علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۴ (ص ۱۵۵-۱۴۷)

انتقال همزمان ۳ ژن باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژنز به گیاه آرابیدوپسیس

فاطمه علیزاده آریمی[۱]، ویدا چالوی[۲*] و علی دهستانی[۳]
۱ و ۲. کارشناس ارشد و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران
۳. دانشیار پژوهشکدهٔ ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳)

چکیده

بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه‌شده (PCBs)، ترکیبات حلقوی کلرداری هستند که به‌دلیل خواصی چون مقاومت به حرارت و پایداری، در سطح گسترده در دهه‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۸۰ در صنایع گوناگون کاربرد داشته‌اند. همین ویژگی پایداری و مقاوت به تجزیه شدن همراه با تأثیرات زیانبار بر سلامت انسان، سبب شد که تولید آنها از دههٔ ۱۹۸۰ میلادی متوقف شود. در حال حاضر، آلودگی آب‌ها و خاک‌های سراسر جهان به PCBs، یکی از مشکلات مهم محیط زیست به‌شمار می‌آید. یکی از راه‌های کاهش آلودگی به PCBs انتقال و بیان ژن‌های باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژناز (BPDO) که دارای توانایی تجزیهٔ PCBs هستند به گیاهان است. هدف پژوهش حاضر، یافتن روشی برای انتقال همزمان ژن‌های *bph* A، *bph* E و *bph* G، که اجزای رمزدهندهٔ آنزیم BPDO هستند به گیاه آرابیدپسیس بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده، ۳ ژن *bph* A، *bph* E و *bph* G که در ناقل pGreen کلون شده بودند به باکتری‌های E.coli و اگروباکتریوم‌های LBA4404 و C58C1 و در انتها به گیاه آرابیدپسیس انتقال یافتند. از لحاظ کارایی انتقال ژن به گیاه، بین دو سویهٔ اگروباکتریوم LBA4404 و C58C1 به‌کاررفته در این پژوهش اختلاف وجود داشت. بیشترین تعداد گیاهان تراریخته (۰/۸۵ درصد) با سویهٔ LBA4404 به‌دست آمد. تراریخت بودن گیاهچه‌های آرابیدوپسیس با انتخاب گیاهان کاملاً سبز در محیط دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و همچنین آزمون PCR تأیید شد. گیاهان تراریخت با موفقیت به خاک انتقال یافتند و به رشد خود ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: **بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه، گیاه آرابیدوپسیس، ناقل** pGreen.

مقدمه

گیاه‌پالایی فناوری بهره‌گیری از گیاهان برای آلودگی‌زدایی از خاک و آب‌های زیرزمینی است. بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه‌شده (PCBs) از ترکیبات معطر کلردار با فرمول شیمیایی عمومی $C_{12}H_{(10-n)}CL_n$ هستند که به‌دلیل مقاومت زیاد به حرارت و عدم اشتعال‌پذیری، از سال‌های ۱۹۲۹ تا ۱۹۸۰ به‌صورت گسترده در صنعت کاربرد داشتند (Van Aken *et al*., 2010). با توجه به سمی بودن این ترکیبات و تجمع آنها در بافت‌های چربی موجودات زنده و به‌دلیل آثار سوء آنها بر انسان، مانند بروز سرطان، ناهنجاری‌های ژنتیکی در نوزادان و تومورهای کبدی و تیروئیدی، حذف و تجزیهٔ PCBs از محیط ضروری است. یکی از آنزیم‌های مؤثر برای تجزیهٔ PCBs، آنزیم باکتریایی بی‌فنیل دی‌اکسیژناز (BPDO) است. این آنزیم دارای سه جزء اکسیژناز با دو زیرواحد *bph* A و *bph* E، یک فرودوکسین *bph*F و یک

* تلفن: ۰۹۱۱۱۵۶۲۶۹۹
E-mail: v.chalavi@sanru.ac.ir

فرودوکسین ردوکتاز *bph*G است. ژن‌های رمزدهندهٔ این آنزیم در باکتری *Burkholderia xenovorans* شامل *bph* A، *bph* E، *bph* F و *bph* G هستند (Mohammadi *et al*., 2007).

سیستم انتقال ژن به‌واسطهٔ اگروباکتریوم، یکی از کارامدترین روش‌های انتقال ژن در گیاهان شناخته شده است. یکی از ناقل‌های دوگانه که برای انتقال ژن به گیاه به‌واسطهٔ آگروباکتریوم به‌کار می‌رود، ناقل pGreen است که با ویژگی‌هایی نظیر کاهش سایز پلاسمید و داشتن چندین مکان کلون کردن ژن به‌عنوان حامل مناسب انتخاب شده است. pGreen برای همانندسازی در اگروباکتریوم، نیاز به عملکرد ژن RepA از لوکوس همانندسازی pSa دارد که این لوکوس در پلاسمید کمکی pSoup مستقر شده است (Hellens *et al*., 2000). برای انتقال این دو پلاسمید به اگروباکتریوم، می‌توان از دو روش انتقال همزمان و انتقال پی‌درپی ناقل‌ها با استفاده از روش‌های الکتروپوریشن یا ذوب و انجماد استفاده کرد (Hellens *et al*., 2000). انتقال همزمان پلاسمیدهای pGreen و pSoup به اگروباکتریوم با روش الکتروپوریشن کارایی زیادی دارد، ولی در صورت نداشتن دستگاه و مواد لازم برای الکتروپوریشن، باید از روش ساده و کم‌هزینهٔ ذوب و انجماد استفاده کرد.

بیشتر آزمایش‌های انتقال ژن به گیاهان شامل انتقال و بیان یک ژن تنهاست و انتقال همزمان چندین ژن به گیاهان برای یک مسیر بیوشیمیایی همچنان کاری دشوار به‌شمار می‌آید. راهکارهای گوناگونی برای انتقال چند ژن خارجی به داخل سلول‌های گیاهی وجود دارند. یکی از این روش‌ها، ایجاد یک ساختمان پلی‌پروتئینی است که در آن ترتیب رمزدهنده چندین پروتئین به یکدیگر ملحق شده و یک واحد نسخه‌برداری به‌وجود آورده‌اند. همچنین می‌توان از انتقال پی‌درپی یا همزمان چندین ناقل حامل ژن‌های مختلف استفاده کرد (Dafny-Yelin *et al*., 2007). از روش‌های دیگر برای بیان چندین ژن در یک گیاه، تلاقی گیاهان تراریختهٔ حاوی ژن‌های مختلف یا کلون کردن چندین ژن در یک ناقل به‌وسیلهٔ سر هم کردن کاست‌هاست (Dafny-Yelin *et al*., 2007).

برای انتقال ژن‌های بی‌فنیل دی‌اکسیژنز به گیاهان پژوهش‌هایی صورت گرفته است. در پژوهشی با انتقال ژن‌های *bph*E+*bph*A، *bph*F و *bph*G به‌صورت مجزا به گیاهان توتون، لاین‌های متفاوتی از گیاهان تراریختهٔ توتون ایجاد کردند (Mohammadi *et al*., 2007). آنان با انتقال همزمان ژن‌های *bph*A+*bph*E+*bph*G در یک ناقل و ژن *bph*F در ناقل دیگر، لاین‌های تراریخته‌ای از گیاهان توتون را تولید کردند. در دو پژوهش جداگانه، ژن *bph*C به گیاهان توتون انتقال یافت و تراریخته بودن گیاهان نیز با آزمون PCR (Francova *et al*., 2003) و وسترن‌بلات (Novacova *et al*., 2010) تأیید شد. تا کنون، گزارشی در زمینهٔ انتقال همزمان ژن‌های دی‌اکسیژناز باکتریایی به‌واسطهٔ اگروباکتریوم‌های LBA4404 و C58C1 به گیاه مدل آرابیدوپسیس منتشر نشده است. در این پژوهش، امکان انتقال همزمان ژن‌های بی‌فنیل دی‌اکسیژناز باکتریایی به گیاهان آرابیدوپسیس به‌روش غوطه‌وری گل‌آذین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

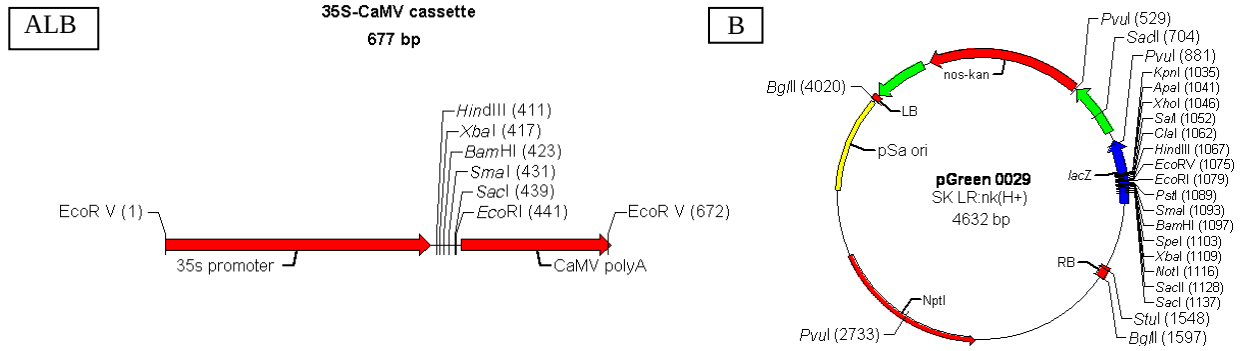
کشت و شرایط رشد گیاه آرابیدوپسیس

این پژوهش در آزمایشگاه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکدهٔ ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گرفت. برای اجرای آزمایش‌های انتقال ژن از گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) رقم کلمبیا استفاده شد. گیاهچه‌های آرابیدوپسیس از طریق کشت بذر در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد به‌دست آمدند.

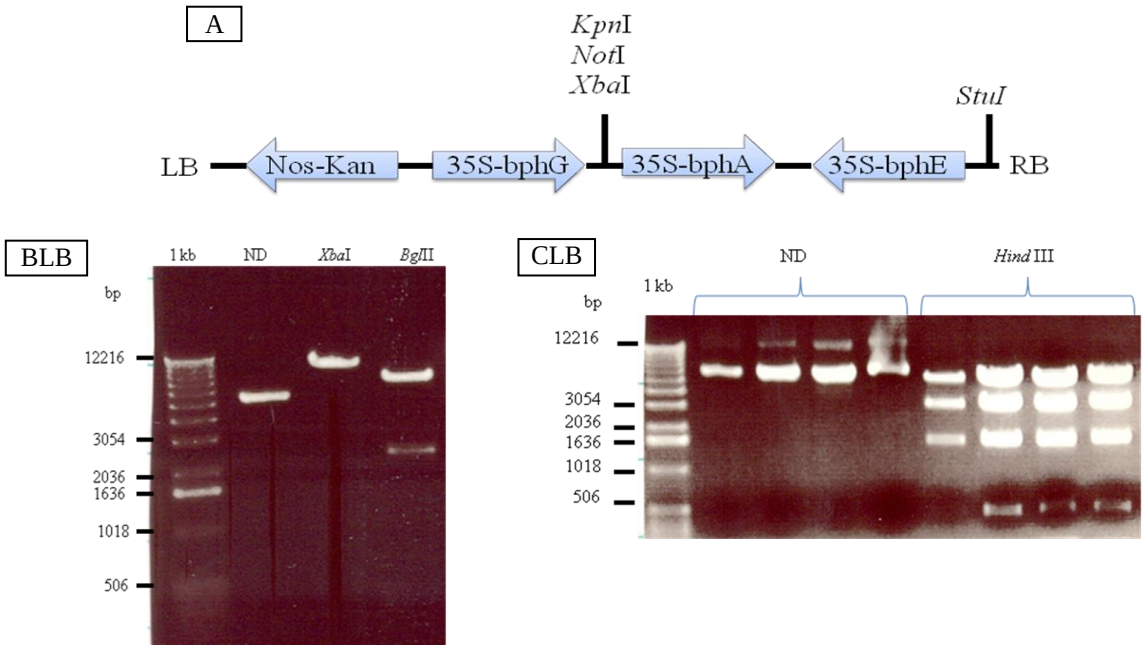
تهیهٔ پلاسمید نوترکیب

ژن‌های دی‌اکسیژنز از باکتری *B. xenovorans* سویهٔ LB400 را دکتر Jean-*François Laliberté* از مؤسسهٔ ملی پژوهش‌های استان کبک کانادا در اختیار این پژوهش قرار دادند. ژن‌های *bph*A، *bph*E و *bph*G به‌وسیلهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و از ژل خالص شدند. سپس هر کدام از این ژن‌ها بین تقویت‌کنندهٔ 35S و پایانهٔ PolyA ویروس موزائیک کلم در کاست 35S-2 کلون شدند (شکل۱-A). ابتدا، کاست خالص‌شدهٔ

35S-*bphE* در محل *Stu* I پلاسمید pGreen0029 کلون شد (شکل ۱-B). در مرحلهٔ بعدی کاست خالص‌شده 35S-*bph*A در محل KpnI پلاسمید، pGreen0029-bphE کلون شد. در نهایت، کاست خالص‌شدهٔ 35S-*bph*G در محل *Not* I پلاسمید pGreen0029-bphE+bphA کلون شد (شکل ۱-B) و پلاسمید pGreen0029-bphE+bphA+bphG (pG-AEG) مورد استفاده در این پژوهش را تولید کرد (شکل ۲- A). درستی کلون‌های انجام‌گرفته، به‌دقت به‌وسیلهٔ نقشهٔ محدودکننده و با استفاده از الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Xba* I، *Bgl* II و *Hind* III بررسی شد (شکل ۲- B و C). در ضمن، در ناحیهٔ T-DNA ناقل pGreen0029 ژن گزینش‌گر کانامایسین (Kan) بین پیش‌بر و پایان‌بر Nos قرار دارد (شکل ۱-B).



شکل ۱- A) ساختمان کاست 35S-2؛ B) ناقل pGreen



شکل ۲. پلاسمید نوترکیب به‌کاررفته در این آزمایش و نتیجهٔ هضم آنزیمی آن

A: ساختار شماتیک T-DNA پلاسمید حاوی ژن‌های *bph* A، *bph* E، *bph* G و *bph*، که در آن مرز چپ (LB)، مرز راست (RB)، به علاوه جایگاه آنزیم‌های برشی *Kpn* I، *Xba* I و *Not* I مشخص شده‌اند. B: نتیجهٔ هضم آنزیمی همین پلاسمید با آنزیم Xba I (با یک محل برش) که اندازهٔ قطعهٔ ۹۹۶۴ bp مورد انتظار را تولید کرد و آنزیم *Bgl* II (با دو محل برش) که اندازهٔ قطعات ۲۴۹۵ bp و ۷۴۷۴ مورد انتظار را تولید کرد، پلاسمید هضم‌نشده با ND مشخص شده است. C: نتیجهٔ هضم آنزیمی، این پلاسمید را با استفاده از آنزیم *Hind* III نشان می‌دهد که با چهار محل برش، قطعاتی با اندازه‌های ۴۶۱، ۱۵۲۶، ۲۹۶۷ و ۵۰۱۵ مورد انتظار را تولید کرد. پلاسمید هضم‌نشده با ND مشخص شده است.

انتقال سازه‌های پلاسمیدی خالص‌شده به اگروباکتریوم

از سویه‌های LBA4404 و C58C1 باکتری *Agrobacterium tumefacience* برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. پس از تهیهٔ سلول‌های مستعد از اگروباکتریوم با استفاده از کلرید کلسیم با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، انتقال پلاسمیدها با استفاده از تکنیک ذوب و انجماد با دو روش انتقال همزمان و انتقال پی‌درپی صورت گرفت. در روش انتقال همزمان pGreen حامل ژن‌های *bph*A، *bph*E و *bph*G (pGreen/*bph*AEG) به‌همراه پلاسمید pSoup به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم اضافه شد و بر روی محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین کشت شدند. در روش انتقال پی‌درپی ناقل‌ها، ابتدا ۵ میکرولیتر پلاسمید pSoup، به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم اضافه شد و درستی تراریخته بودن کلونی‌های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین رشد کرده بودند با آزمون کلونی PCR تأیید شد. سپس، پلاسمید pGreen/*bph*AEG به سلول‌های مستعد حامل پلاسمید pSoup اضافه شد و دوباره درستی تراریخته بودن کلونی‌های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی رشد کرده بودند با آزمون کلونی PCR به تأیید رسید.

تراریخته‌سازی گیاهان آرابیدوپسیس به روش غوطه‌ورسازی گل‌آذین (floral-dip)

برای تلقیح گیاه آرابیدوپسیس از اگروباکتریوم‌های سویه‌های LBA4404 و C58C1 استفاده شد. سویه‌های اگروباکتریوم حامل پلاسمید مورد نظر ابتدا در حجم یک لیتر محیط کشت LB رشد داده شدند. زمانی که تراکم باکتری در طول موج۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ تا ۱ رسید (بعد از ۴۸-۲۴ ساعت)، باکتری‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب باکتری‌ها در محیط تلقیح (حاوی ۱/۲ نمک‌های محیط کشت MS، ۱x ویتامین B5، ساکارز ۵ درصد و ۰/۰۳ درصد سیلوت ال-۷۷) حل شدند. تمامی گل‌آذین‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه در داخل سوسپانسیون نگه داشته شده و بعد از این مدت گیاهان از سوسپانسیون باکتری خارج و برای حفظ رطوبت با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند.

بهینه‌سازی انتقال ژن به آرابیدوپسیس

برای بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن، سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، غلظت‌های متفاوت کانامایسین و تیمارهای تاریکی و نور بررسی شدند. از سویه‌های اگروباکتریوم، سویه‌های LBA4404 و C58C1 برای تراریخته‌سازی آرابیدوپسیس به‌روش غوطه‌وری گل‌آذین ارزیابی شدند. پس از کشت بذرهای آغشته‌شده با محیط تلقیح، تعداد گیاهچه‌های سبز رشدیافتهٔ مربوط به هر سویه در محیط MS حاوی کانامایسین شمارش شد. در انتها نیز درصد فراوانی گیاهان تراریخت مربوط به هر سویه محاسبه شد.

تیمارهای تاریکی و نور

برای تیمار تاریکی، بذرهای کشت‌شده در محیط انتخابی به‌مدت سه روز در تاریکی و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. در تیمار روشنایی، بذرهای کشت‌شده در محیط انتخابی از ابتدا به اتاقک رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

غلظت‌های مختلف کانامایسین

غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوهٔ تراریخت ارزیابی شدند. پس از رشد بذرهای آزمایشی بر روی محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت کانامایسین، میزان فشار انتخابی اعمال‌شده با هر یک از سطوح کانامایسین بررسی شد.

انتخاب و انتقال گیاهان بالقوهٔ تراریخت

برای انتخاب گیاهان تراریخت، بذرهای گیاهان تلقیح‌شده با دو سویهٔ اگروباکتریوم در محیط کشت انتخابی حاوی ۱/۲ نمک‌های MS، ۸ گرم در لیتر آگار و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شدند. پس از

اعمال تیمارهای تاریکی و نور، گیاهچه‌های سبز کاملاً رشدیافته برای هر سویهٔ اگروباکتریوم به‌طور جداگانه برای استخراج DNA و آنالیز بعدی به خاک منتقل شدند. اثبات تراریخت بودن گیاهانی که در محیط کشت انتخابی به کانامایسین مقاومت نشان داده بودند به کمک آزمون PCR صورت گرفت.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

طراحی توالی آغازگرهای رفت و برگشت *bph*A براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *bph*A از باکتری *B. xenovorans* سویهٔ LB ۴۰۰ به‌وسیلهٔ نرم‌افزار oligo انجام گرفت. این دو آغازگر از منطقهٔ ابتدایی و انتهایی ژن انتخاب شدند تا پس از تکثیر، ژن به‌صورت کامل به‌دست آید. شایان ذکر است که طول محصول واکنش PCR مورد انتظار برای ژن *bph*A حدود ۱۳۸۰ bp است. طراحی توالی آغازگرهای رفت و برگشت pSoup نیز به‌وسیلهٔ نرم‌افزار oligo انجام گرفت. طول محصول واکنش PCR مورد انتظار برای قطعهٔ pSoup حدود ۱۰۵۰ bp است. تمامی آغازگرها توسط شرکت ژن فن‌آوران سنتز شدند (جدول ۱).

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده

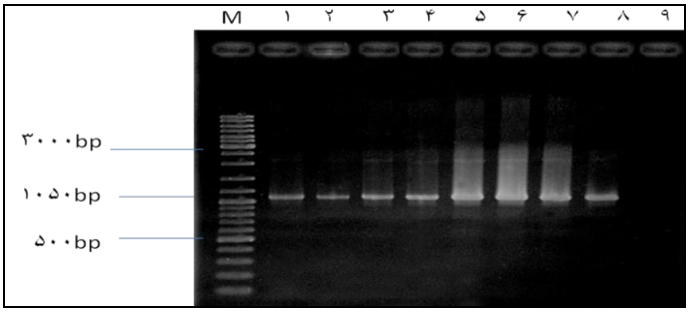
نام آغازگر	توالی
*bph*A – forward	5′ - ATG AGT TCA GCA ATG AAA - 3′
*bph*A – reverse	5′ - GGG CTC GGA CAT CAT GCG - 3′
pSoup - forward	3′- GACCGATGCCCTTGAGA-5′
pSoup – reverse	5′- TGCCCTTATTCCTGATTTGAC - 3′

شرایط PCR

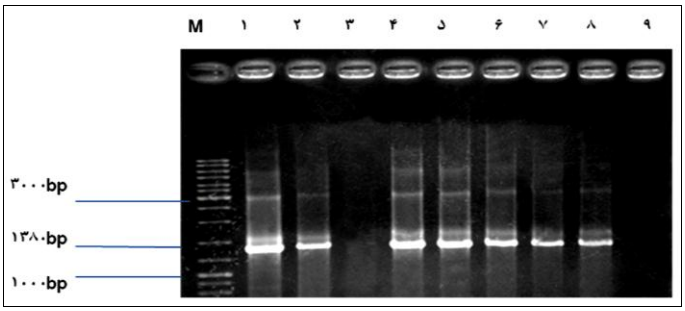
واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر به‌منظور تکثیر قطعهٔ ژنی *bph*A به کمک ۲ میکرولیتر از بافر (PCR 10 سیناژن)، ۱۴۹ نانوگرم DNA الگو، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ (سیناژن)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (سیناژن) و ۰/۲ میکرولیتر Taq (سیناژن) انجام گرفت. برای تکثیر قطعهٔ ژنی *bph*A ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس، واسرشته‌سازی، اتصال و طویل شدن به‌ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و هر کدام به‌ترتیب به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۱:۳۰، ۱:۳۰ در ۳۵ سیکل انجام شد. در نهایت طویل شدن نهایی به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند که انتقال پی‌درپی دو ناقل pSoup و pGreenAEG به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم موفقیت‌آمیز بود و کلونی‌های نوترکیب بر روی محیط انتخابی مشاهده شدند، که با آزمون PCR تراریخته بودن و وجود پلاسمیدها در اگروباکتریوم اثبات شد. بعد از انتقال پلاسمید pSoup به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم، کلونی‌های نوترکیب در سطح محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشاهده شد و سپس با آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای ژن pSoup، وجود باند ۱۰۵۰ جفت بازی که تأییدکنندهٔ حضور قطعهٔ ژنی pSoup در کلونی‌های نوترکیب بوده است، تأیید شد (شکل۳). در ادامه ناقل pGreen/*bph*AEG به سلول‌های اگروباکتریوم مستعد حامل pSoup منتقل شد و کلونی‌های رشدیافته با آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *bph*A بررسی شدند که با حضور باند ۱۳۸۰bp، وجود قطعه ژنی *bph*A تأیید شد (شکل ۴).



شکل ۳. نتیجهٔ واکنش PCR کلونی‌های ترانسفورم‌شده با ناقل pSoup توسط آغازگرهای pSoup. M: مارکر وزنی ۱۰kb. شماره‌های ۱ تا ۷ کلونی‌های ترانسفورم‌شده با ناقل pSoup. شمارهٔ ۸: کنترل مثبت (پلاسمید pSoup). شمارهٔ ۹: کنترل منفی



شکل ۴. نتیجهٔ آزمون PCR کلونی‌های LBA4404 حامل pSoup ترانسفورم‌شده با ناقل نوترکیب pGreen AEG با آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA*. M: مارکروزنی 10kb. شمارهٔ ۱: کنترل مثبت. ۸،۷،۶،۵،۴،۲کلونی‌های ترانسفورم‌شده با pGreenAEG. شمارهٔ ۹: کنترل منفی. شمارهٔ ۳: کلون تراریخت را نشان می‌دهد که واجد پلاسمید pGreenAEG نبود.

پلاسمید pGreen بدون پلاسمید کمکی خود (pSoup) قادر به همانندسازی در سویه‌های مختلف اگروباکتریوم نیست. از آنجا که pGreen برای همانندسازی نیاز به عملکرد ژن *RepA* از لوکوس همانندسازی pSa دارد، ابتدا باید pSoup در سویهٔ اگروباکتریوم مورد نظر مستقر شود و با تکثیر pSoup، کپی‌های زیادی از لوکوس همانندسازی pSa تولید شود تا در نهایت ژن RepA قادر به اجرای عملکرد خود باشد. بنابراین با انتقال پی‌درپی وکتور می‌توان کارایی بیشتری در ترانسفورماسیون انتظار داشت، بدین صورت که پلاسمید کمکی زمان کافی برای تکثیر لوکوس همانندسازی خواهد داشت و متعاقباً توانایی تکثیر پلاسمید توسط پلاسمید کمکی افزایش خواهد یافت (Hellens *et al*., 2000).

تأثیر سویه‌های اگروباکتریوم بر تراریختی

نتایج انتقال ژن به آرابیدوپسیس با استفاده از سویه‌های LBA4404 و C58C1 به‌روش غوطه‌وری گل‌آذین نشان داد که بین دو سویهٔ اگروباکتریوم به‌کاررفته در این پژوهش، از نظر میزان نفوذ، آلوده‌سازی گیاه و تولید گیاهان تراریخت تفاوت وجود دارد. همچنان که در جدول مشاهده می‌شود، نسبت گیاهان تراریخت به‌دست‌آمده از آرابیدوپسیس تیمارشده توسط سویهٔ LBA4404 نسبت به گیاهان تراریخت به‌دست‌آمده از آرابیدوپسیس تیمارشده توسط سویهٔ C58C1 حدود ۱/۶ برابر بود و بیشترین تعداد گیاهان تراریخته به میزان ۰/۸۵ درصد با سویهٔ LBA4404 به‌دست آمد (جدول ۲).

در پژوهش بر روی میزان کارایی سویه‌های اگروباکتریوم در فرایند انتقال ژن مشخص شد که بین سویه‌های اگروباکتریوم از نظر نفوذ، قدرت انتقال ژن و تولید نتایج تراریخته، تفاوت وجود دارد (Bechtold *et al*., 1993). در پژوهشی دیگر، سویهٔ GV3101 به دلیل فعالیت شدید تهاجمی، برای تراریخته‌سازی گیاهان آرابیدوپسیس پیشنهاد می‌شود (Bechtold *et al*., 1993). گزارش شده است که سویهٔ LBA4404 برای تراریخته‌سازی آرابیدوپسیس با روش غوطه‌وری مناسب نیست و بهتر است از نژادهایی با قدرت تهاجمی بیشتر استفاده شود (Weigel *et al*., 2002). همچنین گزارش می‌شود که در بین سویه‌های GV3101، LBA4404 و GV3850، سویهٔ GV3850 بیشترین و سویهٔ LBA4404 کمترین مقدار تولید گیاهان تراریخته را دارند (Dehestani *et al*., 2010). در بررسی انتقال ژن به کلزا به‌روش غوطه‌ورسازی گل‌آذین مشاهده می‌شود که بین نژادهای اگروباکتریوم از لحاظ میزان انتقال ژن تفاوت وجود دارد (Young-Seok *et al*., 2003). در عین حال برخی از پژوهشگران، از لحاظ کارایی تراریخته‌سازی، اختلافی بین سویه‌های اگروباکتریوم پیدا نکردند (Zhang *et al*., 2006). براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش و بررسی‌های انجام‌گرفته در گذشته می‌توان نتیجه گرفت که اختلاف بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم از نظر قدرت نفوذ، ممکن است ناشی از اثر متقابل نوع گیاه و سویهٔ باکتری باشد.

تأثیر تیمارهای نور و تاریکی بر تغییرات مورفولوژیک گیاهچه

نتایج حاصل از تیمارهای تاریکی و نور حاکی از آن است که گیاهانی که پیش از انتقال به اتاقک رشد، برای سه

روز در تاریکی تیمار شده بودند، دارای برگ‌های کوتیلدونی کمترتوسعه‌یافته و هیپوکوتیل و ریشه‌های طویل‌تری بودند. در مقابل گیاهانی که در تیمار استاندارد با شرایط نوری مداوم قرار داشتند، برگ‌های کوتیلدونی بزرگ‌تر و ریشه‌های کوتاه‌تری داشتند (شکل۵).

جدول ۲. نتایج حاصل از بهره‌گیری دو سویهٔ اگروباکتریوم در روش غوطه‌وری گل‌آذین

سویهٔ اگروباکتریوم	تعداد بذور آزمایش‌شده	تعداد گیاهچه‌های سبز بعد از ۱۰ روز انتقال به گلخانه	تعداد گیاهان تراریخت	درصد گیاهان تراریخت به‌دست‌آمده از بذور آزمایش‌شده
LBA4404	۳۵۳	۴	۳	٪۰/۸۵
C58C1	۳۸۲	۳	۲	٪۰/۵۲

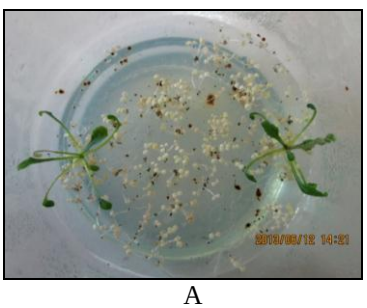
شکل ۵. تغییرات مورفولوژیک گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در محیط انتخابی که با شرایط نوری متفاوت تیمار شده بودند. گیاهچهٔ سمت راست شکل در شرایط نوری مداوم رشد کرده و گیاهچهٔ سمت چپ شکل تیمارشده در شرایط تاریکی است.

اثر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر تراریختی

نتایج ارزیابی غلظت‌های مختلف کانامایسین برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت نشان داد که غلظت‌های ۲۵mg/L کانامایسین به‌دلیل کم بودن فشار انتخابی و افزایش میزان تراریخته‌های غیرواقعی مناسب نبود. در مقابل در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، هیچ گیاه تراریخت کاذبی تولید نشد. غلظت ۱۰۰mg/L کانامایسین به‌دلیل فشار انتخابی زیاد، سبب حذف تراریخته‌های واقعی و کاهش کارایی انتخاب می‌شود. تحقیقات بسیاری غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را برای انتخاب گیاهچه‌های بالقوه تراریخت مناسب می‌دانند (Bechtold *et al*., 1993; Bent, 1998 & Zhang *et al*., 2006). از طرف دیگر، گروهی غلظت‌های بیشتر و کمتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین را پیشنهاد می‌کنند (Bechtold *et al*., 2000). کانامایسین به‌دلیل مهار ریبوزوم‌های ۷۰s از سنتز پروتئین در اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری جلوگیری می‌کند و در نهایت سبب رنگ‌پریدگی و مرگ گیاه می‌شود (Norelli *et al*., 1994).

فرایند انتخاب گیاهان تراریخت

پس از ۱۰-۷ روز انتقال بذرهای کشت‌شده به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، گیاهانی با برگ های کوتیلدونی سبز تیره در چمنی از گیاهان سفید به‌عنوان گیاهان بالقوه تراریخت در نظر گرفته شدند (شکل ۶-A). سپس گیاهچه‌های سبز حاصل از کشت بذور در محیط حاوی کانامایسین، به گلدان منتقل و از آنها DNA استخراج شد (شکل ۶-B).



A

B

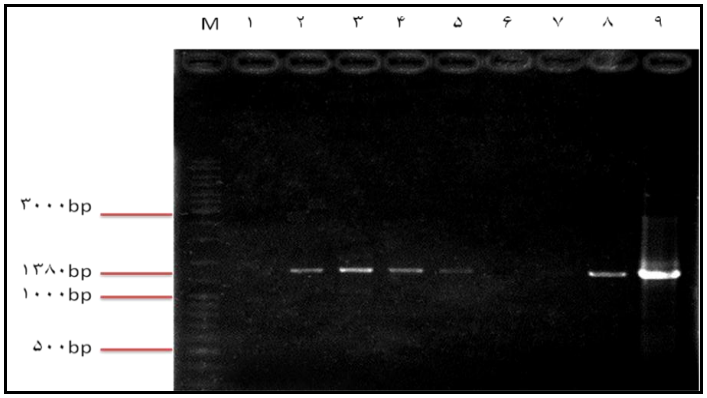
شکل ۶- A) گیاهچه‌های انتخاب‌شده در محیط انتخابی با غلظت ۵۰ mg/L کانامایسین و تیمار ۳ روز تاریکی و ۱۰-۷ روز در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی. شکل ۶- B) انتقال گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین به گلدان

استخراج DNA و اثبات گیاهان تراریخت با آزمون PCR

کیفیت خوب DNA استخراج‌شده به ازای ۳ میلی‌گرم مادهٔ برگی به‌روش Kasajima *et al.* (2004) با الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، اسپکتروفتومتری و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تأیید شد. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۷-۱/۹ به‌دست آمد، که این موضوع در الکتروفورز DNA نیز ثابت شد. روش‌های بسیاری به‌منظور استخراج DNA از بافت گیاهان وجود دارد، اما تحقیقات در خصوص استخراج DNA در آرابیدوپسیس تقریباً محدود بوده و این در حالی است که با توجه به اهمیت این گیاه بسیار ارزشمند و پرکاربرد در انتقال ژن، استخراج DNA از این گیاه به‌منظور بررسی انتقال و بیان ژن امری ضروری است.

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و DNA ژنومیک

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA* و DNA ژنومیک به‌عنوان الگو، در شکل ۵ نشان داده شده است. طول محصول PCR که توسط این آغازگرها تکثیر شد حدود ۱۳۸۰ bp بود که دقیقاً برابر با طول قطعهٔ ژنی *bphA* بود (شکل ۷).



شکل ۷. آزمون گیاهان بالقوه تراریخت به‌روش PCR و با آغازگرهای اختصاصی ژن *bphA* که گیاهان تراریخت قطعهٔ ۱۳۸۰bp را نشان داده‌اند. M: مارکر وزنی ۱۰۰۰۰bp. شماره ۱) کنترل منفی (گیاه آرابیدوپسیس شاهد)؛ شماره‌های ۲، ۳ و ۴) گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت تلقیح‌شده با سویهٔ LBA4404؛ شماره‌های ۵ و ۸) گیاهان تراریخت با سویهٔ C58C1؛ شماره‌های ۶ و ۷) گیاه آرابیدوپسیس غیرتراریخت؛ شماره ۹) کنترل مثبت.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که امکان بهینه‌سازی انتقال همزمان چند ژن کلون‌شده در ناقل pGreen، به گیاه مدل آرابیدوپسیس وجود دارد. برای انتقال ناقل pGreen به روش ذوب و انجماد، ابتدا باید پلاسمید کمکی pSoup به سلول‌های مستعد اگروباکتریوم منتقل شود و در مرحلهٔ بعد ناقل pGreen، به سلول‌های مستعد حامل pSoup اضافه شود. همچنین باید از سویهٔ اگروباکتریوم با قدرت تهاجمی بیشتر برای انتقال ژن استفاده کرد که در این تحقیق سویهٔ LBA4404 نسبت به سویهٔ C58C1 برای انتقال ژن‌های بی‌فنیل به گیاه آرابیدوپسیس کارآمدتر بوده است. استخراج DNA به‌روش کاساجیما (Kasajima *et al.*, 2004) به‌دلیل خلوص زیاد و نیاز به مقدار ناچیز نمونهٔ برگی، روش مناسبی برای استخراج DNA از گیاه آرابیدوپسیس است.

REFERENCES

1. Bechtold, N., Ellis, J. & Plletier, G. (1993). In Planta Agrobacterium Mediated gene transfer by Infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Science Paris*, 316, 1194-1199.
2. Bechtold, N. Jaudeau, B. Jolivet, S. Maba, B. Vezon, D. Voisin, R. & Pelletier, G. (2000). The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana Genetics*, 155, 1875-1887.
3. Bent, A. F. (1998). Arabidopsis in Planta Transformation uses Mechanism and Prospects for of other species. *Plant Physiology*, 124, 1540- 1547.

4. Dafny-Yelin, M. & Tzfira, T. (2007). Focuc issue on vector system for plant research and biotechnology. *Plant Physiology*, 145(4), 1118-1128.
5. Dehestani, A., Ahmadian, G., Salmanian, H., Jelodar, N.B. & Kazemitabar, K. (2010). Transformation efficiency enhancement pf Arabidopsis vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. *Trakia Journal of Sciences*, 19-26.
6. Francova, K., Sura, M., Macek, T., Szekere M., Bancos, S., Demnerova, K., Sylvestre, M.D. & Mackova, M. (2003). Preparation of plants containing bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 309-313.
7. Hellens, R. Edwards, A., Leyland, N., Bean, S. & Mullineaux, P. (2000). pGreen: a vector and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819-832.
8. Kasajima, L., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. & Fujiwara, T. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from*Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 42-59.
9. Mohammadi, M., Chalavi, V., Novakova-Sura, M., Laliberte, JF. & Sylvestre, M. (2007). Expression of bacterial biphenyl-chlorobiphenyl dioxygenase genes in tobacco plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 496-505.
10. Novacova, M. Mackova, M. Antosova, Z. Victorova, J. Szekeres, M. Demnerova, K. & Macek, T. (2010). Cloning the bacterial bphC gene into Nicotiana tabacum to improve the efficiency of phytoremediation of polychlorinated biphenyls. *Biotechnology and Bioengineering*, 1(6), 419-423.
11. Norelli, J. L. Aldwinckle, H. S. Beltran, L. D. & Jaynes, J. M. (1994). Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica. 77, 123-128.
12. Van Aken, B. A., Correa, P. & Schnoor, L. (2010). Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises. *Environmental science and Technology*, 44(8), 2767-2776.
13. Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
14. Young-Seok, J., Joon-seul, L., Byeony-choon, C., Yoon-jeong, N. & Yoon-hi, C. (2003) Development of a method for in planta transformation in *Brassica napus* L. *11th International Rapeseed Congress, BP3*, 23, 148-151.
15. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W. & Chua, N.H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Natural Prptocol*, 1, 641-646.