

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده مهندسی کشاورزی

رشته زراعت گرایش بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک و نوع سویه باکتری بر انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر

آگروباکتریوم

نگارنده: آزاده محسنی تکلو

استاد راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

شهریور ۱۳۹۵

دانشگاه صنعتی شاهرود

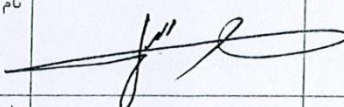
دانشکده کشاورزی

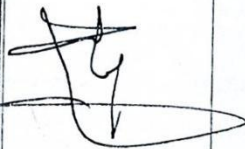
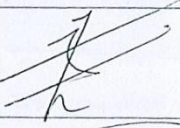
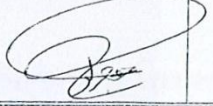
گروه : زراعت

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم آزاده محسنی تکلو به شماره دانشجویی: ۹۲۱۲۵۲۴

تحت عنوان: بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک و نوع سویه باکتری بر انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر آگروباکتریوم

در تاریخ ۹۵/۲/۱۷ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد **بیوتکنولوژی** مورد ارزیابی و با درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :
	نام و نام خانوادگی :		دکتر شاهرخ قرنجیک
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :
	دکتر حسن مکاریان		دکتر مهدیه پارسائیان
			نام و نام خانوادگی :
			دکتر شیده موجرلو

تقریم به مهربان فرشتگانی که

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگی، مدیون حضور سبز آنهاست

تقریم به

مقدس ترین واژه‌ها در لغت‌نامه دلم، مادر مهربانم که زندگی را مدیون مهر و عطوفت آن می‌دانم

پدرم، که راه را به من نشان داد

خواهرم، که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است

برادرانم، که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بودند و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان مایه دلگرمی من می باشد

و تقریم به

روح پاک خواهرم، که همه دنیایم بود...

تشکر و قدردانی

یارب دل ما را تو به رحمت جان ده درد همه را به صابری درمان ده

این بنده چه داند که چه می باید جست داننده تویی هر آنچه دانی آن ده

سپاس بی پایان بر ایزد باری تعالی که در لحظه لحظه زندگی خود، حضور نعمت‌های بیکران او را دیده‌ام و ستایش به درگاه او که مرا در انجام این پروژه یاری کرد

بر خود لازم می‌دانم از تمام کسانی که با بذل عنایت خویش این‌جانب را یاری نموده اند، سپاسگزاری نمایم. از استاد راهنما، جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک که همیشه مورد لطف و مرحمت ایشان بوده‌ام و اجرای این پایان نامه بدون راهنمایی‌ها و مساعدت‌های فراوان ایشان میسر نبود و بدون شک رفتار ایشان چراغ راهنمای این حقیر در تمام مراحل زندگی خواهد بود تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

از اساتید داور سرکار خانم دکتر مهدیه پارسائیان و دکتر شیده موجرلو که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند، همچنین جناب آقای دکتر حسن مکاریان نماینده تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

از کلیه دوستان و دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی را دارم و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند.

تعهدنامه

اینجانب آزاده محسنی تكلو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک و نوع سویه باکتری بر انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر آگروباکتریوم تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام گردیده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند، در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آن ها) استفاده شده است، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت گردیده است.

امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی جهان به شمار می‌رود. علی‌رغم تولید گیاهان تراریخته کلزا کارآیی انتقال ژن در این گیاه پایین می‌باشد. به منظور بررسی تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم و امواج اولتراسونیک بر فراوانی انتقال ژن به گیاه کلزا، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی به ترتیب با ۳ و ۵ تکرار در ریزنمونه‌های کوتیلدونی کلزا رقم Okapi انجام شد. در آزمایش مربوط به سویه، سویه‌های آگروباکتریوم EHA101، LBA4404، GV3850 حامل پلاسمید pBI121 و ژن‌های *gus* و *nptII* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که بین سویه‌های آگروباکتریوم به کار رفته در این تحقیق اختلاف معنی‌داری از لحاظ توانایی انتقال ژن به گیاه کلزا وجود دارد و بالاترین درصد تراریختی مربوط به سویه GV3850 (۳٪) و پایین‌ترین درصد تراریختی مربوط به سویه LBA4404 (۱٪) بدست آمد. در آزمایش مربوط به امواج اولتراسونیک از آگروباکتریوم سویه EHA101 استفاده شد. ریزنمونه‌های کوتیلدونی در معرض تیمارهای مختلف امواج اولتراسونیک (۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ ثانیه) قبل از هم-کشتی با آگروباکتریوم قرار گرفتند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که بین زمان‌های مختلف تیمار اولتراسونیک اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به گونه‌ای که بالاترین درصد تراریختی مربوط به تیمار ۲۰ ثانیه (۱۰٪) و پایین‌ترین درصد تراریختی مربوط به تیمار شاهد (۲٪) بدست آمد. نتایج واکنش PCR روی گیاهان باززا شده بر روی محیط انتخابی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *gus* و *nptII* تکثیر قطعه حدود ۵۲۱bp برای ژن *gus* و قطعه ۱۳۴۱bp برای ژن *nptII* را در هر دو آزمایش تایید کرد.

کلمات کلیدی: کلزا، انتقال ژن، سویه‌های آگروباکتریوم، اولتراسونیک

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

- ۱- بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک در کارایی انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر آگروباکتریوم. دومین کنگره بین المللی و چهاردهمین کنگره ژنتیک ایران، دانشگاه شهید بهشتی تهران، خرداد ۱۳۹۵.
- ۲- بررسی تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر کارایی انتقال ژن به گیاه کلزا. دومین کنگره بین المللی و چهاردهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه گیلان، شهریور ۱۳۹۵.

فهرست

فصل اول	۱
۱-۱ گیاه‌شناسی کلزا	۲
۱-۱-۱ منشا پیدایش کلزا	۲
۱-۱-۲ مشخصات گیاه‌شناسی	۲
۱-۱-۳ رشد و نمو کلزا	۳
۱-۱-۴ اهمیت کلزا	۳
۲-۱ بیوتکنولوژی گیاهی	۵
۱-۲-۱ انتقال ژن	۵
۱-۲-۱-۱ روش‌های انتقال ژن	۶
۳-۱ معرفی آگروباکتریوم	۷
۱-۳-۱ طبقه‌بندی آگروباکتریوم‌ها	۸
۲-۳-۱ دامنه میزبانی آگروباکتریوم	۱۰
۳-۳-۱ ساختار مولکولی پلاسمیدهای Ri و Ti	۱۲
۴-۳-۱ ژن‌های تومورزا و ژن‌های ریشه‌زا	۱۴
۵-۳-۱ القای تومور توسط آگروباکتریوم	۱۴
۶-۳-۱ بررسی اجمالی مفهوم انتقال به واسطه آگروباکتریوم	۱۵

- ۱۶-۳-۷ فرایند انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی ۱۶
- ۱۷-۳-۱ اتصال باکتری ۱۷
- ۱۸-۳-۲ الفاء سیستم بیماری‌زای آگروباکتریوم ۱۸
- ۱۸-۳-۳-۱ تولید و انتقال کمپلکس T-DNA ۱۸
- ۱۹-۳-۴-۱ انتقال کمپلکس T از آگروباکتریوم به گیاه ۱۹
- ۲۲-۳-۵-۱ ادغام T-DNA به داخل ژنوم گیاه ۲۲
- ۲۳-۴-۱ روش تراریختی گیاهان با آگروباکتریوم ۲۳
- ۲۴-۴-۱ روش‌های اصلی تلقیح گیاه یا ریزنمونه با آگروباکتریوم ۲۴
- ۲۵-۴-۲ فاکتورهای موثر در انتقال به واسطه آگروباکتریوم ۲۵
- ۲۷-۵-۱ مزایا و معایب روش آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان ۲۷
- ۲۷-۵-۱ مزایا ۲۷
- ۲۸-۵-۲ معایب ۲۸
- ۲۸-۶-۱ انتقال ژن مبتنی بر آگروباکتریوم با به کارگیری امواج اولتراسونیک ۲۸
- ۲۸-۶-۱ امواج صوتی و گیاهان ۲۸
- ۲۹-۶-۲ کاربرد امواج فراصوت در بیوتکنولوژی و انتقال ژن در گیاهان ۲۹
- ۳۰-۶-۳ مکانیسم فعالیت ۳۰
- ۳۱-۷-۱ روش‌های تایید تراریختی گیاه ۳۱

۳۲	۱-۷-۱ استفاده از ژن‌های نشانگر گزینشگر
۳۳	۱-۷-۲ استفاده از ژن‌های گزارشگر
۳۳	۱-۷-۳ بتاگلوکورونیداز یا GUS (β Glucuronidase)
۳۵	فصل دوم
۳۶	۱-۲ تاریخچه تراریختی در گونه‌های <i>Brassica</i>
۴۳	۲-۲ تاریخچه تراریختی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم
۴۷	۳-۲ برخی مطالعات تراریختی در گیاهان دیگر
۵۱	۴-۲ تاریخچه تراریختی توسط امواج اولتراسونیک
۵۷	فصل سوم
۵۸	۱-۳ مواد مورد استفاده
۵۸	۱-۱-۳ مواد گیاهی
۵۸	۲-۱-۳ مواد شیمیایی، آنزیم‌ها
۵۸	۳-۱-۳ تجهیزات مورد استفاده
۵۹	۲-۳ انتقال ژن و کشت بافت گیاهی
۵۹	۱-۲-۳ مواد گیاهی و آماده سازی بذرها
۶۰	۲-۲-۳ محیط کشت گیاهی MS
۶۲	۳-۲-۳ محیط کشت‌های مورد نیاز در انتقال ژن به گیاه
۶۳	۳-۳ بخش مولکولی

- ۶۳..... ۱-۳-۳ سویه‌های باکتریایی
- ۶۵..... ۲-۳-۳ تهیه ذخیره (Stock) از کشت شبانه باکتری
- ۶۵..... ۳-۳-۳ محیط کشت باکتری
- ۶۵..... ۱-۳-۳-۳ تهیه محیط LB
- ۶۶..... ۴-۳-۳ آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده
- ۶۷..... ۵-۳-۳ استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation
- ۷۱..... ۱-۵-۳-۳ الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید
- ۷۱..... ۶-۳-۳ انتقال پلاسمید به آگروباکتریوم
- ۷۳..... ۷-۳-۳ کشت و آماده سازی آگروباکتریوم حاوی پلاسمید مورد نظر
- ۷۳..... ۴-۳-۳ تراریخت کردن ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای (کوئیلدونی)
- ۷۴..... ۱-۴-۳ باززایی گیاهان تراریخت
- ۷۵..... ۲-۴-۳ بررسی مولکولی گیاهان تراریخته
- ۷۵..... ۱-۲-۴-۳ استخراج DNA ژنومی به روش CTAB
- ۷۷..... ۳-۴-۳ بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی
- ۷۸..... ۱-۳-۴-۳ بررسی کمیت DNA توسط اسپکتروفتومتری
- ۷۸..... ۲-۳-۴-۳ بررسی کیفیت DNA توسط الکتروفورز با ژل آگارز
- ۷۹..... ۴-۴-۳ استفاده از RNase جهت حذف RNA

۷۹ ۵-۳ آنالیز گیاهان تراریخت
۸۰ ۱-۵-۳ آغازگرهای داخلی طراحی شده و آزمون PCR برای ژنهای <i>nptII</i> و <i>gus</i>
۸۲ ۶-۳ تجزیه آماری داده‌ها
۸۳ فصل چهارم
۸۴ ۱-۴ غربالگری کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب pBI121
۸۴ ۲-۴ تایید کلون‌های نو ترکیب سویه‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121
۸۵ ۳-۴ تراریخت کردن گیاهان با استفاده از روش مبتنی بر آگروباکتریوم
۹۱ ۴-۴ بررسی مولکولی گیاهان تراریخت
۹۲ ۵-۴ بررسی قدرت تراریختی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم
۹۵ ۶-۴ بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک در کارایی انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر آگروباکتریوم
۹۹ ۷-۴ نتیجه گیری کلی
۱۰۱ منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: پلاسمید Ti ۱۳
- شکل ۲-۱: الگویی برای تراریختی ژنتیکی با واسطه آگروباکتریوم ۱۷
- شکل ۳-۱: انتقال کمپلکس T از آگروباکتریوم به سلول گیاهی ۲۱
- شکل ۱-۳: مراحل آماده‌سازی و کشت بذرهاي کلزا برای تهیه ریزنمونه ۶۰
- شکل ۲-۳: نقشه پلاسمید pBI121 ۶۴
- شکل ۳-۳: واسرشت شدن پروتئینها توسط pH اسیدی و تشکیل حالت ابری ۷۰
- شکل ۱-۴: رشد آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 روی محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین ۸۴
- شکل ۲-۴: نتایج آزمون کلنی PCR سویه‌های مختلف آگروباکتریوم واجد ژنهای *nptII* و *gus* ۸۵
- شکل ۳-۴: مراحل تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون گیاه کلزا با آگروباکتریوم ۸۶
- شکل ۴-۴: مراحل رشدی گیاه در فرایند انتقال ژن به گیاه کلزا با استفاده از ریزنمونه کوتیلدونی ۸۹
- شکل ۵-۴: مراحل رشدی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی ۹۱
- شکل ۶-۴: آنالیز مولکولی گیاهان باززا شده بر روی محیط انتخابی و شاهد با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی *nptII* و *gus* ۹۲
- شکل ۷-۴: تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر فراوانی انتقال ژن در کلزا ۹۳
- شکل ۸-۴: تاثیر امواج فراصوت روی فراوانی انتقال ژن در کلزا ۹۷
- شکل ۹-۴: عکس میکروسکوپی از سطح ریزنمونه کوتیلدونی ۹۸

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: فاکتورهای درگیر در انتقال به واسطه آگروباکتریوم ۲۷
- جدول ۱-۳: ترکیبات محیط کشت MS ۶۱
- جدول ۲-۳: طرز تهیه محیط‌های مورد نیاز در انتقال ژن ۶۳
- جدول ۳-۳: ترکیب محیط کشت LB ۶۵
- جدول ۴-۳: غلظت محلول‌های مادری و موارد استفاده آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت‌های مختلف ۶۷
- جدول ۵-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ میلی لیتر محلول I استخراج پلاسمید ۶۸
- جدول ۶-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱ میلی لیتر از محلول II جهت استخراج پلاسمید ۶۸
- جدول ۷-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از محلول III جهت استخراج پلاسمید ۶۸
- جدول ۸-۳: آغازگرهای داخلی طراحی شده برای ژن‌های *nptII* و *gus* ۸۰
- جدول ۹-۳: مواد مورد نیاز آزمون PCR ۸۰
- جدول ۱۰-۳: پروفایل دمایی مورد استفاده در واکنش PCR برای ژن *nptII* و *gus* ۸۱
- جدول ۱-۴: جدول تجزیه واریانس درصد فراوانی تراریختی گیاه کلزا تحت تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ۹۳
- جدول ۲-۴: جدول تجزیه واریانس درصد فراوانی تراریختی گیاه کلزا تحت تاثیر تیمارهای مختلف اولتراسونیک ۹۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ گیاه‌شناسی کلزا:

۱-۱-۱ منشا پیدایش کلزا

کلزا با نام علمی (*Brassica napus* L.) که در زبان انگلیسی (*Rapeseed*) و در زبان فرانسه (*Colza*) نامیده می‌شود. گیاهی از خانواده *Brassicaceae* (قبلا *Cruciferae*) می‌باشد که تقریباً در بردارنده ۳۷۵ جنس و ۳۲۰۰ گونه گیاهی می‌باشد (Jessop & toelken, 1986). کلزا گیاهی آمفی دیپلوئید طبیعی و از تلاقی گونه کلم روغنی (*B. rapa*) و شلغم روغنی (*B. campestris*) و دو برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید آن‌ها حاصل شده است. تعداد کروموزوم‌های آن ($2n=36$) می‌باشد (شریعتی و قاضی شهنی زاده، ۱۳۷۹). کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی جهان به شمار می‌آید و از نظر تولید روغن نباتی پس از نخل روغنی و سویا سومین گیاه دانه روغنی جهان محسوب می‌شود (Moghaieb et al., 2006). اصطلاح کلزا در کانادا ظاهراً از حروف کلمات Canadian Oli Seed Association در سال ۱۹۷۹ گرفته شده است. زراعت کلزا از حدود ۳۰۰۰ سال پیش، در هندوستان رواج داشته است و از حدود ۳۵ سال پیش از میلاد، از چین به ژاپن منتقل شد. خاستگاه این گیاه به آسیا و اروپا نسبت داده شد و می‌توان گفت دارای دو موطن، یکی در پاکستان و افغانستان و دیگری در نواحی مدیترانه می‌باشد (دهشیری، ۱۳۷۸).

۱-۱-۲ مشخصات گیاه‌شناسی:

از نظر مشخصات گیاه‌شناسی، گیاهی است علفی و دوره رشد یکساله دارد. کلزا گیاهی سرما دوست و روز بلند است و بهترین رشد را در دمای ۱۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد دارد. این گیاه خودگشن بوده و درصد خودگشنی آن بیش از ۷۰٪ می‌باشد. میوه کلزا به صورت غلاف ۱۰-۵ سانتی‌متر و بدون کرک است (عزیزی و همکاران، ۱۳۷۸). گیاه کلزا دارای دو تیپ بهاره و پاییزه می‌باشد چرخه زندگی

کلزای پاییزه دارای دو مرحله رشدی مشخص می‌باشد: مرحله رویشی، که اندام‌های رویشی در پائیز ظاهر می‌شوند و با گذشت دوره‌ی خواب زمستانه، گیاه رشد سریع را در بهار آغاز می‌کند که با تمایز اندام‌های زایشی همراه است. گونه *Brassica napus* کلزای معمولی است که عموماً در اروپا و کانادا کشت می‌شود و در کانادا به کلزای آرژانتینی معروف است زیرا برای اولین بار از آنجا به کانادا وارد شده است. *B. napus* مهم‌ترین گونه جنس *Brassica* محسوب می‌شود. ارقام بهاره و زمستانه این گونه به عنوان منبع روغنی گیاهی کشت می‌گردد ولی ارقام زمستانه در شرایط مساعد معمولاً پر محصول‌تر می‌باشد. در اروپا و چین اغلب از ارقام پاییزه استفاده می‌شود. در عرض‌های جغرافیایی و در ارتفاعات زیاد و در نقاطی که شانس بقای گیاه در زمستان کم است، مانند غرب کانادا، به اجبار از ارقام بهاره استفاده می‌شود. بذور آن اغلب به رنگ سیاه بوده و در حالت طبیعی فرم‌هایی با بذور زرد رنگ نیز وجود دارد. به نظر می‌رسد رنگ زرد بذر با مقدار کمتر تانن در بذور و نازک‌تر بودن پوسته بذر ارتباط داشته و سبب می‌شود که میزان روغن و پروتئین بذر بیشتر مقدار الیاف و فیبر کنجاله کمتر باشد.

۳-۱-۱ رشد و نمو کلزا:

مراحل رشدی کلزا به چهار مرحله تقسیم می‌شود: ۱- مرحله رشد رویشی ۲- مرحله رشد زایشی

۳- مرحله رشد غلاف ۴- مرحله تشکیل بذر

فاکتورهای زراعی مانند تاریخ کاشت واریته، تراکم، حاصلخیزی خاک، آب و دیگر عوامل می‌توانند

بر مدت و نحوه‌ی رشد و نمو طی این مراحل تاثیر داشته باشد و در نتیجه عملکرد و اجزاء آن را تغییر

دهد (حاجی بابایی، ۱۳۷۶).

۴-۱-۱ اهمیت کلزا:

دانه‌های روغنی بعد از غلات دومین منبع تأمین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب

می‌شوند. روغن و چربی مورد نیاز انسان از منابع مختلف گیاهی و حیوانی تامین می‌شود. روغن‌های گیاهی به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی پروتئین و به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع، نقش مهمی در کنترل کلسترول خون و تندرستی جوامع دارند (جلالی جواران و همکاران، ۱۳۸۳). حدود ۱۴/۷٪ از کل تولید روغن نباتی جهانی توسط کلزا تامین می‌شود که تولید جهانی آن طی سال ۲۰۱۶ میلادی برابر با ۶۷/۱۶ میلیون تن گزارش گردیده است. با توجه به این که میزان روغن حاصل از دانه‌های روغنی تولید داخل، حداکثر به ۸۶ هزار تن می‌رسد، که چیزی حدود ۰.۸٪ از نیاز روغن خام کشور را تامین می‌کند، اهمیت گیاه روغنی کلزا بیش از پیش آشکار می‌شود (جلالی جواران و همکاران، ۱۳۸۳).

Brassica napus به علت دارا بودن دو ماده مسموم کننده طبیعی به نام اورئیک اسید و گلیکوسینولایت منبع غذایی مناسبی برای انسان و دام نبوده تا این که در دهه ۱۹۷۰ در چند کشور تلاش‌هایی برای رفع این مسئله صورت گرفت که باعث ایجاد واریته‌هایی با کیفیت‌های بالا گردید که به طور قابل توجهی این دو ماده سمی را کمتر داشتند. با افزایش تقاضا برای روغن کانولا و نیاز به پاسخ‌گویی به خواسته‌های مصرف‌کنندگان، تحقیقات بیشتری به منظور بهبود کلزا از طریق اصلاح آن دنبال می‌شد. تکنیک‌های اصلاح مرسوم زمان‌بر و پرهزینه است، حداقل هشت تا ده نسل برای تولید انواع جدید با استفاده از روش اصلاح معمولی طول می‌کشد (Bhalla & Mohan, 2008). یک جایگزین برای بهبود صفات بدون اصلاح معمولی تکنیک انتقال ژن در گیاهان است که زمان مورد نیاز برای توسعه واریته جدید را کاهش می‌دهد (جعفری راد و همکاران، ۱۳۹۰). در حال حاضر تحقیقات قابل توجهی در این زمینه انجام شده است و کلزا برای اهداف مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گرفت. برای پاسخگویی به نیاز جمعیت رو به افزایش بشر تلاش‌های به‌نژادی و به‌زراعی کلزا به افزایش کیفیت و کمیت محصول منجر شده، اما کافی نبوده است (Fan et al., 2013). بنابراین، استفاده از روش‌های انتقال ژن برای بهبود ترکیب روغن (Knutzon et al., 1992; زیرجادی و همکاران، ۱۳۸۴) و دستیابی به رقم‌های مقاوم به بیماری‌ها،

آفات و علف‌کش‌ها (De Block, 1989)، امری ضروری به نظر می‌رسد.

۲-۱ بیوتکنولوژی گیاهی

بیوتکنولوژی گیاهی فرایند تولید گیاهانی با تغییرات ژنتیکی است که این تغییرات با استفاده از تکنولوژی DNA ی نو ترکیب انجام می‌شود. بیوتکنولوژی گیاهی به طور عمده شامل وارد کردن ژن‌های خارجی به گونه‌های گیاهی تجاری است که منجر به اصلاح محصولات زراعی و تولید فرآورده‌های جدید در این گیاهان می‌شود. امروزه از بیوتکنولوژی گیاهی به عنوان یک ابزار برای اعطای صفات جدیدی، که برای تولیدات کشاورزی، محیط زیست، تغذیه و سلامت بشر سودمند هستند، استفاده می‌شود. بیوتکنولوژی گیاهی به دو حوزه کشت بافت گیاهی و مهندسی ژنتیک گیاهی محدود می‌شود. یک محصول تراریخته حاوی ژن یا ژن‌هایی است که، به جای آن که گیاه آن‌ها را از طریق گرده افشانی و تلاقی کسب کند، با استفاده از مهندسی ژنتیک به صورت مصنوعی دریافت می‌کند. توالی ژن داخل شده (که به آن ترانسژن می‌گویند) می‌تواند از گیاه غیر خویشاوند دیگری و یا حتی گونه‌ای کاملاً متفاوت باشد. به عنوان مثال در ذرت تراریخته Bt، که آفت کش را خود تولید می‌کند، حاوی ژنی از باکتری باسیلوس تورینجینسیس است. گیاهان حاوی ترانسژن غالباً محصولات تغییر یافته ژنتیکی^۱ یا GM نامیده می‌شوند (فارسی و جلال‌زاده، ۱۳۸۷).

۱-۲-۱ انتقال ژن:

انتقال ژن به سلول‌های گیاهی و کشت بافت امکان انتقال ژن‌هایی با صفات مطلوب به گیاهان را فراهم و باعث ایجاد گیاهان تراریخت با صفات بهبود یافته، شده است. این روش پتانسیل زیادی در بهبود ژنتیکی محصولات گیاهان مختلف با ادغام در برنامه‌های بیوتکنولوژی گیاهی و تولید و تکثیر آن‌ها دارد.

^۱ genetically modified (GM) crops

این تکنیک نقش امیدوار کننده‌ای برای معرفی صفات مهم زراعی مانند افزایش عملکرد، کیفیت بهتر و افزایش مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها را دارد.

۱-۱-۲-۱ روش‌های انتقال ژن:

روش‌های انتقال ژن تکنیک بنیادی برای معرفی DNA به *E. coli*، القاء روش‌هایی برای معرفی DNA به سلول‌های طیف گسترده‌ای از موجودات زنده از جمله سلول‌های پستانداران و گیاهان است. روش‌های انتقال ژن شامل سه دسته است (Ma & chen, 2005)، که عبارتند از:

انتقال توسط مواد شیمیایی

انتقال توسط مواد فیزیکی

انتقال توسط ویروس

از جمله مهم‌ترین تکنیک‌های انتقال ژن در سلول‌های گیاهی و حیوانی عبارتند از (Khan, 2010):

الکتروپورشن^۱، ریزتزریقی^۲، درشت تزریقی^۳، بیولیستیک یا تفنگ ژنی^۴، انتقال ژن با لیپوزوم^۵، انتقال DNA با کلسیم فسفات^۶، انتقال DNA مبتنی بر DAE-Dextran^۷، انتقال DNA مبتنی بر polycation- DMSO^۸، انتقال DNA مبتنی بر پلی اتیلن گلیکول^۹، انتقال DNA توسط پپتید^{۱۰}،

¹ Electroporation

² Microinjection

³ Macroinjection

⁴ Biolistics or microprojectiles

⁵ Liposome mediated gene transfer

⁶ Calcium phosphate mediated DNA transfer

⁷ DNA transfer by DAE-Dextran method

⁸ Transfer of DNA by polycation-DMSO

⁹ Polyethylene glycol mediated transfection

¹⁰ Gene transfer through peptide

انتقال DNA از طریق رتروویروس^۱، انتقال DNA توسط آگروباکتریوم^۲.

از نظر تاریخی، سیستم آگروباکتریوم اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان است که کاربرد آن در سال ۱۹۸۳ موانع مهندسی ژنتیک را شکست داد. سی سال پیش، تصور استفاده از آگروباکتریوم، یک باکتری خاکزاد گرم منفی، به عنوان یک ناقل برای ایجاد گیاهان تراریخته به عنوان یک آرزو تلقی می‌شد. امروزه این رویا برای تعداد زیادی از گونه‌های زراعی و باغی به واقعیت تبدیل شده است و آن یک ابزار ضروری مهم مهندسی ژنتیک گیاهی برای معرفی ژن‌های خارجی به سلول‌های گیاهی به منظور افزایش درصد گیاهان تراریخته احتمالی است (Gelvin, 2003). انتقال گیاه به وسیله آگروباکتریوم در غلات، حبوبات و دیگر گیاهان زراعی و به منظور افزایش محصولات بیوتکنولوژی کشاورزی و بهبود عملکرد و کیفیت محصولات و مواجه شدن با نیاز جمعیت روبه افزایش جهان به کار می‌رود (Abuodeh *et al.*, 2000).

۱-۳ معرفی آگروباکتریوم

باکتری‌های جنس آگروباکتریوم به عنوان ناقلین ژن برای سلول‌های گیاهی به خوبی شناخته شده‌اند. آگروباکتریوم، باکتری‌های میله‌ای، گرم منفی و متعلق به خانواده *Rhizobiaceae* می‌باشند. فیتوپاتوژن خاکزی، *Agrobacterium tumefaciens* به عنوان عامل بیماری گال طوقه (Smith *et al.*, 1907) یک بیماری مهم زراعی که عمدتاً در گیاهان دولپه‌ای اثر می‌گذارد، شناخته شده است. این بیماری توسط رشد تومور از بافت گیاهی در ساقه مشخص شده است و یک مشکل مهم در انگور، سیب، گلابی، هلو، گیلاس، بادام، تمشک است. بینز و توماشاو (Binns & Thomashow., 1988) نشان دادند که A.

¹ Gene transfer by retroviruses

² Agrobacterium mediate

tumefaciens قادر به انتقال بخش خاصی از DNA به نام T-DNA¹ از پلاسمید Ti به هسته سلول‌های آلوده است که در ژنوم میزبان وارد شده و در نهایت منجر به گال طوقه می‌شود. T-DNA حاوی ژن‌های سرطانی کد کننده آنزیم‌های دخیل در سنتز اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها و ژن‌های کد کننده برای سنتز اوپین‌ها است (Zupan & Zambryski, 1995). گونه *A. rhizogenes*، ارتباط نزدیکی با *A. tumefaciens* دارد که منجر به تولید ریشه مویی در گیاهان دولپه‌ای می‌شود. *A. rhizogenes* منجر به ایجاد ریشه نابجا یا همان ریشه مویی در محل آلودگی می‌شود (Chilton *et al.*, 1982).

۱-۳-۱ طبقه‌بندی آگروباکتریوم‌ها:

طبقه‌بندی آگروباکتریوم‌ها در سیستم قدیمی براساس خصوصیات بیماری‌زایی و طیف میزبانی به قرار زیر است (Gelvin, 2003; Otten *et al.*, 1984):

۱. *Agrobacterium tumefaciens*: عامل بیماری گال طوقه
۲. *Agrobacterium rhizogenes*: عامل بیماری ریشه مویی
۳. *Agrobacterium rubi*: عامل بیماری گال نیشکر
۴. *Agrobacterium vitis*: عامل بیماری گال در انگور و تعدادی دیگری از گیاهان که به تازگی پیشنهاد شده
۵. *Agrobacterium radiobacter*: گونه غیر بیماری‌زا

اگرچه کتاب راهنمای طبقه‌بندی سیستماتیک باکتری شناسی^۲ هنوز این نام‌گذاری را منعکس می‌نماید ولی این طبقه‌بندی پیچیده و گیج‌کننده است، زیرا در اکثر موارد، علائم بیماری یاد شده حاصل از نوع پلاسمید مولد تومور است که در درون سویه خاصی وجود دارد. از دست دادن پلاسمید مولد تومور

¹ Transferred DNA

² *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

یا جایگزینی آن با پلاسمید دیگر، می تواند باعث تغییر علائم بیماری شود. به عنوان مثال، آلودگی گیاهان با *A. tumefaciens* C58 که دارای پلاسمید pTiC58 از دسته پلاسمیدهای نوپالین می باشد، باعث ایجاد گال تاجی جنینی می شود. اگر این پلاسمید حذف شود، این سویه باکتری غیر بیماری زا می شود. وارد کردن پلاسمید Ri به این سویه که پلاسمید خود را از دست داده است، باعث تبدیل باکتری به سویه *A. rhizogenes* می شود (Lam et al., 1984; White et al., 1980). علاوه بر این، با وارد کردن پلاسمید Ti (القا کننده تومور) از *A. tumefaciens* به *A. rhizogenes*، سویه ایجاد شده تومورهایی با ظاهری تغییر یافته در گیاه *Kalanchoe* ایجاد می کند. بنابراین، چون *A. tumefaciens* می تواند به راحتی با جانشینی یک نوع پلاسمید بیماری زا با پلاسمید دیگر، به *A. rhizogenes* تبدیل شود، واژه گونه معنی خود را از دست می دهد. شاید یک سیستم طبقه بندی با معنی تر، جنس آگروباکتریوم را بر اساس خصوصیات متابولیکی و رشد به سه بیوتیپ تقسیم نماید. در این سیستم اغلب سویه های *A. tumefaciens* و *A. rubi* در بیوتیپ ۱، سویه های *A. rhizogenes* در بیوتیپ ۲، و سویه های *A. vitis* در بیوتیپ ۳ قرار می گیرند. نژادهای متعلق به بیوتیپ های ۱ و ۲ در آزمایشات مهندسی ژنتیک در گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸، Gelvin, 2003).

بیوتیپ ۱: وجه تمایز این نژادها از دیگر باکتری ها، توانایی آن ها در تولید کتولاکتوز از لاکتوز است. نژادهای بسیار معروف *A. tumefaciens* نظیر 15955, Bo542, T37, C58, B6, A6, Ach5 به بیوتیپ ۱ تعلق دارند. این باکتری ها تا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قادر به تکثیر می باشند، اما در آزمایشگاه معمولاً در دمای ۲۸ تا ۲۹ درجه سانتی گراد کشت داده می شوند، چون بعضی از پلاسمیدهای Ti در دماهای بالاتر، قدری ناپایدار هستند. از محیط کشت های مرسوم *E. coli* همچون محیط کشت LB^۱، NB^۲ و TY^۱

¹ Luria Bertani

² Nutrient broth

می‌توان برای کشت آن‌ها استفاده کرد، اما در محیط کشت‌های تعریف شده حداقل مانند MM یا YMB^۲ نیز امکان رشد آن‌ها وجود دارد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

بیوتیپ ۲: وجه تشخیص این نژاد از دیگر آگروباکتریوم‌ها توانایی آن‌ها در رشد بر روی اریتریتول^۳ به عنوان تنها منبع کربن است. نژادهای ATCC15834, NCPPB1855 و A4 از نژادهای آزمایشگاهی A. *rhizogenes* بیوتیپ ۲ می‌باشند. نژادهای بیوتیپ ۲ در درجه حرارت‌های بیش از ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد ضعیفی دارند و بنابراین برای تکثیر، در دمای ۲۸ یا ۲۹ درجه سانتی‌گراد کشت می‌شوند. در محیط کشت‌های مرسوم *E. coli* به خوبی رشد نمی‌کنند، اما می‌توان آن‌ها را در محیط کشت‌هایی نظیر YMB، TY+Ca و یا در محیط کشت تعریف شده حداقل مانند MM کشت نمود (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

سیستم دیگری نیز برای طبقه‌بندی جنس آگروباکتریوم پیشنهاد شده است. تکمیل توالی-یابی DNA کل ژنوم *A. tumefaciens* C58 که مرکب از یک کروموزوم خطی، یک کروموزوم حلقوی، یک پلاسمید Ti و یک پلاسمید بزرگ دیگر می‌باشد، ممکن است نقطه شروعی برای طبقه‌بندی مجدد سویه-های *Agrobacterium* در گونه‌های واقعی گردد.

۱-۳-۲ دامنه میزبانی آگروباکتریوم:

علی‌رغم سرگردانی موجود در طبقه‌بندی گونه‌ها، شاید مهم‌ترین موضوع در مهندسی ژنتیک گیاهان، طیف میزبانی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم باشد. به عنوان یک جنس، آگروباکتریوم می‌تواند DNA را به تعداد قابل ملاحظه‌ای از موجودات زنده شامل بسیاری از دولپه‌ای‌ها و تک‌لپه‌ای‌ها در گونه‌های نهان‌دانه و بازدانگان منتقل نماید. به علاوه، آگروباکتریوم توانایی انتقال ژن به قارچ‌هایی مثل مخمر، آسکومیست‌ها و بازیدومیست‌ها را دارد. آگروباکتریوم همچنین برای انتقال DNA به سلول‌های

¹ Tryptone yeast extract

² Yeast maltose broth

³ Erythritol

انسانی به کار می‌رود (Gelvin, 2003; Kunik *et al.*, 2001). اساس مولکولی و ژنتیکی طیف میزبان یک سویه آگروباکتریوم هنوز روشن نشده است. مطالعات اولیه حاکی از این است که پلاسمید Ti در مقایسه با ژن‌های کروموزومی، تعیین‌کننده ژنتیکی اصلی طیف میزبانی می‌باشد. نشان داده شده است که چندین مکان ژنی بیماری‌زایی (*vir*¹) بر روی پلاسمید Ti از جمله *virC* و *virF*، در تعیین گونه‌های گیاهی که انتقال ژن به آنها می‌تواند صورت گیرد تا تومورهای گال طوقه ایجاد شود، نقش دارند. مشخص شده که مکان ژنی *virH* که قبلاً *pinF* نامیده شده است، در توانایی آگروباکتریوم در انتقال ژن به ذرت موثر می‌باشد. سایر ژن‌های *vir* مثل *virG* نیز در بیماری‌زایی بیش از حد برخی سویه‌های خاص مشارکت دارند (Gelvin, 2003). به هر حال اکنون روشن شده است که طیف میزبانی فرآیند بسیار پیچیده‌ای می‌باشد که تحت کنترل ژنتیکی چندین عامل در باکتری و میزبان گیاهی می‌باشد. نتیجه هر تلاش و تحقیقی برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، خصوصاً گیاهان جدید، اطلاعاتی را درباره طیف میزبانی آگروباکتریوم به ما می‌دهد. به طور مثال، امروزه انتقال ژن به بسیاری از گونه‌های گیاهان تک‌لپه مثل ذرت، برنج، جو و گندم توسط بسیاری از سویه‌های آگروباکتریوم ممکن شده و فنوتیپ مقاومت به علف‌کش و آنتی‌بیوتیک در آنها ایجاد شده است اما تومور گال طوقه در این گونه‌های گیاهی رشد نمی‌کند. شاید بر همکنش پلاسمید Ti خاصی با زمینه ژنتیکی کروموزوم باکتریایی در تعیین دامنه میزبانی موثر باشد. به طور مثال، پلاسمید pTiBo542 در سویه طبیعی خود یعنی *A. tumefaciens* Bo542 قابلیت تومورزایی محدودی بر روی گونه‌های متعدد بقولات دارد. این پلاسمید اگر در زمینه کروموزومی *A. tumefaciens* C58 قرار گیرد، باعث بیماری‌زایی قوی در سویا و سایر بقولات می‌شود. زمینه ژنتیکی گیاهان در تعیین استعداد آنها به بیماری گال طوقه موثر است. این موضوع در مورد وارپته‌های مختلف کدوئیان، نخود، سویا، انگور و حتی اکوتیپ‌های مختلف *Arabidopsis thaliana* به وضوح مشخص است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸؛

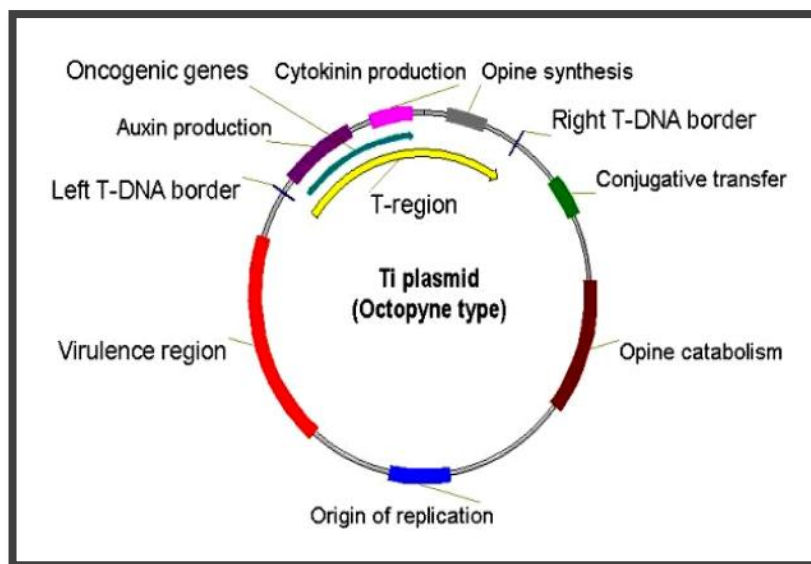
¹ Virulence

تعامل سلول‌های گیاهی با آگروباکتریوم یک فرایند منحصر به فرد و بسیار تنظیم شده است که تنها نمونه شناخته شده از انتقال DNA درون شاخه‌ای است. این سیستم نشان دهنده یک وضعیت طبیعی است که در آن انتقال ژنتیکی اطلاعات اورگانیزم پروکاریوتی به میزبان یوکاریوتی صورت می‌گیرد (Tzfira *et al.*, 2004; Simoh *et al.*, 2007). این قابلیت زمینه ساز استفاده از بیوتکنولوژی آگروباکتریوم است که بیشتر برای انتقال ژنتیکی گونه‌های گیاهی مختلف به کار می‌رود. اختصاصی بودن نژادهای آگروباکتریوم برای ژنوتیپ‌های گیاهی مختلف و انواع مختلف بافت‌ها به خوبی تایید گردیده است. برای پیدا کردن ترکیبات مطلوب نژاد-ژنوتیپ، بایستی مجموعه‌ای از نژادهای آگروباکتریوم در گستره‌ای از ژنوتیپ‌های گیاهی آزمایش شوند. علاوه بر ژنوتیپ، سن، نوع و وضعیت فیزیولوژی بافت گیاهی نیز می‌تواند در تعیین سازگاری‌های نژاد-ژنوتیپ حائز اهمیت باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). با این حال انتقال توسط آگروباکتریوم در گونه‌های تک‌لپه‌ای دشوار و غیر قابل اعتماد است چون این گیاهان به طور طبیعی مستعد ابتلا به آگروباکتریوم هستند. دلایلی که تا به امروز برای مشکلاتی که در انتقال به واسطه آگروباکتریوم در تک‌لپه‌ای‌ها که با آن مواجه هستیم، مطرح شده است عبارتند از: عدم توانایی آگروباکتریوم در اتصال به دیواره سلولی گیاه، فعالیت کاهش یافته پروموتور T-DNA، بازدارندگی القاء ژن-های Vir، تعادل غیر عادی اکسین-سیتوکنین در سلول‌های تک‌لپه‌ای و در نهایت عدم پاسخ آگروباکتریوم به زخم گیاهان تک‌لپه در اثر عدم تولید فاکتورهای علامت‌دهنده خاص توسط زخم شدن گیاهان تک‌لپه‌ای، که به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

۱-۳-۳ ساختار مولکولی پلاسمیدهای Ri و Ti

پلاسمیدهای Ri و Ti، DNAهای حلقوی بزرگی به اندازه ۲۳۵-۱۴۰ کیلو جفت باز هستند. ناحیه T-

DNA که به سلول‌های گیاه منتقل می‌شود از ۱۵ تا ۴۲ کیلو باز در نژادهای مختلف متفاوت است که دو توالی حفاظت شده ۲۵ جفت بازی تکراری مستقیم به نام توالی‌های مرزی در طرفین آن بر روی پلاسمید حامل قرار گرفته است. هر توالی DNA که در فاصله این دو توالی مرزی قرار گرفته باشد می‌تواند به سلول‌های گیاهی منتقل شود. دو منطقه مهم دیگر بر روی پلاسمیدهای Ti و Ri وجود دارد. منطقه ژن‌های بیماری‌زا یا منطقه Vir، که ژن‌های مسئول انجام مراحل انتقال T-DNA شامل برش، انتقال و تلفیق آن در ژنوم سلول‌های گیاهی در این منطقه قرار گرفته‌اند و منطقه ژن‌های کد کننده آنزیم‌های دخیل در کاتابولیسم اوپین‌ها که آگروباکتریوم را از قابلیت استفاده از اوپین‌هایی که توسط تومورها و ریشه‌های موئین تراوش می‌یابند، برخوردار می‌نماید (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). شکل زیر مربوط به پلاسمید Ti می‌باشد که در همه سویه‌های بیماری‌زای *A. tumefaciens* یافت می‌شود و به طور پایدار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در آگروباکتریوم حفظ می‌شود (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: پلاسمید Ti

۱-۳-۴ ژن‌های تومورزا و ژن‌های ریشه‌زا

کشت‌های این ویتروی تومورها و ریشه‌های موئین جدا شده از مکان تلقیح، به راحتی و بدون نیاز به منابع خارجی هورمون‌های رشد، به رشد و تکثیر سلولی ادامه می‌دهند. این عدم نیاز به هورمون، به دلیل بیان پایدار ژن‌های T-DNA است. این ژن‌ها یا مسئول تولید فیتوهورمون هستند (ژن‌های onc سرطان‌زایی پلاسمید Ti) و یا مسئول افزایش حساسیت سلول‌ها به اکسین‌ها می‌باشند (ژن‌های rol پلاسمیدهای Ri). بافت‌های توموری، رشد خود را به صورت بافت‌های تمایز نیافته کالوس ادامه می‌دهند، در حالی که ریشه‌های موئین به صورت توده‌ای شدیداً منشعب از ریشه‌های پلاژیوتروپیک^۱ (عدم زمین-گرایی)، رشد می‌نمایند (Tepfer, 1990). توالی‌های DNA مشابهی در T-DNA نوپالینی و TL-DNA اوکتوپینی مشاهده شده است. این مناطق دارای ژن‌های فیتوهورمون مولد تومور هستند که آنزیم‌های مسیر تولید AMP_ ایزوپنتیل (نوعی سیتوکینین) و ایندول استیک اسید (نوعی اکسین) را کد می‌نمایند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

۱-۳-۵ القای تومور توسط آگروباکتریوم

Agrobacterium rhizogenes و *Agrobacterium tumefaciens* دو نوع از باکتری‌های خاک هستند که به ترتیب همان‌گونه که گفته شد بیماری گال طوقه و ریشه مویی را در محل‌های زخم در گیاهان دولپه‌ای ایجاد می‌کنند. هنگامی که القاء آغاز می‌شود، رشد تومور در غیاب باکتری می‌تواند ادامه پیدا کند و بافت تومور می‌تواند در کشت بافت در محیط فاقد سیتوکینین و اکسین خارجی رشد کند. این بافت مشتقات آمینواسیدی و قندی جدیدی را می‌سازد که در مجموع اوپین نامیده می‌شوند. نوع اوپینی که در تومور ساخته می‌شود (برای مثال نوپالین^۲، اکتوپین^۳ منوپین^۱، آگروپین^۲، آگروسینوپین^۳) به نژاد

^۱ plagiotropic

^۲ Nopalin

^۳ Octopin

آگروباکتریومی که تشکیل تومور را آغاز کرده بستگی دارد. حضور یک پلاسمید بزرگ در داخل باکتری باعث القاء تومور و سنتز اوپین می‌شود که در مورد *A. tumefaciens* پلاسمید القاء تومور Ti و در مورد *A. rhizogenes* پلاسمید القاء ریشه Ri نامیده می‌شود (Mehtra & Goyal, 2012; Zupan & Zambersky, 1995). سویه‌های متفاوت آگروباکتریوم دارای ۴ منطقه شبیه هم هستند. منطقه T-DNA و بیماری‌زا و دو منطقه دیگر مربوط به انتقال همیوگ و حفظ همانند سازی پلاسمید در داخل آگروباکتریوم هستند. در مدت تشکیل تومور یک ترادف مشخص از پلاسمید به نام T-DNA به سلول گیاهی منتقل شده و در داخل ژنوم هسته‌ای گیاه به طور پایدار ادغام می‌شود و در مدت برقراری تومور بازآرایی مهمی در ترادف T-DNA تومور رخ نمی‌دهد. مکان ادغام T-DNA به DNA گیاه کاملاً تصادفی است (Draper, 1988). به گونه‌ای که یک یا چند کپی از T-DNA می‌توانند جدا از هم یا پیوسته در بین تکرارهای مستقیم ۲۵ جفت بازی قرار بگیرند (Mehtra & Goyal, 2012).

۱-۳-۶ بررسی اجمالی مفهوم انتقال به واسطه آگروباکتریوم:

انتقال گیاه به واسطه آگروباکتریوم یک فرایند بسیار پیچیده و تکامل یافته شامل عوامل تعیین کننده ژنتیکی از هر دو باکتری و سلول گیاه میزبان است. اجزای ژنتیکی حمل شده توسط *A. tumefaciens* که برای انتقال به گیاه مورد نیاز است، شامل T-DNA است که به سلول‌های گیاهی انتقال پیدا می‌کند. همان‌گونه که گفته شد پلاسمید Ti و ناحیه بیماری‌زا Vir کلید اصلی برای انتقال می‌باشد (Stachel *et al.*, 1985; Stachel *et al.*, 1986) و سه جایگاه بیماری‌زایی کروموزومی ضروری برای فرایند انتقال وجود دارد که شامل *chvA*, *chvB* و *pscA* (Douglas *et al.*, 1985; Thomashow *et al.*, 1987) است که بیان هر کدام از این ساختارها در تقابل با ناحیه Vir است. ناحیه T-DNA شامل هشت اپران است

¹ Monopin

² Agropin

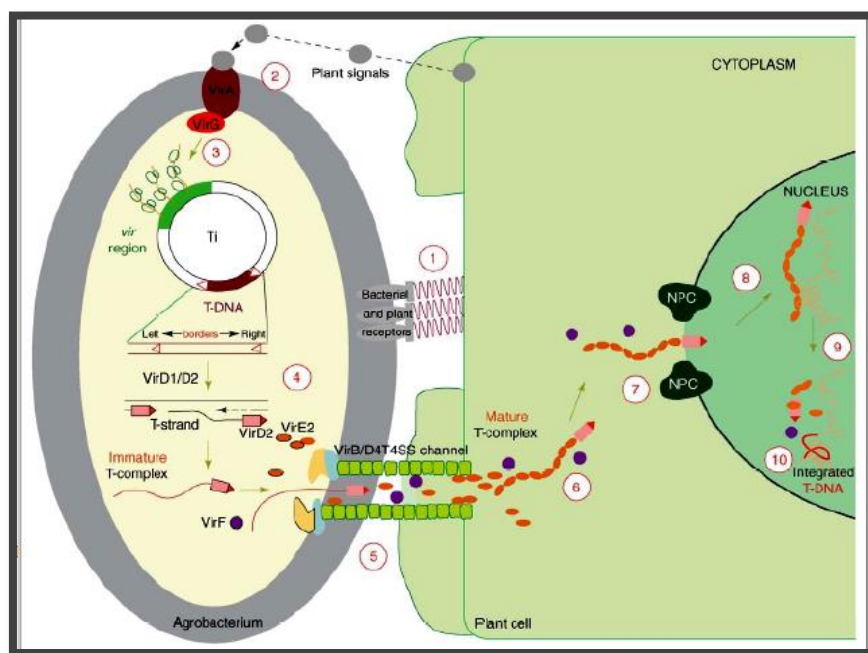
³ Agrocina-pin

virH و virG, virA, virB, virC, virD, virE, virF که کدکننده پروتئین‌ها برای تنظیم فرایند انتقال از T-DNA می‌باشند. مطالعات استاکل (Stachel *et al.*, 1985; Stachel *et al.*, 1986) نشان داد که سلول‌های گیاهی می‌توانند بیان ژن‌های Vir که برای روند انتقال به گیاه ضروری است را القا کنند. ناحیه T-DNA سازگار شده با ژن تراریخته به طور پایداری به ژنوم گیاه با استفاده از پروتوکل انتقال یکپارچه شده است. سلول آلوده شده به آگروباکتریوم ترکیباتی با وزن مولکولی کمتر را آزاد می‌کنند که به طور خاص توسط آگروباکتریوم به عنوان مولکول‌های سیگنالی القاکننده بیان ژن‌های Vir و بنابراین انتقال T-DNA فعال، به رسمیت شناخته شده است (Stachel *et al.*, 1985; Stachel *et al.*, 1986). پروتئین‌های گیاهی شناخته شده نقش مهمی را در انتقال توسط آگروباکتریوم دارند. Ku80, CAK2M, VIP1, BTI1, SGA1, H4, H3-11, H2A, histones-UDP, گلیکوسیل ترانسفراز و پروتئین‌های که در تعامل با تولید گال هستند، گزارش شده که در انتقال پروتئین‌های بیماری‌زا و T-DNA درگیرند و در هدف قرار دادن هسته‌ای، یکپارچه‌سازی T-DNA، پایداری و بیان و در واکنش‌های دفاعی نقش داشته اند (Gelvin, 2010; Tenea, 2012).

۱-۳-۷ فرایند انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی

فرایند انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی شامل پنج مرحله ضروری به شرح زیر (شکل ۱-۲)

است (Delariva *et al.*, 1998):



شکل ۱-۲: الگویی برای تراریختی ژنتیکی با واسطه آگروباکتریوم (Tzfira & Citovskiy., 2006)

۱. اتصال باکتری
۲. القا سیستم بیماری‌زای باکتری
۳. تولید کمپلکس انتقال T-DNA
۴. انتقال T-DNA
۵. ادغام T-DNA به ژنوم گیاه

۱-۳-۷-۱ اتصال باکتری:

اتصال باکتری اولین مرحله در القاء تومور است و وقتی اتفاق می‌افتد که باکتری به سطح سلول گیاهی متصل می‌شود، جهش یافته‌هایی که قادر به اتصال نیستند، فاقد توانایی القاء تومور می‌باشند

(Delariva *et al.*, 1998). در این مرحله سلول‌های گیاهی زخمی شده ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین به نام سرینگون^۱ و استوسرینگون^۲ ترشح می‌کنند که باعث کیموتاکسی و حرکت آگروباکتریوم به سمت قسمت زخم شده می‌شود و باکتری به دیواره سلول گیاهی متصل می‌شود. لیپوپلی‌ساکارید موجود در دیواره آگروباکتریوم و کپسول پلی‌ساکاریدی آن از مهم‌ترین اجزای اتصال محسوب می‌شود (Kerr, 1991).

۱-۳-۷-۲ القاء سیستم بیماری‌زای آگروباکتریوم

انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به گیاه، توسط محصولات ژن‌های ناحیه Vir انجام می‌شود که بر روی پلاسمید Ti قرار دارند و بیان آنها فقط در حضور سلول‌های گیاهی زخم شده که هدف آلودگی هستند، اتفاق می‌افتد. پروتئین‌های VirA و VirG به صورت یک سیستم دو جزئی هستند که بیان ژن را کنترل می‌کنند. VirA یک حسگر^۳ محیطی است که به صورت دائمی بوده و در غشاء باکتری قرار می‌گیرد. نقش این پروتئین درک ترکیبات کوچک فنولی نظیر سرینگون و استوسرینگون است که از گیاهان زخمی آزاد می‌شود. تحریک پروتئین VirA با این ترکیبات موجب فسفریله شدن خود به خودی^۴ VirA شده و VirA، VirG را فسفریله می‌کند. پروتئین VirG در سیتوپلاسم حضور داشته و پس از فعال شدن با فسفات به صورت یک عامل رونویسی، بیان ژن‌های موجود در ناحیه Vir را تحریک می‌کند.

۱-۳-۷-۳ تولید و انتقال کمپلکس T-DNA

اولین ژن در ناحیه Vir که توسط پروتئین‌های VirG القا می‌شود، VirD است و منجر به تولید یک تک رشته از T-DNA می‌گردد. پروتئین VirD2 در حضور VirD1 نقش اندونکلئازی داشته و به کمک VirD1 ترادف ۲۵ bp در دو طرف T-DNA را شناسایی کرده و شکاف اندو نوکلئوتید ss در انتهای

¹ Syringone

² Acetosyringone

³ Sensor

⁴ Autophosphorylation

هر مرز ایجاد می‌کند. این شکاف‌ها به عنوان مکان‌های آغاز و پایان تولید تک رشته T¹ استفاده می‌شوند. وجود این شکاف در DNA، سیستم ترمیمی باکتری را تحریک کرده و انتهای 3'-OH، سیگنال‌های لازم جهت ساخته شدن یک رشته جدید از روی رشته الگو را صادر می‌کند. VirD2 به انتهای 5' تک رشته T به صورت کووالانسی متصل شده و عملاً آنرا از حمله اگزونوکلازها محافظت می‌کند و در انتهای 5' خاصیت قطبی به مجموعه T می‌دهد (Zupan & Zambryski, 1995). مراحل انتهایی فرایند تراریختی شامل عبور از غشاهای خارجی و داخلی و دیواره سلولی باکتری، ترابری در داخل سیتوپلاسم (مرحله ۶)، ورود به هسته (مرحله ۷)، حمل درون هسته (مرحله ۸)، در آوردن پوشش T-DNA (مرحله ۹) و ادغام در ژنوم (مرحله ۱۰) است (شکل ۱-۳) (Tzfira & Citovski, 2006).

۱-۳-۷-۴ انتقال کمپلکس T از آگروباکتریوم به گیاه

انتقال کمپلکس T از آگروباکتریوم به گیاه یکی از مراحل است که بسیار کم شناخته شده است. تاکنون مشخص شده که VirB برای تومورزایی لازم است. تعیین توالی ژن VirB نشان داد که محصول این ژن احتمالاً در فرایند انتقال شرکت می‌کند. ۱۱ قالب خواندنی باز برای جایگاه ژنتیکی VirB وجود دارد که پروتئین‌هایی با ویژگی‌های خاص کد می‌کند که در تشکیل کانال غشایی برای انتقال T-DNA لازم هستند. این ویژگی‌ها شامل آب‌گریزی دومین‌های ادغامی در غشاء هستند. پروتئین‌های virB بسیار محکم در یک مجموعه که بین دو غشاء گسترده شده، مجاور یکدیگر قرار گرفته‌اند. دوپروتئین virB4 و virB11 دارای نقش ATPase هستند و وظیفه فراهم کردن انرژی برای انتقال مجموعه T را به عهده دارند. پروتئین virB2 به همراه پروتئین virB به عنوان واحدهای اصلی عمل کرده و به کمک پروتئین‌های virB7 و virB9 و با صرف انرژی ساختار لوله‌ای شکلی در غشاء باکتری می‌سازند که عملاً نظیر پیلای

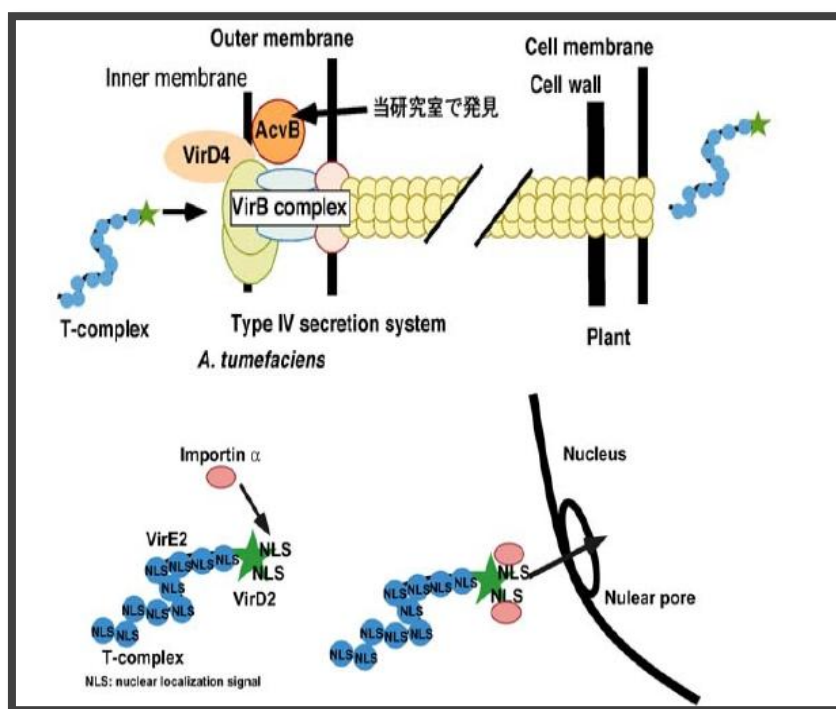
¹ T- strand

در سایر باکتری‌ها است. در همین زمان virB1 نیز با عملکردی مشابه لیزوزیم ساختار پپتیدوگلیکان را تخریب کرده و این پیلی در حال ساخت به خارج از باکتری هدایت می‌گردد. این مجرا محل عبور کمپلکس T و ورود آن به سلول گیاه است. کمپلکس T با صرف انرژی از سیتوپلاسم باکتری به داخل سیتوپلاسم گیاه منتقل می‌شود. پروتئین virF با وزن مولکولی 23 KD به نظر می‌رسد که به همراه کمپلکس T از طریق کانال هم‌یوگی به داخل سلول گیاه منتقل شده و نقش آن در هدایت مجموعه به سمت هسته است. اپران virH دو پروتئین virH1 و virH2 را تولید می‌کند که حضور آن‌ها چندان الزامی نبوده ولی به نظر می‌رسد در تحریک رشد باکتری و خنثی نمودن ترکیبات سمی گیاه برای باکتری نقش اساسی به عهده دارند (Jefferson, 1987).

احتمالاً کمپلکس T مشابه با بسیاری از DNAهای ویروس‌ها به کمک ماشین ترابری داخل سلولی به سمت هسته هدایت می‌شود. زیرا ساختار متراکم سیتوپلاسم که از یک توری ریزلوله‌ای، اکتین و شبکه رشته‌های حد واسط تشکیل شده، انتشار براوونی ماکرومولکول‌های بزرگ را شدیداً محدود می‌سازد. مطالعات انجام شده با استفاده از روش‌های بیوفیزیکی و نشان‌دار کردن فلورسانتی کمپلکس‌های virE-TDNA، نشان داده که موتورهای داینین برای هدایت مجموعه T به سمت هسته لازم هستند (شکل ۱-۴). برای جلوگیری از تخریب DNA تک رشته‌ای توسط نوکلئازهای غیر اختصاصی درون سیتوپلاسم، محصولات ژن virE وارد عمل می‌شوند (Tzfira & Citovskiy, 2006). پروتئین virD2 و virE2 بر روی ترادف آمینواسیدهای خود دارای ساختارهای خاصی به نام NLS^۱ هستند. این ساختارهای ویژه ترادف-های کوتاهی از آمینواسیدهای بازی هستند که علامت‌های لازم جهت انتقال یک پروتئین به داخل هسته یوکاریوت‌ها را کد می‌کنند. یک سری از پروتئین‌های میزبان به NLS متصل می‌شوند و برای ورود به هسته سلول میزبان، هر دو جزء پروتئینی کمپلکس T، virD2 و virE2 با پروتئین‌های میزبان، کنش

¹ Nuclear Location Signaling

متقابل دارند (Eisenbrandt *et al.*, 1999).



شکل ۳-۱: انتقال کمپلکس T از آگروباکتریوم به سلول گیاهی (Tzfira & Citovskiy, 2006)

VirD2 با AtKAP α از خانواده کاریوفیرین α آرابیدوپسیس، کنش متقابل دارد. AtKAP α در ورود هسته‌ای به داخل سلول‌های مخمر دخالت می‌کند. virE2 با virE2-interacting protein (VIP1) و virE3 باکتری کنش متقابل دارد. هر دو آن‌ها به عنوان سازشگرهای مولکولی بین virE2 و α کاریوفیرین سلول میزبان عمل می‌کنند و virE2 را قادر می‌سازند که به عبور رشته T از منفذ هسته کمک کند (شکل ۳-۱). (Tzfira & Citovskiy, 2006).

۱-۳-۷-۵ ادغام T-DNA به داخل ژنوم گیاه

در داخل هسته، کمپلکس T باید به نقطه ادغام خود رود و قبل از ادغام با ژنوم هسته، پوشش پروتئینی آن برداشته شود. برای این کار از مکانیسم لیز کننده پروتئین^۱ گیاه استفاده می‌کند. برهمکنش متقابل مجموعه T با VIP1، CAK2M (کینازهای فعال کننده کیناز وابسته به سیکلین) و پروتئین متصل شونده به جعبه TATA (TBP) و همه اعضای ماشین رونویسی میزبان، مشخص می‌کند که آن‌ها ممکن است مجموعه T را به مکان ادغام در کروماتین میزبان هدایت کنند. توانایی VIP1 برای کنش متقابل با هیستون H2A (یک پروتئین کروماتین گیاهی ضروری برای ادغام T-DNA) از این فرضیه حمایت می‌کند که آگروباکتریوم از تحرک داخل هسته‌ای VIP1 و شاید فاکتورهای رونویسی دیگر برای حمل مجموعه T به مکان ادغام در کروماتین میزبان استفاده می‌کند. نقش عوامل خاص میزبان و ساز و کارهای مولکولی ادغام هنوز روشن نشده اگرچه ادغام مولکول‌های T-DNA دو رشته‌ای به شکاف‌های دو رشته‌ای کروموزومی (DSBs) ممکن است مسیر مهمی برای ادغام در ژنوم گیاهی باشد (شکل ۱-۳) (Tzfira & Citovskiy, 2006).

VirD2 توسط یک اسید آمینه تایروزین به T-DNA متصل شده و این اتصال موقت بین دو رشته DNA موجب می‌گردد که باند فسفوتایروزین به انتهای 3'-OH موجود در DNA گیاه نزدیک شده و باند فسفودی استر ایجاد گردد. نزدیک انتهای 3' رشته T-DNA نیز یک همولوژی کوچک بر روی DNA گیاه را پیدا کرده و اندونکلازها بخش دیگر 3'-OH مربوط به T-DNA را که با DNA گیاهی همولوژی نداشته و آزاد می‌باشد و همچنین قسمتی از DNA تک رشته‌ای گیاه که حفظ شده نمی‌باشد، حذف می‌گردد. با شکسته شدن پیوند فسفودی استر بین VirD2 و T-DNA انرژی بالایی تولید می‌شود و باعث می‌شود، انتهای T-DNA و همچنین DNA دو رشته را به هم متصل می‌نماید و موجب جایگزینی کامل قطعه

¹ Proteolysis

هدف در یک رشته از DNA گیاه می‌گردد. سیستم ترمیمی DNA گیاه نیز رشته مکمل را می‌سازد. آنچه در انتقال T-DNA نقش اساسی را بر عهده دارد علاوه بر ناحیه vir ترادف‌های حفاظت شده ۲۵ جفت بازی در دو طرف نواحی T-DNA وجود دارد (Kerr, 1991).

از توانایی طبیعی آگروباکتریوم در انتقال ترادف‌های معینی از DNA به ژنوم گیاه، برای توسعه یک سری ناقلین^۱ تراریختی گیاهان استفاده شده است. در طول دهه اول ۱۹۸۰ چندین گروه تحقیقاتی پلاسمیدهای Ti را طراحی کردند که همه ژن‌های تومورزای T-DNA آن‌ها برداشته شده بود. اولین کشف مهم این بود که ژن‌های تومورزا (onc) که توسط پلاسمید Ti کد می‌شود نه برای انتقال T-DNA به سلول گیاهی و نه ادغام آن به داخل DNA هسته نیاز هستند؛ از این‌رو این ژن‌ها می‌توانند جایگزین شوند. دومین موفقیت مهم کشف این مساله بود که محصولات ژن vir به طور ترانس هم می‌توانند، عمل کنند و در نهایت T-DNA‌های غیر تومورزا که در گیاهان باززایی شده وجود دارند، طبق مدل مندلی به نسل‌های بعدی منتقل شوند (Kerr, 1991).

۴-۱ روش تراریختی گیاهان با آگروباکتریوم:

امروزه برای تولید گیاهان تراریخته، از آگروباکتریوم استفاده گسترده‌ای می‌شود. اجزای لازم برای انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم به گیاهان عالی عبارتند از:

۱- تولید ترکیبات فنولیکی مانند استوسرینگون یا دیگر ترکیبات مرتبط توسط ریزنمونه گیاهی که برای فعال شدن ژن‌های vir نیاز می‌باشد. در غیر این صورت آگروباکتریوم باید از قبل توسط استوسرینگون‌های مصنوعی تحریک شده باشد. آگروباکتریوم‌های تحریک شده بایستی به سلول‌های گیاهی مستعد برای تراریخت نمودن دسترسی داشته باشند.

¹ Vectors

۲- سلول‌ها و بافت‌های مستعد برای تراریختی بایستی از توانایی باززایی گیاهان کامل برخوردار باشند.

۳- ریز نمونه مورد استفاده برای تلقیح یا کشت توأم با آگروباکتریوم حامل ناقلین دوتایی یا تلفیقی مورد نظر می‌تواند سلول پرتوپلاست، کالوس، قطعاتی از بافت یا اندام‌های کامل باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

۱-۴-۱ روش‌های اصلی تلقیح گیاه یا ریزنمونه با آگروباکتریوم عبارتند از:

۱- آلوده‌سازی گیاهان زخمی: تلقیح این ویوو گیاهچه‌ها و یا گیاهان کاملی که در شرایط آزمایشگاهی و تحت شرایط استریل تکثیر یافته‌اند، روش سنتی برای به دست آوردن سلول‌های تراریخت با آگروباکتریوم است. گیاهچه‌ها را از ناحیه مریستم انتهایی قطع کرده و سطح زخمی را که به تازگی بریده شده است با آگروباکتریوم تلقیح می‌نمایند. گال حاصل قطع می‌گردد و به صورت یک بافت کالوس رشد داده می‌شود. کالوس‌های تراریخت جدا شده و باززایی می‌شوند.

۲- روش کشت توأم: پرتوپلاست‌های تهیه شده و در مرحله تشکیل مجدد دیواره سلولی به مدت ۲۴ تا ۴۰ ساعت در سوسپانسیون از آگروباکتریوم به غلظت ۱۰۰ باکتری به ازای هر پرتوپلاست کشت داده می‌شوند. چند روزی بعد از کشت توأم تراریخت شدن سلول رخ داده و در معرض عامل گزینش کننده، سلول‌های تراریخت انتخاب خواهند شد.

۳- روش دیسک برگی: این روش برای ریزنمونه هر بافتی که منبع خوبی برای رشد و نمو و تمایز گیاه کامل باشد، قابل اجرا است. بدین منظور کوتیلدون‌هایی که به تازگی خارج شده‌اند، بسیار مناسب می‌باشند. در روش دیسکی، قطعه‌ای از بافت هدف را که برگ و دیسک‌های برگ است، قطع نموده و آن را در سوسپانسیون از آگروباکتریوم فرو برده و سپس بر روی یک محیط کشت مناسب برای باکتری کشت می‌دهند. سپس ریزنمونه‌های بافتی را به یک محیط کشت

محتوی یک عامل متوقف کننده باکتری، که باکتری‌ها را حذف می‌نماید، انتقال می‌دهند. پس از این مرحله، ریزنمونه‌ها به محیط کشتی که برای گزینش سلول‌های تراریخت طراحی شده و از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب برخوردار می‌باشد، منتقل می‌شوند. روش دیسک برگری از نظر تکنیکی ساده بوده و خیلی سریع، گیاهان تراریخت تولید می‌نماید. بدین جهت در حال حاضر استفاده از این روش ترجیح داده می‌شود (chawla, 2000).

۱-۴-۲ فاکتورهای موثر در انتقال به واسطه آگروباکتریوم:

انتقال T-DNA و ادغام آن به درون ژنوم گیاهی توسط عواملی مثل سوپروپلازمیدهای مختلف آگروباکتریوم، نوع ناقل و پلاسمید و فاکتورهای مختص بافت گیاهی که شامل ژنوتیپ گیاه، ریزنمونه، ترکیب محیط کشت، میزان آسیب بافتی، مهار و حذف آلودگی بعد از هم‌کشتی کنترل می‌شود (Sood *et al.*, 2011; Ivarson, 2011; Mohammad & Bagherieh-Najjar, 2009; *al.*, 2011). فاکتورهای تاثیر گذار در انتقال به واسطه آگروباکتریوم در جدول ۱-۱ خلاصه شده است. گوا و همکاران (Guo *et al.*, 2012) فاکتورهای موثر بر انتقال به واسطه آگروباکتریوم را در گوجه فرنگی مطالعه کردند و گزارش دادند که میزان انتقال با زمان هم‌کشتی، زمان غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتری و غلظت باکتری و آنتی‌بیوتیک مورد استفاده برای حذف باکتری و نیز با پلاسمیدی که حاوی ژن‌های نشانگر انتخابی مختلف است، در ارتباط است. خشک شدن ریزنمونه یک عامل مهمی که باعث افزایش انتقال گونه‌های زراعی در نظر گرفته شده است (Bajestani *et al.*, 2011). ترکیب محیط کشت، غلظت نمک، ساکارز، تنظیم کننده‌های رشد و برخی مواد شیمیایی نیز روی کارایی انتقال اثر می‌گذارد. مواد شیمیایی مانند استوسرینگون نیز برای بالا بردن انتقال ژنتیکی گیاهی توصیه می‌شود (Kumlehn *et al.*, 2006; Kavitha *et al.*, 2010). افزودن ترکیبات تیولی در محیط هم‌کشتی جامد و هیگرومایسین B انتخابی همراه با گنجاندن L-cysteine،

دیتئوتريتولو سدیم تیوسولفات در محیط هم‌کشتی تولید ترانسژن‌ها را بهبود می‌بخشد (Olhofs & Somers, 2001; Olhofs *et al.*, 2001). همچنین اضافه کردن آسکوربیک اسید، سیستئین و سیلور نترات در محیط کشت هم‌کشتی انتقال پایدار در ذرت را افزایش می‌دهد (Enríquez-Obregón *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2003).

اثر دما بر میزان انتقال ژن توسط نویسندگان مختلفی گزارش شده است (Salas *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2012). مشخص شده است که درجه حرارت پایین در هم‌کشتی از ۱۹-۲۰ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به انتقال کارآمد در دولپه‌ای‌ها حیاتی است. دمای هم‌کشتی برای تک‌لپه‌ای‌ها در محدوده ۲۴-۲۵ درجه سانتی‌گراد است (Enríquez-Obregón *et al.*, 1998; Hashizume *et al.*, 1999). سورفاکتانت‌هایی مانند Silwet L77، تویین ۲۰، پرولینیک اسید F68 منجر به افزایش تحویل T-DNA به کمک *A. tumefaciens* یا توسط حذف مواد خاص که آگروباکتریوم را مهار می‌کند، می‌شود (Cheng *et al.*, 2000; Desfeux *et al.*, 1997; *al.*). آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی مانند سفوتاکسیم، کربنسیلین و تیمنتین در انتقال به واسطه آگروباکتریوم برای مهار و جلوگیری از رشد آگروباکتریوم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cheng *et al.*, 1996; Thu *et al.*, 2003). نشانگرهای انتخابی مختلف مانند نئومایسین فسفوترانسفراز، فسفینوتریسین استیل ترانسفراز و هیگرومایسین فسفوترانسفراز، برای انتخاب سلول‌های ترانسفورم شده به واسطه آگروباکتریوم شناخته شده‌اند، به کار می‌روند (Opabode, 2006).

جدول ۱-۱: فاکتورهای درگیر در انتقال به واسطه آگروباکتریوم (Mehrotra & golva, 2012)

Factors	Examples
Genotype of the plant and Vector/ plasmid	Type (root/shoot/cotyledon/embryo/hypocotyl) and age of explant pCAMBIA, pGreen, pGA, pCG, pGPTV, Bi-BAC etc.
Bacterial strain	LBA4404, EHA101, C58, AGL1
Composition of culture medium	Salt concentration, sugars, growth regulators
Temperature of co-cultivation	19–30 °C, generally 19–20 °C, 24–25 °C
Time of co-cultivation	28 h/48 h/60 h/72 h, 1–5 days
pH of co-cultivation medium	Acidic pH, 5.2/5.5/5.6/5.8/6.0
Antibiotic	Cefotaxime, carbenecillin, kanamycin, timentin
Chemicals	Acetosyringe, L-cysteine, dithiothreitol and sodium thiosulphate
Surfactants	Silwet L77, pluronic acid F68, Tween20
Selectable markers	hpt, pat, nptII

hpt hygromycin phosphotransferase, *pat* phosphinothricin acetyltransferase, *nptII* neomycin phosphotransferase

۱-۵ مزایا و معایب روش آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان:

۱-۵-۱ مزایا:

- ۱- به دلیل این که روش طبیعی است و در طبیعت نیز صورت می گیرد مقبولیت زیادی دارد به تجهیزات پیچیده نیاز ندارد
- ۲- مقرون به صرفه است
- ۳- قابلیت آلوده سازی بالای بافت ها و یا اندامک های گیاهی را دارا می باشد
- ۴- گیاهان تراریخت شده را سریع تر می توان باززایی کرد
- ۵- توانایی انتقال قطعات بزرگ DNA را دارا می باشند
- ۶- انتقال توسط آگروباکتریوم معمولا تعداد نسخه کمتری از ژن را معرفی می کند (بنابراین

مشکلات معرفی ژن و بیان ژن اغلب کاهش می‌یابد، در حالی که بمباران ذره‌ای اغلب منجر به معرفی نسخه‌های متعدد می‌شود، بنابراین ژن‌های انتقال یافته با آگروباکتریوم به موجودات تراریخت بسیار پایدارتر از سایر روش‌ها است (de Mello-Farias & Chaves, 2008; Gelvin, 2003).

۱-۵-۲ معایب:

- ۱- محدودیت دامنه میزبان‌ها به خصوص برای گیاهان تک‌لپه‌ای هرچند با توسعه نژادهای با قدرت بیماری‌زایی زیاد به گیاهان تک‌لپه تا حدودی این مشکل حل شده است.
- ۲- تراریخت نمودن بافت‌هایی که توانایی باززایی دارند در بعضی اوقات مشکل است. مثلاً جنین‌هایی که در لایه‌های عمیق کالوس قرار دارند.

۱-۶ انتقال ژن مبتنی بر آگروباکتریوم با به کارگیری امواج اولتراسونیک

۱-۶-۱ امواج صوتی و گیاهان:

قابلیت گیاهان برای پاسخ به محرک‌های محیطی فیزیکی مانند نور، دما، گرانش، ضربات مکانیکی، تماس، از اهمیت تکاملی گیاهان به شمار می‌رود (Telewski, 2006; Gagliano *et al.*, 2012a). صدا یکی از محرک‌های (سیگنال‌های) فیزیکی است که روی زندگی گیاهان اثر می‌گذارد اگرچه مکانیسمی که گیاهان درک می‌کنند و به محرک صدا عمل می‌کنند به خوبی شناخته شده نیست. با این حال، درک و تصور استفاده و انتشار صدا از مزایای تکاملی برای همه‌ی موجودات زنده است، در بین آن‌ها گیاهان، با توجه به ویژگی‌های آن‌ها، اطلاعات و انرژی را با سرعت زیاد و با هدر رفت کم انرژی انتقال می‌دهند (Gagliano *et al.*, 2012a, b; Gagliano, 2013, 2012). امواج صوتی به خصوص فراصوت

شکلی از استرس‌های غیر زنده برای گیاهان هستند (Telewski, 2006; Wang *et al.*, 2006). انرژی صوتی، هنگامی که در یک نمونه زیستی به کار می‌رود، به عنوان یک تیمار فیزیکی در قالب فراصوت فعالیت می‌کند و وقتی که به فرکانس بالاتر می‌رسد اثر گذاری آن روی فرایندهای زیستی افزایش پیدا می‌کند (Telewski, 2006; Mason, 2007; Rokhina *et al.*, 2009). صدا یک موج مکانیکی با فرکانس بین ۲۰ هرتز و ۲۰ کیلو هرتز است در حالی که اولتراسونیک یک موج پرقدرت با فرکانس بیش‌تر از ۲۰ کیلو هرتز است (Raichel, 2006). در چند دهه گذشته تعدادی از مطالعات بر روی انتشار و درک صدا هم در محدوده صوتی (۱۰-۲۴۰ Hz) و هم در محدوده اولتراسونیک (۲۰-۳۰۰ kHz) بوده است (Laschimke *et al.*, 2006; Gagliano *et al.*, 2012a; Gagliano, 2013, 2012).

۱-۶-۲ کاربرد امواج فراصوت در بیوتکنولوژی و انتقال ژن در گیاهان

امواج فراصوت باعث تغییر در رشد و فرایندهای تکاملی در گیاهان می‌شود (Rokhina *et al.*, 2009). اولتراسونیک با فرکانس پایین به عنوان یک استرس غیر زنده با اثرات حرارتی و شیمیایی در موجود زنده است که دارای چندین اثر زیستی یا بیولوژیکی است. اولتراسونیک می‌تواند منجر به ایجاد حفره و میکرواستریمینگ (امواج اولتراسونیک حباب‌هایی را در بافت تشکیل می‌دهد، جریان یکسویه‌ی مایع سلولی اطراف این حباب‌ها را microstreaming می‌نامند) شود که منجر به تغییر فراساختاری سلول، پایداری آنزیمی و تحریک رشد سلول می‌شود. اولتراسونیک همچنین می‌تواند منجر به شکستگی پلیمرهای خارج سلولی، آزاد شدن DNA از هسته، کاهش پایداری سلول، تغییر نفوذ پذیری غشاء سلول و تغییر بار در سطح سلول شود (Rokhina *et al.*, 2009).

اگرچه روش انتقال ژن به سلول‌های گیاهی در طی سال‌های اخیر کاملاً موفق بوده است، با این حال برخی از گونه‌ها هنوز نسبت به انتقال نامستعد می‌باشند و برخی از روش‌ها برای انتقال ژن زمانبر

بوده و نیاز به تجهیزات پیچیده دارند. بنابراین، پیشرفت‌های بیشتر در این زمینه مد نظر است. انتقال مبتنی بر آگروباکتریوم با به کار گیری اولتراسونیک، روشی جدید برای انتقال کارآمد T-DNA به سلول‌های گیاهی مخصوصاً گیاهانی که در انتقال ژن توسط آگروباکتریوم نامستعد هستند، می‌باشد. اولتراسونیک، وقتی به عنوان یک روش کاربردی در انتقال ژن به همراه آگروباکتریوم به کار می‌رود، انتقال به واسطه آگروباکتریوم به کمک اولتراسونیک یا SAAT¹ نامیده می‌شود که اولین بار توسط تریک و فینگر در سال ۱۹۹۷ برای بهبود انتقال ژن در سویا، لوبیا چشم بلبلی، گندم، ذرت، صنوبر و شاه‌بلوط هندی معرفی شد، هنگامی که بافت هدف برای مدت کوتاهی تحت تیمار با اولتراسونیک در حضور آگروباکتریوم که حاوی ژن خارجی است، قرار می‌گیرد، افزایش ۱۰۰ تا ۱۴۰۰ برابر در بیان موقت ژن *gus* در گونه‌های فوق ایجاد می‌شود. SAAT کارایی انتقال به واسطه آگروباکتریوم در گل داوودی (Teixeira da Silva & Fukai, 2003)، توتون (da Silva, 2005)، کلزا (Li et al., 2009)، کتان (Beranova' et al., 2008) و غیره را افزایش می‌دهد.

۱-۶-۳ مکانیسم فعالیت:

اثر فراصوت به فرکانس، شدت و مدت زمانی که صدا ایجاد می‌شود بستگی دارد (Rokhina et al., 2009). امواج صوتی می‌توانند روی رشد و فعالیت‌های تکاملی در سطوح مختلف اثر گذارد. روسوکی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که عملکرد تولید متابولیت ثانویه در گیاهانی که در معرض امواج اولتراسونیک به مدت ۲/۵ تا ۵ دقیقه بودند بدون هیچ گونه تغییر در رشد گیاه، دو برابر شد. اولین بخش از موجود زنده که در معرض امواج فراصوت است ابتدا دیواره سلولی و به دنبال آن غشا است. بررسی‌ها نشان دادند که امواج فراصوت نفوذ پذیری گذرای غشاء پلاسمایی را برای تسهیل جذب افزایش می‌دهد

¹ Sonication-assisted Agrobacterium-mediated

(Tachibana *et al.*, 1999). در مقایسه با دیگر روش‌های انتقال مستقیم DNA، امواج فراصوت ساده‌تر به انجام می‌رسد. با این حال روش فراصوت می‌تواند منجر به آسیب سلولی یا پارگی سلول هم شود. اگر از امواج فراصوت برای انتقال DNA استفاده شود شرایط برای جذب، بدون آسیب سلول باید بهینه‌سازی شود. اعمال امواج فراصوت به صورت ملایم و خفیف یک روش کارآمد برای انتقال سلول‌های حیوانی و بافت در شرایط آزمایشگاهی و محیط طبیعی است (Bao *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1999; Huber & Pfisterer, 2000). از آنجایی که دیواره سلول‌های گیاهی ممکن است مانع بزرگی برای انتقال ژن باشد پژوهش‌های حاضر به بررسی استفاده از اولتراسونیک برای انتقال ژن و ارائه راهکارهای به‌ترو افزایش کارایی انتقال پرداخته است.

۱-۷ روش‌های تایید تراریختی گیاه:

یکی از مراحل اصلی در فرایند انتقال ژن خارجی به گیاه، تایید تراریختی مواد گیاهی پس از انجام آزمایش انتقال ژن می‌باشد که با هدف اطلاع از ورود ژن مورد نظر به مواد گیاهی اولیه‌ای که انتقال ژن بر روی آن‌ها صورت گرفته است و همچنین در گیاهان باززایی شده از این مواد گیاهی صورت می‌گیرد و فقط پس از انجام این مرحله است که موفقیت یا شکست یک فرایند انتقال ژن مشخص می‌گردد. بدین منظور، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که از متداول‌ترین این روش‌ها، ساترن بلات^۱، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و ژن‌های نشانگرانتخابی می‌باشند. با استفاده از روش ساترن بلات، علاوه بر تشخیص قسمتی از توالی ژنی منتقل شده، می‌توان تعداد نسخه‌های منتقل شده آن را نیز مشخص نمود. تکنیک PCR نیز روشی قوی برای پی بردن به حضور توالی ژن منتقل شده، در ژنوم مواد گیاهی، پس از انجام فرایند انتقال است. بدین منظور یک جفت آغازگر اختصاصی برای ساختار ژنی مورد استفاده در آزمایش

¹ Southern Blotting

تراریختی طراحی گردیده و پس از استخراج DNA مواد گیاهی، این آغازگر را در یک واکنش PCR برای تکثیر قطعه اختصاصی مورد نظر وارد می‌نمایند. مقدار کم DNA گیاهی مورد نیاز، سرعت و دقت از مزایای استفاده از این روش می‌باشند. ردیابی و آشکار سازی سیستم‌های ترانسفورماسیون گیاه، به منظور اطلاع از این که آیا DNA مورد نظر با موفقیت به درون سلول‌های میزبان منتقل شده است یا خیر به کمک مجموعه‌ای از ژن‌ها صورت می‌گیرد. ژن‌های نشانگر نیز همراه با ژن هدف در پلاسمید ناقل جای داده می‌شوند. ژن‌های نشانگر به دو گروه تقسیم می‌شوند (Miki & McHugh, 2004; محسن پور و همکاران، ۱۳۸۳):

ژن‌های گزینشگر^۱ و ژن‌های گزارشگر^۲. مزیت استفاده از این ژن‌ها بررسی آسان آن‌هاست. چون برای تشخیص آن‌ها به استخراج DNA، الکتروفورز و یا اتورادیوگرافی نیازی نیست.

۱-۷-۱ استفاده از ژن‌های نشانگر گزینشگر:

ژن‌های نشانگر گزینشگر، سلول‌های گیاهی تراریخته را از قابلیت زنده ماندن در محیط کشت-هایی که محتوی مقادیر سمی از یک عامل گزینش می‌باشند، برخوردار می‌سازند، در حالی که سلول‌های غیر تراریخته در چنین محیط‌هایی از بین خواهند رفت. برای استفاده از یک ژن گزینشگر، آن را به روش مشابه با ژن‌های گزارشگر، به همراه ژن اصلی مورد نظر، در آزمایش تراریختی مورد استفاده قرار می‌دهند. در صورت انتقال کاست ژنی مورد نظر به بافت گیاهی مورد آزمایش، سلول‌های تراریخته از فنوتیپ ژن گزینشگر برخوردار خواهند گردید. تعداد زیادی از ژن‌های نشانگر گزینشگر در دسترس محققین بیوتکنولوژی گیاهی وجود دارد. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌متابولیت‌ها و علفکش‌ها، ژن‌های بیوسنتز هورمون و ژن‌های ایجاد مقاومت به مقادیر سمی از اسیدهای آمینه، ژن‌های نشانگر گزینشگر

¹ Selectable Marker Gene

² Reporter or scoreable Genes

مورد استفاده در آزمایشات تراریختی گیاهی می‌باشند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

۱-۷-۲ استفاده از ژن‌های گزارشگر:

یک ژن گزارشگر، تحت کنترل یک پروموتور که از فعالیت مطلوب در سلول گیاهی برخوردار باشد، در بالا دست ژن اصلی در ساختار ژنی منتقل شونده جاسازی می‌گردد. در صورت انتقال موفقیت آمیز ساختار ژنی منتقل شونده، ژن گزارشگر بیان گردیده و یک فنوتیپ قابل سنجش را بروز می‌دهد که بر اساس آن می‌توان به راحتی و بدون استفاده از تکنیک‌هایی همچون هیبریداسیون ساترن و PCR، به طور مستقیم مواد گیاهی تراریخته را شناسایی نمود. ژن‌های اوپین سنتتاز (OS)، کلرامفنیکول استیل ترانسفراز (CAT)، لوسیفراز باکتریایی ($Lux F_z$)، پروتئین فلورسنت سبز (GFP)، بتاگلوکورونیداز (*gus*) و ژن‌های تولید آنتوسیانین، ژن‌های معمول گزارشگر مورد استفاده در آزمایشات تراریختی گیاهی می‌باشند که برای پی بردن به بیان آن‌ها در سلول‌های گیاهی، به ترتیب از الکتروفورز بر روی کاغذ، آشکارسازی فرآورده نشاندار واکنش آنزیمی در اتورادیوگرافی، ثبت پرتو تابی توسط لومینومتر، میکروسکوپ فلورسنت و مشاهده چشمی استفاده می‌شود. یک ژن گزارشگر ایده آل باید واجد خصوصیات باشد از جمله این که با حساسیت زیادی آشکار شود، زمینه داخلی خیلی کم داشته باشد، بررسی آن به صورت کمی ممکن باشد، بررسی آن غیر مخرب باشد، هزینه بررسی آن زیاد نباشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). به دلیل استفاده از ژن گزارشگر *gus* در این تحقیق به بررسی بیشتری در ادامه در مورد این ژن گزارشگر می‌پردازیم.

۱-۷-۳ بتا گلوکورونیداز یا GUS (β Glucuronidase)

در چند سال اخیر ژن باکتریایی *Uida* که آنزیم بتاگلوکورونیداز (*gus*) را کد می‌کند به عنوان پرکاربردترین ژن گزارشگر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن در گیاهان مطرح شده است. ژن *Uida*

آنزیم بتاگلوکورونیداز با وزن مولکولی ۶۸ کیلودالتون و pH مطلوب ۷-۸ را کد می‌کند. بتاگلوکورونیداز، گلوکورونید را می‌شکند و منجر به واکنش رنگی می‌شود به طوری که وجود آن قابل آشکارسازی است.

دلیل اصلی مقبولیت این ژن به عنوان ژن گزارشگر، وجود یک آزمایش غیر رادیو اکتیو بسیار حساس با استفاده از ماده فلوروژنیک 4-MUGluc و آزمایش هیستوشیمیایی با استفاده از X-Gluc است. که امکان سنجش کمی بیان ژن *Uida* را به طور اختصاصی در سلول و بافت گیاهی فراهم می‌آورد. مزیت اصلی این گزارشگر عدم نیاز آن به استخراج DNA، الکتروفورز و اتورادیوگرافی است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). این ژن از باکتری *E. coli* برای اولین بار استخراج شد. این ژن بسیار پایدار، دارای مقاومت بسیار بالا به بسیاری از مواد شوینده و متحمل به شرایط یونی بسیار متغیر است و نیز در حضور عناصر احیا کننده گوگرد (thiol) نظیر بتامرکاپتواتانول یا DDT بسیار فعال است. دارای قابلیت سنجش در pH بهینه بین ۵/۲-۸ می‌باشد. ژن *gus* معمولاً در حالت ترکیب ژنی به کار برده می‌شود، به این معنی که توالی کد کننده *gus* تحت کنترل توالی کد کننده ژن دیگری است که اغلب از پروموتور 35S و پیروس موزاییک گل کلم استفاده می‌شود. این ژن اولین بار به عنوان ژن ترکیبی مارکر در *E. coli* و یک نماد به کار برده شده است. اما اخیراً به طور گسترده‌ای جهت مشاهده بیان ژن در گیاهان به کار گرفته شده است (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002).

فصل دوم

مروری بر منابع

۱-۲ تاریخچه تراریختی در گونه‌های *Brassica*

گزارشات متعدد در خصوص استفاده موفق از انتقال ژن به کلزا به منظور معرفی صفات مانند تغییر در ترکیب روغن (Knutzon *et al.*, 1992; زبرجدی وهمکاران، ۱۳۸۴)، مقاومت به علف کش (De Block, 1989; Kahrizi and salmanian, 2008)، تغییر در ترکیب پروتئین (Altenbach *et al.*, 1992) و مقاومت به حشرات (Stewart *et al.*, 1996) توسط محققین مختلف ارائه شده است.

در سال ۱۹۸۷، فری و همکاران قطعات ساقه‌ای گیاه کلزای ۵ تا ۶ هفته‌ای را با آگروباکتریوم دارای پلاسمید Ti خلع سلاح شده دارای ژن مقاومت به کانامایسین، تلقیح کردند. ریزنمونه‌های ساقه‌ای را به مدت ۲ روز، قبل از انتقال به محیط حاوی کانامایسین با باکتری هم‌کشت نمودند. شاخه‌های باززایی شده از جدا کشت‌ها را قطع نموده و به محیط ریشه‌زایی دارای ¹NAA منتقل کردند. گیاهان ریشه‌دار به خاک انتقال یافتند. تراریختی با بررسی تولید اپین، مقاومت به کانامایسین و ساترن بلات موردتایید قرار گرفت. اثبات نهایی تراریختی به وسیله تفرق تولید اپین و مقاومت به کانامایسین در نتاج بر اساس قوانین مندل نشان داده شد. آنها بیش از ۲۰۰ گیاه کلزای تراریخت شده تولید کردند.

در تحقیق دیگری رادکی و همکاران (۱۹۸۸) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه کلزا از طریق آگروباکتریوم سویه EHA101 گیاهان تراریخت به دست آوردند. در این تحقیق از ناقل دوتایی با ژن‌های *nptII* و پیشبرنده CaMV 35S و ژن *napin* مهندسی شده و پیشبرنده اختصاصی آن استفاده شد. ژن‌های *napin* کد کننده پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه خاص رویان می‌باشند. تراریختی با ساترن بلات و آزمایش مقاومت نتاج به کانامایسین تایید شد. بیان ژن *napin* مهندسی شده در رویان‌ها مشاهده شد ولی در برگ‌های گیاهان تراریخت توسط نورترن بلات تایید نشد. آن‌ها فراوانی تراریختی از ۰/۴ تا ۲/۵٪ را گزارش نمودند. عمومی‌ترین تغییر غیر طبیعی در گل‌ها مربوط به طول شدن مادگی‌ها بود که این

¹ 1-Naphthalene acetic acid

تغییرات موفولوژیکی در تعداد اندکی از گیاهان کلزای حاصل از کشت *in vitro* مشاهده شد. این تغییرات غیر طبیعی در نسل‌های بعد مشاهده نشد.

روش باززایی گیاه *B. campestris* توسط ماخوپادهیای و همکاران (۱۹۹۲) به منظور افزایش تراریختی بهینه‌سازی شد. آن‌ها برای انتقال از دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ‌های کوتیلدونی به واسطه آگروباکتریوم دارای ناقل دوتایی حاوی ژن‌های *nptII*، *gus*-intron استفاده نمودند. فراوانی گیاهان تراریخت حاصل از هیپوکوتیل ۷-۱۳٪ بود که کاربرد نیترا نقره تاثیر چشمگیری در بهبود باززایی در شرایط غیرانتخابی داشت. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل علی‌رغم باززایی زیاد، سرسختی بالایی برای تراریختی نشان دادند. فقط دو شاخه تراریخت شده شیمربک از بیش از ۱۰۰۰۰ برگ کوتیلدونی تیمار شده بدست آمد.

بررسی‌های انجام شده توسط جان و همکاران (۱۹۹۵) باززایی گیاهان تراریخت *B. campestris* را از طریق آگروباکتریوم نشان دادند. آنان با استفاده از ریزنمونه‌های برگ‌های کوتیلدونی ۵ روزه و آگروباکتریوم سویه LBA4404 دارای ناقل دوگانه حاوی ژن‌های شیمری نوپالین سنتتاز و *nptII* برای مقاومت به کانامایسین و پیشبرنده CaMV35S و TMV-L قادر به تولید گیاهان تراریخت شدند. از ۲۰۰ ریزنمونه برگ کوتیلدونی ۸ گیاه تراریخت بدست آوردند که ۶ تا از آنها بالغ شده و تولید بذر نمودند. گیاهان تراریخت با استفاده از PCR، ساترن بلات و وسترن بلات مورد تایید قرار گرفتند.

در تحقیق دیگری که توسط تاکازاکی و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد از ریزنمونه‌های محور زیرلپه گیاه *B. rapa* توسط آگروباکتریوم سویه EHA101 حاوی ژن *gus* و ژن *nptII* و ژن مقاومت به هیگرومایسین گیاهان تراریخت بدست آمد. بررسی هیستوشیمیایی *gus*، ساترن بلات و تفرق مقاومت به کانامایسین در نتاج انجام شد. در این تحقیق فراوانی تراریختی ۵٪ گزارش شد.

انتقال ژن مقاومت به حشرات (*cry IC*) از طریق آگروباکتریوم به رقم ۴ *B. rapa* (Seoul,) گزارش گردیده است. کارایی تراریختی در این ارقام بدین گونه گزارش شد که در ارقام Seoul, Samjin, Olympic و Junsung به ترتیب ۸/۹٪، ۶/۲٪ و ۵/۲٪ و ۰/۴٪ بود. پس بالاترین درصد انتقال مربوط به رقم Seoul و پایین‌ترین درصد انتقال مربوط به رقم Junsung بود که تراریختی توسط روش‌های ساترن بلات، نورترن بلات و PCR آزمون نتایج تایید شد. بیش از ۵۰ گیاه مقاوم به هیگرومایسین به خاک منتقل شد. گیاهان تراریخت به حشرات حمله کننده به خانواده شب بو مقاومت نشان دادند (Cho et al., 2001).

در مطالعه‌ای بر روی کلزا که توسط کاردوza و استوارت (۲۰۰۳) به انجام رسید مدت زمان پیش کشت و مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با آگروباکتریوم بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها بررسی گردید. در این آزمایش از دو پروتئین فلئورسنت mGFP5-ER و eGFP هر دو تحت کنترل پرموتور CAMV35s به طور مجزا در دو کاست به کار گرفته شدند. بالاترین راندمان انتقال از ۴٪ تا ۲۵٪ در مدت زمان ۷۲ ساعت پیش کشت ریزنمونه و ۴۸ ساعت هم‌کشتی با آگروباکتریوم به دست آمد و درصد انتقال نیز در کاستی که حاوی پروتئین فلئورسنت eGFP بود نسبت به mGFP5-ER نیز بالاتر بود پس نشان داده شد که علاوه بر مدت زمان پیش کشت و هم‌کشتی نوع سازه انتخابی برای انتقال به گیاه نیز در افزایش درصد راندمان تراریختی نقش داشت.

جنوبی (۲۰۰۳) شرایط باززایی گیاهچه را برای انتقال کارآمد ژن به دو رقم گیاه *B. napus* از طریق آگروباکتریوم بهبود بخشید و از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل برای باززایی و تراریختی استفاده نمود. فراوانی تراریختی از طریق مقاومت به کانامایسین، در ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱۱/۳٪ و در هیپوکوتیل ۸/۲٪ گزارش شد. با استفاده از مقاومت به کانامایسین، PCR، RT-PCR، لکه گذاری نقطه‌ای و آزمون هیستوشیمیایی *gus*، تراریخت بودن گیاهچه‌های به دست آمده را تایید کردند.

در پژوهشی لانگدو و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی بیان ژن کیتیناز در گیاهان تراریخته براسیکا (دو رقم H165 در *B. napus* و رقم DB3 در *B. juncea*) پرداختند. از آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن‌های کیتیناز و ژن مقاومت به علفکش استفاده کردند. در این آزمایش به بررسی فراوانی انتقال ژن توسط دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل در رقم H165 و دماهای هم‌کشتی متفاوت (۱۹-۲۲-۲۵-۲۸-۳۱) در رقم DB3 پرداختند. حضور ژن مورد نظر را در گیاهان تراریخته توسط آزمون PCR تایید کردند. آن‌ها بالاترین فراوانی تراریختی را در ریزنمونه هیپوکوتیل (۱/۱۴٪) و پایین‌ترین فراوانی تراریختی را در ریزنمونه‌های کوتیلدون (۰/۰۱٪) رقم H165 و بهترین دما برای دوره هم‌کشتی ۲۵ درجه سانتی‌گراد با درصد تراریختی ۲۳/۴۴، در رقم DB3، نشان دادند.

در تحقیق دیگری کهریزی و همکاران (۲۰۰۷) به بررسی رقم کلزا، ریزنمونه و سویه *A. tumefaciens* بر فراوانی تراریختی در گیاه کلزا پرداختند. برای این منظور از دو ریزنمونه (کوتیلدون و هیپوکوتیل)، دو رقم تجاری کلزا PF-7045-91 و SLM-046 و دو سویه باکتری LBA4404 و C58 (pGV3101) حامل پلاسمید pBI121 برای انتقال ژن گزارشگر *gus* استفاده کردند. برای سنجش اولیه حضور ساختار حاوی ژن در گیاه، از مقاومت گیاهان به ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده شد. حضور ژن‌های وارد شده و بیان آن به ترتیب از طریق آزمون‌های PCR و سنجش *gus* اثبات شد. نتایج آزمون آماری نشان داده شد که بین ارقام کلزا، ریزنمونه، سویه *A. tumefaciens* و اثرات متقابل آنها برای فراوانی تراریختی گیاه کلزا اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. به طوریکه رقم PF-7045-91 با میانگین ۱۰/۶۴٪، تراریختی بیشتری را نسبت به رقم SLM-046 با میانگین ۴/۵٪ نشان داد. از طرف دیگر سویه LBA4404 نیز با ۸/۷۸٪ تراریختی، توانایی بیشتری نسبت به سویه C58 (pGV3101) با میانگین ۶/۳۹٪ جهت انتقال ژن را نشان داد.

ماهشواری و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی ۴ رقم کلزا {Topas, Westar, Invigor 5020} و لاین‌های حاصل از کشت میکروسپور از Topas (Line 4079) و اثر ترکیبات هورمونی، سن گیاه و نوع ریزنمونه بر ظرفیت باززایی پرداختند. نتایج نشان می‌دهد که هیپوکوتیل‌های ۸ روزه روی محیط کشت همراه با یک میلی گرم در لیتر 2,4-D^۱ بیشترین کالوس‌دهی را ایجاد می‌کند. هنگامی که به محیط کشت ۵ میلی گرم BA^۲ اضافه شد حدود ۸۲٪ از جنین‌های سوماتیکی باززا شدند، کارایی باززایی در گیاهان Invigor 5020 نسبت به بقیه بیشتر بود. در این تحقیق هنگامی که ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با آگروباکتریوم نژاد GV3101 حاوی ناقل بیانی ژن لوسیفرا هم‌کشت شدند، تعداد زیادی از گیاهان باززاشده + LUC بودند که فراوانی آن‌ها عبارت بود از (Invigor 5020 (54.2 _ 2.5%)، Westar(53.7 _ 5.3)، Topas (16.0 _ 0.24) و Line 4079 (13.4 _ 4).

در سال ۲۰۱۱ لیو و همکاران، یک ناقل دوگانه (pCAMBIA1300-PMSN-PMCN) حامل ژن‌های sporamin و chitinase PjChi-1 را توسط آگروباکتریوم سویه GV3101 به ریزنمونه کوتیلدونی گیاه کلزا رقم ZS 758 برای مقاومت در برابر حمله قارچ و حشرات انتقال دادند. ریزنمونه‌های کوتیلدونی در سوسپانسیون بکتري با OD_{600nm}= 0.2 به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند. ۳۲ گیاه باززاشده از بین ۶۰۰ ریزنمونه دمبرگ انتخاب شدند. از این تعداد گیاه ۲۷ گیاه ترانسفورم شده حامل هر دو ژن بودند که از طریق PCR تایید شدند. در این آزمایش ۸ گیاه به طور تصادفی برای تایید بیشتر مورد آنالیز ساترن و نورترن بلات قرار گرفتند. در این آنالیز ۴ گیاه حامل یک کپی از ترانسژن‌ها بودند در حالی که ۴ گیاه دیگر حامل دو یا سه کپی از ترانسژن‌ها بودند. علاوه بر این بیان ترانسژن اسپورامین توسط دورگ گیری نورترن بلات در لاین‌های تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داده شد. گیاهان تراریخته در شرایط آزمایشگاهی و تلقیح با لارو پروانه‌ی *Plutella xylostella* و با اسپورهایی از قارچ *Sclerotinia*

¹ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

² Benzylamine

sclerotiorum رشد کردند. گیاهان تراریخته سطوح بالای مقاومت در برابر این قارچ و پروانه را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند.

بیان هترولوگ پروتئین‌های شبه thaumatin (tlp) از چاودار و انتقال آن به کلزا رقم HYOLA 308 برای افزایش مقاومت به پوسیدگی ساقه توسط زمانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌های شبه thaumatin فعالیت ضد قارچی در برابر پاتوژن‌های مختلف قارچی را نشان می‌دهند. بدین منظور ژن tlp از چاودار جدا گردیده و تحت کنترل پروموتور ساختاری دائمی CaMV35S توسط آگروباکتریوم سویه LBA4404 به گیاه کلزا منتقل شد. ورود ترانسژن با واکنش PCR و DNA ژنومی با روش دات بلات تأیید شد. نتایج نشان داد اندازه علائم ناشی از پوسیدگی ساقه در برگ کلزای تراریخته به طور قابل توجهی نسبت به گیاهان غیرتراریخت کاهش یافته بود.

بهبود پروتکل باززایی برای ریزنمونه‌های کلزا و ارزیابی تحمل به شوری در گیاهان تراریخت کلزا توسط سادات نوری و همکاران در سال ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که درصد باززایی ریزنمونه‌ها، نوع ریزنمونه، غلظت هورمونی و دوره پیش کشت نقش مهمی در کارایی انتقال ایفا می‌کنند، در این مطالعه ریزنمونه‌های مختلف به تنهایی با محیط کشت‌های مختلف مطالعه شدند. بدین منظور چهار وارسته کلزا (Hayola308، RGS003، Modena، PF) از نظر توانایی باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در غلظت‌های هورمونی متفاوت BAP¹ (۱ mg.l⁻¹، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۹) مورد ارزیابی قرار گرفتند. انتقال ریزنمونه‌های کوتیلدونی از طریق یک ژن کد کننده P5CS (یک آنزیم کلیدی برای بیوسنتز پرولین) توسط پلاسمید PBI- P5CS تحت کنترل پروموتور CAMV35S با واسطه آگروباکتریوم سویه pGV3101 مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد که ریزنمونه‌های برگ کوتیلدونی با

¹ Benzyl amino purine

غلظت ۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین باززایی را نشان دادند. پیش کشت ۴۸ ساعت بیشترین فراوانی انتقال را به خود اختصاص داد. با بررسی غلظت پرولین بیان و فعالیت ژن تراریخته تأیید شد، علاوه بر این گیاهان تراریخته مقاومت بیشتری به نمک در مقایسه با گیاهان غیر تراریخته نشان دادند.

هونگ و همکاران (۲۰۱۳) ژن BrAGL20 حاوی باکس MADS از *Brassica rapa* جدا شد و از طریق ناقل دوگانه توسط آگروباکتریوم سویه GV3101 برای افزایش زمان گلدهی به گیاه کلزا رقم Youngsan مشتق شد. بیان این ژن تحت پروموتور CaMV35S بود که منجر به القای گلدهی زودرس در گیاهان تراریخته نسبت به نوع وحشی می‌شود. این فنوتیپ به طور پایدار در نسل دوم و سوم صرف نظر از فصل کاشت به ارث رسیده است. نتایج نشان می‌دهد که افزایش بیان BrAGL20 می‌تواند روی زمان گلدهی کلزا اثر بگذارد علاوه بر این تنظیم بیان این ژن می‌تواند برای سازگاری محصولات با محیط‌های محلی و تغییرات آب و هوایی به کار گرفته شود.

در تحقیق دیگری حسین و همکاران (۲۰۱۴) درصد باززایی را در سه رقم کلزا (Con-1، Wester، Pakola) در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کالوس‌های حاصل از هیپوکوتیل مورد بررسی قرار دادند که بالاترین درصد باززایی مربوط به Wester (۰/۸۷/۶) و Con-1 (۰/۸۴/۴) و بدون تفاوت در بین هم پایین‌ترین درصد باززایی در Pakola (۰/۵۴/۲) مشاهده گردید. در این مطالعه از دو آگروباکتریوم سویه LBA4404 با پلاسمید جداگانه pCAMBIA2301 و pCAMBIA1391Z (هردوبا ژن گزارشگر *gus*) استفاده گردید. درصد تراریختی در این مطالعه از طریق PCR و بیان ژن *gus* توسط آزمون هیستوشیمیایی *gus* تایید شد. بالاترین درصد تراریختی گیاه (۰/۸۰) در شرایط بیان ژن *gus* در این آزمایش مربوط به رقم Pakola که با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pCAMBIA1391Z تلقیح شده بود، به دست آمد.

۲-۲ تاریخچه تراریختی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم:

در پژوهشی شرایط انتقال به واسطه آگروباکتریوم به جنین سویا از طریق بیان ژن‌های مقاومت به حشرات توسط دانگ و همکاران (۲۰۰۷) بهینه‌سازی شد. در این پژوهش از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم (EHA105، KYRT1 و LBA4404) استفاده شده است. سویه‌های آگروباکتریوم با ناقل دوگانه pCAMBIA3301 حاوی ژن‌های *gus* به عنوان ژن گزارشگر و *bar* به عنوان مارکر انتخابی تحت پروموتور CaMV35S بودند. بهبود کارایی انتقال ژن با اندازه‌گیری سطوح بیان گذرای آنزیم بتا گلوکورونیداز بر روی ریزنمونه‌های مقاوم به علفکش فسفینوتریسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده است که آگروباکتریوم سویه‌ی KYRT1 انتقال بهتری نسبت به EHA105 و LBA4404 دارد. کارایی انتقال هنگامی که جنین با سوسپانسیون آگروباکتریوم ($A_{600} = 0.5$) به مدت ۲۰ ساعت انکوبه شدند و محیط در هم‌کشتی (pH 5.4) با درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز و در شرایط تاریکی قرار گرفتند، بررسی شد. فراوانی انتقال [(تعداد گیاهان باززا شده با PCR مثبت به تعداد ریزنمونه‌های آلوده شده) در ۱۰۰] در محدوده ۱۸-۴/۲۹٪ بود. آنالیز PCR و ساترن ادغام پایدار ژن‌های مقاومت به حشرات را در گیاهان تراریخته اولیه تایید کردند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل گیاهان نسل T₁ ادغام پایدار و وراثت‌پذیری گیاهان تراریخته را نشان دادند. در این گزارش برخی از سویه‌های تراریخته نسل T₁ مقاومت بالایی در برابر کرم غوزه پنبه توسط مطالعات مقاومت به حشرات، نشان دادند.

در بررسی دیگری تکاور و همکاران (۲۰۱۰) در انتقال ژن در ذرت به مطالعه فاکتورهای مهمی که کارایی انتقال و باززایی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند، پرداختند. در این پژوهش ژنوتیپ‌های مختلف گیاه ذرت (S61، B73، Mo17 و A188)، سویه‌های مختلف آگروباکتریوم (EHA101، LBA4404، EHA105)، اندازه جنین برای انکوبه شدن با آگروباکتریوم، مدت زمان پیش تیمار جنین و آنتی بیوتیک

مناسب برای انتقال را مورد بررسی قرار دادند. سویه‌های آگروباکتریوم با ناقل دوگانه pCAMBIA3301 حاوی ژن‌های *gus* به عنوان ژن گزارشگر و *bar* به عنوان مارکر انتخابی تحت پروموتور CaMV35S ترانسفورم شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، حضور ژن‌های *gus* و *bar* را در ژنوم گیاهان باززا شده تایید کردند. فراوانی انتقال (تعداد گیاهان تراریخته با PCR مثبت در هر ۱۰۰ جنین آلوده) برای ژنوتیپ S61، ۶/۴۵٪ بود. بنابراین نتایج به دست آمده ژنوتیپ مناسب (S61)، اندازه جنین (۲-۱/۵ میلی متر)، سویه آگروباکتریوم مناسب (LBA4404)، مدت زمان پیش تیمار مناسب (72h) و انتی بیوتیک مناسب (Timentin) برای انتقال توسط آگروباکتریوم در ذرت را نشان دادند.

انتقال ژن AtHSP101^۱ با ناقل دوگانه pCAMHSP به واسطه آگروباکتریوم سویه‌های C58 و GV2260، توسط ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل به کلزا انجام گرفت. بیان ژن از طریق ژن گزارشگر *lacZ* و RT-PCR تایید شد. در این مطالعه بازده انتقال برای کوتیلدون و هیپوکوتیل به ترتیب ۴۵٪ و ۳۲/۵٪ گزارش گردید. بهترین زمان تلقیح ۱۰ دقیقه و از بین این دو سویه، سویه GV2260 بالاترین کارایی انتقال را داشته است (Rafat *et al.*, 2010).

محمدی‌زاده و همکاران (۲۰۱۱) به منظور تولید گیاهچه‌های تراریخته گندم مقاوم به قارچ‌های فوزاریوم^۲ و ارایزیف^۳، از ۴ سویه آگروباکتریوم EHA101, AGL, LBA4404 و C58، حامل پلاسمید pBI121 نو ترکیب و حاوی ژن‌های کیتیناز و گلوکوناز هر کدام به طور جداگانه تحت کنترل پیشبر CAMV35S و خاتمه دهنده NOS و نیز ژن انتخابگر *nptII* استفاده کردند. ریزنمونه‌های جنینی نارس ۵ ژنوتیپ از ارقام (مغان، آرتا، سایسون و گاسکوژن) و لاین A، پس از هم‌کشتی با سوسپانسیون باکتری به محیط کشت کالوس‌دهی حاوی ۵۰ mg/l کانامایسین منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا بعد از رشد در

¹ Heat shock protein 101

² *Fusarium Oxysporum*

³ *Erysiphe*

محیط انتخابی، به محیط باززایی حاوی ۲۵ mg/l کانامایسین انتقال یافتند. در این پژوهش دو گیاهچه حاصل از تلقیح با سویه C58 با درصد تراریزش (۰/۳۱) و یک گیاهچه حاصل از تلقیح با سویه LBA4404 با درصد تراریزش (۰/۰۷۴) از رقم آرتا حاصل شد. در سایر ارقام و سویه‌ها هیچ تراریخته‌ای مشاهده نشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آنالیز ساترن بلات نشان داد که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکوناز و نیز نئومایسین فسفوترانسفراز (*nptII*) را در ژنوم خود دارا هستند.

بررسی‌های انجام شده توسط چتی و همکاران (۲۰۱۳) کارایی انتقال در گوجه فرنگی رقم میکروتام را توسط ۴ سویه آگروباکتریوم *MP90*، *GV3101*، *EHA105*، *AGL1* ترانسفورم شده با پلاسمید *pBI121* مقایسه کردند. حضور ژن‌های *nptII* و *uidA* در گیاهان T_0 باززا شده توسط PCR، ساترن بلات و آزمون هیستوشیمیایی *gus* تایید شد. در این آزمایش بالاترین درصد انتقال (۰/۶۵) در سویه *GV3101* و به دنبال آن *EHA105* (۰/۴۰)، *AGL1* (۰/۳۵) و *MP90* (۰/۱۵) به دست آمد. میزان از بین رفتن کوتیلدون به علت رشد بیش از حد باکتری در سویه *GV3101* کمترین مقدار بود. آنالیز *real-time* PCR نشان داد که سویه *EHA105* کارایی بیشتری نسبت به سویه *GV3101* در انتقال T-DNA منفرد الحاقی از ترانسژن‌های *nptII* و *uidA* درون ژنوم گوجه فرنگی دارد. ترکیبی از کارایی بالای انتقال و ترانسژن‌های الحاقی کمتر در گیاهان ترانسفورم شده با استفاده از سویه *EHA105*، این سویه را برای برنامه‌های ژنتیکی و کاربردهای بیوتکنولوژی روی گوجه فرنگی بهینه می‌کند.

در تحقیق دیگری یاداو و همکاران (۲۰۱۴) تاثیر سه سویه آگروباکتریوم را روی انتقال ژنتیکی در گیاه باکوپا بررسی می‌کند. در این مطالعه باکوپا با سه سویه مختلف آگروباکتریوم از جمله *LBA4404*، *EHA105*، *GV3101* با ناقل بیانی *pCAMBIA2301* حاوی پرموتر *CAMV35s* و *gus* به عنوان ژن

گزارشگر و *nptII* به عنوان نشانگر انتخابی، ترانسفورم شده است. گیاهان انتقال یافته با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی آنالیز شدند. بیان و حضور ژن *gus* با استفاده از روش رنگ آمیزی هیستوشیمیایی و کیفیت آن با استفاده از آنالیز آنزیم *gus* با روش فلورومتري انجام شد. تفاوت معنی داری از نظر آماری در کارایی انتقال یافته در سه سویه مشاهده نشد. جالب توجه است که بیان *gus* با گیاهانی که با LBA4404 ترانسفورم شدن متغیر بوده و بالاترین فعالیت *gus* را نشان داده است.

تولید گیاهان تراریخته بیشتر به وسیله‌ی روش‌های مبتنی بر کشت بافت است که به آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و گزینش دقیق ریزنمونه، غربالگری بافت‌های تراریخته و باززایی گیاهان فوق تحت شرایط درون شیشه‌ای نیاز است، که برخی مواقع مشکل و زمان‌بر است. در پژوهشی تراریزش دو گیاه تک لپه و مهم زراعی برنج و گندم با روش *in planta* (در این روش از سوزن آلوده به آگروباکتریوم در شرایط محیط طبیعی برای تلقیح بذور در حال جوانه زنی استفاده می‌شود) انجام و کارایی انتقال ژن آن‌ها بررسی شد. آزمایش با دو سویه‌ی آگروباکتریوم (EHA101، LBA4404)، سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام)، سه رقم گندم (آذر ۲، الوند و سرداری)، سه غلظت استوسرینگون (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و نیز استفاده از شرایط خلا با استفاده از دستگاه خلاء به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. کارایی انتقال ژن با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی *gus* و واکنش PCR با سه ژن مختلف بررسی شد. بالاترین کارایی در رقم حسن سرایی در گیاه برنج با استفاده از سویه‌ی EHA105 با حضور ۱۰۰ میکرو مولار استوسرینگون همراه با استفاده از خلا به میزان ۱/۱ درصد بود. هم‌چنین کارایی انتقال ژن رقم آذر ۲ و سرداری در بین ارقام گندم در سویه‌ی EHA105 با حضور ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون با استفاده از خلا به میزان ۰/۵۵ درصد بود (نصر رمزی و همکاران، ۱۳۹۲).

کارایی انتقال پنج سویه آگروباکتریوم GV2260، LBA4404، AGL1، EHA105 و C58C1 در توتون رقم سامسون توسط بخش و همکاران (۲۰۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های آگروباکتریوم

حامل ناقل دوگانه نو ترکیب pBin19 که حاوی بتا گلوکورونیداز *uidA* تحت کنترل پرموتور CAMV35s بودند. ژن *nptII* به عنوان نشانگر انتخابی به کار گرفته شد. بیان ژن *uidA* در گیاهان T₀ باززا شده ابتدا توسط *gus* آنالیز شد سپس حضور ژن های *nptII* و *uidA* توسط PCR تایید شد. بالاترین درصد انتقال (۲۰٪) با آگروباکتریوم سویه LBA4404 و بعد از آن سویه های آگروباکتریوم EHA105، GV2260، C58C1 و AGL1 به دست آمد.

علیزاده و همکاران (۱۳۹۳) روشی برای انتقال همزمان ژن های *bph A*، *bph E* و *bph G* که اجزای رمزدهنده ی آنزیم BPDO هستند به گیاه آرابیدوپسیس را بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده، سه ژن که در ناقل pGreen کلون شده بودند به باکتری *E. coli* و آگروباکتریوم های LBA4404 و C58C1 و در انتها به گیاه آرابیدوپسیس انتقال یافتند. از لحاظ کارایی انتقال ژن به گیاه، بین دو سویه آگروباکتریوم به کار رفته در این پژوهش اختلاف معنی داری وجود داشت. بیشترین تعداد گیاهان تراریخته (۸۵٪) با سویه LBA4404 به دست آمد. تراریخت بودن گیاهچه های آرابیدوپسیس با انتخاب گیاهان کاملاً سبز در محیط دارای ۵۰ mg/l کانامایسین و همچنین آزمون PCR تایید شد. گیاهان تراریخت با موفقیت به خاک انتقال یافتند و به رشد خود ادامه دادند.

۳-۲ برخی مطالعات تراریختی در گیاهان دیگر

در آزمایشی به منظور استاندارد کردن پروتکل انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم در گیاه ماش از پارامترهای مهم مانند حساسیت ریزنمونه ها به کانامایسین، pH محیط هم کشتی، سن ریزنمونه، زمان هم-کشتی و OD محیط کشت آگروباکتریوم مطالعه شد. آگروباکتریوم مورد استفاده در این مطالعه سویه آگروباکتریوم C58C1 ترانسفورم شده با ناقل دوگانه p35SGUSINT تحت کنترل پرموتور CaMV35S و ترمیناتور NOS حاوی ژن مقاومت به *nptII* به عنوان نشانگر انتخابی و ژن *gus* به عنوان ژن گزارشگر بود.

در این تحقیق کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر برای سلول‌های ترانسفورم شده به کار برده شد. بیان پایدار و موقت ژن *gus* در ریزنمونه‌های ترانسفورم شده و کالوس‌های باززا شده به ترتیب مطالعه شد. نتایج نشان داد که بالاترین بیان موقت (۰/۷۰٪) در pH ۵/۸ بعد از سه روز هم‌کشتی در ریزنمونه‌های دو روزه مشاهده شد. OD مناسب برای به دست آوردن بالاترین درصد انتقال ژن در طول موج ۵۶۰ نانومتر برابر با ۱ بود. محیط کشت آگروباکتریوم حاوی هر دو آنتی بیوتیک کانامایسین و آمپی‌سیلین بود که تاثیر زیادی در کارایی انتقال داشت. برگ‌های کوتیلدونی کارایی انتقال بالاتری (۰/۸۰٪) نسبت به هیپوکوتیل (۰/۶۰٪) و ریشه (۰/۴۰٪) داشتند (Tazeen & Mirza, 2004).

گیاهان مکانیسم‌های خاصی برای مقابله با شرایط استرس دارند. در بین آنها، لایه‌ی پوششی مومی کوتیکولی ممکن است به عنوان سد محافظ برای جلوگیری از، از دست دادن آب و همچنین حمله پاتوژن عمل کند. ژن *OsFAE* برنج کد کننده یک پروتئین درگیر در طویل سازی اسیدهای چرب به شکل اسیدهای چرب با زنجیره بسیار طولانی (VLCFAs) برای بیوسنتز لایه‌ی پوششی مومی کوتیکولی مورد نیاز است. این ژن در توالی سنس تحت کنترل پروموتور *CaMV35S* و خاتمه دهنده نوپالین قرار گرفته است. انتقال ژن به ریزنمونه کوتیلدونی گیاهان توتون تراریخته به واسطه آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک کشت بافت انجام گرفت. در این آزمایش از سویه آگروباکتریوم LBA4404 با OD600 برابر ۰/۴ تا ۰/۶ استفاده شد. ریزنمونه‌های کوتیلدونی به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه با آگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر تیمار شدند. آنالیز PCR از گیاهان نسل اول ادغام ژن به درون ژنوم را تایید کرد. انتخاب گیاهان تراریخته در محیط حاوی هیگرومایسین صورت گرفت. آنالیز و جداسازی نسل اول نسبت ۳:۱ مندلی را در بسیاری از لاین‌های تراریخته نشان دادند (Bhatti & He, 2009).

فرفیون (*Jatropha curcas*) یک گونه‌ی روغنی با چندین کاربرد و دارای پتانسیل اقتصادی قابل توجه به عنوان یک محصول سوخت فسیلی است. در مطالعه‌ای توسط کومار و همکاران (۲۰۱۰) یک

پروتکل ساده و تکرار پذیر برای انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم و با استفاده از ریزنمونه برگی در این گیاه توسعه داده شد. سویه آگروباکتریوم LBA4404 حامل ناقل دوگانه pCAMBIA 1304 دارای ژن پاسخگوی حساس به از دست دادن آب (*S-DREB2A*)¹، ژنهای *gus* و هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*) و پروموتور CAMV35S که برای انتقال ژن استفاده شد. تعدادی از پارامترها مانند پیش کشت ریزنمونه‌ها، برش و خراش ریزنمونه کوتیلدونی، فاز رشدی آگروباکتریوم (OD)، مدت زمان آلودگی، دوره هم‌کشتی، pH محیط هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون برای بهینه‌سازی شرایط انتقال مورد مطالعه قرار گرفت. بالاترین کارایی انتقال، با استفاده از پیش کشت ۴ روزه، ریزنمونه‌های کوتیلدونی برش نخورده آلوده شده با محیط آگروباکتریوم با OD= ۰/۶ برای ۲۰ دقیقه و به دنبال آن هم‌کشتی برای ۴ روز در محیط حاوی ۱۰۰ میکرو مولار استوسرینگون و pH ۵/۷ به دست آمد. آنالیز هیستوشیمیایی *gus* از بافت تراریخته انتقال ژن مورد نظر را تایید کرد. PCR و هیبریداسیون بلات حضور ترانسژن را تایید کردند. کارایی انتقال برای ریزنمونه‌های برگی در این پروتوکل ۲۹٪ بود (Kumar et al., 2010).

در تحقیق دیگری جها و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تاثیر کارایی انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم در ارزن پرداختند. در همین راستا از آگروباکتریوم سویه EHA105 حامل ناقل دوگانه pCAMBIA 1301 و ژنهای *gus* و *hptII* استفاده کردند. فاکتورهای نظیر غلظت باکتری (۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۳)، مدت زمان تلقیح (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه)، طول دوره‌ی هم‌کشتی (۶-۱ روز) و غلظت استوسرینگون (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومولار) و انکوبه شدن در شرایط خلا نسبی را مورد بررسی قرار دادند. مشاهده کردند که بالاترین فراوانی انتقال (۵/۷۹٪) وقتی که ریزنمونه به مدت ۳۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح و در غلظت باکتری ۱/۲ و دوره هم‌کشتی ۳ روز در محیط حاوی ۴۰۰

¹sense-dehydration responsive element binding

میکرومولار استوسرینگون و تحت شرایط خلا نسبی به دست آمد. تراریخته بودن گیاه نیز توسط آنالیز PCR و آزمون هیستوشیمیایی *gus* تایید شد.

اقبال و همکاران (۲۰۱۲) ژن کیتیناز برنج تحت پروموتور CaMV35S را به بادام زمینی برای بهبود مقاومت در برابر لکه برگی توسط آگروباکتریوم منتقل کردند. سویه آگروباکتریوم LB4404 حاوی ناقل دوگانه pB1333-EN4-RCG3 دارای ژن کیتیناز و ژن مقاومت هیگرومایسین به عنوان نشانگر انتخابی مورد استفاده قرار گرفت. باززایی و رشد گیاهچه‌های تراریخته روی محیط MS با ۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر کاینترین و ۳۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین انجام شد. شاخه‌هایی که طویل شده برای حضور ژن مورد نظر در محیط انتخابی مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی ادغام ژن در ژنوم از گیاهان تراریخته احتمالی (T_0) از طریق آنالیز ساترن بلات مورد تایید قرار گرفت. درصد گیاهان باززا شده در شرایط درون شیشه‌ای ۶۰٪ بود در حالی که گیاهان تراریخته‌ای که دارای ژن مورد نظر هستند با فراوانی انتقال ۴۲٪ تولید شدند. گیاهان T_1 برای مقاومت در برابر *Cercospora arachidicola* (بیمارگر قارچی که باعث ایجاد لکه برگ می‌شود) مورد آزمایش قرار گرفتند. گیاه تراریخته نسبت به گیاه شاهد مقاومت بالاتری را نشان داد. بیان ژن کیتیناز در سویه‌های مقاوم با سویه‌های حساس مقایسه شد. همبستگی خوبی بین فعالیت کیتیناز و مقاومت در برابر بیمارگرهای قارچی مشاهده شد.

در پژوهشی دیگر برخی عوامل موثر در تراریختی سیب مورد بررسی قرار گرفت و در همین راستا از دو سویه GV3850 و GV3101 حاوی ناقل دوگانه pBI121، دو نوع محیط کشت برای رشد باکتری (LB و AB)، مدت زمان تلقیح (۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه)، طول دوره هم کشتی (۲ و ۳ روز) و غلظت باکتری (۱، ۰/۷، ۰/۵، OD=600) استفاده شد. نتایج نشان داد که از بین تیمارهای مختلف سویه‌ی GV3850 نسبت به سویه GV3101 موثرتر بود. بر اساس نتایج دو روز هم کشتی با آگروباکتریوم و استفاده از محیط LB به عنوان محیط آلودگی آگروباکتریومی نسبت به محیط AB (محیطی با درصد فسفر کمتر و گلوکز

بیشتر) مناسب‌تر تشخیص داده شد. به علاوه آن‌ها دریافتند که غلظت‌های ۱ و ۰/۷ باعث رشد زیاد باکتری بر روی ریزنمونه شده و بعد از چند روز آن را از بین برد بنابراین از غلظت ۰/۵ در این تحقیق استفاده کردند، تلقیح ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری نیز به مدت ۵ دقیقه نسبت به دو تیمار دیگر نتیجه بهتری را نشان داد. زمانی که همه شرایط را همزمان با هم اعمال کردند نشان دادند که تیمار دو روز همکشتی + محیط LB + سویه‌ی GV3850 با درصد تراریختی ۲٪ بهترین تیمار است (ناظری و همکاران، ۱۳۹۰).

۲-۴ تاریخچه تراریختی توسط امواج اولتراسونیک:

انتقال به واسطه آگروباکتریوم به کمک امواج فراصوت به طور قابل توجهی کارایی انتقال را از طریق ایجاد حفره‌های کوچک متعدد در بافت گیاه هدف بهبود می‌بخشد. ساننارم و همکاران (۱۹۹۸) از کوتیلدون‌های نابالغ سویا به عنوان ریزنمونه در انتقال به واسطه آگروباکتریوم توسط امواج فراصوت استفاده کردند. پارامترهایی که اثر آن‌ها در بیان گذرای *gus* ارزیابی شد عبارت بود از: نوع رقم، نوع ناقل دوگانه، غلظت باکتری در طول آلودگی، مدت زمان تیمار اولتراسونیک (۲، ۵ و ۱۰ ثانیه)، شرایط هم-کشتی، طول دوره پیش کشت و مقدار استوسرینگون در محیط هم‌کشتی. میزان آسیب بافت توسط امواج فراصوت نیز تعیین شد. بالاترین بیان *gus* توسط امواج فراصوت زمانی حاصل شد که کوتیلدون نابالغ در حضور آگروباکتریوم ($OD_{600nm} = 0.11$) و تیمار ۲ ثانیه اولتراسونیک به مدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد هم‌کشت شدند. علاوه بر این اضافه کردن استوسرینگون به محیط هم‌کشتی باعث افزایش بیان موقت *gus* می‌شود. تفاوتی بین ارقام مختلف و ناقل‌های دوگانه مشاهده نشد. تیمار ۲ ثانیه با اولتراسونیک آسیب بافتی کمتری داشت، درحالی که تیمارهای دیگر منجر به آسیب بافتی زیاد می‌شد.

در تحقیق دیگری حسین و همکاران (۲۰۰۷) از روش انتقال به کمک آگروباکتریوم با استفاده از

امواج فراصوت در گیاه پنبه استفاده کردند. از جنین بالغ به عنوان ریزنمونه و آگروباکتریوم LBA4404 حاوی گزارشگر *gus* استفاده شد. با ثابت نگه داشتن تمام شرایط کشت، چهار روش انتقال؛ انتقال به واسطه آگروباکتریوم، بیولیستیک، ترکیبی از دو روش قبلی و انتقال به واسطه آگروباکتریوم با استفاده از امواج فراصوت، در این آزمایش مقایسه شدند، میزان تراریختی در هر روش به ترتیب ۷/۳۳، ۱۷، ۳۳/۶۷، ۳۴۹/۶۷٪ به دست آمد. آزمون LSD نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین سه روش اول نیست ولی انتقال به واسطه آگروباکتریوم به کمک امواج فراصوت تفاوت معنی‌داری با سه روش دیگر دارد. آزمون هیستوشیمیایی *gus* به عنوان یک شاخص مفید برای انتقال ژن مورد نظر به ریزنمونه به کار گرفته شد.

یک روش کارآمد و تکرار پذیر برای انتقال به واسطه آگروباکتریوم با استفاده از امواج فراصوت برای گیاه نخود توسط پاتک و حمزه (۲۰۰۸) توسعه داده شد. آگروباکتریوم سویه LBA4404 حامل پلاسمید pCAMBIA1305.2 حاوی پروموتور CMV35S و ترمیناتور نوپالین سنتتازپلی A برای انتقال ریزنمونه‌های جنین دو رقم نخود (ICC 10386 و ICC 10943) مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده مجموعه‌ای از محیط کشت‌های هم‌کشتی، القای کالوس‌دهی، شروع ساقه‌دهی و القای ریشه‌دهی تعداد زیادی از گیاهان تراریخت به دست آمد. بیان گذرای ژن *gus* توسط آزمون هیستوشیمیایی X-Gluc در بافت‌های تراریخته آشکار شد. آنالیز DNA از گیاهان نسل اول و دوم توسط PCR و هیبریداسیون ساترن ادغام ترانسژن در نسل اول و نسل‌های بعدی تراریخته در لاین‌های تراریخته مختلف را تایید کرد. درصد انتقال در زمانی که از تیمار فراصوت استفاده شده در ارقام ICC 10386 و ICC 10943 به ترتیب ۲۴ و ۲۶٪ بود و درصد انتقال با آگروباکتریوم بدون فراصوت در همان ارقام به ترتیب ۹ و ۱۱٪ بود و این نشان داد که در تیمار فراصوت کارایی انتقال نسبت به انتقال با آگروباکتریوم بدون فراصوت بیش از دو برابر بود.

برانوا و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهش دیگری از تکنیک انتقال به واسطه آگروباکتریوم توسط امواج

اولتراسونیک برای افزایش کارایی انتقال در کتان استفاده کردند. ریزنمونه‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیلی از گیاه کتان ۱۰ روزه جدا شده و با آگروباکتریوم حامل وکتور دوگانه pBIN m-gfp5-ER ER و حاوی ژن mgfp5-ER تحت کنترل پیشبر CAMV35S انکوبه شدند. سپس ریزنمونه‌ها به مدت صفر تا ۱۵۰ ثانیه در دستگاه sonicator (۳۵ kHz) در برابر امواج اولتراسونیک قرار گرفتند و به مدت دو ساعت در ۲۷ درجه سانتی‌گراد هم‌کشت شدند. ریزنمونه‌ها برای باززایی به محیط مورد نظر منتقل شدند. بررسی با میکروسکوپ الکترونی در ریزنمونه‌هایی که با اولتراسونیک تیمار شده بود هزاران زخم کوچک در سطح ریزنمونه‌ها نشان داده شد. از استریو میکروسکوپ Leica MZ 12 مجهز به آدابتور GFP برای ارزیابی آلودگی و انتقال ژن به بافت‌های گیاهی استفاده شد. بعد از فقط ۴۸ ساعت و برای حداقل ۳۰ روز بعد از حذف باکتری، نشانه‌هایی از بیان ژن GFP دیده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار فراصوت منجر به افزایش جذب DNA پلاسمیدی درون سلول‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیلی کتان می‌شود و علاوه بر این کارایی و بازده اولتراسونیک بستگی به مدت زمان تیمار با اولتراسونیک و فرکانس اولتراسونیک دارد. ریزنمونه کوتیلدون با تیمار ۵۰ ثانیه اولتراسونیک بالاترین بیان ژن GFP (بالاتر از ۵۰٪) در آن مشاهده شده است. انتقال ژن با آگروباکتریوم به کمک امواج فراصوت می‌تواند یک ابزار امیدوار کننده‌ای برای افزایش کارایی انتقال در کتان باشد.

در تحقیقی دیگر یک پروتوکل برای دستیابی به لاین‌های پایدار رقم بهاره ارکیده وارپته سانیا با روش انتقال به واسطه آگروباکتریوم توسط امواج فراصوت در جنین‌های سوماتیکی در ارکیده (PLBs) توسعه داده شد. از آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 ترانسفورم شده با حامل دوگانه YF9078 حاوی ژن‌های تکراری معکوس از ژن ACC برای مهار تولید اتیلن و ژن *nptII* به عنوان نشانگر انتخابی برای مقاومت به کانامایسین و اینترون حاوی بتاگلوکورونیداز (*gusint*) به عنوان ژن گزارشگر به کار برده شد. PLBs به

مدت ۱۰ دقیقه با اولتراسونیک (۴۰ kHz) و پس از آن با سوسپانسیون آگروباکتریوم به مدت ۶۰ دقیقه تیمار شدند. علاوه بر این ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون در طول پیش کشت، انکوباسیون و هم کشتی منجر به بازده بالایی از انتقال ژن (۰.۱/۰۴) در ارکیده شد. بعد از هم کشتی PLBs روی محیط کشت انتخابی حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت شدند. PLBs چندین دور در محیط حاوی کانامایسین کشت شدند و لاین‌های انتقال یافته پایدار را ایجاد کردند. الحاق و بیان ترانسژن‌ها توسط آزمون هیستوشیمیایی *gus*، آنالیز PCR، آنالیز ساترن بلات و RT-PCR تایید شد. در مجموع پنج لاین ساترن بلات مثبت تراریخته به دست آمد. توانایی مهار اتیلن در گیاهان تراریخت گلدانی کوچک اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد مهار اتیلن در لاین‌های تراریخته نسبت به لاین‌های غیر تراریخته به طور قابل توجهی بیشتر بودند (Zheng et al., 2012).

دیبانتا و همکاران (۲۰۱۳)، از روش انتقال به واسطه آگروباکتریوم توسط امواج فراصوت برای بررسی بیان گذرا در کنجد استفاده کردند. انتقال به وسیله آگروباکتریوم توسط امواج فراصوت به طور چشمگیری کارایی انتقال را در آگروباکتریوم بهبود بخشید. در این مطالعه از آگروباکتریوم سویه LBA4404 حامل وکتور دوگانه pCAMBIA 1301 و پروموتور CMV35S و ژن‌های *gus* و *hpt* و از ریزنمونه‌های کوتیلدونی استفاده شد. پارامترهای مختلفی مانند مدت زمان تیمار فراصوت، غلظت آگروباکتریوم و غلظت استوسرینگون در طول محیط هم کشتی، برای ایجاد یک پروتوکل متعادل که بالاترین بیان *gus* با کمترین آسیب دیدگی در بافت را داشته باشد، استفاده شد. از هفت ثانیه (صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ ثانیه) به عنوان تیمار برای طول مدت فراصوت در این آزمایش استفاده شد. نتایج نشان داد استفاده از سوسپانسیون آگروباکتریوم با غلظت باکتری $OD_{600}=1$ هیچ گونه آسیب بافتی ایجاد نمی‌کند. استفاده از ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون باعث تسهیل انتقال T-DNA از طریق فعال کردن ژن‌های Vir در آگروباکتریوم، باعث افزایش بیان گذرا در *gus* می‌شود. بالاترین بیان گذرای *gus* در این

آزمایش مربوط به تیمار ۱۰۰ ثانیه تیمار فراصوت و پایین‌ترین بیان گذرا مربوط به صفر ثانیه تیمار فراصوت است.

در تحقیق دیگری به منظور دستیابی به درصد انتقال بالاتر در گیاهان کلزا، روش‌های انتقال به واسطه آگروباکتریوم به کمک امواج فراصوت (SAAT) و بمباران ذره‌ای توسط مقیب و همکاران (۲۰۱۴) مقایسه شدند. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل از گیاه ۴ روزه از دو واریته کلزا (Serw-3 و Serw-4) جدا شدند و با استفاده از دو روش فوق، انتقال پیدا کردند. ریزنمونه‌ها با اولتراسونیک در زمان‌های مختلف (۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵ ثانیه) قبل از هم‌کشتی با آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 حامل ناقل دوگانه PBI-121-*gfp* که حاوی ژن‌های *nptII* و *gfp* تحت پیشبرنده CaMV35S و خاتمه دهنده *nos*، تیمار شدند. آنالیز داده‌های تیمار شده با اولتراسونیک نشان داد که تیمار ۵ ثانیه اولتراسونیک بالاترین درصد انتقال (۵۵٪) را دارد. نتایج نشان داد که فراوانی انتقال دو رقم Serw-4 و Serw-3 کلزا آزمایش شده بعد از بمباران ذره‌ای به ترتیب ۲۵٪ و ۱۶٪ بود در حالی که در تیمار اولتراسونیک، در ارقام فوق به ترتیب ۳۳٪ و ۵۵٪ بود که توسط آنالیز PCR و دات بلات تایید شد. به طور کلی تیمار ۵ ثانیه اولتراسونیک به همراه آگروباکتریوم نسبت به بمباران ذره‌ای فراوانی بالاتری در انتقال ژن مربوطه به ژنوم گیاه کلزا را دارد (Moghaieb *et al.*, 2014).

بررسی‌های ینچون و چاتو (۲۰۱۵)، انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم توسط امواج فراصوت و تاثیر غلظت هیگرومایسین بر بقاء جنین‌های سوماتیکی ثانویه نخل روغنی^۱ را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد ۲۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین به طور کامل می‌تواند از رشد جنین‌های ترانسفورم نشده جلوگیری کند و برای انتخاب جنین‌های ترانسفورم شده مناسب است. بیان گذرای *gus* تحت تاثیر

¹secondary somatic embryos

تیمارهای مختلف اولتراسونیک (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ ثانیه) قرار گرفت و به طور قابل توجهی با افزایش دوره اولتراسونیک بیان گذرای *gus* افزایش یافت. با این حال تیمار به مدت طولانی با اولتراسونیک منجر به کاهش فرکانس باززایی در گیاه نخل روغنی شد. بالاترین درصد انتقال در جنین‌ها (۳۱/۲۵٪) زمانی که با اولتراسونیک به مدت ۵ دقیقه تیمار شدند ایجاد شد. آنالیز PCR و هیبریداسیون ساترن حضور ژن‌های گزارشگر را در ژنوم گیاهان تراریخته تایید کرد.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۱-۳ مواد مورد استفاده:

۱-۱-۳ مواد گیاهی:

در این پژوهش بذور گیاه کلزا (*Brassica napus*) رقم Okapi از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۱-۳ مواد شیمیایی، آنزیم‌ها

مواد شیمیایی شامل IsoAmyl Alcohol, NaCl, PVP, CTAB, β -mercaptoethanol, Chloroform, Isopropanole, Ethanol و همچنین مواد محیط کشت MS شامل مواد ماکرو، مواد میکرو و مواد ویتامین و آهن از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان)، EDTA, Loading Buffer, Boric Acid, Etidium Bromid از شرکت Sinaclon (تهران-ایران)، مواد محیط کشت جهت کشت نمونه‌های باکتری شامل Peptone, Yeast extract از شرکت سپاهان طب (اصفهان، ایران)، آگارز از شرکت Invitrogen (آلمان)، آگار، آنتی بیوتیک‌ها شامل کانامایسین، ریفامپیسین و سفوتاکسیم از شرکت Duchefa (هارلم، هلند) خریداری گردید.

آنزیم Taq DNA Polymerase به همراه باقی مواد PCR شامل $10\times$ PCR, MgCl₂, dNTP, Ribonuclaease, 1kb DNA Ladder از شرکت فرمنتاز (کانادا) تهیه گردید. آغازگرهای مورد استفاده به سفارش شرکت تکاپوزیست و توسط شرکت سنتز گردید.

۳-۱-۳ تجهیزات مورد استفاده

شیکرانکوباتور Labnet (کره جنوبی)، اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، سانتریفیوژ

Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، ترازو Sartorius (فرانسه)، سمپلر ۱۰ μl، ۱۰۰ μl و ۱۰۰۰ μl
Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکر TaKara
(اتسو، ژاپن)، pH متر Hanna (مجارستان)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (memmert)
آلمان، ماکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل داگ Quantum ST4 (فرانسه)، ترانس ایلومینیتور (تهران،
ایران)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، یخچال- فریزر ۲۰- پارس و ژرminatور (تهران، ایران)،
دستگاه اولتراسونیک (آلمان)، اسپکتروفوتومتری (آلمان).

۲-۳ انتقال ژن و کشت بافت گیاهی

۱-۲-۳ مواد گیاهی و آماده سازی بذرها

به منظور تهیه ریزنمونه برای تراریختی بذرهای کلزا رقم Okapi پس از شست و شوی سطحی،
با استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضد عفونی شد. سپس دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل
صورت گرفت. بذرها توسط محلول وایتکس ۲۰٪ (حاوی ۱/۵٪ هیپوکلریت سدیم) به مدت ۱۵ دقیقه، بر
روی همزن استریل گردیدند و سه مرتبه و هر بار ۴ دقیقه توسط آب مقطر استریل شستشو شده، بر روی
کاغذ صافی استریل منتقل گردیدند و سپس در محیط کشت جوانه زنی که حاوی محیط MS $\frac{1}{2}$ (با غلظت
۵۰٪ نمکها و ساکارز) و بدون هورمونهای گیاهی بود، کشت شدند و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶
ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز نگهداری گردیدند، شکل
(۱-۳).



شکل ۳-۱: مراحل آماده‌سازی و کشت بذرهای کلزا برای تهیه ریزنمونه

۳-۲-۲ محیط کشت گیاهی MS

در این تحقیق محیط کشت گیاهی پایه، محیط MS (Murashing & Skoog, 1962) مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت MS از متداول‌ترین محیط‌های کشتی است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. تهیه محیط کشت MS با استفاده از محلول‌های مادری (Stock) عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین، انجام شد، جدول (۳-۱).

جدول ۱-۳: ترکیبات محیط کشت MS (Murashing & Skoog, 1962)

ترکیبات	غلظت محلول مادری (میلی گرم بر لیتر)
عناصر پر مصرف	
NH ₄ NO ₃	افزودن مستقیم ۱۶۵۰
KNO ₃	افزودن مستقیم ۱۹۰۰
CaCl ₂ .2H ₂ O	۴۴۰
MgSO ₄ .7H ₂ O	۳۷۰
KH ₂ PO ₄	۱۷۰
آهن	
Na ₂ EDTA	۳۷/۳
FeSO ₄ .7H ₂ O	۲۷/۸
عناصر کم مصرف	
MnSO ₄ .4H ₂ O	۲۲/۳
ZnSO ₄ .7H ₂ O	۸/۶
H ₃ BO ₃	۶/۲
KI	۰/۸۳
NaMoO ₄ .2H ₂ O	۰/۲۵
CuSO ₄ .5H ₂ O	۰/۰۲۵
CoCl ₂ .6H ₂ O	۰/۰۲۵
ویتامین ها	
G Lysine	۰/۰۰۲
Nicotinic acid	۰/۵
Pyridoxine- HCl	۰/۵
Thiamine- HCl	۰/۱
Myo- Inositol	افزودن مستقیم ۱۰۰

تهیه محیط کشت MS از مواد شیمیایی پایه وقت گیر و دشوار است ولی این مزیت را دارد که جهت تغییر اجزاء خاص محیط کشت انعطاف پذیر بوده و احتمالاً ارزان تر است. محیط کشت شامل سه دسته مواد اصلی است: مواد غذایی پر مصرف^۱، مواد غذایی کم مصرف^۲ و ویتامین‌ها. هریک از سه دسته مواد را به صورت محلول مادری^۳ و با غلظت خاص تهیه نموده و برای تهیه MS کامل استفاده می‌کنیم.

۳-۲-۳ محیط کشت‌های مورد نیاز در انتقال ژن به گیاه

در انتقال ژن به گیاه قبل از این که ریزنمونه را با آگروباکتریوم انکوبه کنیم از گیاه مورد نظر ریزنمونه تهیه کرده و در مدت زمان مشخص بسته به نوع گیاه به محیط MS حاوی هورمون‌های مشخص منتقل کرده که آن را محیط پیش کشت (PreC^۴) می‌نامند. سپس ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم تلقیح شده، در مدت زمان مشخص و در دمای ۲۵°C و در شرایط تاریکی به محیطی منتقل شده تا آگروباکتریوم در این مدت فرصت انتقال ژن مورد نظر به گیاه را داشته باشد که آن را محیط کشت هم‌کشتی (Coc^۵) می‌نامند. بعد از محیط هم‌کشتی ریزنمونه‌ها برای شروع باززایی و به دنبال آن تشکیل گیاهچه به محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر با غلظت‌های مشخص منتقل می‌شوند، که به آن محیط‌های القاء شاخه-زایی (SIM^۶) گفته می‌شود، طویل شدن شاخه (SEM^۷) نیز محیطی است برای طویل شدن گیاهچه‌های تراریخته احتمالی منتقل شده و در آخر نیز گیاهچه‌های تراریخته احتمالی طویل شده به محیطی برای ریشه دار شدن با ترکیب هورمونی مشخص منتقل می‌شوند که به آن محیط القاء ریشه‌زایی (RIM^۸)

(جدول ۳-۲)

¹ Macronutrients

² Micronutrients

³ Stock solution

⁴ Pre- culture medium

⁵ Co-Culture medium

⁶ Shoot induction medium

⁷ Shoot elongation medium

⁸ Root induction medium

جدول ۳-۲: طرز تهیه محیط‌های مورد نیاز در انتقال ژن

Compositions	PreC	CoC	SIM	SEM	RIM
MS salt	1x	1x	1x	0/5x	0/5x
Sucrose(g/l)	30	30	30	20	20
mioinositol(mg/l)	100	100	100	50	50
Agar(g/l)	8	8	8	8	8
AgNO ₃ (mg/l)	5	-	5	-	-
BAP(mg/l)	3	3	3	-	-
NAA(mg/l)	0/1	0/1	0/1	-	-
IBA(mg/l)	-	-	-	-	2
Cefotaxime(mg/l)	-	-	200	100	-
kanamycin(mg/l)	-	-	0,10,15,25	25	-
pH	5/8	5/8	5/8	5/6	5/6

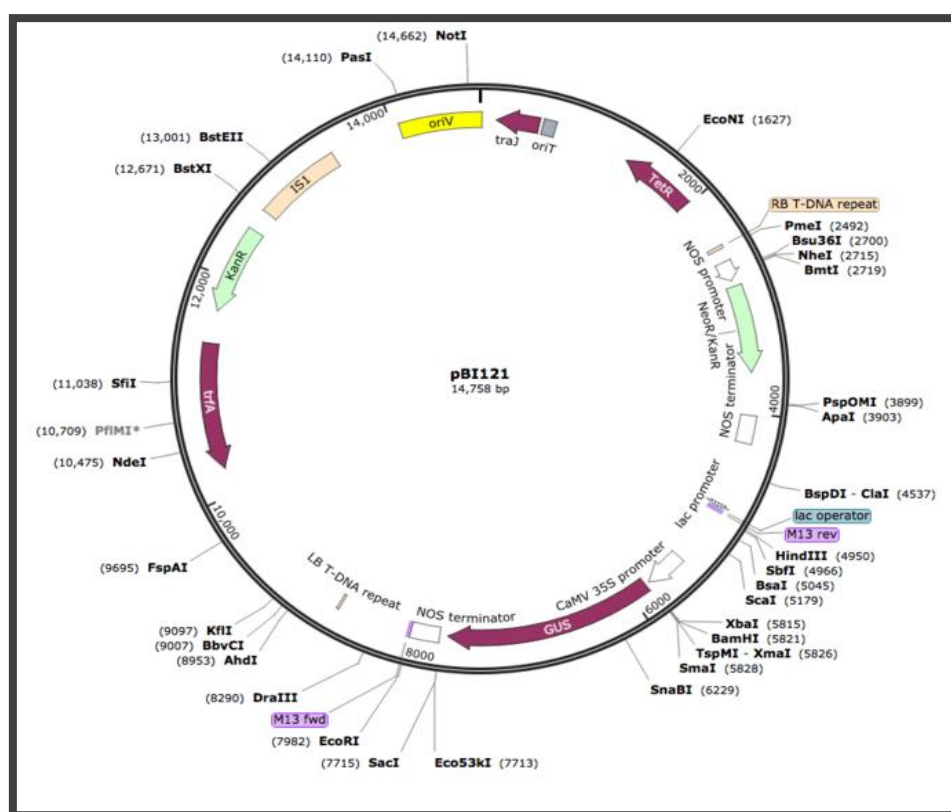
۳-۳ بخش مولکولی:

۳-۳-۱ سویه‌های باکتریایی

باکتری اشیریشیا کولی (*E. coli*) سویه DH5 α از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری به منظور نگهداری پلاسمید اصلی و *A. tumefaciens* سویه‌های LBA4404 (پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری)، EHA101 و GV3850 (دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری) برای انتقال سازه ژنی به گیاه کلزا تهیه شد.

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم استفاده شده، حاوی ژن مقاومت به ریفامپیسین در ساختار ژنوم خود هستند. پلاسمید pBI121 به روش انجماد و ذوب کردن به سویه‌های آگروباکتریوم مورد نظر منتقل شدند. ناقل pBI121 حاوی ناحیه T-DNA می‌باشد که برای انتقال ژن به ژنوم گیاه استفاده می‌شود. در

منطقه T-DNA ژن‌های نوئومایسین فسفوترانسفراز^۱ و *gus* (بتا- گلوکونیداز) همراه پیشبرنده CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS وجود دارد. هم چنین حاوی ناحیه‌ای جهت کلون نمودن قطعات می‌باشد (شکل ۲-۳). سویه‌های آگروباکتریوم خلع سلاح شده^۲ فوق دارای ژن‌های Vir برای انتقال منطقه T-DNA بوده ولی فاقد انکوژن‌های سرطان‌زا می‌باشند. به این صورت است که ژن هدف از طریق آگروباکتریوم به گیاه کلزا منتقل می‌شود.



شکل ۲-۳: نقشه پلاسمید pBI121 با طول ۱۴۷۵۸ bp حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین، تحت کنترل پروموتور CaMV35S و خاتمه دهنده NOS که موجب بیان ژن در سلول‌های موجودات پرسلولی می‌شود. این پلاسمید دارای مناطق مرزی چپ و راست موجود در پلاسمید Ti است، که در انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی نقش دارند (Kahrizi & Salmanian, 2008).

¹ NPTII

² Disarmed

۲-۳-۳ تهیه ذخیره (Stock) از کشت شبانه باکتری

به منظور تهیه ذخیره (Stock) جهت نگهداری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، میزان ۷۰۰ µl از کشت مایع شبانه باکتری در شرایط کاملاً استریل با ۳۰۰ µl گلیسرول استریل شده (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه، در اتوکلاو) بطور کامل مخلوط گردید و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

۳-۳-۳ محیط کشت باکتری

۱-۳-۳-۳ تهیه محیط LB (Lauri & bertani)

محیط کشت LB یک محیط نامعین^۱ است، به این معنی که هویت و کیفیت مواد آن مشخص نیست. این مساله به این علت است که دو تا از مواد سازنده آن به نام پپتون^۲ و عصاره مخمر^۳ مخلوطی پیچیده از مواد شیمیایی ناشناخته هستند (Brown, 1998) از این محیط کشت برای کشت باکتری *E. coli* و آگروباکتریوم برای مراحل تراریختی استفاده شد. ترکیب محیط کشت به شرح زیر است:

جدول ۳-۳: ترکیب محیط کشت LB

Peptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
حجم کل	1 Lit

حجم مواد مورد نظر به حجم یک لیتر (با اضافه کردن آب مقطر) رسانده شد. برای تهیه محیط

¹ Undefined medium

² Peptone

³ Yeast extract

کشت LB جامد علاوه بر مواد مورد استفاده در LB مایع، ۱۰ گرم در لیتر آگار نیز اضافه می‌شود. میزان pH در دو محیط به کمک سود (NaOH) یک نرمال بر روی ۷/۴ تنظیم و برای مدت زمان ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شدند. در صورت نیاز، آنتی بیوتیک‌های لازم پس از پایین آمدن دمای محیط کشت به آن اضافه گردید.

۳-۳-۴ آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

برای اضافه کردن آنتی بیوتیک به محیط‌های جامد، دمای محیط باید حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد. دمای بالاتر موجب تخریب آنتی بیوتیک می‌شود. پلیت‌های حاوی محیط کشت که واجد آنتی بیوتیک می‌باشند، تا یک هفته در یخچال نگهداری شدند، نگهداری در مدت زمان بیشتر منجر به کم شدن اثر آنتی بیوتیک در محیط کشت می‌شود.

سویه‌های آگروباکتریوم GV3850, EHA101, LBA4404 در ساختار ژنوم خود دارای ژن مقاومت به ریفامپیسین می‌باشند، که از این آنتی بیوتیک نیز به عنوان نشانگر انتخابی سویه آگروباکتریوم استفاده شد.

سفوتاکسیم برای کنترل رشد آگروباکتریوم استفاده می‌شود که به صورت بسته‌های استریل وجود دارد که با اضافه کردن آب مقطر به آن محلول 200 mg.ml^{-1} تهیه شد. در جدول (۳-۴) میزان آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در محیط کشت LB و MS مشخص شده است.

جدول ۳-۴: غلظت محلول‌های مادری و موارد استفاده آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت‌های مختلف

نام آنتی‌بیوتیک	غلظت محلول مادری	غلظت مورد استفاده در محیط کشت	
		LB(mg/l ⁻¹)	MS(mg. l ⁻¹)
Kanamycin	50(mg.ml ⁻¹) DDW	50	10, 15, 25
Rifampicin	100 (mg.ml ⁻¹) DDW	50	–
Cefotaxim	200 (mg.ml ⁻¹) DDW	–	200, 100

لازم به ذکر است که کانامایسین به عنوان یک نشانگر انتخابی برای مرحله تراریختی گیاهان نیز استفاده می‌شود و گیاهچه‌های تراریخت در حضور کانامایسین رشد کرده و سبز می‌مانند، اما گیاهچه‌های غیر تراریخت سفید شده و رشد آن‌ها متوقف می‌شود (که‌ریزی و همکاران، ۲۰۱۰).

۳-۳-۵ استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation

برای به دست آوردن پلاسمیدها در این تحقیق از روش Mini-Preparation استفاده گردید. این روش در مقایسه با سایر روش‌های تخلیص پلاسمید به زمان کمتری نیاز دارد و در ضمن غلظت و خلوص پلاسمید در پایان استخراج مناسب می‌باشد. در این روش، تخلیص پلاسمید با استفاده از سه محلول به نام محلول I، محلول II و محلول III صورت می‌گیرد. این محلول‌ها به ترتیب مسئول آماده سازی سلول، لیز نمودن سلول و واسرشت کردن پروتئین‌های سلول و DNAهای کروموزومی می‌باشند. این روش بر اساس لیز قلیایی سلول‌ها، حذف مواد زائد و در نهایت تغلیظ DNAهای پلاسمیدی با استفاده از آب‌گیری از محیط، توسط اتانول استوار است (Sambrook & Russei, 2001).

جدول ۳-۵: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ میلی لیتر محلول I استخراج پلاسمید (GET buffer)

مقادیر (گرم)	غلظت (میلی مولار)	مواد مورد نیاز
۹/۰۰۷	۵۰	Glucose
۲/۹۲۲	۱۰	EDTA
۳/۹۴	۲۵	(pH=8) Tris-HCl

جدول ۳-۶: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱ میلی لیتر از محلول II جهت استخراج پلاسمید (Lyses buffer)

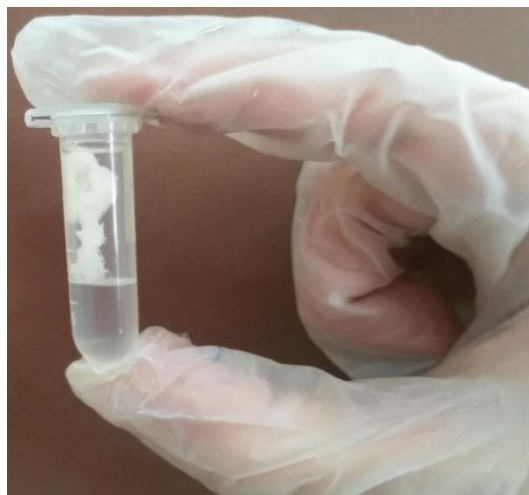
مقادیر (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۴۰	هیدروکسید سدیم ۵ نرمال
۱۰۰	۱ درصد SDS
۸۶۰	آب دیونیزه

جدول ۳-۷: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از محلول III جهت استخراج پلاسمید

مقادیر (میلی لیتر)	مواد مورد نیاز
۶۰	استات پتاسیم ۵ مولار
۱۱/۵	اسید استیک
۲۸/۵	آب دیونیزه

مراحل استخراج پلاسمید به شرح زیر می‌باشد:

- ۱- پس از کشت باکتری در محیط حاوی آنتی بیوتیک انتخابی یک تک کلون برداشته و در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه گردید.
- ۲- ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع باکتری به میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل و به مدت ۸ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید.
- ۳- محلول رویی خارج شده و میکروتیوب به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار داده شد، تا رطوبت آن گرفته شود.
- ۴- از محلول سرد شماره ۱ (جدول ۳-۵)، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.
- ۵- از محلول شماره ۲، که به صورت تازه تهیه شده بود (جدول ۳-۶) ۳۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب‌ها افزوده گردید و چند مرتبه مخلوط گردید.
- ۶- مجدداً میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. بعد از طی شدن زمان مورد نظر درب میکروتیوب‌ها را باز کرده و مشاهده حالت چسبندگی (کش آمدن) نشانه‌ی لیز شدن باکتری است.
- ۷- مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۳ (جدول ۳-۷) به صورت کاملاً سرد، به مخلوط داخل میکروتیوب‌ها اضافه و پس از چند مرتبه مخلوط شدن، دوباره به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. در این مرحله باقیمانده توده باکتری که اکثراً پروتئین‌ها هستند توسط pH اسیدی واسرشت شده که این واسرشتی با تشکیل یک حالت ابری در نمونه نمایان گردید (شکل ۳-۳).



شکل ۳-۳: واسرشت شدن پروتئین‌ها توسط pH اسیدی و تشکیل حالت ابری

۸- پس از این مرحله ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد

صورت پذیرفت.

۹- مایع فوقانی را به میکروتیوب جدید منتقل کرده و مقدار ۴۵۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم:

ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به مایع افزوده و بعد چند بار تکان دادن، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm

دور در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. در این مرحله کل پروتئین‌ها اعم از محلول و غیر

محلول، قطبی و غیر قطبی توسط کلروفرم موجود واسرشت شده و از DNA جدا شدند و در فاز پایینی

قرار گرفتند.

۱۰- محلول فوقانی جداگردید و به میکروتیوب جدید منتقل گردید. دو برابر حجم ایزوپروپانول

سرد اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۱۱- پس از یک ساعت، ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ و محلول رویی خارج شد.

اتانول با خاصیت آبگیری، باعث شده تا آب اطراف مولکول‌های DNA گرفته شود.

۱۲- رسوب با یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. اتانول بطور کامل خارج گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند.

۱۳- در انتها ۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به رسوب باقیمانده افزوده شد.

۳-۳-۱ الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید

جهت بررسی کمیت و کیفیت پلاسمید استخراجی از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ با ولتاژ ۸۰ میلی ولت به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. در شرایط ایده آل الگوی سه بانندی مربوط به اشکال مختلف پلاسمید شامل سوپرکویل^۱، خطی^۲ و حلقوی^۳ مشاهده می‌گردد.

۳-۳-۶ انتقال پلاسمید به آگروباکتریوم

برای تراریختی آگروباکتریوم، روش استاندارد انجماد و ذوب و با استفاده از CaCl_2 ۲۰ میلی مولار و ازت مایع استفاده شد (Sambrook & Rusell, 2001). آماده سازی سلول باکتری و تراریختی به شرح زیر انجام گردید:

۱- تک کلنی *A. tumefaciens* سویه‌های LBA4404, EHA101, GV3850 به طور جداگانه در

۵ml محیط LB حاوی آنتی بیوتیک‌های مناسب (ریفامپیسین و کانامایسین) برای مدت حدود ۱۰ ساعت کشت داده شد.

۲- ۲ml از سوسپانسیون سلولی به ۵۰ml محیط جدید در ارلن (۵۰ml) استریل اضافه شد و روی

¹ Supercoiled

² Nicked

³ Open Circle

شیکر با دور rpm ۲۵۰ در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تا هنگام رسیدن به OD مناسب (OD₆₀₀= 0.5-1) قرار داده شد.

۳- سوسپانسیون سلولی روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه سرد شد.

۴- سپس در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ گردید.

۵- روشناور حذف و رسوب سلولی در ۱ml محلول از CaCl₂ ۲۰ میلی مولار سرد شده حل گردید.

۶- سوسپانسیون سلولی در ویال‌های ۱/۵ml (۱۰۰ µl) توزیع شد.

۷- مقدار ۳-۴ میکرولیتر پلاسمید pBI121 به هر ویال افزوده شد، به آرامی مخلوط شده و سپس در نیتروژن مایع قرار داده شد تا مجموعه کاملاً یخ بزند.

۸- ویال‌ها با قرار دادن در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه ذوب شدند.

۹- یک میلی لیتر محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک به نمونه‌ها افزوده و روی شیکر با دور rpm ۱۵۰ در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳-۴ ساعت قرار داده شد.

۱۰- در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و روشناور حذف گردید.

۱۱- سوسپانسیون سلولی بر روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک انتخابی (کانامایسین) کشت داده شد.

۱۲- کشت‌ها به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند.

۱۳- تک کلنی‌های مقاوم در محیط کشت مایع و حاوی کانامایسین کشت داده شد.

۱۴- باکتری را در گلیسرول ذخیره و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳-۳-۷ کشت و آماده سازی آگروباکتریوم حاوی پلاسمید مورد نظر:

از آگروباکتریوم‌های دارای ناقل pBI121، کشت شبانه در محیط LB مایع دارای ۵۰ mg/l کانامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر ۱۸۰ rpm انجام شد. زمانی که OD₆₀₀ برابر با ۰/۶-۰/۸ شد، محیط LB با سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ rpm و دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه حذف گردید. رسوب سلول‌های باکتری در محیط مخصوص آلوده سازی آگروباکتریوم که شامل محیط MS¹ بود، به صورت سوسپانسیون در آمد و به نسبت‌های ۱:۲ رقیق شده و جهت تراریختی از آن‌ها استفاده گردید.

۳-۴ تراریخت کردن ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای (کوتیلدونی^۱)

در تحقیق حاضر از روش ملونی و همکاران برای تراریختی گیاه کلزا استفاده گردید (Moloney *et al.*, 1989). برگ‌های لپه‌ای ۵ روزه، بعد از حذف جوانه انتهایی جدا و به محیط پیش کشت (MS حاوی ۳ mg.l⁻¹ BAP^۲، ۱ mg.l⁻¹ NAA^۳، ۵ mg.l⁻¹ AgNO₃، ۸ گرم در لیتر آگار با pH=5.8 و فاقد آنتی‌بیوتیک) منتقل شد به طوری که مقداری از دمبرگ در محیط فرو رفته باشد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در شرایط ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت انجام تراریختی، کشت آگروباکتریوم در محیط LB مایع حاوی ۵۰ mg.l⁻¹ کانامایسین و ۵۰ mg.l⁻¹ ریفامپسین، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm انجام شد. رسوب سلول‌های باکتری در محیط مخصوص آلوده سازی آگروباکتریوم که شامل محیط MS¹، فاقد هورمون و حاوی ۰/۱ میلی مولار استوسرینگون و با pH=5.5 به صورت سوسپانسیون در آمده و جهت تراریختی از

¹ Cotyldon

² Benzyl amino purine

³ 1-Naphthalene acetic acid

آن استفاده گردید.

دمبرگ‌های کوتیلدونی به مدت ۴۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار داده شدند و سپس به محیط هم‌کشتی (محیط MS حاوی 3 mg.l^{-1} هورمون BAP و 0.1 mg.l^{-1} NAA و فاقد آنتی بیوتیک) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مرحله برای اعمال تیمارهای اولتراسونیک ابتدا از کشت سویه آگروباکتریوم در غلظت ۰/۸ $\text{OD}_{600\text{nm}} =$ رسوب تهیه شد، سپس رسوب در محیط تلقیح ($\frac{1}{2}$ MS) حاوی ۰/۱ میلی مولار استوسرینگون حل شد سپس ریزنمونه‌های کوتیلدونی (برای هر تیمار ۵۰ ریزنمونه) در لوله فالکون حاوی سوسپانسیون تلقیح، در معرض تیمارهای مختلف اولتراسونیک (۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ ثانیه) قرار داده شدند و بعد از آن ریزنمونه‌ها به مدت ۴۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون تلقیح نگهداری شدند. بعد از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، به محیط هم‌کشتی (محیط پیش کشت حاوی 5 mg.l^{-1} AgNO_3) منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۳-۴-۱ باززایی گیاهان تراریخت

پس از مرحله هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط القای شاخه‌زایی (محیط MS حاوی 3 mg.l^{-1} هورمون BAP و 0.1 mg.l^{-1} NAA 200 mg.l^{-1} آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و بدون کانامایسین و 5 mg.l^{-1} AgNO_3) منتقل شدند بعد از مدت ۱۰ روز سازگار شدن گیاه با این شرایط ریزنمونه‌ها به محیط کشتی حاوی کانامایسین 10 mg.l^{-1} منتقل شدند و هر دو هفته به محیط جدید با میزان کانامایسین بالاتر (۱۵ و 25 mg.l^{-1}) واگشت گردیدند.

بعد از ۶ هفته، شاخه‌های باززا شده از قاعده دمبرگ‌های لپه‌ای جدا شده و به محیط طویل شدن شاخه منتقل شدند. پس از دو هفته نوساقه‌ها به محیط القای ریشه‌زایی واگشت شدند. پس از تشکیل ریشه‌ها،

گیاهچه‌های ریشه‌دار به گلدان‌های حاوی پرلایت، خاک برگ و خاک (ترکیب یکسانی از هر کدام) منتقل شدند و تا زمان بذر دهی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری شدند. هنگام انتقال گیاهچه‌ها به خاک باید توجه نمود که حداقل تنش به آن‌ها وارد شود. بعد از جدا نمودن ریشه‌ها از آگار، ریشه‌ها توسط آب شست‌وشو شدند تا آگار اطراف آن‌ها کاملاً حذف گردد، چرا که باقی ماندن آن می‌تواند باعث بروز آلودگی گردد. درجه حرارت مناسب و رطوبت نسبی بالا در اوایل مرحله انتقال می‌تواند باعث کاهش تلفات گیاهان تراریخت گردد. به منظور حفظ رطوبت گیاهان تازه منتقل شده روی آن‌ها را به مدت یک تا دو هفته با پلاستیک پوشانده شد.

۲-۴-۳ بررسی مولکولی گیاهان تراریخته

۱-۲-۴-۳ استخراج DNA ژنومی به روش CTAB^۱

برای استخراج DNA ژنومی گیاه به دلیل اندازه بزرگ ژنوم گیاهی بایستی به گونه‌ای از سلول استخراج شود که تا حد امکان حداقل صدمه یا شکستگی به آن وارد شود. علاوه بر آن ترکیبات فنلی موجود در دیواره سلول گیاهی در حین استخراج DNA به درون محلول استخراج شده وارد می‌شوند. این ترکیبات فنلی در مراحل بعدی دستکاری‌های DNA اعم از PCR و هضم‌های آنزیمی مزاحمت فراوان از طریق غیر فعال کردن آنزیم‌ها به وجود می‌آورند. لذا در استخراج DNA ژنومی بایستی از روشی استفاده شود که اولاً DNA ژنومی سالم به دست آید و ثانیاً ترکیبات فنلی تا حد امکان در محلول استخراج شده حضور نداشته باشند. بنابراین جهت اثبات تراریخت بودن گیاهان ترانسفورم شده و حضور ژن‌های *gus* و *nptII* DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه کلزای تراریخت و شاهد غیر تراریخت با استفاده از

¹ Cethyl Trimethyl ammonium bromide

روش CTAB (Murray & Thompson, 1980) استخراج گردید. ترکیب اصلی در این روش یک ماده شوینده^۱ CTAB می‌باشد، که علاوه بر این خاصیت، با دارا بودن بارهای مثبت می‌تواند اطراف مولکول‌های DNA را که بار منفی دارند بپوشاند که این عمل DNA را تا حد زیادی از سایر ترکیبات جدا می‌نماید.

روش کار به این صورت است:

۱- یک گرم بافت تازه برگ را وزن نموده و در ازت مایع درون هاون چینی که قبلاً در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۱/۲ بار اتوکلاو گردیده بود، پودر گردید.

۲- پودر حاصل به میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل گردید. ۱ میلی لیتر بافر استخراج CTAB حاوی ۰.۲٪ پودر CTAB، Tris-base ۱ مولار، NaCl ۵ مولار و EDTA ۰/۵ مولار با pH=8، به نمونه اضافه گردید و کاملاً ورتکس شد تا همگن گردید.

۳- نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۴- به مخلوط فوق ۲/۵ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به میکروتیوب افزوده گردیده و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت.

۵- سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm صورت پذیرفت.

۶- فاز رویی به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و ۸۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم و ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴ به آن افزوده شد و چند مرتبه به آرامی معکوس گردید، تا کلروفرم کاملاً مخلوط شود.

۷- سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در این مرحله ۳ فاز تشکیل شد (فاز

¹ Detergent

روی شامل محلول DNA- RNA، فاز میانی شامل پروتئین و کربوهیدرات‌ها و فاز زیری شامل کلروفرم). فاز رویی به آرامی برداشته شد و به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید.

۸- جهت رسوب DNA، ۳۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۷/۵ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول کاملاً سرد افزوده شد، مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۹- سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید، رسوب DNA در انتهای میکروتیوب تشکیل گردید.

۱۰- فاز رویی حذف شد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به رسوب افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ تکرار شد.

۱۱- فاز رویی مجدداً برداشته شد و شستشوی مجدد این بار با الکل ۷۰٪ صورت پذیرفت

۱۲- سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ صورت گرفت.

۱۳- فاز رویی کاملاً خارج شد و میکروتیوب به مدت نیم ساعت به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی استریل قرار گرفت تا پلیت کاملاً خشک شود.

۱۴- بعد از اطمینان از تبخیر کامل الکل، ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه به میکروتیوب افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

۳-۴-۳ بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی

آگاهی از غلظت و کیفیت DNA به دست آمده برای مراحل بعدی، حائز اهمیت است. جهت

تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید.

۳-۴-۳-۱ بررسی کمیت DNA توسط اسپکتروفتومتری

در این روش، غلظت و خلوص DNA به صورت کمی با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می گردد. ابتدا دستگاه با استفاده از حلال DNA - آب مقطر - کالیبره گردید. در این روش از رقت ۱ به ۱۰۰ نمونه DNA در آب مقطر استفاده شد. مقدار اشعه ماورابنفش جذب شده توسط محلول با مقدار DNA موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. در این طول موج یک واحد جذب، معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته‌ای در هر میلی لیتر است. از اسپکتروفتومتر جهت بررسی خلوص DNA هم می توان استفاده کرد. در نمونه DNA خالص، نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱/۸ می باشد. میزان جذب نور ۲ میکرولیتر از نمونه DNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ محاسبه گردید. کمیت نمونه DNA با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{ضریب رقت} / \text{OD}_{260} \times 50 = (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \text{ غلظت DNA}$$

۳-۴-۳-۲ بررسی کیفیت DNA توسط الکتروفورز با ژل آگارز

جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی و تعیین میزان آلودگی از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید. هرچه میزان کشیدگی کمتر باشد، نشانگر کیفیت بالای استخراج است. همچنین وجود آلودگی در نمونه استخراجی، باعث ایجاد خطا در کارهای مولکولی می گردد. لذا تعیین کیفیت از اهمیت بالایی برخوردار است. ۵ میکرو لیتر از نمونه DNA به همراه نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp بر روی ژل آگارز ۱٪، در جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید صورت گرفت. بعد از رنگ آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل، DNA مورد نظر از نظر شکستگی بررسی گردید.

برای تهیه بافر الکتروفورز (بافر TBE) که به صورت استوک 5X تهیه و نگهداری می‌گردد، 54 گرم Tris base، 27/5 گرم اسید بوریک و 20 میلی لیتر EDTA 0/5 مولار با pH=8، مخلوط و به حجم 750 میلی لیتر رسانده شد. pH محلول روی 8 تنظیم گردید. سپس با آب مقطر به حجم 1 لیتر رسانده شد (این استوک به صورت 1X مصرف می‌گردد).

برای تهیه ژل آگارز 1 درصد، 1 گرم آگارز به 100 میلی لیتر بافر TBE اضافه و برای ذوب شدن در ماکروویو قرار داده شد. پس از شستن شانه و سینی ژل با استفاده از آب مقطر استریل و بستن دو سمت آزاد سینی، آگارز ذوب شده به قطر نیم سانتی متر ریخته شد. پس از بستن کامل ژل، شانه به آرامی کشیده شد و ژل درون تانک حاوی بافر TBE به گونه‌ای قرار داده شد که بافر حدود یک میلی متر سطح ژل را بپوشاند. 5 میکرولیتر نمونه با 1 میکرولیتر بافر بارگذاری¹ مخلوط و درون چاهک ژل بارگذاری گردید.

3-4-4 استفاده از RNase جهت حذف RNA

برای حذف RNA از DNA استخراجی، از RNase استفاده گردید. 3 میکرولیتر RNase به میکروتیوب حاوی DNA افزوده شد و به مدت 30 دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. در نهایت برای غیر فعال سازی آنزیم به مدت 10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

3-5 آنالیز گیاهان تراریخت

به منظور اطمینان و تایید تراریخت بودن گیاهان باززایی شده آنالیزهای PCR با آغازگرهای اختصاصی روی گیاهان انتخابی انجام شد.

¹ Loading dye

۳-۵-۱ آغازگرهای داخلی طراحی شده و آزمون PCR برای ژن‌های *nptII* و *gus*

حضور این ژن‌ها با استفاده از روش PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی اثبات گردید.

مشخصات آغازگرهای داخلی طراحی شده برای ژن‌های *nptII* و *gus* مطابق جدول (۳-۸) می‌باشد:

جدول ۳-۸: آغازگرهای داخلی طراحی شده برای ژن‌های *nptII* و *gus*

ژن	آغازگر	توالی آغازگر	%GC	TM	سایز قطعه تکثیری
Neomycin phosphotransferase II	Forward	GTCGCCTAAGGTCACCTATCAGCTAGC	53/9%	59/7	۱۳۴۱bp
	Reverse	ATGTTTGAACGATCGGGGATCATG	45/8%	62/5	
β -glucuronidase	Forward	GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG	52.2	57.1	521bp
	reverse	CCGGCATAGTTAAAGAAATCATG	39.1	52.1	

برای انجام واکنش PCR از روش ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد (جدول ۳-۹).

جدول ۳-۹: مواد مورد نیاز آزمون PCR

مواد مورد استفاده	مقدار
Template (plant genomic DNA and pBI121)	1 μ l
Primer F (10 pmol)	1 μ l
Primer R (10 pmol)	1 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 μ l
Taq DNA Polymerase Buffer (10X)	2.5 μ l
dNTP (10 mM)	0.5 μ l
Taq DNA Polymerase (5 μ unit/ μ l)	0.5 μ l
DDW	17 μ l
Total	25 μ l

شرایط بهینه انجام واکنش PCR برای ژن *nptII* و *gus*

شرایط بهینه برای ژن *nptII* به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴°C، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۸°C و بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲°C) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت.

شرایط بهینه برای ژن *gus* به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵°C، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۹°C و بسط ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲°C) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت.

جدول ۳-۱۰: پروفایل دمایی مورد استفاده در واکنش PCR برای ژن *nptII* و *gus*

مرحله	مرحله واکنش	ژن	دما (°C)	زمان (دقیقه)
مرحله اول	واسرشت‌سازی اولیه	<i>nptII</i>	۹۵	۵ min ^۱
		<i>gus</i>		
مرحله دوم	واسرشت‌سازی	<i>nptII</i>	۹۴	۱ min
		<i>gus</i>	۹۵	۴۵sec ^۲
	اتصال	<i>nptII</i>	۵۸	۱ min
		<i>gus</i>	۵۹	۴۵sec
	بسط	<i>nptII</i>	۷۲	۱ min
		<i>gus</i>	۷۲	۴۵sec
مرحله سوم	بسط نهایی	<i>nptII</i>	۷۲	۱۰ min
		<i>gus</i>		

^۱ minute

^۲ second

۳-۶ تجزیه آماری داده‌ها:

در بخش اول این تحقیق جهت بررسی تاثیر نوع سویه باکتری *A. tumefaciens* بر فراوانی انتقال ژن در گیاه کلزا رقم Okapi آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. سویه‌های مورد بررسی در این آزمایش همان‌گونه که در مطالب قبلی بیان شد LBA4404, EHA101, GV3850 بودند. در بخش دوم این تحقیق برای بررسی تاثیر تیمارهای مختلف اولتراسونیک در ۵ سطح (۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ ثانیه) بر فراوانی انتقال ژن در گیاه کلزا رقم Okapi آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و رسم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel انجام شد.

فصل چہارم

نتایج و بحث

۱-۴ غربالگری کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب pBI121

انتقال سازه ژنی مورد نظر به آگروباکتریوم سویه‌های LBA4404, EHA101, GV3850 به روش انجماد و ذوب صورت گرفت و پس از رشد تک کلون‌های آگروباکتریوم بر روی محیط جامد LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (50 mg.l^{-1}) و ریفامپیسین (50 mg.l^{-1}) شکل (۱-۴)، برای تایید بیشتر حضور سازه در تک کلون رشد کرده، مقداری از تک کلون برای واکنش Colony PCR (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی) استفاده شد و مقدار باقی مانده از کلونی علامت گذاری گردید و بر روی پلیت به رشد ادامه داد و از کلونی‌های با نتیجه PCR مثبت استوک گلیسرول تهیه شد.

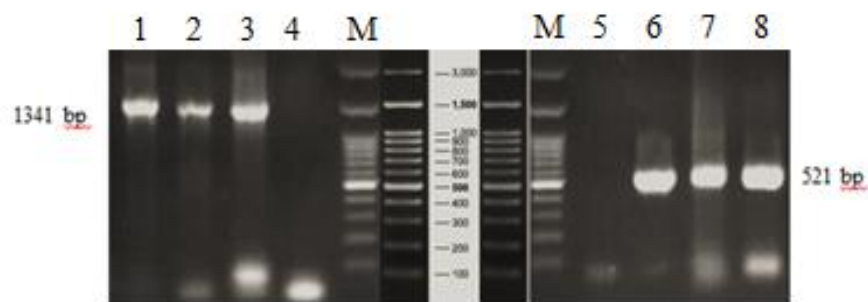


شکل ۱-۴: رشد آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 روی محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین

۲-۴ تایید کلون‌های نو ترکیب سویه‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121

از آنجا که هر کدام از سویه‌های باکتری در محیط دارای دو آنتی بیوتیک کشت داده شده‌اند. تا حدود زیادی می‌توان به صحت ترانسفورم شدن سویه‌ها مطمئن شد (شکل ۱-۴)، اما برای حصول

اطمینان بیشتر آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *nptIII* و *gus* انجام شد و محصولات واکنش نیز بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید (شکل ۴-۲). حضور تک باند در اندازه مورد نظر (تکثیر یک قطعه حدود ۵۲۱ bp توسط آغازگرهای *gus* و ۱۳۴۱ bp توسط آغازگرهای *nptIII*) ترانسفورم شدن کلونی‌های انتخابی را تایید کرد. عکس ژل حاصل نشان می‌دهد که شرایط PCR صحیح بوده و همه سویه‌های باکتری دارای پلاسمید نو ترکیب هستند و آلودگی در ضمن کار نیز وجود ندارد.



شکل ۴-۲: نتایج آزمون کلنی PCR سویه‌های مختلف آگروباکتریوم واجد ژن‌های *nptIII* و *gus*. شکل سمت چپ (آغازگرهای اختصاصی *nptIII*)، M: مارکر مولکولی ۳۰۰۰ bp، خطوط 1 و 2 و 3 به ترتیب کلونی‌های GV3850، EHA101، LBA4404 ترانسفرم شده با آغازگر *nptIII*، خط 4: کنترل منفی (باکتری فاقد پلاسمید). شکل سمت راست (آغازگرهای اختصاصی *gus*)، خطوط 6 و 7 و 8 به ترتیب کلونی‌های GV3850، EHA101، LBA4404 ترانسفرم شده با آغازگر *gus*، خط 5: کنترل منفی (باکتری فاقد پلاسمید).

۳-۴ تراریخت کردن گیاهان با استفاده از روش مبتنی بر آگروباکتریوم

روش انتقال به واسطه آگروباکتریوم امروزه به طور گسترده‌ای جهت تراریخت گیاهان (خصوصاً دولپه‌ای‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Fischer & schillberg, 2004). یکی از فاکتورهایی که در فرایند انتقال ژن از اهمیت زیادی برخوردار است، نوع ریزنمونه و میزان باززایی گیاه است. در این پژوهش از ریزنمونه‌های کوتیلدونی ۵ روزه کلزا استفاده گردید. برگ‌های لپه‌ای از گیاهچه‌های ۵ روزه استریل جدا

شده پس از حذف مریستم انتهایی روی محیط کشت اولیه (پیش کشت) کشت شدند. پس از سه روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی جهت هم‌کشتی با سویه‌های آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳: مراحل تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون گیاه کلزا با آگروباکتریوم الف: جوانه‌های ۵ روزه ب: جدا نمودن کوتیلدون‌ها از منطقه جوانه انتهایی ج: کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط کشت

در گزارشاتی که برای باززایی گیاه کلزا ارائه شده است (Moloney *et al.*, 1989, Radchuk *et al.*, 1990) از ریزنمونه‌های متنوعی استفاده شده است که از میان انواع ریزنمونه‌ها، برگ کوتیلدونی و هیپوکوتیل از میزان باززایی بالاتری برخوردار است. از بین این دو ریزنمونه هم، ریزنمونه کوتیلدون دارای فراوانی باززایی و تراریختی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها گزارش شده است (Cardoza & Stewart, 2003; Monoley *et al.*, 1989; زبرجدی و همکاران، ۱۳۸۴). مزیت استفاده از این ریزنمونه نسبت به ریزنمونه‌های دیگر به این دلیل است که درصد زنده ماندن آن‌ها پس از هم‌کشتی با باکتری و بعد از انتقال آن به محیط انتخابی نسبت به ریزنمونه‌های دیگر، بیشتر می‌باشد.

در هنگام آماده سازی ریزنمونه‌ها باید دقت شود تا مریستم انتهایی، در انتهای دمیرگ باقی نماند زیرا به

دلیل رشد سریع ناحیه مریستمی و تشکیل جوانه‌های نابجا، با آنتی‌بیوتیک انتخابی مخصوص گیاه تراریخته کنترل نمی‌شود و ممکن است جوانه‌های نابجا با جوانه‌های باززایی شده تراریخت اشتباه گرفته شوند. همین‌طور چنانچه انتهای دمبرگ بیش از حد قطع گردد، از توان باززایی کاسته می‌شود.

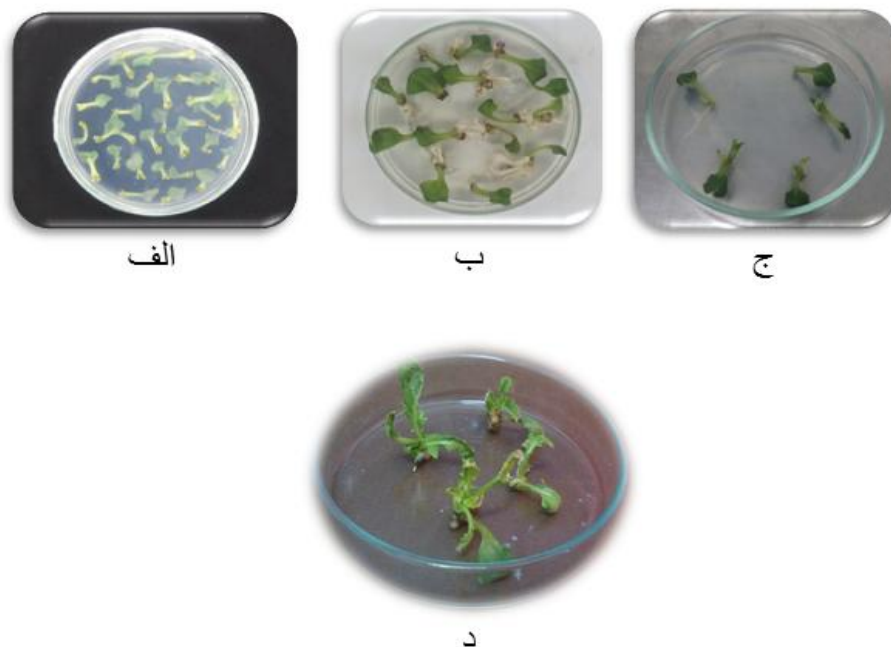
در خصوص پیش‌کشت ریزنمونه‌ها، برگ‌های کوتیلدونی حساسیت بالایی به هم‌کشتی با باکتری دارند و در فرایند انتقال ژن دیده شده است که برای جلوگیری از نکرور شدن ریزنمونه‌ها بعد از تلقیح با آگروباکتریوم، آن‌ها را قبل از هم‌کشتی با آگروباکتریوم، پیش‌کشت می‌کنند (Cardoza & Stewart, 2003). دلیل پایین بودن فراوانی تراریختی در حالتی که بلافاصله پس از برش کوتیلدون، وارد فرایند آلودگی و انتقال ژن می‌شود (بدون پیش‌کشت) را می‌توان به صورت ذیل بحث نمود. چنانچه پس از قطع کردن کوتیلدون، مستقیماً توسط آگروباکتریوم آلوده شود، با توجه به این‌که میزان مواد فنولیک ترشح شده از ریزنمونه به حد لازم نبوده، در نتیجه اثر متقابل قابل قبولی بین عوامل آگروباکتریوم و مواد فنولیک وجود نخواهد داشت، بنابراین فراوانی تراریختی کاهش می‌یابد. به‌طور کلی می‌دانیم که انتقال ژن از آگروباکتریوم به گیاه توسط بیان ژن‌های ناحیه Vir صورت می‌گیرد و تحریک بیان این ژن‌ها به مواد فنولیک ترشح شده از گیاه زخمی مربوط می‌شود. هرچه این مواد فنولیکی که از گیاه آزاد می‌شود بیشتر باشد، طبیعتاً احتمال تحریک و بیان ژن‌های Vir بیشتر شده و احتمال انتقال ژن مورد نظر به گیاه و ترانسفورم شدن گیاه نیز بیشتر می‌شود و بالعکس. پس وجود بافت زخمی و ترشح مواد فنولیک (به‌ویژه استوسرینگون) شرط اولیه تراریختی به واسطه آگروباکتریوم می‌باشد (که‌ریزی و همکاران، ۲۰۱۰). در این پژوهش بر طبق گزارشات کاردوزا و همکاران (۲۰۰۳) و مینگ و همکاران (۲۰۰۵) مدت زمان پیش‌کشت ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد.

برای حصول نتایج بهتر، بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، ریزنمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط

MS حاوی هورمون مناسب و فاقد آنتی‌بیوتیک و در دمای 25°C و در تاریکی رشد داده شدند که بهترین مدت زمان برای هم‌کشتی می‌باشد (Kong *et al.*, 2009). زیرا حداقل زمان لازم برای فعالیت پروتئین‌های Vir و انتقال T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی، ۱۶ ساعت می‌باشد و در شرایط فوق آگروباکتریوم با سهولت بیشتری ژن را به گیاه منتقل می‌کند (Khosravi *et al.*, 2012; Goleyjani Moghaddam *et al.*, 2012).

غلظت محلول باکتری یکی دیگر از عواملی است که در فرایند انتقال ژن به گیاه باید مورد توجه قرار گیرد. در آزمایشات انتقال ژن به کلزا معمولاً OD مناسب بین 0.3×10^8 - 0.8×10^8 است. این موضوع توسط وانگ و همکاران (۲۰۰۵)، الوی و همکاران (۲۰۰۵)، کاردوزا و استوارت (۲۰۰۳)، نشان داده شده است.

بر روی محیط کشت تلقیح، بعد از دو روز در قاعده دمبرگ‌ها اندکی تورم دیده شده است. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (حاوی کانامایسین و سفوتاکسیم) منتقل شدند. بعد از ۲ تا سه هفته ریزنمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند در حالی که هیچ‌گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم) دیده نشد. ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز یک بار به محیط مشابه واگشت شدند. تعدادی از نوساقه‌های تولید شده بر روی محیط گزینشگر فوق، سبز باقی ماندند و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین می‌رفتند. به نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده، پلاسمید pBI121 که حامل ژن مورد نظر هست را دریافت نموده‌اند شکل (۴-۴).

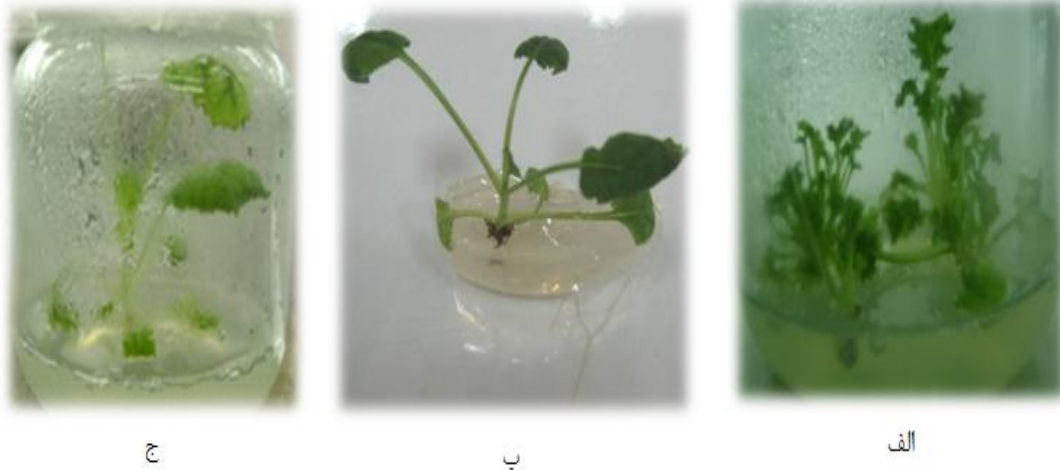


شکل ۴-۴ : مراحل رشدی گیاه در فرایند انتقال ژن به گیاه کلزا با استفاده از ریزنمونه کوتیلدونی الف) قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت انتخابی و شروع باززایی با ایجاد تورم در گیاه ب) گیاهچه‌های غیر تراریخت در اثر کانامایسین محیط سفید و بنفش شدند ج) گیاهچه‌های تراریخت سبز باقی ماندند د) گیاهان تراریخت مطلوب برای انتقال به محیط طویل سازی

غلظت 10 mg.l^{-1} کانامایسین موجود در محیط انتخابی، جهت حذف سلول‌های غیر تراریخت کافی می‌باشد. اما توانایی حذف ژن‌های وارد شده به منطقه نامطلوب از کروموزوم را ندارند.

همان طور که برای اکثر سیستم‌های انتقال ژن صادق است، انتخاب کارآمد گیاهچه‌های تراریخته احتمالی کلید افزایش کارایی انتقال ژن است. لذا غلظت بحرانی کانامایسین باید قبلاً برای هر ریزنمونه محاسبه شود زیرا بافت‌های متفاوت حساسیت متفاوتی به کانامایسین دارند (Li, 2002). کانامایسین در فرآیند ترجمه mRNAهای ژنوم کلروپلاستی دخالت کرده و مانع عمل ترجمه شده و ساخته شدن کروفیل را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین با عدم ساخته شدن کروفیل، سلول‌های گیاهان باززایی شده

در صورت غیر تراریخت بودن زرد و سفید شده و از بین می‌روند (Dawson, 1996). در رابطه با میزان مصرف کانامایسین باید توجه داشت که در گونه‌های مختلف گیاهی، میزان آن برای استفاده به عنوان گزینشگر متفاوت بوده و نیاز به انجام آزمایش می‌باشد. کانامایسین قادر است با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌سازی و با اتصال به بخش 30S ریبوزوم، که در اندامک‌ها وجود دارد، سلول تحت اثر را از بین ببرد. میزان مقاومت یک سلول گیاهی تراریخت شده بستگی کامل به تعداد نسخه‌های ژن مقاومت به کانامایسین و جایگاه قرارگیری آن در ژنوم هسته‌ای دارد. از طرف دیگر به علت مرگ سلول‌های گیاهی غیر تراریخت که در اثر آنتی‌بیوتیک کانامایسین روی می‌دهد، ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئل‌ها به محیط بیرون منتقل می‌گردد. این ترکیبات نیز می‌توانند روی سلول‌های دیگر و حتی سلول‌های تراریخت اثر بگذارند. لذا مرگ بسیاری از سلول‌های گیاهی (از جمله سلول‌های تراریخت) نه به واسطه ماده انتخابگر (کانامایسین) است، بلکه به علت آزاد شدن ترکیبات نامطلوب از سلول‌های مرده است (Chawla, 2000). بنابراین میزان کانامایسین به عنوان عامل گزینشگر استفاده شده است در محدوده 1^{-1} ۱۵-۳۰ mg برای گیاه کلزا مناسب و کافی بوده است و بیش از این مقدار گیاهان تراریخت نیز حذف می‌گردند. گیاهان تراریخت واقعی که در این شرایط سبز باقی ماندند، با انتقال محیط ریشه‌زایی تشکیل ریشه دادند (شکل ۴-۴).

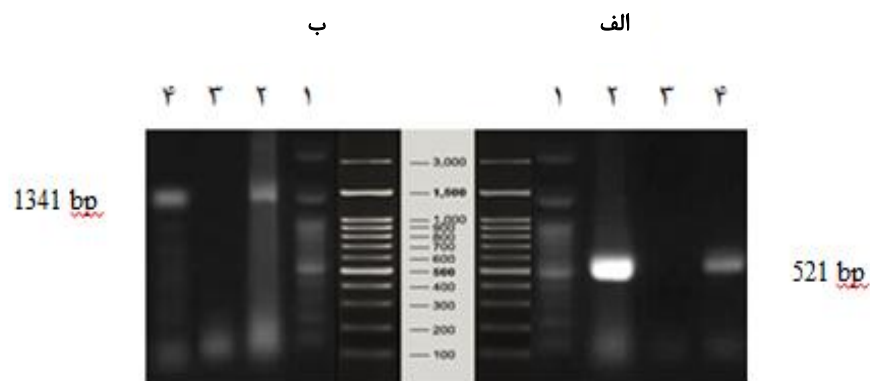


شکل ۴-۵: مراحل رشدی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی (الف) رشد گیاهچه‌ها در محیط طولی سازی (ب) گیاهچه با رشد مناسب در محیط ریشه‌دهی (ج) گیاهچه آماده انتقال به گلدان

پس از ریشه‌دار شدن گیاهان تراریخت، گیاهان ابتدا به پرلیت و سپس به خاک منتقل شدند و در شرایط دمایی 25°C و طول روز ۱۶ ساعت به رشد خود ادامه دادند.

۴-۴ بررسی مولکولی گیاهان تراریخت

پس از انتخاب و رشد کامل گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، بررسی مولکولی بر روی آن‌ها انجام شد. برای تایید تراریختی گیاه به روش مولکولی، تکنیک PCR با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن کانامایسین و ژن *gus* انجام شد. این آغازگرها برای تکثیر قطعه ۱۳۴۱bp برای آغازگرهای *nptII* و قطعه ۵۲۱bp برای *gus* طراحی شدند. وجود باند مورد نظر در گیاهان تراریخت نشان دهنده موفقیت آمیز بودن انتقال ژن به درون ژنوم گیاه کلزا می‌باشد. این باند در گیاه شاهد مشاهده نگردید (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶: آنالیز مولکولی گیاهان باززا شده بر روی محیط انتخابی و شاهد با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی *nptII* و *gus* شکل الف (آغازگرهای اختصاصی *gus*)، خط ۱: مارکر مولکولی ۳۰۰۰bp، خط ۲: پلاسمید (کنترل مثبت ژن *gus*)، خط ۳: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت)، خط ۴: گیاه تراریخت، شکل ب (آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII*)، خط ۱: مارکر مولکولی ۳۰۰۰bp، خط ۲: پلاسمید (کنترل مثبت ژن *nptII*)، خط ۳: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت)، خط ۴: گیاه تراریخت.

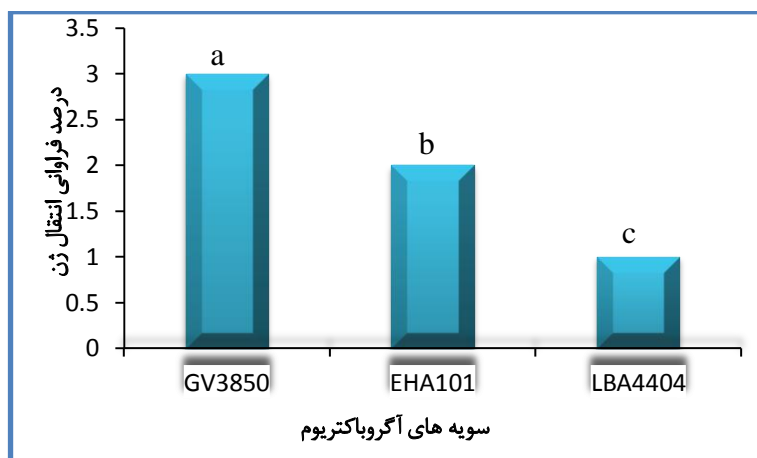
۴-۵ بررسی قدرت تراریختی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم

به منظور بررسی قدرت تراریختی سویه‌های مختلف بر فراوانی انتقال ژن به گیاه کلزا، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. در این مرحله آزمایش از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم (LBA4404, EHA101, GV3850) برای انتقال ژن به گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه‌های ذکر شده از نظر میزان نفوذ، قدرت انتقال ژن و تولید نتاج تراریخته یکسان نبودند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که بین سویه‌های فوق در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۴-۱)، به گونه‌ای که بالاترین درصد گیاهان تراریخته با سویه GV3850 (۳٪) و پایین‌ترین درصد گیاهان تراریخته با سویه LBA4404 (۱٪) به دست آمد (شکل ۴-۷). که این نتایج با گزارشات سلمانیان و همکاران (۱۳۹۳) در گیاه کلزا مطابقت دارد.

جدول ۴-۱: جدول تجزیه واریانس درصد فراوانی تراریختی گیاه کلزا تحت تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۲	۰/۰۰۰۵*
خطا	۶	۰/۰۰۰۱

* معنی داری در سطح آماری ۵ درصد (cv= 28.87%)



شکل ۴-۷: تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر فراوانی انتقال زن در کلزا

به عبارتی دیگر در این آزمایش سویه GV3850 توانایی بیشتری نسبت به سویه‌های LBA4404 و EHA101 جهت انتقال زن به سلول‌های گیاهی کلزا را داشته است. که این نتایج با گزارشات دهستانی و همکاران در گیاه آرابیدوپسیس که نشان دادند در بین سویه‌های GV3101، GV3850 و LBA4404، سویه GV3850 بیشترین و سویه LBA4404 کمترین مقدار تولید گیاهان تراریخته را دارند، مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر سویه GV3101 به دلیل فعالیت شدید تهاجمی، برای تراریخته سازی گیاهان آرابیدوپسیس پیشنهاد شد (Bechtold *et al.*, 1993). گزارش شده است که سویه LBA4404 برای

تراریخته سازی آرابیدوپسیس مناسب نیست و بهتر است از نژادهایی با قدرت تهاجمی بیشتر استفاده شود (Weigel & Glazebrook, 2002). در گزارشی بیان شده است که سویه‌ی EHA101 و EHA105 نسبت به سویه‌ی LBA4404 در توانایی انتقال ژن تاثیرگذارترند چون هر دوی آنها از سویه‌های نسبتاً وحشی فوق بیماریزا A281 مشتق شده‌اند (Hood *et al.*, 1993) در حالی که سویه‌ی LBA4404 از نژاد با بیماریزایی کمتر به نام Ach5 مشتق شده است (Hoekema *et al.*, 1983). با این وجود در مطالعه‌ای که توسط سونیلکونار و رازر (۲۰۰۱) انجام شد، مشاهده شد که کارایی انتقال سویه‌ی LBA4404 به طور قابل توجهی نسبت به سویه‌ی EHA105 در انتقال به پنبه بیشتر بوده است (Sunilkumar & Rather, 2001). از طرفی بیماریزایی کمتر سویه‌ی LBA4404 منجر شده که این سویه در انتقال ژن به گیاهان به کار برده شود، زیرا نیازمند سطوح کمتر استفاده از آنتی‌بیوتیک برای حذف باکتری بعد از هم‌کشتی می‌باشد (Maheswaran *et al.*, 1992).

موفقیت انتقال ژن در گیاهان به عوامل زیادی مانند ژنوتیپ گیاه، سویه باکتری، غلظت باکتری، نوع نشانگر انتخابی، نوع ناقل، نوع ریزنمونه، محیط بازرایی، دمای محیط هم‌کشتی و طول دوره هم‌کشتی بستگی دارد (Mehrotra & Goyal, 2012; Montemurro *et al.*, 2008)، از این رو یکی از فاکتورهای مهم و موثر در انتقال ژن به گیاهان سویه باکتری است. برای این هدف سویه‌های آگروباکتریوم خلع سلاح شده مختلف، برای بهینه سازی انتقال ژن در گیاهان مختلف به کار می‌رود.

در گزارشات متعدد سویه‌های مختلف آگروباکتریوم برای انتقال T-DNA به ژنوم گیاه میزبان بهینه سازی شده است (Subramanyam *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013) زیرا سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، زمینه کروموزومی متفاوتی دارند و به علت ناحیه Vir متفاوت و اثرات متقابل متفاوت بین گیاه میزبان و آگروباکتریوم، ممکن است طیف وسیعی از گیاهان را تحت تاثیر قرار دهند (Hood *et al.*, 1993; Hellen *et al.*, 2000). در تحقیقی که توسط یانگ و همکاران (۲۰۰۳) برای بررسی انتقال ژن به

کلزا به روش غوطه‌ورسازی گل‌آذین انجام شد، مشاهده می‌شود که بین نژادهای آگروباکتریوم از لحاظ میزان انتقال ژن تفاوت وجود دارد (Young-Seok *et al.*, 2003). در عین حال برخی از پژوهشگران، از لحاظ کارایی تراریخته‌سازی، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های آگروباکتریوم مشاهده نکردند (Zhang *et al.*, 2006).

اختلاف بین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر قدرت نفوذ، ممکن است ناشی از اثر متقابل نوع گیاه و سویه باکتری باشد. بدیهی است که نه تمامی سویه‌های آگروباکتریوم برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی قابلیت بیماری‌زایی دارند و نه تمامی گیاهان آماده‌ی پذیرش ژن بیگانه و باززایی هستند (علیزاده آریمی، ۱۳۹۳). دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و فقط می‌توان گفت که چنین حالتی در قالب اثرات متقابل گیاه پاتوژن قابل بحث است که یک گیاه پاسخ‌های متفاوتی را به نژادهای مختلف یک گونه بیماری‌زا می‌دهد. بنابراین، بهبود بیماری‌زایی باکتری و آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش به‌سزایی دارد. هر گونه‌ی گیاهی دارای ساختار دیواره سلولی، وضعیت فیزیولوژیکی و مولکول‌های علامت‌دهنده متفاوتی است که ممکن است موجب تفاوت در توانایی تشکیل گیاه تراریخته در گونه‌های مختلف باشد، همچنین توالی ژنوم باکتریایی و پلاسمیدی نقش بسزایی در القای گیاه تراریخته دارد (نوری و همکاران، ۱۳۹۳).

۴-۶ بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک در کارایی انتقال ژن به گیاه کلزا به روش مبتنی بر آگروباکتریوم:

به منظور بررسی تاثیر امواج اولتراسونیک بر فراوانی انتقال ژن به گیاه کلزا در روش آگروباکتریوم و با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار انجام شد. در این تحقیق از آگروباکتریوم سویه EHA101 حاوی پلاسمید pBI121 حاوی ژن‌های *gus* و *nptII* استفاده

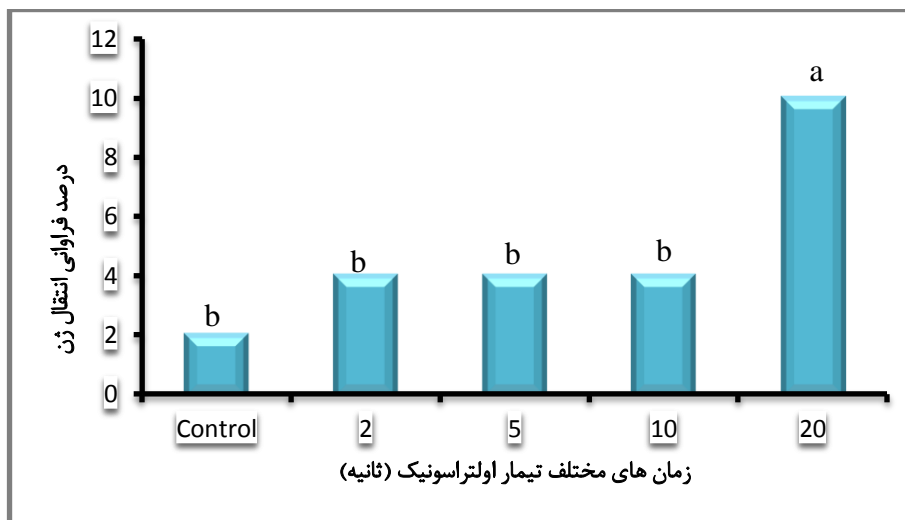
شد. ریزنمونه‌های کوتیلدونی کلزا در معرض تیمارهای مختلف امواج اولتراسونیک (۰، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ ثانیه) قبل از هم‌کشتی با آگروباکتریوم قرار گرفتند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین زمان‌های مختلف تیمار اولتراسونیک و شاهد (بدون اولتراسونیک) در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که گیاهانی که در معرض تیمارهای اولتراسونیک بودند نسبت به گیاهان شاهد فراوانی تراپختی بالاتری دارند به طوری که بالاترین فراوانی تراپختی مربوط به تیمار ۲۰s (۱۰٪) و کمترین فراوانی تراپختی مربوط به تیمار شاهد (۲٪) بود و بین تیمارهای ۲s، ۵s و ۱۰s و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نگردید (شکل ۴-۸).

جدول ۴-۲: جدول تجزیه واریانس درصد فراوانی تراپختی گیاه کلزا تحت تاثیر تیمارهای مختلف اولتراسونیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۴	۰/۰۰۵**
خطا	۲۰	۰/۰۰۱

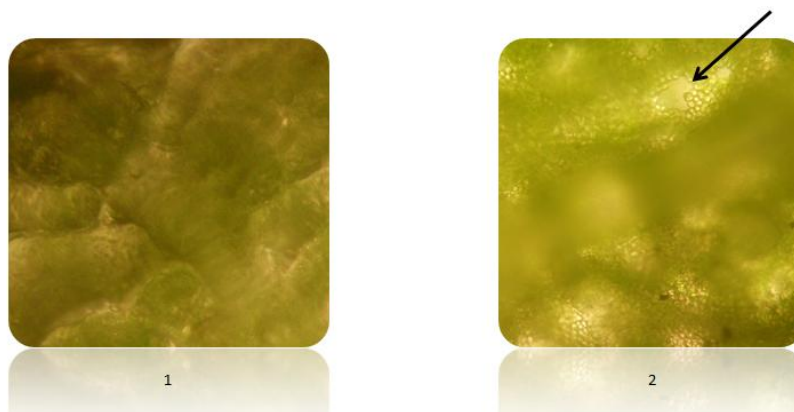
** معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد. (cv= 25.5%)



شکل ۴-۸: تاثیر امواج فراصوت روی فراوانی انتقال ژن در کلزا

افزایش فراوانی تراریختی با استفاده از امواج فراصوت می تواند به این دلیل باشد که این امواج منجر به ایجاد حفره های کوچک زیاد و القای زخم های میکروسکوپی در اطراف ریزنمونه شده (شکل ۴-۹)، که این امر، از یک سو باعث ترشح ترکیبات فنلی (مثل استوسرینگون) بیشتر از گیاه شده و از این رو باعث تحریک ژن های Vir و تحریک حرکت آگروباکتریوم به سمت دیواره سلولی گیاه شده است، اجازه ورود عمیق تر و کامل تر آگروباکتریوم را به بافت هدف می دهد و از این رو احتمال آلوده شدن سلول های گیاهی را افزایش می دهد (Santarem *et al.*, 1998) و از سوی دیگر القای زخم منجر به افزایش تولید ترکیبات پلی فنولیک سیگنالی و افزایش امکان دسترسی فاکتورهای سیگنالی دیواره سلولی به آگروباکتریوم در طول انتقال می شود (Stachel *et al.*, 1985). این نتایج با گزارشات بخشی و همکاران (۲۰۱۱) که در گیاه لوبیا چشم بلبلی نشان دادند با افزایش زمان فراصوت کارایی انتقال افزایش می یابد و به علاوه فراصوت به مدت ۲۰ ثانیه بالاترین کارایی بیان گذرا در *gus* را دارد، مطابقت دارد (Bakshi *et al.*, 2011). در عین حال این نتایج مخالف نتایج مقیب و همکاران در گیاه کلزا است که بیان کردند با

افزایش مدت زمان فراصوت از ۵ ثانیه تا ۳۰ ثانیه کارایی انتقال کاهش می‌یابد (Moghaieb *et al.*, 2014).



شکل ۴-۹: عکس میکروسکوپی از سطح ریزنمونه کوتیلدونی. ۱- گیاه شاهد ۲- گیاه اولتراسونیک شد با آسیب‌ها و حفره‌های میکروسکوپی در سطح کوتیلدون

کارایی انتقال به واسطه آگروباکتریوم به چند عامل بستگی دارد، یکی از این موارد تعامل و ارتباط بین آگروباکتریوم با بافت میزبان به ویژه بافت‌های گیاهی نامستعد به انتقال، است در این راستا زخم‌هایی که توسط امواج اولتراسونیک در سطح گیاه ایجاد شده و به دنبال آن ترشح ترکیبات فنلی از گیاه، تعامل بین آگروباکتریوم و بافت‌های گیاهی مختلف را افزایش می‌دهد (Santarem *et al.*, 1998; Trick & Finer, 1997). در مورد استفاده از امواج فراصوت در انتقال ژن به گیاه باید توجه داشت که اگر امواج فراصوت بیش از حد و یا در فرکانس بالا استفاده شود منجر به هیدراتاسیون بیش از حد گیاه، کمبود کلروفیل در گیاه، کاهش چوبی شدن گیاه، اختلال در روزنه و کاهش مقاومت مکانیکی بافت گیاه در گیاهان باززا شده و یا مرگ بافت گیاهی می‌شود، این بدین معناست که باید متناسب با نوع بافت و هدف آزمایش، شدت و مدت زمان اعمال فراصوت بهینه سازی شود (Beranova *et al.*, 2008).

علاوه بر این استفاده از امواج اولتراسونیک با فرکانس پایین می‌تواند ساختار، شکل و نفوذپذیری غشا را در داخل و خارج سلول تغییر دهد (Bochu *et al.*, 2001; Ananthakrishnan *et al.*, 2007; Rokhina *et al.*, 2009). وانگ و همکاران (۲۰۰۶) ثابت کردند که قابلیت ارتجاع و ضریب ویسکوزیته غشاء پلاسمایی وقتی که فرکانس امواج از ۸۰ هرتز به ۸ کیلو هرتز بیشتر شده است، افزایش یافته است.

۴-۷ نتیجه گیری کلی :

به کار گیری مهندسی ژنتیک در کلزا برای تولید صفات با ارزش زراعی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بیشترین انتقال ژن به کلزا از طریق آگروباکتریوم انجام شده است. جهت انتقال ژن موفق با این روش پارامترهای مختلفی باید بهینه شود. یکی از این پارامترهای مهم انتخاب سویه مناسب برای گونه‌های گیاهی کلزا است. در راستای همین هدف در این پروژه از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاه کلزا استفاده شده است. نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر فراوانی انتقال ژن به گیاه کلزا در بین سویه‌های آگروباکتریوم وجود دارد و سویه‌ی GV3850 توانایی بیشتری جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی را دارد. در واقع نتایج بیان می‌کند که سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر قدرت انتقال ژن به گیاه یکسان نیستند، پس سویه‌هایی غیر از سویه‌های مورد نظر نیز بدون شک توانایی متفاوتی در انتقال ژن به گیاه کلزا را دارند. علاوه بر سویه نوع رقم نیز در فراوانی انتقال ژن موثر است پس اگر از ارقام دیگر کلزا برای دستیابی به بهترین رقم از نظر فراوانی انتقال ژن استفاده شود، به نتیجه مطلوب خواهیم رسید.

در مبحث استفاده از امواج اولتراسونیک، امواج اولتراسونیک به عنوان روشی موفقیت آمیز برای انتقال ژن در گیاهان با کارایی بالا به کار برده شد. بررسی‌ها نشان داد که امواج اولتراسونیک نفوذپذیری گذرا و کوتاه غشاء پلاسمایی را برای تسهیل جذب ژن‌های خارجی افزایش می‌دهد. بنابر این در این پروژه

نیز به بررسی تاثیر زمان‌های مختلف امواج اولتراسونیک در فراوانی انتقال ژن به گیاه کلزا با روش مبتنی بر آگروباکتریوم پرداخته شد. نتایج نشان داد که بین تیمارهای اولتراسونیک و شاهد در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد و گیاهانی که در معرض امواج اولتراسونیک بودند نسبت به شاهد فراوانی تراریختی بالاتری دارند. در واقع تیمارهای زمانی متفاوت اولتراسونیک اثر یکسانی در انتقال ژن به گیاه کلزا ندارند و نیاز به بررسی بیشتری در این زمینه دارد.

در دو مبحث فوق تایید انتقال ژن ابتدا توسط بیان ژن *nptII* در گیاهان تراریخته‌ایی که در مجاورت آنتی بیوتیک کانامایسین قرار گرفته بودند انجام شد. از آنجایی که در گزینش گیاهان بر روی محیط انتخابی امکان فرار گیاهچه‌های غیر تراریخته وجود دارد به تایید قطعی تری نیاز است. لذا به منظور اطمینان و تایید تراریخت بودن گیاهان باززایی شده آنالیزهای PCR با آغازگرهای اختصاصی روی گیاهان انتخابی انجام شد. حضور تک باند در اندازه مورد نظر برای هر کدام از آغازگرهای اختصاصی در گیاهان تراریخت گواهی بر موفقیت آمیز بودن انتقال ژن به گیاه کلزا است. علاوه بر آزمون PCR که گواهی بر تایید تراریختی گیاه است می‌توان از آزمون‌های تکمیلی دیگری همچون ساترن بلات که تعداد نسخه ژن مورد نظر را در گیاه تراریخت مشخص می‌کند، برای تایید تراریختی استفاده کرد.

منابع

جعفری راد، م.، رهنما، ح. و ناجی، ا. م. ۱۳۹۰. بررسی انتقال ژن *gus* به گیاه کلزا. هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی. تهران، پژوهشگاه نیرو.

جلالی جواران، م.، هاشم زاده، ح. و موسوی، ا. ۱۳۸۳. بررسی تغییرات کمی و کیفی میزان پروتئین، کلروفیل و کارتنوئید در کلزای تراریخت شده با آنتی سنس ژن گلوتامین سنتتاز (GS1). مجله علوم آب و خاک- علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۸ (۲): ۱۰۷-۱۲۰.

حاجی بابایی، م. ۱۳۷۶. پایداری کشاورزی یا کشاورزی پایدار. مجله علمی- فنی- کشاورزی زیست محیطی. شماره ۹۶.

دهشیری، ع. ۱۳۷۸. زراعت کلزا. انتشارات دفتر تولید برنامه‌های ترویجی و انتشارات فنی معاونت و ترویج. صفحه ۶۳.

سلمانیان، ع.ه.، کاظمی، ر.، امانی، ج.، شرفی، ع. و عباسی، ع. ۱۳۹۰. بهینه سازی تراریختی در گیاه کلزا با کنترل تولید گاز اتیلن و افزایش تدریجی عامل انتخاب کننده. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷(۴). ۵۷۵-۵۸۸.

شریعتی، ش. و قاضی شهنی زاده، پ. ۱۳۷۹. کلزا. چاپ اول، نشر آموزش کشاورزی. صفحه ۸.

عزیزی، م.، سلطانی، ا. و خاوری خراسانی، س. ۱۳۷۸. کلزا. تألیف: Kimber, D. S. and McGregor D. (I., چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. صفحه ۲.

علیزاده آریمی، ف.، چالوی، و. و دهستانی، ع. ۱۳۹۳. انتقال همزمان ۳ ژن باکتریایی بی فیل دی اکسیژنز به گیاه آرابیدوپسیس. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۶(۱): ۱۴۷-۱۵۵.

فارسی، م. و ذوالعلی، ج. ۱۳۸۸. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۴۹۵.

فارسی، م. و جلال زاده، ب. ۱۳۸۷. استفاده از بیوتکنولوژی در اصلاح گوجه فرنگی. اولین کنگره ملی فناوری تولید و فرآوری گوجه فرنگی، مشهد، صفحه ۷-۳.

محسن پور، م.، توحید فر، م.، بابائیان جلودار، ن. و حبشی، ع. ا. ۱۳۸۶. طراحی و ساخت پلاسمید نو ترکیب pBI121-Glu جهت انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به پنبه. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۴(۴): ۱۱۲-۱۲۴.

محمدی زاده، ن.، توحیدفر، م. و محسن پور، م. ۱۳۸۹. تراریخت گیاه گندم بواسطه آگروباکتریوم به

منظور انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۲(۱): ۸۱-۹۷.

ناظری، س.، محسنی آذر، م.، ملیوبی، م.ع.، فدیم‌زاده، م.، برزگری، ا. و فرخزاد، ع. ۱۳۹۰. بررسی و بهینه سازی برخی عوامل موثر بر انتقال ژن بتا- گلوکورونیداز (gusA) با واسطه آگروباکتریوم در سیب پاکوتاه (*Malus domestica*. Borkh var. Gami Almasi). مجله فن آوری زیستی در کشاورزی. ۱۰ (۲)، ۷-۱۵.

نصر رمزی، ص.، سوهانی، م.م. و ایمان زاده، م. ۱۳۹۲. بهبود کارایی انتقال ژن به روش غیر کشت بافت در گیاهان گندم و برنج با استفاده از آگروباکتریوم. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۲(۱): ۸۰-۷۱.

نوری، م. ۱۳۹۳. بررسی القاء ریشه های موین در گیاه دارویی سرخارگل از طریق انتقال ژن با آگروباکتریوم رایزوتنز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود.

Abuodeh, R. O., Orbach, M. J., Mandel, M. A., Das, A. and Galgiani, J. N. 2000. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 2106-2110.

Altenbach, S. B., Kuo, C. C., Staraci, L. C., Pearson, K. W., Wainwright, C., Georgescu, A. and Townsend, J. 1992. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant molecular biology*, 18(2), 235-245.

Ananthakrishnan, G., Xia, X., Amutha, S., Singer, S., Muruganatham, M., Yablonsky, S. and Gaba, V. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. *Plant cell reports*, 26(3), 267-276.

Bhalla, P.L. and Mohan, B.S. 2008. *Agrobacterium*- mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature protocols*. 3:181-189.

Bakhsh, A., Anayol, E. and Ozcan, S. F. 2014. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana Tabacum* L. *Emirates. Journal of Food and Agriculture*, 26(3), 259.

Bajestani, M. J., Khodai-Kalaki, M., Motamed, N. and Noorayin, O. 2011. Genetic transformation of olive somatic embryos through *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *African Journal of Biotechnology*, 1028, 5468-5475.

Bakshi, S., Sadhukhan, A., Mishra, S. and Sahoo, L. 2011. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant cell reports*, 30:2281-229.

Bao, S., Thrall, B. D. and Miller, D. L. 1997. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound in medicine & biology*, 23(6), 953-959.

Bechtold, N., Ellis, J. & Pelletier, G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 316(10), 1194-1199.

Beranová, M., Rakouský, S., Vávrová, Z. and Skalický, T. 2008. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(3), 253-259.

Bhatti, K. H. and He, C. 2009. *Agrobacterium* mediated tobacco transformation with rice FAE gene and segregation analysis of T1 generation. *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 403-412.

Binns, A. N. and Thomashow, M. F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* of infection and transformation plants. *Annual Review of Microbiology*, 42, 575-606.

Bochu, W., Hucheng, Z., Yiyao, L., Yi, J. and Sakanishi, A. 2001. The effects of alternative stress on the cell membrane deformability of chrysanthemum callus cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 20(4), 321-325.

Brown, T.A. 1998. Gene Cloning. 3rd edition: 50-56, Blackwell Science LTD.

Cardoza, V. and Stewart Jr, C. N. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant cell reports*, 21(6), 599-604.

Charest, P. J., Holbrook L. A., Gabard J., Iyer V. N. and Miki B. L. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 75,438-445.

Chawla, H. S. 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. Enfield,NH, USA. Chapters:8,9,13,18,22.

Cheng, M. I., Jarret, R. L. I., Li, Z. I., Xing, A. I. and Demski, J. W. 1996. Production of fertile transgenic peanut (*Arachis hypogea* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 15, 653-657.

Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115, (3), 971-980.

Cheng, M., Hu, T., Layton, J., Liu, C. N. and Fry, J. E. 2003. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 595-604.

Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W. and Orozco-

Cardenas, M. L. 2013. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant cell reports*, 32(2), 239-247.

Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Delbart, F. C. and Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295(5848), 432–434.

Cho, H. S., Cao, J., Ren, J. P. and Earle, E. D. 2001. Control of Lepidopteren insect pests in transgenic *Chinese cabbage* (*Brassica rapa*ssp. *Pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1C gene. *Plant Cell Reports*, 20(1), 1-7.

Dang, W.,Wei, Z-M. 2007. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science*, 173 ,381–389.

da Silva, J. A. T. 2005. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. *Plant science*, 169(6), 1046-1058.

Dawson, M. T., Powell, R. and Gannon, F. 1996. *Gene technology*. Garland Science.

Debnath, A. J., Basu, D. and Sikdar, S. R. 2013. An approach to standardize transient expression of GUS in sesame (*Sesamum indicum* L.) using the Sonication-Assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation (SAAT) method. *Israel Journal of Plant Sciences*, 61(1-4), 37-45.

De Block, M., De Brouwer, D. and Tenning, P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of bar and neo genes in transgenic plants. *Plant Physiology* 91: 694-701.

Dehestani, A., Ahmadian, G., Salmanian, H., Jelodar, N.B. and Kazemitabar, K. 2010. Transformation efficiency enhancement pf *Arabidopsis* vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. *Trakia Journal of Sciences*,8(1), 19-26.

de Mello-Farias, P. C. and Chaves, A. L. S. 2008. Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with enphasys on soybean. *Scientia Agricola*, 65(1), 95-106.

De La Riva, G. A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R. and Ayra-Pardo, C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 24-25.

Desfeux, C., Clough, S. J. and Bent, A. F. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dipmethod. *Plant Physiology*, 123, 859–904l.

Dormann, M., Datla, N., Hayden, A., Puttick, D. and Quandt, J. 1997. Non-destructive screening of haploid embryos for glufosinate ammonium resistance four weeks after

microspore transformation in Brassica. In *International Symposium Brassica 97, Xth Crucifer Genetics Workshop 459* (pp. 191-198).

Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. and Nester, E. W. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Journal of Bacteriology*, 161, 850–860.

Draper, J., Scoh, R., Armitage, P. and Walben, R. 1988. Plant genetic transformation and gene expression. Blackwell scientific publications.

Enríquez-Obregón, G. A., Vazquez-Padron, R. I., Prieto-Samsonov, D. L., De la Riva, G. A. and Selman-Housein, G. 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta*, 206, 20–27.

Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I. and Lanka, E. 1999. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22548-22555.

Fan, Y., Du, K., Gao, Y., Kong, Y., Chu, C., Sokolov, V. and Wang, Y. 2013. Transformation of *LTP* Gene into *Brassica napus* to Enhance Its Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Russian Journal of Genetics*, 49(4):439-47.

Fischer, R. and Schillberg, S. 2004. Molecular farming: Plant-made pH pharmaceuticals and technical proteins. Weinheim: Wiley-VCH verlag GmbH & Co. KGaA.

Fry, J., Barnason, A. and Horsch, R. B. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Reports*, 6(5), 321-325.

Gagliano, M., Renton, M., Duvdevani, N., Timmins, M. and Mancuso, S. 2012a. Acoustic and magnetic communication in plants: is it possible?. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1346-1348.

Gagliano, M., Mancuso, S. and Robert, D. 2012b. Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in plant science*, 17(6), 323-325.

Gagliano, M. 2012. Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, ars206.

Gagliano, M. and Renton, M. 2013. Love thy neighbour: facilitation through an alternative signalling modality in plants. *BMC ecology*, 13(1), 1.

Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.

Gelvin, S. B. 2010. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Annual Griffith F. The significant of pneumococcal types. *Hyg J* 1928;27:113. Review of Phytopathological, 48, 45–684.

Goleyjani Moghaddam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. and Rezanejad, H. 2012. Optimization of regeneration and transformation of canola HYOLA 308 and RGS003 lines.47-60.

Guo, M., Zhang, Y. L., Meng, Z. J. and Jiang, J. 2012. Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 661–671.

Hashizume, F., Tsuchiya, T., Ugaki, M., Niwa, Y., Tachibana, N. and Kowyama, Y. 1999. Efficient Agrobacterium-mediated transformation and the usefulness of a synthetic GFP reporter gene in leading varieties of japonical rice. *Plant Biotechnology*, 16, 397–401.

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant molecular biology*, 42(6), 819-832.

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.

Hong, J. K., Kim, S. Y., Kim, K. S., Kwon, S. J., Kim, J. S., Kim, J. A. and Lee, Y. H. 2013. Overexpression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, BrAGL20, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus*. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 231-237.

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A. 1993. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic research*, 2(4), 208-218.

Huber, P. E. and Pfisterer, P. 2000. Invitro and invivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *GENE THERAPY-BASINGSTOKE-*, 7(17), 1516-1525.

Hussain, S., Rasheed, A., Latif, M., Mahmood, T. and Naqvi, S. M. 2014. Canola (*Brassica napus* L.) regeneration and transformation via hypocotyl and hypocotyl derived calli. *Sarhad Journal of Agriculture*, 30, 165-172.

Hussain, S. S., Husnain, T. A. Y. Y. A. B. and Riazuddin, S. 2007. Sonication assisted Agrobacterium mediated transformation (SAAT): An alternative method for cotton transformation. *Pakistan Journal of Botany*, 39(1), 223.

Ivarson, E. 2011. Factors affecting Agrobacterium transformation in oat. Degree Thesis in Horticulture Project for MSc.

Iqbal, M. M., Nazir, F., Ali, S., Asif, M. A., Zafar, Y., Iqbal, J. and Ali, G. M. 2012. Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves

resistance against leaf spot. *Molecular biotechnology*, 50(2), 129-136.

Jalali Javaran, M., Mirza GHaderi, GH. and SHakib, A. M. 2004. Analysis of CaMV 35S Promoter Activity Using GUS Reporter Gene in Transgenic *Brassica napus*. *Iranian, Journal. Agriculture. Sci.* Vol. 35, No. 3, 2004.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant molecular biology reporter*, 5(4), 387-405.

Jessop, J., Black, J. M., & Toelken, H. R. 1986. *Flora of South Australia: Lycopodiaceae-Rosaceae*. South Australian Government Printing Division.

Jha, P., Rustagi, A., Agnihotri, P. K., Kulkarni, V. M. and Bhat, V. 2011. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. using shoot apices as explant source. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(3), 501-512.

Jonobi, P. 2003. Invitro optimization and transformation of EPSPS gene to rapeseed via Agrobacterium. Ph. D. Thesis. Tarbiat Moalem University. P 194.

Jun II, S., Kwon, S. Y., Paek, K. Y. and Paek, K. H. 1995. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'spring flavor'). *Plant cell reports*, 14(10), 620-625.

Kahrizi, D., Arminian, A. and Masomi, Asl. A. 2007b. B. In Vitro Plant Breeding. Razi University Publications.

Kahrizi, D. and Salmanian, A. H. 2008 . Substitution of Ala183Thr in *aroA* Product of *E. coli* (K12) and Transformation of Rapeseed (*Brassica napus*) With Altered Gene Confers Tolerance to Roundup. *Transgenic Plant Journal*.2(2), 170-175.

Kahrizi, D., Zebarjadi, A. and Salmanian, A. 2010. effect of cold pretreatment and period of preconditioning inoculation on transformation frequency in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Agricultural Biotechnology*, 9(1).

Kavitah, G., Taghipour, F. and Huyop, F. 2010. Investigation of factors in optimizing Agrobacterium medium gene transfer in *Citrullus lanatus* cv round dragon. *Journal of Biological Sciences*, 10(3), 209–216.

Kerr, A. 1991. *Agrobacterium* in the prokaryotes chapter 108 pp2214- 2235. Springer-Verlag.

Khan, K. H. 2010. Gene transfer technologies and their applications: Roles in human diseases. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 1(2), 208-18.

Khosravi, H., Jalali. Javaran, M., Hosseinkhani, S. and Razmi, A. 2012. Transformation of the Rapeseed (*Brassica napus* L.) with Firefly Luciferase Gene. *Agricultural Biotechnology*, 11(1).

Kim, Y. G., Sharmin, S. A., Alam, I., Kim, K. H., Kwon, S. Y., Sohn, J. H. and Lee, B. H. 2013. Agrobacterium-mediated transformation of reed (*Phragmites communis Trinus*) using mature seed-derived calli. *GCB Bioenergy*, 5(1), 73-80.

Knutzon, D. Z. Thompson, G. A. Radke, S. E. Johnson, W. B., Knauf, V. C. and Kridl, J. C. 1992. Modification of Brassica seed oil by antisense of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. The Proceeding of the National Academy of Science USA, 89:2624-2628.

Kong, F., Li, J., Tan, X., Zhang, L., Zhang, Z., Qi, C. and Ma, X. 2009. new time-saving transformation system for *Brassica napus*. *African Journal of Biotechnology*, 8(11).

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 1871–1876.

Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Lorez, H. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*, 4, 251–261.

Kumar, N., Anand, K. V., Pamidimarri, D. S., Sarkar, T., Reddy, M. P., Radhakrishnan, T. and Sopori, S. K. 2010. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Industrial crops and products*, 32(1), 41-47.

Lam, S., Lam, B., Harrison, L. and Strobel, G. 1984. Genetic information on the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* determines host specificity. *Plant science letters*, 34(3), 345-352.

Laschimke, R., Burger, M. and Vallen, H. 2006. Acoustic emission analysis and experiments with physical model systems reveal a peculiar nature of the xylem tension. *Journal of plant physiology*, 163(10), 996-1007.

Liu, H., Guo, X., Naeem, M. S., Liu, D., Xu, L., Zhang, W. and Zhou, W. 2011. Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(1), 143-151.

Li, S., Zhao, D. G., Wu, Y. J. and Tian, X. E. 2009. A simplified seed transformation method for obtaining transgenic *Brassica napus* plants. *Agricultural sciences in China*, 8(6), 658-663.

Li, X., Krasnyanski, S. F. and Korban, S. S. 2002. Optimization of the uidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(5), 453-459.

Longdou, L., Jun, G. W., Jingxue, W., Hongying, D. and Ruili, L. 2005. Expression of

chitinase gene in transgenic rape plants. *Analele Stiintifice ale Universitatii" Al. I. Cuza" Din Iasi.(Serie Noua). Sectiunea 2. a. Genetica si Biologie Moleculara*, 6.

Lv L., Lei J., Song M., Li L. and Cao B. 2005. Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis). *African Journal of Biotechnol.* 4 (1): 45-49.

Ma, H. and Chen, G. 2005. Gene transfer technique. *Nature and Science*,3(1), 25- 31.

Maheswaran, G., Welander, M., Hutchinson, J. F., Graham, M. W. and Richards, D. 1992. Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology*, 139(5), 560-568.

Maheshwari, P., Selvaraj, G. and Kovalchuk, I. 2011. Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. *New biotechnology*, 29(1), 144-155.

Mason, T.J. 2007. Developments in ultrasound-non-medical. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93:166–175.

Mehrotra, S. and Goyal, V. 2012. Agrobacterium-mediated gene transfer in plants and biosafety considerations. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(7), 1953-1975.

Miki, B. and McHugh, S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 193-232.

Miller, D. L., Bao, S., Gies, R. A. and Thrall, B. D. 1999. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. *Ultrasound in medicine & biology*, 25(9), 1425-1430.

Ming, L. L. L. J. S. and Bihao, L. L. C. 2005. Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis). *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 45.

Moghaieb, R., El-Awady, M., El Mergaw,y R., Yousse,f S. and El-Sharkawy, A. 2014. Comparing the efficiency of sonication assisted *Agrobacterium* -mediated and particle bombardment for the production of transgenic canola plants. *International Journal of Advanced Research*, 2(10), 200-208.

Moghaieb, R. E., El-Awady, M. A., El Mergawy, R. G., Youssef, S., & El-Sharkawy, A. M. 2006. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 5(2), 143.

Mohammad, A. M. and Bagherieh-Najjar, M. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of plants:basic principles and influencing factor. *African Journal Biotechnology*, 8(20), 5142–5148.

Moloney, M. M., Walker, J. M. and Sharma, K. K. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 8(4), 238-242.

Montemurro, C., Sabatta, W., Stinbiss, H.H., Soltesz, A., Blanco, A. and Crosatti, C. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation in durum wheat. Poster Abstract – E.09.

Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan, A. K., Gupta, V. and Pental, D. 1992. *Agrobacterium*- mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant Cell Reports*, 11:506-513.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.

Olhoft, P. M., Lin, K., Galbraith, J., Nielsen, N. and Somers, D. A. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20, 731–737.

Olhoft, P. M. and Somers, D. A. 2001. L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20, 706–711.

Ottens, L. A. B. M., De Greve, H., Leemans, J., Hain, R., Hooykaas, P. and Schell, J. 1984. Restoration of virulence of vir region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* strain B6S3 by coinfection with normal and mutant *Agrobacterium* strains. *Molecular and General Genetics MGG*, 195(1-2), 159-163.

Opabode, J. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 1(1), 12–20.

Pathak, M. R. and Hamzah, R. Y. 2008. An effective method of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1), 65-71.

Radchuk, V. V., Klocke, E., Radchuk, R. I., Neumann, M. and Blume, Y. B. 2000. Production of Transgenic Rapeseed *Brassica napus* L., by Transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Russian Journal of genetics c/c of genetika*, 36(7), 767-775.

Radke, S. E., Andrew, B. M., Moloney, M. M., Crouch, M. L., Kridl, J. C. and Knauf, V. C. 1988. Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*: development regulated expression of reintroduced napin gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 685-694.

Rafat, A., Aziz, M. A., Rashid, A. A., Abdullah, S. N. A., Kamaladini, H., Sirchi, M. T.

and Javadi, M. B. 2010. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. Capitata) cv. KY Cross with AtHSP101 gene. *Scientia horticultrae*, 124(1), 1-8.

Raichel, D. R. 2006. *The science and applications of acoustics*. Springer Science & Business Media.

Rokhina, E. V., Lens, P. and Virkutyte, J. 2009. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in biotechnology*, 27(5), 298-306.

Sadat-Noori, S. A., Atarodi, S. A., Mortazavian, S. M. and Rastgar-Jazil, F. 2012. Improved shoot regeneration protocol for canola explants and pre-assessment of salinity tolerance in canola transgenic plants. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1, 28-35.

Salas, M. C., Park, S. H., Srivatanakul, M. and Smith, R. H. 2001. Temperature influence on stable TDNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports*, 20, 701–705.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. *Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK*.

Santarem, E.R., Trick, H.N., Essig, J.S. and Finer, J.J. 1998. Sonicated assisted *Agrobacterium*- mediated transformation of soybean immature cotyledons. *Plant Cell Reports* 17:752–759.

Sevón, N. and Oksman-Caldentey, K. M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859-868.

Simoh, S., Linthorst, H. J. M. and Verpoorte, R. 2007. Host-bacterium interactions in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation: mechanism of action and *Agrobacterium*/plant factors involved. *Current Topics in Plant Biology, Volume 8*, 1-20.

Smith, E. F. and Townsend, C. O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671–673.

Sood, P., Bhattacharya, A. and Sood, A. 2011. Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum*, 55, 1–15.

Stachel, S. E., Nester, E. W. and Zambryski, P. C. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 83, 379–383.

Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318, 624-629.

Stewart, C. N., Adang, M. J., All, J. A., Raymer, P. L., Ramachandran, S. and Parrott,

W. A. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a syntjetic *Bacillus thuringiensiscryIAC* gene. *Plant Physiology*, 112: 115-120.

Subramanyam, K., Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Srinivasulu, M. and Lakshmidevi, K. 2011. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant cell reports*, 30(3), 425-436.

Sunilkumar, G. and Rathore, K. S. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding*, 8(1), 37-52.

Su, G., Park, S., Lee, S. and Murai, N. 2012. Low co-cultivation temperature at 20 C resulted in the reproducible maximum increase in both the fresh weight yield and stable expression of GUS activity after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco leaf disks. *American Journal of Plant Sciences*, 3(4), 537.

Tachibana, K., Uchida, T., Ogawa, K., Yamashita, N. and Tamura, K. 1999. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *The Lancet*, 353(9162), 1409.

Takavar, S., Rahnama, H., Rahimian, H. and Kazemitabar, K. 2010. *Agrobacterium* mediated transformation of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 21, 21-29.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Ojima, K., Watanabe, M., Toriama, K. and Hinata, K. 1997. Factors influencing *Agrobacterium* –mediated transformation of *Brassica napus* L. *Breeding Sciences*. 47: 127-134.

Tazeen, S. and Mirza, B. 2004. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pakistan Journal of Botany*, 36(4), 887-896.

Teixeira da Silva, J. A. and Fukai, S. 2003. Gene introduction method affects the shoot regeneration of in vitro and greenhouse-grown chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura). *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 114-123.

Telewski, F. W. 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*, 93(10), 1466-1476.

Tenea, G. N. 2012. Host chromatin proteins towards increasing susceptibility to *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3).

Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 140-146.

Thomashow, M. F., Karlinsey, J. E., Marks, J. R. and Hurlbert, R. E. 1987. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects

polysaccharide composition and plant cell attachment. *Journal of Bacteriology*, 169, 3209–3216.

Thomzik, J. E. and Hain, R. 1990. Transgenic *Brassica napus* plants obtained by cocultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell reports*, 9(5), 233-236.

Thu, T. T., Mai, T. T. X., Deade, E., Farsi, S., Tadesse, Y., Angenum, G. and Jacobs, M. 2003. In vitro regeneration and transformation of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.Mills P). *Molecular Breeding*, 11, 159–168.

Trick, H.N. and Finer, J.J. 1997. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation. *Transgenic Research Journal*, 6:329–336.

Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. and Citovsky, V. 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in genetics*, 20(8), 375-383.

Tzfira, T. and Citovskiy, V. 2006. *Agrobacterium*–mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 17:147-154.

Wang Y.P., Sonntag K., Rudloff E. and Han J. 2005. Production of fertile transgenic *Brassica napus* By *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. *Plant breeding*, 124:1-4.

Wang, B. C., Zhou, J., Wang, Y. C., Zhu, L. C. and Teixeira da Silva, J. A. 2006. Physical stress and plant growth. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 2, 68-85.

Weigel, D. and Glazebrook, J. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor*, New York.

White, F. F. and Nester, E. W. 1980. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1134-1141.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.

Yadav, S., Sharma, P., Srivastava, A., Desai, P. and Shrivastava, N. 2014. Strain specific *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Bacopa monnieri*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(2), 89-94.

Yenchon, S. and Te-chato, S. 2015. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated gene transformation of oil palm secondary somatic embryo. *Kasetsart Journal, Natural Science*, 49(3), 319-326.

Young-Seok, J., Joon-seul, L., Byeony-choon, C., Yoon-jeong, N. and Yoon-hi, C.

2003. Development of a method for in planta transformation in *Brassica napus* L. *11th International Rapeseed Congress, P23*, 148-151.

Zebarjadi, A. R., Jalali, M., Salmanian, A., Karimzadeh, G., Moieni, A., Jafari, A. and Mousavi, A. 2005. RNA Antisense Technique Use for Genetic Manipulation in Fatty Acid Profile of *Brassica napus*. fourth National Biotechnology Congress of Iran, 3(1), 9-16.

Zamani, A., Motallebi, M., Jonoubi, P., Ghafarian-Nia, N. S. and Zamani, M. R. 2012. Heterologous expression of the Secale cereal thaumatin-like protein in transgenic canola plants enhances resistance to stem rot disease. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(2), 87-95.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W. and Chua, N.H. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Natural Protocoll*, 1, 641-646.

Zheng, Q., Zheng, Y. P., Wang, G. D., Guo, W. M., Fan, W. F. and Wang, C. 2012. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of the ACC gene to interfere the production of ethylene in spring *Dendrobium* cv. 'Sanya'. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 266-274.

Zupan, J. R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. *Plant Physiology*, 107(4), 1041.

Abstract

Canola is one of the most important oilseed crops in the world. Despite the production of transgenic canola plants, transformation efficiency is low. In order to investigate the effects of *Agrobacterium* strains and ultrasonic waves on frequency of the gene transformation in canola, experiment were carried out based on completely randomized design with 3 and 5 replications, respectively, using cotyledon explants in canola (cultivar Okapi) *Agrobacterium* strains belong to LBA4404, EHA101 and GV3850, containing pBI121 plasmid carrying the *gus* and *nptII* genes , were evaluated in experiments. Results of statistical analysis showed significant difference among *Agrobacterium* strains used in this study and the highest transformation frequency achieved in strain of GV3850 (3%) and lowest transformation frequency was belonging to strain LBA4404 (1%). In ultrasonic waves experiments *Agrobacterium* strain EHA101 was used. cotyledons explants exposed to different ultrasonic waves treatments (2, 5, 10 and 20 seconds) before they were co-cultured with *Agrobacterium*. Results of statistical analysis showed significant difference among ultrasonic treatments. The highest transformation frequency achieved in treatment of 20 seconds (10%) and lowest transformation frequency was belong to control (2%). PCR reaction using regenerated plants on selection medium, with specific primers of *gus* and *nptII* genes, In both experiments confirmed the amplification of fragments 521bp for *gus* and 1341bp for *nptII* gene.

Key words: Canola, gene transformation, *Agrobacterium* strains, ultrasonic.



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture
Msc thesis in Agriculture of Biotechnology

Study the effect of ultrasonic waves and the type of bacteria strain on genetic transformation of *Brassica napus* plant using Agrobacterium-mediated method

By: Azadeh Mohseni Takallo

Supervisor:
Dr. Shahrokh Gharanjik

September 2016