نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۸، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۳۸۹، ص ۳۷۴-۳۶۸

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 8, No. 2, May – Jun. 2010, p. 368-374

بهینه‌سازی عوامل مؤثر در انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم تومه‌فشینس به گوجه‌فرنگی

لیلا جدّی[۱*] - ابراهیم دورانی علیایی[۲] - محمّد فارسی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۸
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۵

چکیده

گوجه‌فرنگی، گیاهی است که از جنبه‌های غذایی، اقتصادی و علمی از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به اهمیت زراعی آن و حساسیت این گیاه زراعی نسبت به اغلب تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نیاز به استفاده از روش‌های نوین در اصلاح این گیاه بیش از پیش احساس می شود. در این تحقیق عوامل مؤثر در تراریزش گوجه‌فرنگی زراعی مورد بررسی قرار گرفت. دو رقم پتوارلیCH و ارلی‌اوربانایY به ترتیب بیشترین میانگین باززایی را داشتند و بیشترین میزان تراریزش در رقم ارلی اوربانایY مشاهده شد. پیش کشت یک روزه ریز نمونه‌ها و افزودن ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون به محلول تلقیح، در تراریزش گیاهان اثر مثبت داشت. بهترین زمان تلقیح ریزنمونه با باکتری ۱۵ دقیقه و بهترین زمان برای هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، دو روز پس از تلقیح تشخیص داده شد. گیاهان تراریخته احتمالی، در محیط کشت‌های گزینش به خوبی رشد کردند. گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر دو ژن کولین اکسیداز آرتروباکتر (*codA*) و ژن نشانگر گزینشگر نئومایسین فسفوترانسفرازII (*nptII*) مورد تأیید قرار گرفتند. گیاهان فوق برای آزمایش‌های تکمیلی مولکولی و زیست‌سنجی به خاک انتقال یافتند.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم، باززایی، تراریزش، گوجه‌فرنگی، هم‌کشتی

مقدمه

گوجه‌فرنگی گیاهی مناسب برای مطالعات ژنتیکی و فیزیولوژیکی و مدل ژنتیکی خوبی جهت اصلاح سایر گیاهان زراعی دو لپه می‌باشد (۱۹).

افزایش روز افزون جمعیت، خطر کاهش مواد غذایی موجود در طبیعت و ترس از عدم جایگزینی مواد غذایی توجه محققان را به استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان معطوف کرده است (۲). تولید در واحد سطح و افزایش دامنه سازگاری گیاهان زراعی در برابر عوامل محدود کننده محیطی از جمله تنش‌های زیستی و غیر زیستی از منطقی‌ترین راهبردها برای تأمین غذای نسل در حال رشد می‌باشد. از ابزارها و روش‌های مختلفی برای این منظور استفاده شده است. از آن جمله می‌توان به اهلی کردن گیاهان هالوفیت وحشی، اصلاح گیاهان از طریق روش‌های اصلاحی سنتی، استفاده از گزینش درون شیشه‌ای، جمع کردن صفات فیزیولوژیکی در یک گونه، هیبریداسیون بین گونه‌ای، استفاده از گزینش مبتنی بر نشانگر و توسعه گیاهان تراریخته اشاره کرد. اخیرا بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک امید دستیابی به گیاهان زراعی با عملکرد بالا را افزایش داده است. با پیشرفت‌های به دست آمده در زیست شناسی مولکولی، در کنار روش‌های کلاسیک، اصلاح گیاهان تسهیل شده و زمان مورد نیاز نیز کاهش می‌یابد (۷). لذا توسعه فن‌آوری انتقال ژن به گیاهان زراعی، از راهبردهای اساسی در استفاده از این فن‌آوری در دستیابی به ارقام پرمحصول به شمار می‌آید.

تولید گیاهان تراریخته مستلزم بهینه‌سازی شرایط کشت بافت و باززایی کامل گیاه از یک توده سلولی، آشنایی با روش‌های مختلف تراریزش سلول‌های گیاهی و در نهایت دسترسی به یک سیستم گزینش کارآمد جهت انتخاب گیاهان تراریخته می‌باشد (۱، ۲۱ و ۲۲). اولین گزارش تراریزش گوجه‌فرنگی به واسطه آگروباکتریوم توسط مک‌کورمیک و همکاران (۱۳) منتشر شد و از آن پس مقالات زیادی از تراریزش ارقام و گونه‌های مختلف گوجه‌فرنگی ارائه شده است (۹، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۲). تراریزش موفق گوجه‌فرنگی در مطالعات پایه و کاربردی برای اصلاح این گیاه ضروری است. به همین دلیل، توسعه روش تراریزش کارآمد و مستقل از ژنوتیپ و یا بهینه‌سازی شرایط تراریزش برای تک تک ژنوتیپ‌ها بسیار تعیین کننده است. ولی با وجود موفقیت‌های بسیار به دست آمده در تراریزش

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
(*- نویسنده مسئول: Email: Leila.jeddi@gmail.com)
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

گوجه‌فرنگی، هنوز روشی متداول، ساده و تکرارپذیر برای تراریزش همه ارقام زراعی گوجه‌فرنگی موجود نیست (۹، ۱۶، ۱۷، ۲۱ و ۲۲).

در این مقاله عوامل مؤثر در انتقال ژن به چند رقم زراعی گوجه‌فرنگی برای به دست آوردن روشی ساده و تکرارپذیر برای تراریزش ارقام زراعی آن مورد بررسی قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و باکتری: بذور ارقام ارلی‌اوربانا Y[1]، جینا VF[2]، کال G[3]، موبیل[4] و پتوارلی CH[5] گوجه‌فرنگی، از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد. همچنین نژاد DH5α باکتری *E. coli* و دو نژاد LBA4404 و GV3101 آگروباکتریوم تومه‌فشینس و پلاسمید pGAH حامل ژن کولین اکسیداز آرتروباکتر (*codA*) و ژن نشانگر گزینشگر نئومایسین فسفوترانسفراز II (*nptII*) مورد استفاده قرار گرفتند. ضدعفونی سطحی بذرها در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و بذور روی محیط کشت جامد حاوی نمک‌های MS (۱۴) تکمیل شده با ویتامین‌های B5 (۸) با ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت گردیدند. سپس به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ : ۸ (نور : تاریکی) انتقال یافتند.

شرایط باززایی: کوتیلدون گیاهچه‌های استریل ۱۰ روزه، جدا و به صورت وارونه بر روی محیط کشت‌های باززایی قرار گرفتند. این محیط کشت‌ها شامل، محیط کشت پایه MS با دو سطح هورمونی ۱/۵ و ۳ میلی گرم در لیتر BAP[6] و سه سطح ۰/۰۷، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA[7]، ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از ۶ هفته، تعداد ریزنمونه باززایی شده و تعداد کل شاخساره تولید شده در هر کشت ثبت گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP4 تجزیه واریانس شده و میانگین‌ها در سطح ۵ درصد=α مقایسه شدند. در نهایت، سه رقم دارای بیشترین میانگین باززایی، برای تراریزش مورد استفاده قرار گرفتند.

هم‌کشتی و تراریزش گیاهان: جهت تعیین غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین (برای انتخاب گیاهان تراریخته احتمالی) ۴ تیمار ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین به محیط کشت باززایی افزوده شد و ریزنمونه‌های کوتیلدونی سه رقم برتر انتخاب شده برای تراریزش (ارقام ارلی‌اوربانا Y، کال G، و پتوارلی CH) بر روی آن کشت گردید. پس از ۴ هفته با توجه به عدم باززایی ریزنمونه‌ها و سرعت از دست رفتن کلروفیل و مرگ بافتی، غلظت بازدارنده کانامایسین جهت استفاده در مراحل تراریزش انتخاب شد.

ریزنمونه‌های کوتیلدونی بدون انجام پیش کشت و یا به مدت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز در محیط کشت باززایی، به عنوان پیش کشت، کشت شدند و به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ : ۸ (نور : تاریکی) در اتاقک رشد انتقال یافتند و برای تلقیح آگروباکتریوم آماده گردیدند.

برای آماده سازی سوسپانسیون تلقیح، یک کلنی از باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین کشت شد و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۳۸۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتریایی در محیط کشت MS مایع مجدداً حل شد. قبل از انجام عمل تلقیح مقدار ۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون به محلول باکتری اضافه گردید. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS مایع حاوی رسوب باکتری و استوسیرینگون قرار داده شدند و مخلوط حاصل در زمان‌های مختلف ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه به آرامی تکان داده شد. سپس ریزنمونه‌ها به مدت ۱، ۲ و ۳ روز به محیط کشت مشابه محیط کشت پیش کشت که فاقد آنتی‌بیوتیک بود (محیط هم‌کشتی) منتقل شدند.

جهت انتخاب ریزنمونه‌های تراریخته، پس از طی مدت زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم، ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی (جدول ۱)، تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم سفوتاکسیم[8] انتقال یافتند. واکشت ریزنمونه‌های باززایی شده هر ۴ تا ۵ هفته در محیط کشت مشابه انجام شد. پس از حدود ۶ تا ۸ هفته، گیاهچه‌های باززایی شده به محیط کشت ساقه‌زایی (جدول ۱) حاوی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر کاربنیسیلین، منتقل گردیدند و بعضی از گیاهچه‌ها در این محیط کشت طی ۴ تا ۵ هفته تولید ساقه کردند. هنگامی که طول ساقه این گیاهچه‌ها به ۲ سانتی‌متر رسید (مرحله ۲ تا ۴ برگی)، از محل اتصال به ریزنمونه اصلی قطع و به محیط کشت ریشه‌زایی (جدول ۱)، تکمیل شده با ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر کاربنیسیلین، منتقل شدند.

1. Early urbana Y
2. Jina.VF
3. Kal G
4. Mobil
5. Peto early CH
6. 6-Benzylaminopurine
7. Indole-3-acetic acid
8. Cefotaxim

جدول ۱- ترکیب محیط کشت‌های گیاهان تراریخته احتمالی در مراحل مختلف رشد

مواد مورد استفاده	نوع محیط کشت		
	محیط کشت باززایی	محیط کشت ساقه‌زایی	محیط کشت ریشه‌زایی
نمک‌های MS	X۱	X۱	X۱
ویتامین‌های B_5	X۱	X۱	X۱
ساکارز (درصد)	۳	۳	۳
آگار (درصد)	۰/۷	۰/۷	۰/۷
pH	۵/۷-۵/۸	۵/۷-۵/۸	۵/۷-۵/۸
IAA (میلی گرم در لیتر)	۰/۰۷	۰/۰۷	-
BAP (میلی گرم در لیتر)	۳	۰/۰۱	-
IBA (میلی گرم در لیتر)	-	-	۲

جهت تأیید تراریزش، استخراج DNA از برگ گیاهان تراریخته احتمالی با روش دلاپورتا و همکاران (۵) انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *codA* و نیز آغازگرهای ژن نشانگر گزینشگر *nptII* صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر تیمارهای هورمونی اعمال شده و ارقام و اثر متقابل آن‌ها، بر میانگین باززایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

در بین ارقام مورد استفاده، دو رقم ارلی‌اوربانا Y و پتوارلی CH بیشترین میانگین باززایی را داشتند و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. رقم کال G که از نظر میانگین باززایی در مقایسه با ارقام ارلی‌اوربانا Y و پتوارلی CH در رتبه سوم قرار گرفت، با سایر ارقام تفاوت معنی‌داری داشت. دو رقم جینا VF و موبیل کمترین میانگین باززایی را دارا بودند و از این نظر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند.

در بین تیمارهای هورمونی نیز از نظر میانگین باززایی، تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA با داشتن بالاترین میانگین باززایی، با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت و علاوه بر آن، تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱۵ میلی گرم در لیتر IAA دومین میانگین باززایی را دارا بود. در طی مراحل تراریزش، دو تیمار هورمونی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱۵ میلی گرم در لیتر IAA، با وجود داشتن بالاترین میانگین‌های باززایی، به دلیل تولید ریشه قبل از باززایی مستقیم، برای تراریزش مناسب نبودند. در نتیجه، تیمار ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰۷ میلی گرم در لیتر IAA که بعد از دو تیمار فوق بهترین باززایی را نشان می‌داد و با اعمال آن باززایی مستقیم بدون تولید ریشه صورت می‌گرفت، برای ادامه آزمایش‌های تراریزش انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین باززایی (تعداد شاخساره تولید شده/ تعداد ریزنمونه کشت شده) در ۵ رقم مورد آزمایش*

تیمارهای هورمونی (میلی گرم در لیتر)		ارقام					میانگین باززایی در هر تیمار
BAP	IAA	ارلی‌اوربانا Y	جینا VF	کال G	موبیل	پتوارلی CH	
۳	۰/۳	۰/۲۸۹	۱/۰۵۳	۲/۳	۰/۹۳۹	۱/۵۳۴	^{c}۱/۸۲۲
۳	۰/۱۵	۲/۷۵	۱/۰۸۸	۱/۹۱۸	۱/۱۱۱	۳/۳۸۹	^{bc}۲/۰۵۱
۳	۰/۰۷	۲/۷۷۸	۰/۷۱۷	۳/۶۱۴	۱/۶۳۳	۲/۱۳۴	^{bc}۲/۱۷۵
۱/۵	۰/۳	۵	۱/۵۵۶	۳/۳۰۹	۲/۸۶۱	۶/۶۹۴	^{a}۳/۸۸۴
۱/۵	۰/۱۵	۳/۶۱۳	۱/۵۰۲	۲/۰۹	۱/۰۸۴	۴/۶۹۵	^{b}۲/۵۹۶
۱/۵	۰/۰۷	۳/۱۹۴	۰/۸۳۴	۱/۹۷۴	۱/۶۱۱	۲/۶۹۷	^{bc}۲/۰۶۲
میانگین باززایی در هر رقم		^{a}۳/۴۳۷	^{c}۱/۱۲۵	^{b}۲/۵۳۳	^{c}۱/۵۴۰	^{a}۳/۵۲۳	-

*- برای هر رقم و در هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

در مجموع، بین سطوح هورمونی استفاده شده برای باززایی، غلظت پایین هورمون BAP (۱/۵ میلی گرم در لیتر) به همراه غلظت بالای هورمون IAA (۰/۳ میلی گرم در لیتر)، برای باززایی مناسب‌تر بودند.

پارک و همکاران (۱۶) اثر ترکیب‌های متفاوت هورمونی را بر روی باززایی ارقام و ریزنمونه‌های مختلف گوجه‌فرنگی مطالعه کردند. بر اساس بررسی صورت گرفته، محیط کشت حاوی سیتوکینین زآتین و اکسین IAA در تمام موارد به طور معنی‌داری بهتر از ترکیب BAP با NAA بود. اگرچه، در محیط کشت حاوی ترکیبی از BAP و IAA میزان باززایی مشابه با محیط حاوی زآتین یا ترکیب زآتین – IAA بود. با توجه به داده‌های فوق، با وجود این که در بسیاری از منابع، زآتین بهترین سیتوکینین جهت باززایی و تراریزش گوجه‌فرنگی، ذکر شده است (۱۰ و ۱۸)؛ ولی با در نظر گرفتن هزینه بالای تهیه این هورمون طبیعی و با توجه به میانگین‌های باززایی قابل قبول به دست آمده در تحقیق حاضر، هورمون BAP به عنوان سیتوکینین در ترکیب با IAA برای باززایی ریزنمونه‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

ریزنمونه‌های کوتیلدون غیرتراریخته در هیچ کدام از محیط کشت‌های باززایی حاوی چهار غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، باززایی نشدند و با از دست دادن کلروفیل خود در مدت ۴ هفته از بین رفتند. اما غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین حداقل غلظت کانامایسین لازم برای مرگ کامل بافت ریزنمونه‌ها در طول مدت زمان فوق بود. در نتیجه، برای گزینش ریزنمونه‌ها در محیط کشت باززایی مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده از آزمایش‌های لینگ و همکاران (۱۲)، افزایش غلظت کانامایسین عامل بازدارنده در رشد و باززایی گوجه‌فرنگی است. به همین علت، در مرحله ساقه‌زایی، در حضور ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین، حتی پس از طی بیش از ۴ هفته هم القا ساقه‌زایی صورت نگرفت. برای القا ساقه‌زایی، غلظت‌های پایین‌تر از ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین، در محیط کشت ساقه‌زایی گیاهان تراریخته احتمالی مورد استفاده قرار گرفت ولی کاهش غلظت این آنتی‌بیوتیک نیز در ساقه‌زایی مؤثر نبود. در نتیجه، به منظور حذف فشار گزینش جهت القا بهتر ساقه‌زایی، کانامایسین از محیط کشت حذف شد. در مرحله ریشه‌زایی نیز به دلیل حساسیت بالای این مرحله رشدی گیاه، غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین (نصف غلظت آن در مرحله باززایی) مناسب‌ترین غلظت این آنتی بیوتیک در محیط ریشه‌زایی بود. گیاهچه‌های تراریخته در محیط کشت ریشه‌زایی دارای این غلظت کانامایسین، پس از ۶ روز ریشه‌دار شدند. راج و همکاران (۱۸) و سون و همکاران (۱۹) نیز در مرحله ریشه‌زایی گوجه‌فرنگی، این غلظت کانامایسین را مورد استفاده قرار دادند.

هنگامی که ریزنمونه‌ها بدون انجام پیش کشت با آگروباکتریوم تلقیح شدند، قسمت‌های زخمی ریزنمونه‌ها نکروز گردیده و باززایی صورت نگرفت. در حالتی که پیش کشت بیشتر از یک روز بر روی محیط کشت باززایی انجام می‌گردید، تعداد ریزنمونه‌های باززایی شده افزایش یافت؛ اما هنگامی که این ریزنمونه‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند، پس از مدتی کلروفیل خود را از دست داده و از بین رفتند. این امر نشان‌دهنده عدم تراریزش گیاهچه‌های فوق بود. سونیل‌کومار و همکاران (۲۰) گزارش کردند که در طی زمان پیش کشت در گیاه توتون، سطح ترکیبات القا کننده ژن‌های *vir* در بافت‌های زخمی گیاه افزایش می‌یابد که باعث بالا رفتن بازده تراریزش می‌گردد. همچنین نشان دادند که تقسیم فعال سلول‌های نواحی زخمی در طول زمان پیش کشت، سنتز دیواره سلولی و فعالیت سیستم همانندسازی در این سلول‌ها برای اتصال مؤثر آگروباکتریوم قبل از تراریزش و الحاق T-DNA ضروری بوده و سلول‌های در حال تقسیم را در مقایسه با سلول‌های غیر تقسیم شونده برای تراریزش مستعدتر می‌کند. این امر نشان داد که اعمال پیش کشت بر تراریزش گیاهان به وسیله آگروباکتریوم اثر مثبت دارد.

به نظر می‌رسد سلول‌های نواحی زخمی قبل از تلقیح با باکتری به سمت تولید گیاهچه و باززایی متمایز شده و با افزایش زمان پیش کشت، سلول‌های ریزنمونه دیگر امکان دریافت DNAی خارجی از طریق آگروباکتریوم را ندارند و یا کاهش تقسیم سلول‌ها پس از تراریزش از رشد و تمایز سلول‌های تراریخته و تولید گیاهچه از آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۵). در نتیجه، بهترین زمان پیش کشت برای گوجه‌فرنگی یک روز در نظر گرفته شد. کیو و همکاران (۱۷) نیز با اعمال یک روز پیش کشت توانستند گوجه‌فرنگی تراریخته به دست آورند.

در تحقیق حاضر، در غیاب استوسیرینگون تراریزش در ریزنمونه‌ها دیده نشد. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون به محلول باکتری، تراریزش انجام شد و با افزایش میزان استوسیرینگون تا ۱۵۰ میکرومولار، میزان تراریزش افزایش چشمگیری نشان داد. هرچند در سایر مقالات، تراریزش گوجه‌فرنگی بدون استفاده از استوسیرینگون و یا با استفاده از غلظت‌های متفاوت آن (۹، ۱۶، ۱۸، ۱۹ و ۲۲) گزارش شده است؛ آموه و همکاران (۳) نیز نشان دادند که فقدان استوسیرینگون در محیط تلقیح یا همکشتی، باعث عدم تراریزش در گندم شد و با افزودن ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون تراریزش صورت گرفت؛ با بالا بردن غلظت استوسیرینگون تا ۲۰۰ میکرومولار درصد تراریزش افزایش یافت ولی بالاتر بردن غلظت آن تا ۴۰۰ میکرومولار باعث کاهش تراریزش گردید.

بهترین مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری ۱۵ دقیقه

تشخیص داده شد. در مدت زمان کوتاه‌تر از ۱۵ دقیقه هیچ گیاه تراریخته‌ای به دست نیامد. مدت زمان طولانی‌تر از ۱۵ دقیقه نیز باعث ضعیف یا نکروزه شدن بافت ریزنمونه‌ها و در نهایت از بین رفتن کامل آن‌ها می‌گردید.

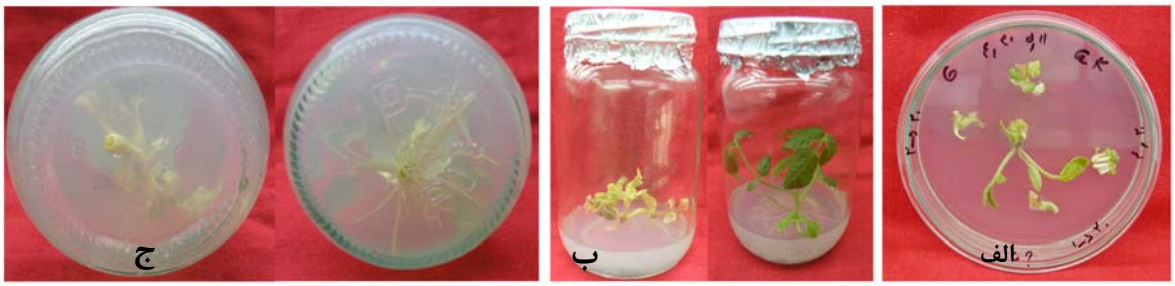
مناسب‌ترین مدت زمان برای هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، دو روز بود. در هم کشتی کمتر از دو روز، هیچ گیاه تراریخته‌ای به دست نیامد. در صورت طولانی‌تر بودن زمان هم‌کشتی نیز، با توجه به رشد سریع باکتری در اطراف ریزنمونه در مراحل گزینش، آنتی‌بیوتیک محیط کشت قادر به کنترل و حذف باکتری نبود. این امر سبب ایجاد مشکل در انجام تراریزش شد.

از بین غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم مورد استفاده در محیط کشت باززایی گیاهان تراریخته احتمالی، حتی در حضور ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم، هیچ باکتری در اطراف ریزنمونه‌های تلقیح شده دو رقم ارلی اوربانا Y و کال G رشد نکرد و ریزنمونه‌ها نیز قادر به رشد و باززایی بودند. در نتیجه، در مراحل اولیه گزینش دو رقم فوق (در محیط کشت باززایی)، از سفوتاکسیم با پایین‌ترین غلظت به دست آمده جهت کنترل رشد باکتری (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. زیرا طبق بررسی ایمخانگ و چاتچاوانکانفانیچ (۱۱) سفوتاکسیم در غلظت‌های بالا اثر بازدارندگی معنی‌داری بر باززایی و رشد گیاهان دارد. در نتیجه، غلظت انتخاب شده در پژوهش حاضر، در عین حال که مانع از رشد آگروباکتریوم می‌شد، اثر منفی کمتری بر روی باززایی ریزنمونه‌ها داشت. با توجه به این که تعداد زیرنمونه باززایی شده در محیط گزینش در بازده گیاهان تراریخته مؤثر است، این آنتی‌بیوتیک با غلظت فوق مناسب‌ترین تیمار برای گزینش شناخته شد. اما در اطراف ریز نمونه‌های تلقیح شده رقم پتوارلی CH حتی در حضور ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم نیز رشد باکتری مشاهده می‌شد. به نظر می‌رسد این مسئله با اثر متقابل رقم گوجه‌فرنگی با نژاد آگروباکتریوم مرتبط باشد (۴). برای جلوگیری از رشد باکتری در اطراف ریزنمونه‌های رقم پتوارلی CH، زمان استقرار آن در محیط کشت کوتاه‌تر در نظر گرفته شد و واکشت آن در محیط کشت گزینش جدید زودتر از سایر ارقام انجام گردید.

گیاهچه‌های تراریخته که با دریافت T-DNA آگروباکتریوم در مقابل کانامایسین مقاوم بودند، در حضور این آنتی‌بیوتیک سبز باقی ماندند. در حالی که ریزنمونه‌های غیر تراریخته در محیط گزینش، با از دست دادن کلروفیل، به رنگ سفید درآمدند. ریزنمونه‌های اخیر فاقد رشد بوده و پس از مدتی از بین می‌رفتند (شکل ۱).

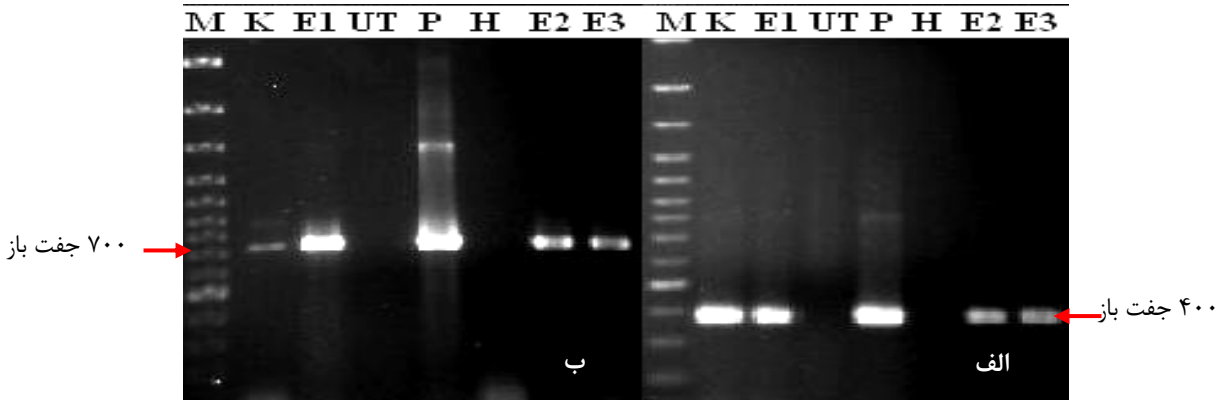
یک هفته پس از انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی، در گیاهان تراریخته احتمالی ریشه‌ها ظاهر شده و به سرعت رشد کردند. به تدریج انتهای بریده گیاهچه‌های غیرتراریخته که طی مراحل قبلی گزینش از بین نرفته بودند، نکروزه شد. در این گیاهچه‌ها از دست دادن کلروفیل و مرگ بافت از انتهای قرار گرفته در محیط کشت آغاز شد. وجود گیاهچه‌های غیرتراریخته در این مرحله، احتمالاً به دلیل سرعت رشد بالای گیاهچه‌هایی بود که در تماس مستقیم با آنتی‌بیوتیک نبودند و به همین علت، کانامایسین موجود در محیط کشت امکان از بین بردن کامل آن‌ها را نداشت.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز II (جهت تأیید انجام انتقال ژن) و نتایج تکرار واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *codA*، در شکل ۲ نشان داده شده است. طبق انتظار در پلاسمید نوترکیب حامل ژن *codA* که به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شده بود و در گیاهان تراریخته احتمالی، با استفاده از آغازگرهای ژن نئومایسین فسفوترانسفراز II، قطعه‌ای به طول حدود ۷۰۰ جفت باز تکثیر گردید.



شکل ۱- باززایی، ساقه‌زایی و ریشه‌زایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

الف) مرحله باززایی؛ گیاهچه تراریخته احتمالی در وسط در حال رشد بوده و سبز مانده و گیاهچه‌های اطراف در حال از دست دادن کلروفیل، مرگ بافت و فاقد رشد هستند. ب) مرحله ساقه‌زایی؛ اندام هوایی گیاه تراریخته احتمالی به رشد و تولید کلروفیل ادامه داده (سمت راست) و اندام هوایی گیاه غیر تراریخته فاقد رشد بوده و کلروفیل خود را از دست داده است (سمت چپ). ج) مرحله ریشه‌زایی؛ گیاه تراریخته احتمالی در حضور آنتی‌بیوتیک کانامایسین تولید ریشه کرده (سمت راست) ولی گیاه غیر تراریخته علاوه بر عدم تولید ریشه، در انتهای بریده شده نکروز شده است (سمت چپ).



شکل ۲- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته احتمالی

الف- با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *codA* (ناحیه ۴۰۰ جفت باز). M: نشانگر ۱۰۰bp. K، E1، E2 و E3: قطعات تکثیر شده از گیاهان تراریخته. UT: گیاه غیر تراریخته. P: شاهد مثبت، قطعه تکثیر شده از پلاسمید آگروباکتریوم نژاد GV3101 حامل ژن نئومایسین فسفوترانسفرازII در کنار ژن *codA*. H: شاهد منفی آب و ب- با استفاده از آغازگرهای ژن نئومایسین فسفوترانسفرازII (ناحیه ۷۰۰ جفت باز)

به دلیل این که این ژن به همراه ژن *codA* منتقل شده بود، صحت تراریزش مورد تأیید قرار گرفت. همچنین، در حضور آغازگرهای اختصاصی ژن *codA* قطعه‌ای به طول ۴۰۰ جفت باز مربوط به ژن *codA* تکثیر گردید، که وجود ژن در این نمونه ها و انجام تراریزش را تأیید می‌کند. در هر دو مورد مذکور، در گیاه غیر تراریخته و در حضور آب که هر دو به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفتند، هیچ باندی مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل از PCR گیاهان تراریخته احتمالی، از دو رقم ارلی اوربانY و کالG گیاه تراریخته به دست آمد ولی از رقم پتوارلیCH هیچ گیاه تراریخته‌ای به دست نیامد. نتیجه فوق به دلیل وابسته بودن انتقال ژن به نوع رقم گوجه فرنگی می‌باشد (۶ و ۲۲).

در این آزمایش، هیچ گیاهی توسط آگروباکتریوم نژاد LBA4404 حامل ژن *codA*، تراریخته نشد. تنها با استفاده از آگروباکتریوم نژاد GV3101 گیاهان تراریخته به دست آمد. با توجه به نتایج مشابه به دست آمده توسط دیویس و همکاران (۴)، این امر می‌تواند به علت اثر متقابل رقم گوجه‌فرنگی و نژاد آگروباکتریوم بر تراریزش گیاه باشد. به این ترتیب که، هرچند رقم پتوارلیCH بیشترین میانگین باززایی در بین ارقام گوجه‌فرنگی را داشت، اما در آزمایش‌های تراریزش هیچ گیاه تراریخته‌ای از آن به وجود نیامد. که احتمالاً به این علت بوده است که نژادهای آگروباکتریوم مورد استفاده در این تحقیق امکان انتقال ژن به این رقم را نداشتند. اگر چه در بسیاری از گزارش‌های مربوط به انتقال ژن به گوجه فرنگی از نژاد LBA4404 استفاده شده است (۹، ۱۲ و ۱۸)، اما در این تحقیق نژاد فوق قادر به انتقال ژن به گیاه نبود. که این امر وجود اثر متقابل بین رقم گوجه فرنگی و نژاد آگروباکتریوم را تأیید می‌کند (۴).

قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم بوستانی تکنسین محترم آزمایشگاه‌های گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر همکاری صمیمانه ایشان طی انجام مراحل این پژوهش و بخش نهال و بذر مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی به خاطر تأمین بذر ارقام گوجه‌فرنگی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱- دورانی علیایی، ا.، م. فارسی، ع. باقری، و ب. قره‌یاضی. ۱۳۸۲. بهینه‌سازی انتقال ژن به سیب‌زمینی با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*. مجله علمی-پژوهشی علوم و صنایع کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد: جلد ۱۷ شماره ۱ صفحه ۱۳-۲۰.

۲- معظمی، ن. و ع. شجاع الساداتی. ۱۳۶۹. مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. صفحه ۵.

3- Amoah, B.K., H. Wu, C. Sparks, and H.D. Jones. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uid*A in wheat inflorescence tissue. J. Exp. Bot. 52:135-142.

4- Davis, M.R., R.D. Lineberger, and A.R. Miller. 1991. Effect of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 24:115-121.

5- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rep. 1:19-21.

6- Ellul, P., S.B. Gracia, B. Pineda, G. Rios, L.A. Roig, and V. Moreno. 2003. The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. Theor. Appl. Genet. 106:231-238.
7- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany. 55(396): 307-319.
8- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
9- Gao, N., W. Shen, Y. Cao, Y. Su, W. Shi. 2009. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 98:321-330.
10- Gubis, J., Z. Lajchova, J. Farago, Z. Jurekova. 2004. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Biologia Bratislava. 59:405-408.
11- Imeakhng, S., and O. Chatchawankanphanich. 2005. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 82:213-220.
12- Ling, H.Q., D. Kriseleit, and M.W. Ganal. 1998. Effect of ticarcillin/ potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Rep. 17:843-847.
13- McCormick, S., J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, and R. Fraley. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 5:81-84.
14- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
15- Nontaswatsri, C., S. Fukai, and M. Goi. 2004. Revised cocultivation conditions produce effective *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Science. 166:59-68.
16- Park, S.H., J.L. Morris, J.E. Park, K.D. Hirschi, and R.H. Smith. 2003. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium* – mediated tomato transformation. J. Plant Physiol. 160:1253-1257.
17- Qiu, D., G. Diretto, R. Tavarza, and G. Giuliano. 2007. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. Scientia Horticulturae. 112:172-175.
18- Raj, S.K., S. Rachana-Singh, K. Pandey, and B.P. Singh. 2005. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. Current Science. 88:1674-1679.
19- Sun, H.J., S. Uchii, S. Watanabe, and H. Ezura. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics. Plant Cell Physiol. 47(3):426-431.
20- Sunilkumar, G., K. Vijayachandra, and K. Veluthambi. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. Plant Science. 141:51-58.
21- Velcheva, M., Z. Faltin, M. Flaishman, Y. Eshdat, and A. Perl. 2005. A liquid culture system for *Agrobacterium*- mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Science. 168:121-130.
22- Yasmeen, A. 2009. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). Acta Physiol. Plant. 31:1271-1277.