچه در روش‌های مرسوم اصلاحی انجام می‌شده است، فراهم می‌کند. بنابراین به‌کارگیری مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای فراهم نمودن غذا جهت رویارویی با نیازمندی‌ها در آینده نزدیک مورد نیاز است و می‌توان پیشرفت‌های زیادی را در چارچوب زمانی کوتاه‌تر نسبت به روش‌های مرسوم که در گذشته صورت گرفته‌اند، انجام داد (Kole and Timothy, 2008). هدف از این پژوهش، تراریزش گندم با استفاده از دو ژن کیتیناز و گلوکاناز برای مقاومت به بیماری‌های قارچی به ویژه فوزاریوم¹ و ارایزیف² می‌باشد که می‌تواند به کاهش مصرف سموم قارچکش منجر گردد.

مواد گیاهی

بدور 4 رقم تجاری گندم نان شامل ارقام پاییزه (سایسون و گاسکوژن) و ارقام بهاره (آرتا، مغان) و نیز لاین A از بخش غلات موسسه

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 -1 و 3 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 -1,4 به هم متصل هستند. کیتیناز پیوند بین کربن‌های 1 و 4 از دو N - استیل گلوکز آمین متوالی در ساختمان کیتین را می‌شکند (Shin et al., 2008). آنزیم β -1 و 3 گلوکاناز نیز، پیوند پلی‌ساکارید بین کربن‌های 1 و 3 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 -1 و 3 گلوکانازها انجام می‌گیرد که این امر موجب ایجاد مقاومت افزایشی به قارچ‌ها می‌شود و در صورت وجود این دو آنزیم در گیاه گندم، این گیاه قادر خواهد بود که مقاومت بهتر و پایداری را در برابر قارچ‌های عامل بیماری زنگ زرد، قهوه‌ای، سیاهک، سفیدک و فوزاریوم از خود نشان دهد. بنابراین مهندسی ژن‌های رمز کننده کیتیناز به همراه سایر ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های ضد قارچی در گیاهان، حفاظت آنها را در برابر پاتوژن‌های قارچی

¹ Fusarium

² Erysiph

آماده‌سازی و تلقیح ریزنمونه‌ها

در ادامه، بذور مورد آزمایش در گلدان کشت و پس از طی کلیه مراحل داشت در گلخانه، بذور نارس آنها در فاصله زمانی 12 الی 18 روز پس از گرده‌افشانی برداشت شد. بذور نارس ابتدا به مدت 5 دقیقه در الکل 70 درصد ضدعفونی و سپس آبشویی شده، پس از آن به مدت 20 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 2/5 درصد به طور کامل ضدعفونی شدند و پس از آبشویی و خشک شدن بر روی کاغذ خشک‌کن استریل در مقابل هود کشت، در زیر میکروسکوپ جدا شده و بر روی پتری دیش‌های حاوی 35 میلی‌لیتر محیط کشت کالوس‌دهی شامل نمک‌ها و ویتامین‌های MS، 2 میلی‌گرم برلیتر توفوردی، 40 میلی‌گرم برلیتر تیامین، 200 میلی‌گرم برلیتر کازئین، 500 میلی‌گرم برلیتر گلوتامین، 30 گرم برلیتر ساکارز، 8 گرم برلیتر آگار و $\text{pH} = 5/8$ قرار گرفتند، به گونه‌ای که سپرچه جنین رو به بالا و سمت دیگر آن که بر اثر برش مریستم ساقه - ریشه، زخمی شده، بر روی محیط قرار گیرد. پس از آن محلول باکتری با $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1-1/2$ ، به وسیله سمپلر بر روی تک تک ریز نمونه‌ها قطره‌گذاری شد. سپس جنین‌های نارس آغشته به باکتری، به مدت 20 دقیقه در مقابل هود خشک شده و پس از بستن درب پتریدیش، به مدت 2 الی 3 روز تحت شرایط تاریکی و دمای 26 درجه

تحقیقات و اصلاح نهال و بذور کرج تهیه و به عنوان مواد گیاهی استفاده شد.

سازه ژنی و سویه‌های باکتری

در این پژوهش از 4 سویه آگروباکتریوم نوترکیب شامل EHA101، AGL، LBA4404 و C58، حامل پلاسمید pBI121-ChiGlu(-) (Mohsenpour *et al.*, 2008)، به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. همچنین جنین نارس گندم به عنوان ریزنمونه جهت تراریزش با آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی تلقیح

سویه‌های آگروباکتریوم جهت انتقال ژن، در محیط LB مایع حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و 75 میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین، در دمای 28 درجه سانتی‌گراد در دستگاه شیکر - انکوباتور با دور 200rpm کشت شدند. پس از طی مدت زمان 18-22 ساعت، به منظور افزایش کارایی تراریزش، 500 میکرولیتر از محلول باکتری رشدیافته به همراه ماده القاءگر استوسرینگون با غلظت 400 میکرو مولار، به 3 میلی‌لیتر محیط LB جدید حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین اضافه شده و برای رشد باکتری‌های تازه، در دستگاه شیکر - انکوباتور قرار گرفت، $\text{OD}_{600\text{nm}}$ مناسب باکتری جهت تلقیح در این پژوهش 1-1/2 در نظر گرفته شد.

سانتی‌گراد و 16 ساعت نور با شدت 10000 لوکس و 8 ساعت تاریکی، به فیتوترون، انتقال یافتند. کالوس‌های جنین‌زا، به رنگ کرم روشن بوده و ظاهری ترد و شکننده دارند. در مراحل بعدی با مشاهده شاخه‌زایی، آنتی‌بیوتیک‌ها از محیط حذف شده و گیاهچه‌های باززا شده، به محیط باززایی حاوی 1/5 گرم برلیتر ذغال فعال جهت تولید ریشه منتقل شدند. واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام و فاکتورهای نظیر درصد شاخه‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زای شاخه‌دار شده به کل کالوس‌های جنین‌زا $\times 100$) و ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه‌ها و کالوس‌های جنین‌زای ریشه‌دار شده به کل کالوس‌های جنین‌زا $\times 100$) و در صد تراریزش (نسبت گیاهچه‌های تراریخته به کل جنین‌های نارس تلقیح‌شده با آگروباکتریوم $\times 100$) بررسی شد. گیاهچه‌های باززاشده در درون شیشه، ابتدا به گلدان‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدان‌های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند.

تائید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته

استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های گندم به روش دلاپورتا (Dellaporta et al., 1983) انجام گرفت. به منظور اثبات تلفیق ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *nptII* واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم 25 میکرولیتری حاوی یک واحد

سانتی‌گراد در فیتوترون قرار گرفتند. این زمان جهت رشد و نفوذ باکتری به جنین مورد نیاز است. پس از طی این مدت، جنین‌ها با محلول سفوتاکسیم با غلظت 250 میلی‌گرم بر لیتر شستشو و بر روی کاغذ صافی خشک شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

جنین‌های تلقیح شده به محیط کالوس‌دهی انتخابی حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و 250 میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت کنترل رشد باکتری منتقل شده و تحت شرایط تاریکی و دمای 26 درجه سانتی‌گراد در فیتوترون به مدت 15 تا 18 روز نگهداری شدند. در طی این مدت، فاکتورهای نظیر درصد کالوس‌دهی (نسبت کالوس‌های تولید شده به کل جنین‌های نارس $\times 100$) و درصد جنین‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زا به کل کالوس‌ها $\times 100$) بررسی شد. پس از طی مدت زمان کالوس‌دهی، کالوس‌های جنین‌زا به محیط باززایی انتخابی شامل نمک‌ها و ویتامین‌های MS، 2 میلی‌گرم بر لیتر BAP، 0/1 میلی‌گرم بر لیتر IAA، 30 گرم بر لیتر ساکارز، 7 گرم بر لیتر آگار و pH=5/7 به همراه 25 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و 250 میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت کنترل رشد باکتری و همچنین تحریک شاخه‌زایی و ریشه‌زایی، تحت شرایط دمایی 26 درجه

آب (فاقد هر گونه DNA) و DNA گیاه شاهد به عنوان کنترل منفی و از نمونه پلاسمید به عنوان کنترل مثبت، برای تأیید تراریزش گیاه استفاده گردید. همچنین برای تأیید بیشتر تلفیق ژن، آزمون لکه گذاری DNA با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن *nptII* و پیشبر CaMV35S، براساس روش Sambrook and Russell (2001) انجام شد. عمل نشاندار کردن کاوشگرها نیز به روش کیت DIG Labeling شرکت Roche انجام شد. توالی آغازگرها در جدول 1 آمده است. برای اثبات حضور ژن کیتیناز، با آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن کیتیناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S و برای اثبات حضور ژن گلوکاناز با آغازگرهای اختصاصی رو به عقب ژن گلوکاناز و رو به جلو پیشبر CaMV35S و نیز برای اثبات حضور ژن *nptII* با آغازگرهای اختصاصی رو به عقب و رو به جلو ژن نئومایسین فسفوترانسفراز، بررسی شدند.

آنزیم DNA پلیمرز Taq، 25 نانوگرم DNA، 2/5 میکرولیتر dNTPs (0/2 میلی مولار)، 2 میکرولیتر MgCl₂ (25 میلی مولار) و 2/5 میکرولیتر بافر PCR 10X و 10 پیکومول از 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 94 درجه سانتی گراد 5 دقیقه و 35 چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در 94 درجه، 30 ثانیه در 60 درجه و یک دقیقه در 72 درجه سانتی گراد و تکمیل بسط در 72 درجه 7 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 نئومایسین فسفوترانسفراز، با دمای بهینه اتصال 58 درجه سانتی گراد انجام شد. در هر سه واکنش از نمونه

جدول 1- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تایید تراریزش گیاهان تراریخته احتمالی.

توالی Sequence	آغازگرها Primers	قطعه تکثیری (bp) Amplified Fragment
گلوکاناز <i>gluconase</i>	Forward : CAGGTCCAAGGGCATCAACG Reverse : CTCCGACACCACCACCTTC	629
کیتیناز <i>chitinase</i>	Forward : GAGTGGTGTGGATGCTGTTG Reverse : GCCATAACCGACTCCAAGCA	872
نئومایسین فسفو ترانسفراز <i>nptII</i>	Forward : GAACAAGATGGATTGCACGC Reverse : GAAGAACTCGTCAAGAAGGC	786
پیشبر 35S 35S Promoter	Forward : CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG Reverse : TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC	123
کیتیناز-35S 35S- <i>chitinase</i>	Forward : CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG Reverse : GCCATAACCGACTCCAAGCA	1096
گلوکاناز-35S 35S- <i>gluconase</i>	Forward : CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG Reverse : TCTCCGACACCACCACCTTC	972

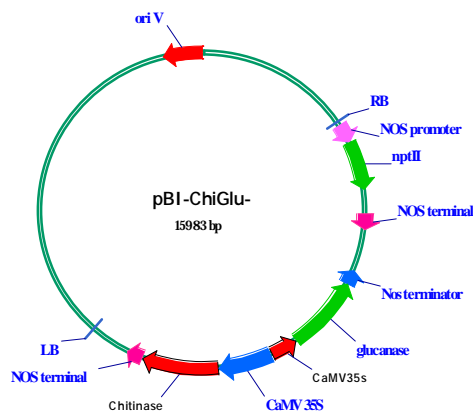
Table 1- Primers used in PCR analysis for accuracy of putative transgenic plants.

نتایج حاصل تلقیح با سویه C58 با درصد تراریزش اولیه 0/31 درصد، تراریختی را نشان دادند (جدول 2). بیشترین درصد کالوس‌دهی 77 درصد و بیشترین درصد شاخه‌زایی 2/1 درصد مربوط به رقم آرتا تلقیح شده با سویه LBA4404 و

در این تحقیق 5 گیاهچه باززا شده رقم آرتا بدست آمد که از میان آن‌ها 3 گیاهچه، شامل 1 گیاهچه حاصل تلقیح با سویه LBA4404 با درصد تراریزش اولیه 0/074 درصد و دو گیاهچه

دارا هستند (شکل های 4، 5 و 6). آنالیز لکه گذاری DNA تلفیق ژنهای فوق را در ژنوم این 3 گیاهچه در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد که تأیید بیشتری بر نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز بود. این 3 گیاه، در واکنش زنجیره ای پلیمرز و آزمون لکه گذاری DNA پاسخ مثبت نشان دادند (شکل های 7 و 8).

بیشترین درصد جنین زایی 23/3 درصد و نیز بیشترین درصد ریشه زایی 1/9 درصد مربوط به رقم آرتا تلقیح شده با سویه C58 بدست آمد (جدول 2). واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد که 3 گیاهچه تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد، حداقل یک نسخه از ژنهای کیتیناز، گلوکاناز و نوومايسين فسفوترانسفراز (*nptII*) را در ژنوم خود



شکل 1- وکتور دوگانه pBI121 نو ترکیب حاوی ژنهای کیتیناز و گلوکاناز.

Figure 1- pBI121 Recombinant binary vector containing *chitinase* and *glucanase* genes.



شکل 2- گیاهچه آلبینو در محیط کشت دارای آنتی بیوتیک کانامایسین.

Figure 2- Albino explants in medium containing kanamycin.

جدول 2- فراوانی تراریزش گیاهچه های باززا شده از جنین های نارس گندم در تراریزش با اگروباکتریوم.

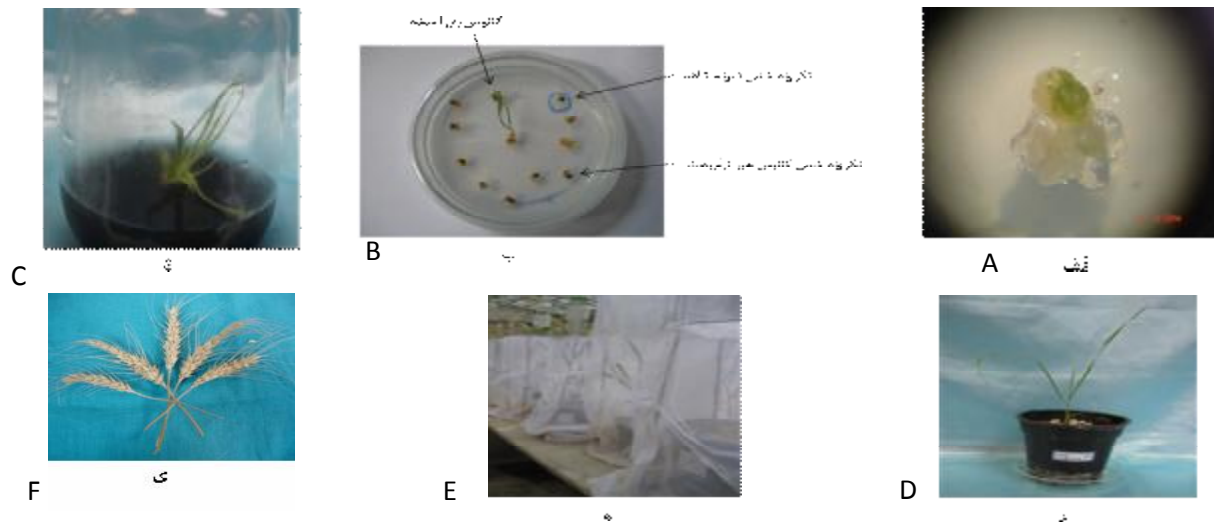
درصد تراریزش*	تعداد گیاهچه تراریخت	درصد ریشه زایی	درصد شاخه زایی	درصد جنین زایی	درصد کالوس دهی	تعداد ریز نمونه جنین نارس	سویه اگروباکتریوم	ارقام cultivars
The percent of transformation	The number of transgenic explant	The percent of rooting	The percent of shooting	The percent of embryogenesis	The percent of callus induction	The number of immature embryo	<i>Agrobacterium</i> strain	
0	0	0.09	0.03	1.7	9	315	LBA4404	سایسون Sison
0	0	0.02	0.1	2.5	15	470	LBA4404	گاسکوژن Gascogen
0	0	1.2	1.7	12	37	425	LBA4404	مغان Mogan
0.074	1	1.8	2.1	21	77	1350	LBA4404	آرتا Arta
0	0	0.7	1.2	5.5	17	65	LBA4404	لاین A: A Line A
0	0	0.04	0.15	2.2	11	125	AGL	سایسون Sison
0	0	0.01	0.02	2.7	16.5	245	AGL	گاسکوژن Gascogen
0	0	1.3	1.1	13.6	42	273	AGL	مغان Mogan
0	0	1.4	1.2	19.5	65	520	AGL	آرتا Arta
0	0	1.2	0.8	6.8	15.1	42	AGL	لاین A: A Line A
0	0	0	0.04	1.3	7.8	75	EHA101	سایسون Sison
0	0	0	0.25	1.6	12	87	EHA101	گاسکوژن Gascogen
0	0	1.4	1.86	11	32	145	EHA101	مغان Mogan
0	0	0.98	1.15	16.2	67	240	EHA101	آرتا Arta
0	0	1.1	1	7.7	15.6	35	EHA101	لاین A: A Line A
0	0	0	0	2.1	8.2	335	C58	سایسون Sison
0	0	0	0	1.8	10	546	C58	گاسکوژن Gascogen
0	0	1.03	1.8	10.5	47	377	C58	مغان Mogan
0.31	2	1.9	1.83	23.3	72	630	C58	آرتا Arta
0	0	0.9	0.3	4.9	12.7	28	C58	لاین A: A Line A

* درصد تراریزش از (نسبت گیاهچه های تراریخت به تعداد جنین های نارس تلقیح شده با اگروباکتریوم × 100)، بدست آمد.

Table 2- Transformation Frequency of regenerated explants from wheat immature embryo using *Agrobacterium*-mediated transformation.

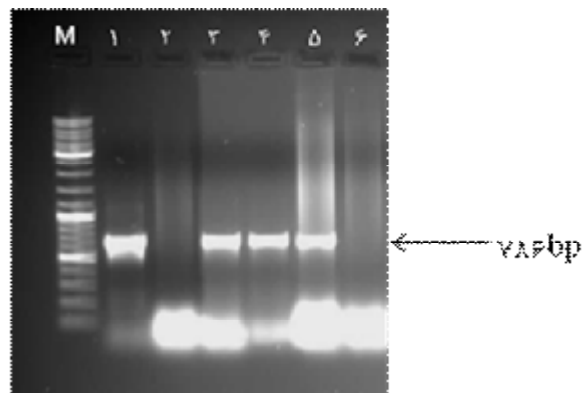
در محیط باززایی، علاوه بر جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی که موجب عدم ریشه‌زایی می‌شوند، محیطی کم نور، مناسب با رشد ریشه را نیز فراهم می‌آورد (شکل 3- ج). از این رو، به منظور جلوگیری از تاثیر سوء آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر باززایی ارقام آرتا، مغان، سایسون، گاسکوژن و نیز لاین A، کالوس‌های جنین‌زا که دارای ظاهری ترد و شکننده و رنگ کرم روشن بودند، در محیط کالوس‌دهی و باززایی فاقد کانامایسین قرار گرفتند. مراحل مختلف رشد گیاهچه تراریخته احتمالی در شکل 3 نشان داده شده است. هر 3 گیاهچه باززا شده، به واکنش زنجیره ای پلیمرز (شکل 4، 5 و 6) و آزمون لکه‌گذاری DNA (شکل های 7 و 8) پاسخ مثبت نشان دادند و تراریزش آنها حداقل در وجود یک نسخه از هر کدام از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و نئومایسین فسفوترانسفراز تایید شد. آزمون لکه‌گذاری DNA، حضور ژن نئومایسین فسفوترانسفراز و پیشبر CaMV35S، رادر 3 گیاه تراریخته تایید کرد.

استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی اثرات سوئی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و فراوانی بالای آلبینیسم را به همراه داشت. نتایج حاصل از این مشاهدات نشان دادند که آنتی‌بیوتیک کانامایسین به میزان 50 میلی‌گرم بر لیتر در محیط کالوس‌دهی و باززایی موجب عدم باززایی می‌شود. همچنین با استفاده از مقادیر 50 میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین در محیط کالوس‌دهی و 25 میلی‌گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه‌زایی به میزان بسیار کم دیده شد که این تعداد نیز پس از چند روز دچار رنگ‌پریدگی شده و در نهایت آلبینیسم را نشان دادند (شکل 2). با حذف کانامایسین از محیط کالوس‌دهی و استفاده از غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر در محیط باززایی، شاخه‌زایی بطور بارز مشاهده شد اما ریشه‌زایی دیده نشد. گیاهچه‌های فوق نیز پس از مدتی دچار رنگ‌پریدگی شدند. با انتقال گیاهچه‌ها به محیط باززایی فاقد کانامایسین و حاوی 1/5 گرم در لیتر ذغال فعال، رنگ سبز گیاهچه‌ها مجدداً پدیدار شد. ذغال فعال



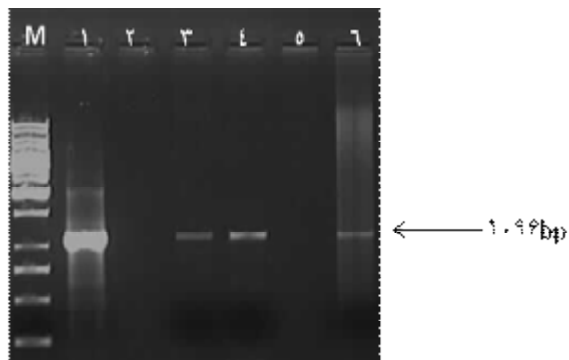
شکل 3- مراحل مختلف رشد گیاه تراریخته. الف) کالوس در ابتدای باززایی، ب) کالوس باززا شده، ج) گیاهچه باززا شده در شیشه، د) گیاهچه باززا شده در گلدان، ه) انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، ی) بذور تراریخته.

Figure 3- different stages of transgenic plant growth. (A) initial callus regeneration, (B) regenerated callus, (C) invitro regenerated explants, (D) regenerated explant in pot, (E) transferring explants to green house, (F) transgenic seeds.



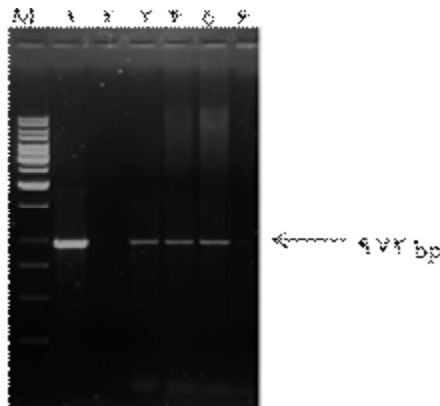
شکل 4- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب ژن *nptII* برای اثبات تراریختی رقم آرتا، M، نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb plus)، چاهک 1 پلاسמיד (کنترل مثبت)، چاهک 2 گیاه شاهد، چاهک 3 گیاه تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه LBA4404، چاهک 4 و 5 گیاهان تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه C58، چاهک 6 نمونه آب (واکنش PCR بدون الگوی DNA).

Figure 4- PCR analysis using *nptII* gene forward and reverse specific primers for accuracy of Arta cultivar transformation, M : DNA molecular weight (1 Kb plus) ladder, lane 1 : plasmid (positive control), lane 2 : control plant, lane 3 : Arta transgenic plant inoculated by LBA4404 strain, lane 4 and 5 : Arta transgenic plants inoculated by C58 strain, lane 6 : water sample (PCR reaction without DNA template).



شکل 5- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلوی پیشبر 35S CaMV و رو به عقب ژن کیتیناز برای اثبات تراریختی رقم آرتا، M، نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، چاهک 1 . پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک 2 . نمونه آب (واکنش PCR بدون الگوی DNA)، چاهک 3 و 4 . گیاهان تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه C58، چاهک 5 . گیاه شاهد، چاهک 6 . گیاه تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه LBA4404.

Figure 5- PCR analysis using CaMV 35S forward and *chitinase* gene reverse primers for accuracy of Arta cultivar transformation, M : DNA molecular weight (1 Kb) ladder, lane 1 : plasmid (positive control), lane 2 : water sample (PCR reaction without DNA template), lane 3 and 4 : Arta transgenic plants inoculated by C58 strain, lane 5 : control plant, lane 6 : Arta transgenic plant inoculated by LBA4404 strain.



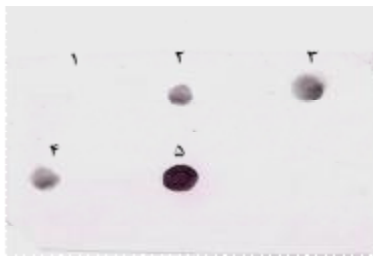
شکل 6- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رو به جلوی پیشبر CaMV 35S و رو به عقب ژن گلوکاناز برای اثبات تراریختی رقم آرتا، M، نشانگر وزن ملکولی DNA (1 Kb)، چاهک 1 پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک 2 نمونه آب (واکنش PCR بدون الگوی DNA)، چاهک 3 و 4 گیاهان تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه C58، چاهک 5 گیاه تراریخته آرتا تلقیح شده با سویه LBA4404، چاهک 6 گیاه شاهد.

Figure 6- PCR analysis using CaMV 35S forward and *gluconase* gene reverse primers for accuracy of Arta cultivar transformation, M : DNA molecular weight (1 Kb) ladder, lane 1 : plasmid (positive control), lane 2 : water sample (PCR reaction without DNA template), lane 3 and 4 : Arta transgenic plants inoculated by C58 strain, lane 5 : Arta transgenic plant inoculated by LBA4404 strain, lane 6 : control plant.



شکل 7- آزمون لکه‌گذاری برای اثبات تراریختی گندم با استفاده از کاوشگر تهیه شده برای پیشبر CaMV35S. نمونه 1، 3 و 4 گیاهچه‌های تراریخت، نمونه 2 پلاسمید (کنترل مثبت)، نمونه 5 گیاه شاهد (کنترل منفی).

Figure 7- Dot blot analysis for accuracy of wheat transformation using synthesized prob of CaMV35S promoter, sample 1,3 and 4 : transgenic plants, sample 2 : plasmid (positive control), sample 5 : control plant (negative control).



شکل 8- آزمون لکه‌گذاری برای اثبات تراریختی گندم با استفاده از کاوشگر تهیه شده برای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز. نمونه 1 گیاه شاهد (کنترل منفی)، نمونه 2، 3 و 4 گیاهچه‌های تراریخت، نمونه 5 پلاسمید (کنترل مثبت)

Figure 8- Dot blot analysis for accuracy of wheat transformation using synthesized prob of *nptII* gene, sample 1 : control plant (negative control), Sample 2 ,3 and 4 : transgenic plants, sample 5 : plasmid (positive control).

بحث

خواهد داشت، علاوه بر آن در تراریزش به واسطه آگروباکتریوم، DNA در صورت ورود به درون ناحیه فعال رونویسی، فعالیتی مطمئن از رونویسی و بیان ژن‌های خارجی را نشان می‌دهد. با این حال کاربرد این روش در مقیاس گسترده در ژنوتیپ‌های مختلف دارای محدودیت است (Patnaik *et al.*, 2006). فاکتورهای مانند ژنوتیپ، سویه آگروباکتریوم، ریزنمونه، ناقل دوگانه، نشانگر انتخابی، پیشبر، شرایط و محیط‌های تلقیح و هم‌کشتی، تیمارهای اسمزی، غلظت آگروباکتریوم، کشت بافت و محیط بازرایی ممکن است بر سودمندی تراریزش و بهبود پایداری سلول‌های گیاهی، پس از آلوده‌سازی با آگروباکتریوم تاثیر بگذارند (Montemurro *et al.*, 2008). با ارزیابی صفات (کالوس‌دهی، جنین‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی) در ارقام

با وجود آنکه انتقال ژن به روش زیست‌پرتابی روشی موفق برای تراریزش ژنتیکی گندم بوده و بدون وجود هر گونه محدودیت بیولوژیکی یا محدودیت میزبانی، به طور رایج، برای تولید مفید ژرم پلاسم گندم تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرد، (Rakszegi *et al.*, 2001). اما به علت ورود چندین نسخه از ژن خارجی گرایش بالا برای خاموشی ژن و در نتیجه کارایی کم تراریزش را به همراه دارد (Montemurro *et al.*, 2008). در مقابل، استفاده از روش انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم مزایای متعددی از جمله، توانایی انتقال و الحاق قطعه DNA با بازآرایی کمتر درون ژنوم میزبان، ورود تعداد نسخه‌های کمتر و پایداری ژن خارجی، عدم حضور توالی‌های بدنه ناقل و نیز هزینه کمتر آزمایشات را در پی

وجود در این تحقیق پس از اعمال آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی، پدیده‌هایی نظیر عدم شاخه‌زایی، عدم ریشه‌زایی و آلبنیسم به میزان بالایی بیش از حد انتظار دیده شد. نتایج بدست آمده از مشاهدات این نکته را بیان داشت که آنتی‌بیوتیک کانامایسین حتی در مقادیر کم نیز موجب از بین رفتن سبزینه گیاه در ارقام فوق شده و از ریشه‌زایی آنها جلوگیری به عمل می‌آورد، از این رو بهتر است به جای کانامایسین از آنتی‌بیوتیک دیگری نظیر جنیتیسین استفاده کرد. در ادامه با حذف آنتی‌بیوتیک کانامایسین از محیط کشت باززایی، اکثریت کالوس‌های جنین‌زا به تدریج شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و نیز باززایی را نشان دادند، سپس از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آنالیز لکه‌گذاری DNA تاریختی آنها بررسی شد. نکته بسیار مهم دیگر در این تحقیق، وجود توالی‌هایی مشابه با ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در ژنوم گیاه شاهد است به همین علت استفاده از این ژن‌ها برای تشخیص تاریختی گیاه به دلیل دیده شدن باند مورد انتظار در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گیاه شاهد، با مشکل مواجه خواهد شد. استفاده از آغازگرهای طراحی شده نظیر توالی پیشبر، توالی پایانبند و نیز نشانگر انتخابی، به تنهایی و یا همراه با یکی از آغازگرهای ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، به علت هم‌جواری با این ژن

(سایسون، گاسکوژن، آرتا، مغان) و لاین A، مشاهده شد که ارقام بهاره در مقایسه با ارقام پائیزه، پس از تراریزش با آگروباکتریوم، عملکرد مناسب‌تری در جهت تراریختی از خود نشان می‌دهند. یکی از دلایل مهم که می‌توان به آن اشاره کرد، نوع ژنوتیپ است. همانطور که گفته شد، تراریزش با آگروباکتریوم به نوع ژنوتیپ‌ها و واریته‌های مورد آزمایش بستگی دارد و فقط تعداد محدودی از واریته‌ها تراریخته می‌شوند، که اساساً به علت تفاوت‌های زیاد در توانایی تولید کالوس و باززایی در میان واریته‌های گندم پس از آلوده‌سازی با آگروباکتریوم اتفاق می‌افتد (Machii *et al.*, 1998). در روش انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، تراریزش حاصل تلفیق ژن خارجی در کروموزوم گیاه می‌باشد. به همین علت برای انتخاب کالوس‌های تراریخته احتمالی، از ژن‌های نشانگر انتخابی که به همراه ژن‌های هدف در ژنوم میزبان وارد می‌شوند، استفاده می‌شود. ژن نئومایسین فسفوترانسفراز (*nptII*)، موجب مقاومت گیاه در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود، همچنین به دلیل اینکه این ژن همراه با ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز بر روی پلاسמיד قرار دارد، با انتخاب گیاه بر اساس مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در محیط کشت، به طور غیرمستقیم نه با احتمال 100 درصد، گیاهانی که حاوی ژن‌های هدف می‌باشند، انتخاب می‌گردند. با این

ها در ناحیه T-DNA و در نتیجه عدم حضور این توالی ها در ژنوم گیاه غیرتراریخت، اثبات تراریزش را ممکن خواهد ساخت. انتظار می رود گیاهان حاصل با دریافت دو ژن کدکننده پروتئین های ضدقارچی مقاومت پایداری را نسبت به بیماری های قارچی از خود نشان دهند. از این رو آنالیزهای بیشتری برای اثبات حضور و بیان ژن های وارد شده و نیز آزمایشات زیست سنجی جهت اثبات مقاومت به بیماری های قارچی و در نهایت آنالیز نسل های تراریخته برای اثبات پایداری ژن در آینده مورد نیاز خواهد بود.

منابع

- Bushuk W (1998). Wheat breeding for end product use. *Euphytica* 100: 137-145
- 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.
- Farsi M, Zolala J (2006). Principle of Plant Biotechnology. Publication of Mashhad Ferdosi university. Pp. 425.
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence transfer. *Natural Genetics* 38:953–956.
- Kazemi Arbath H (2005). Cereal Morphology and Physiology. Tabriz university Publication. Pp. 104
- 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.
- Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H, Hagio T (1998). Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue and Organ. Culture* 53: 67-74.
- 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 Report* 26:479–488.
- Mauch F, Mauch Mani B, Boller T (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue, II: Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and beta-1,3-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- Mohsenpour M, Babayian jelodar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008). Design and Construct of Four Recombinant Plasmid Vector for Plant transformation by Chitinase, Glucanase and Bt genes. *Journal of Agricultural Science and Natural resources of Gorgan* 4: 68-80.

- Montemurro C, Sabatta W, Stinbiss HH, Soltesz A, Blanco A, Crosatti C (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation in durum wheat. Poster Abstract – E.09.
- Patnaik D, Vishnudasana D, Khurana P (2006). Current Science 3:307-330.
- 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
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning. A Laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Shahcheraghi M, Masoumi M (1997). Guide of Wheat diseases. Publication center of Tehran University 11-36.
- 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.
- 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.

***Agrobacterium*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum*) using chitinase and glucanase genes**

Mohammadizadeh N.^{*1}, Tohidfar M.², Mohsenpour M.³

¹ MSc of Agricultural Biotechnology Institute, Karaj, Iran

² Academic member of Agricultural Biotechnology Institute, Karaj, Iran

³ PhD student of Mazandaran University, Sari, Iran

Abstract

Production of transgenic wheat (*Triticum Aestivum*) was studied by *chitinase* and *glucanase* genes by *Agrobacterium*-mediated transformation and also pBI121 plasmid containing *neomycin phospho transferasa* selectable marker gene under control of Nos promoter. In addition, *chitinase* and *glucanase* genes were individually expressed under control of CaMV35S promoter. Immature embryo explants excised from seeds then were co-cultivated with bacterial suspension containing the recombinant plasmid and they were placed to callus induction medium supplemented with 50 mg/l kanamycin. Embryonic calluses, were selected and they were transferred to regeneration medium with 25 mg/l kanamycin in order to producing shoots and roots. Maximum percent of transformation by *Agrobacterium*-mediated transformation was 0.31% for transformed ARTA with C58 strain and then 0.074% for transformed ARTA with LBA4404 . There was not any transgenic plant in other cultivars or strains and transformation percent was 0%. PCR and Dot blot analysis showed that the putative transgenic plants consist at least one copy of either, *chitinase*, *glucanase* and *neomycin phospho transferase* genes in their genome in comparison with control plants.

Key word: *Agrobacterium*, *chitinase*, *glucanase*, *transgenic wheat*

* Corresponding Author: N. Mohammadizadeh

Tel: 09133706936

Email: ne.mohammadi@yahoo.com