چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

انتقال ژن *gus* به نخود (*Cicer arietinum*) با استفاده از اگروباکتريوم تومه فاسينس

شيوا حمزه ، پريسا كوباز ، علي اكبر حبشي، عزت الله فرشادفر**
دانشگاه رازی کرمانشاه، موسسه تحقيقات بيوتكنولوژی كشاورزی كرج
كرج- جاده ماهدشت- موسسه تحقيقات بيوتكنولوژی كشاورزی. پست الكترونيكی: sh_hamzehy@yahoo.com

چكيده
به منظور بررسي امكان انتقال ژن به گياه نخود (*Cicer arietinum*) ، دو جداكشت محور جنيني سربريده و مريستم انتهايي از رقم بيونيج به وسيله اگروباكتريوم تومه فاسينس سويهLBA4404 حامل پلاسميد pBI121 آلوده شدند. اين پلاسميد حاوي ژنهاي بتاگلوكورونيداز (*gus*) با پيشبر ويروس موزائيك گل كلم CaMV35S و نئومايسين فسفوترانسفراز (*nptII*) با پيشبر Nos مي‌باشد. در اين تحقيق دو نوع سوسپانسيون (سوسپانسيونI : رسوب باكتري معلق در محيط MS حاوي تركيبات سديم تيوسولفات، استو سرينگون و ال- سيستئين وسوسپانسيونII : باكتري كشت داده شده در محيط LB حاوي ۴۰ ميلي‌گرم استوسرينگون) جهت آلوده‌سازي و سه دوره زماني ٤٨، ۷۲ و ۱۲۰ ساعته هم كشتي ، مورد بررسي قرار گرفتند. پس از آن جداكشتها روي محيط باززايي (جداكشتهاي محور جنيني بر روي محيط MS حاوي ۱/۵ ميلي‌گرم در ليتر BAP ۰/۱، ميلي‌گرم در ليتر IAA و۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين و جداكشتهاي مريستم انتهايي بر روي محيط MS حاوي ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر BAP ۱، ۰/ ميلي‌گرم در ليتر IAA و۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين) قرار گرفتند. آزمون هيستوشيميايي بيان ژن *gus* با استفاده از برگچه‌گياهچه‌هاي باززا شده در محيط انتخابي انجام شد. براساس نتايج اين آزمون برگچه‌هاي ۵ شاخساره بيان ژن *gus* را به صورت تظاهر رنگ آبي نشان دادند. نتايج حاصل از انجام واكنش زنجيره‌اي پليمراز نشان داد كه از بين ۵ شاخساره كه آزمون بيان ژن *gus* در آنها مثبت بوده است همه شاخساره‌ها حاوي ژن‌هاي بتاگلوكورونيداز و نئومايسين فسفوترانسفراز مي‌باشند. هر۵ شاخساره‌متعلق به جداكشتهاي محور جنيني بوده‌اند كه ۱ شاخساره از آلوده سازي با سوسپانسيون I و ٤ شاخساره از آلوده سازي با سوسپانسيون II حاصل شدند. در ضمن ۴ شاخساره متعلق به دوره همكشتي ۷۲ ساعته و ۱ شاخساره مربوط به دوره همكشتي ۱۲۰ ساعته بوده است. بر اساس نتايج به دست آمده بهترين درصد تراريزش معادل ۱ درصد مي‌باشد كه متعلق به تيمار ۷۲ ساعت همكشتي، سوسپانسيونII و جداكشت محور جنيني سربريده بوده است.
كلمات كليدي: نخود، انتقال ژن، اگروباكتريوم

Agrobacterium tumefaciens- Mediated Transformation of Chickpea (*Cicer arietinum*)

Shiva Hamzeh, Parisa Koobaz, Aliakbar Habashi, Ezatollah Farshadfar**

Abstract
To improve *Agrobacterium* mediated transformation of chick pea (*Cicer arietinum*), we examined the effect of different factors such as kind of explants (decapitated embryo axes and apical meristem), kind of suspension media (I & II) and the time of co cultivation (72, 48, 120 hours). In this study we used of Bivanij cultivar. Explants were inoculated with LBA4404 strain of *Agrobacterium tumefaciences* with binary vector pBI121 containing gus and *nptII* genes. Multiple shoots were repeatedly selected with kanamycin. The GUS histochemichal assay and polymerase chain reaction analyses were carried out for confirmation of the existence of gus and *nptII* genes. At the end decapitated embryo axes was selected as the best explant and cocultivation for 72 hours in suspension II showed the best results.The frequency of gene transformation in this treatment was estimated about 1%.

مقدمه
نخود (*Cicer arietinum*) از مهمترين حبوبات دانه‌اي محسوب مي‌شود. اين گياه با دارا بودن حدود ۲٤-۱۷ درصد پروتئين به عنوان يك منبع مهم پروتئيني مكمل غلات در جيره غذايي مردم كشورهاي آسيايي و آفريقايي اهميت فراوان دارد(Saxena *et al* 1996). نخود هر ساله متحمل خسارات زيادي توسط بيماري‌هاي قارچي و آفات نباتي مانند بيماري برق زدگي و آفت كرم غلاف خوار مي‌گردد. اگرچه نخود داراي گونه‌هاي وحشي زيادي است كه واجد صفات مطلوب مي‌باشند، اما تلاقي آنها با گونه زراعي توسط روشهاي مرسوم اصلاح نباتات موفقيت آميز نبوده است. بنابراين نياز به استفاده از فناوري مهندسي ژنتيك به عنوان مكمل روشهاي مرسوم اصلاحي جهت توليد گياهان مقاوم به آفات، بيماري‌ها و تنش‌هاي محيطي امري لازم به نظر مي‌رسد. قبل از انتقال ژن يا ژنهاي مطلوب، بهينه كردن شرايط انتقال ژن در گياه نخود ضروري مي باشد (Sately *et al* 1985).

امروزه گزارشات كمي از انتقال ژن به نخود در دسترس مي‌باشد. توليد كالوسهاي تراريخته با استفاده از گونه‌هاي وحشي اگروباكتريوم گزارش شده است (Mohapatra and Sharma,1991 and Islam *et al* 1994). انتقال ژن‌هاي *nptII* و*gus* از طريق تيمار جداكشت محور جنيني (با حذف ناحيه مريستمي ساقه) با اگروباكتريوم تومه‌فاسينس، سويه LBA4404 حامل پلاسميد pBI121 به گياهچه‌هاي نخود موفقيت آميز بوده است (Fontana *et al*,1993 and Kar *et al* 1996). انتقال موفقيت آميز ژنهاي *nptII* و *gus* با استفاده از سويه‌هاي C58C1 ، CV2260 و EHA101 حامل پلاسميد pBI121 به تعدادي از ارقام نخود با استفاده از محور جنيني سر بريده نيز گزارش شده است (Krishnamurty *et al* 2000).

هدف اصلي در اين تحقيق بررسي امكان انتقال ژن به گياه نخود (رقم بومي بيونيج) از طريق تلقيح با اگروباكتريوم تومه‌فاسينس و با تكيه بر القاي شاخساره چندگانه بوده است. در اين تحقيق نوع جداكشت، سوسپانسيون باكتري و طول دوره هم‌كشتي مورد بررسي قرار گرفت ودر نهايت مطلوب‌ترين شرايط براي انتقال ژن با گزينش گياهچه‌هاي مقاوم در برابر كانامايسين و انجام آزمون بيان ژن *gus* و واكنش زنجيره‌اي پليمراز معرفي شد.

مواد و روشها

مواد گياهي، سويه اگروباكتريوم و پلاسميد مورد استفاده

رقم مورد بررسي در اين تحقيق رقم بيونيج بوده كه بذور آن از معاونت تحقيقات ديم موسسه تحقيقات كشاورزي كرمانشاه (سرارود) تهيه شدند. براي استريل كردن بذور از الكل ۷۰ درصد و هيپوكلريت سديم ۲% استفاده شد (Adkines *et al* 1995). جداكشت محور جنيني سربريده با حذف ۲ ميلي‌متر از ناحيه مريستمي ساقه و ريشه تهيه شد. مريستم انتهايي نيز با حذف برگچه‌هاي اطراف ناحيه مريستمي و برش از محل اتصال برگچه‌ها تهيه شد. براي تلقيح جداكشتها از اگروباكتريوم تومه فاسينس، سويه LBA4404 حامل پلاسميد pBI121 استفاده شد كه حاوي ژنهاي ß-glucoronidase (*gus*) با پيشبر ويروس موزائيك گل كلم CaMV35S و نئومايسين فسفوترانسفراز (*nptII*) با پيشبر NOS مي‌باشد. دو روش تهيه سوسپانسيون باكتري مورد بررسي قرار گرفت. براي تهيه سوسپانسيون I تك كلوني اگروباكتريوم در محيط LB مايع حاوي ۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين در دماي ۲۸ درجه سانتيگراد داخل شيكر با دور ۲۰۰ rpm كشت داده شد. زماني كه به OD: ۰/٤-۰/٦ رسيد محيط حاوي باكتري با دور ٤۰۰۰ rpm سانتريفوژ شد. رسوب باكتري در محيط MS مايع معلق و تركيبات، ال-سيستئين (۳/۵ ميلي‌مولار)، سديم تيو سولفات (۱ ميلي‌مولار) و استوسرينگون (٤۰ ميليگرم در ليتر) به آن افزوده شد. براي تهيه سوسپانسيون II تك كلوني باكتري ۱٦ ساعت قبل كشت داده شد. ۲۰۰ ميكروليتر از محيط حاوي باكتري داخل ۲۰ ميلي‌ليتر محيط LB تازه حاوي استوسرينگون (٤۰ ميلي‌گرم در ليتر) ريخته و تا رسيدن به غلظت ۰/٦ داخل شيكر قرار داده شد.

آلوده‌سازي جداكشت ها

پنجاه عدد از هر يك از جداكشت ها به طور جداگانه در ۵ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون هاي I و II به مدت ۳۰ دقيقه معلق شدند. سپس جداكشت ها روي كاغذ صافي استريل خشك شده و روي محيط باززايي (محورهاي جنيني بر روي محيط MS همراه ۱/۵ ميلي‌گرم در ليتر BAP و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر IAA و مريستمها بر روي محيط MS همراه ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر BAP و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر IAA) قرار گرفتند. جداكشت ها در سه دوره هم‌كشتي ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعته در تاريكي و دماي ۲۵ درجه سانتيگراد قرار گرفتند. پس از آن به محيط باززايي حاوي ۵۰ ميلي‌گرم در ليتر كانامايسين منتقل شده و در دماي ۲٤ درجه سانتيگراد با طول دوره روشنايي ۱٦ ساعت نگهداري شدند. واكشت هر دو هفته يكبار انجام شد. در مجموع ۱۳۵۰ جداكشت محور جنيني و مريستم انتهايي با اگروباكتريوم آلوده شدند.

رنگ آميزي بافت براي بيان فعاليت ژن *gus* و واكنش زنجيره‌اي پليمراز

براي آزمون هيستوشيميايي*gus* ۲-۱ برگچه از قسمت گياهچه‌هاي باززا شده در محيط انتخابي به مدت ۱٦-۱۲ ساعت در محلول رنگ آميزي *gus* در دماي ۳۷ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. پس از آن برگچه‌ها چندين بار با الكل ۷۰ درصد شستشو شدند. براي انجام واكنش زنجيره‌اي پليمراز غلظت ۵۰ نانوگرم از DNA گياهان تراريخته احتمالي به همراه DNA گياه شاهد، وكنترل منفي و پلاسميدpBI121 به عنوان كنترل مثبت، PCR شدند. توالي آغازگرهاي اختصاصي ژنها عبارتند از:

آغازگر رو به جلو ژن gus: GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG

آغازگر معكوس: TGG ATT CCG GCA TAG TTA AA

آغازگر رو به جلوژن *nptII* : GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT

آغازگر معكوس: ATC GGG AGC GGC GAT ACC GT.

نتايج و بحث

در حدود ۱۰ الي ۱٤ روز پس از كشت ۳-۲ شاخساره از محل زخم خورده راس محور جنيني و نيز از مريستم انتهايي ظاهر شد. در ضمن از محل گره‌هاي لپه‌اي جداكشت محور جنيني نيز در اغلب نمونه‌ها دو شاخساره بوجود آمدند. تمامي شاخساره‌هاي القايي از منطقه گره لپه‌اي و اغلب شاخساره‌هاي ظاهرشده از محل زخم خورده جداكشتها سفيد رنگ بودند (شكل۱)، كه اين مطلب با نتيجه گزارش شده توسط كار و همكاران (۱۹۹٦) مطابقت دارد و غلظت مناسب كانامايسين به كار رفته در محيط انتخابي را تاييد مي‌كند. تعدادي از شاخساره‌ها در ابتدا متمايل به سبز بودند ولي با گذشت زمان سفيد رنگ شدند و فقط تعداد معدودي از شاخساره‌ها به رنگ سبز باقي ماندند (شكل ۳). همانطور كه در جدول شماره ۱ نشان داده شده از ۷۵۰ جداكشت مريستم انتهايي آلوده شده با سوسپانسيون I، بعد از گذشت ۸ هفته كشت در محيط انتخابي ۲ شاخساره سبز و از ۷۵۰ جداكشت محور جنيني آلوده شده نيز ۲ شاخساره سبز و مقاوم در مقابل كانامايسين به دست آمد، كه اين شاخساره ها جهت بررسي بيشتر تحت آزمون هيستوشيميايي براي بيان فعاليت ژن *gus* قرار گرفتند. بر اساس نتايج حاصل از رنگ آميزي، فقط برگچه‌هاي جدا شده از يكي از شاخساره‌هاي القايي محور جنيني با دوره هم كشتي ۷۲

ساعته فعاليت ژن *gus* را به صورت تظاهر رنگ آبي در بافت خود نشان داد (شكل۲) در حالي كه آزمون هيستوشيميايي بيان ژن *gus* در بافت برگچه‌هاي حاصل از مريستم انتهايي منفي بود. پس از ۸ هفته كشت شاخساره‌هاي مقاوم در محيط انتخابي واكنش زنجيره‌اي پليمراز براي دی ان آاس‌تخراجي از گياهچه‌هاي مقاوم همراه با كنترل منفي ، مثبت و دی ان آ گياه شاهد با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي ژنهاي *gus* و *nptII* انجام شد. بر اساس نتايج حاصله دی ان آ استخراجي ازگياهچه سبز القا شده توسط جداكشت محور جنيني كه آزمون بيان ژن *gus* نيز براي آن مثبت بوده است، باندهاي مربوط به ژنهاي *gus* و *nptII* را بر روي ژل آگارز نشان داد. لذا در مرحله بعدي تحقيق كه هدف بررسي تاثير سوسپانسيون II در تلقيح جداكشتها بوده است فقط از جداكشت محور جنيني سربريده استفاده شد و دوره هم كشتي ٤٨ ساعته نيز حذف شد. در اين مرحله از ٦٠٠ جداكشت آلوده شده توسط سوسپانسيون II ، ۱۰ شاخساره مقاوم در محيط انتخابي مشاهده شد. از بين آنها فقط برگچه‌هاي ٤ شاخساره بيان ژن *gus* را به صورت تظاهر رنگ آبي نشان دادند. واكنش زنجيره‌اي پليمراز براي دی ان آ استخراجي از گياهچه هاي مقاوم انجام شد. بر اساس نتايج حاصله دی ان آ استخراجي از چهار گياهچه‌اي كه آزمون بيان ژن *gus* در آنها مثبت بود باند مورد نظر ژن‌هاي *gus* و *nptII* را نشان دادند (شكل ۴). نتايج هر دو مرحله در جدول شماره۱ آورده شده است. در اين تحقيق در مجموع ۱۳۵۰ جداكشت توسط اگروباكتريوم تلقيح شدند و در نهايت بيشترين درصد تراريزش در حدود ۱% تخمين زده شد كه مربوط به استفاده از جداكشت محورجنينی، دوره هم كشتی ۷۲ ساعته و استفاده از سوسپانسيون II بوده است كه در مقايسه با آمار ارائه شده توسط كريشنامورتي و همكاران (۲۰۰۰) كه از ٤۰۰۰ جداكشت آلوده شده ۱٦ گياه تراريخته احتمالي به دست آوردند (با درصد تراريختي بالاتر از ٤/۰%) مطلوب مي‌باشد.

منابع:

1- Adkins AL, Godwin ID and Adkins W (1995) An efficient in vitro regeneration system for Australian-grown chickpea (*Cicer arietinum*). Aust.J.Bot 43 : 491-497

2- Carlos Popelka J, Terryn N and Higgins T.J.V (2004) Review of gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing counties . Plant Science. 167: 195-206.

3- Fontana G, Santini L, Caretto S, Frugis G and Mariotti D (1993) Genetic transformation in the grian legume(*Cicer arietinum* L). Plant Cell Reports. 12:194-198.

4-Islam R, Malik T, Husnain T and Riazudin S (1994) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*- chickpea interaction. Plant Cell Reports. 13: 561-563.

5- Kar S, Johnson M, Nayak P and Sen SK (1996) Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports. 16: 32-37.

6- Krishnamurtyhy KV, Suhasini K, Sagare AP, Meixner M, Kathen A.de , Pickardt T and Schieder O (2000) *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea *(Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Reports. 19: 235-240.

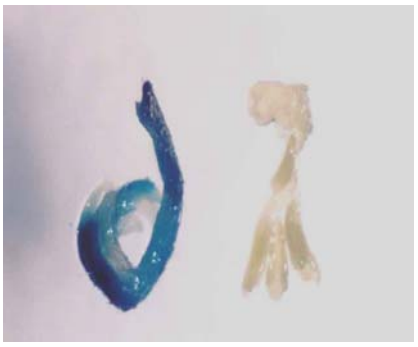
7- Satelly DM, Altman DW, Kohel RJ, Rangan TS and Commiskey E (1985) Abstracts American of Agronomy , Madison. pp: 135.

8- Saxena N, Saxena P, Johanson MC, Virmanir C, Virmani SM and Harris H (1996) Adaption of chickpea in west Asia and North America. ICARDA and ICRISAT.

جدول۱- نتايج نهايی تراريزش جداكشت های نخود

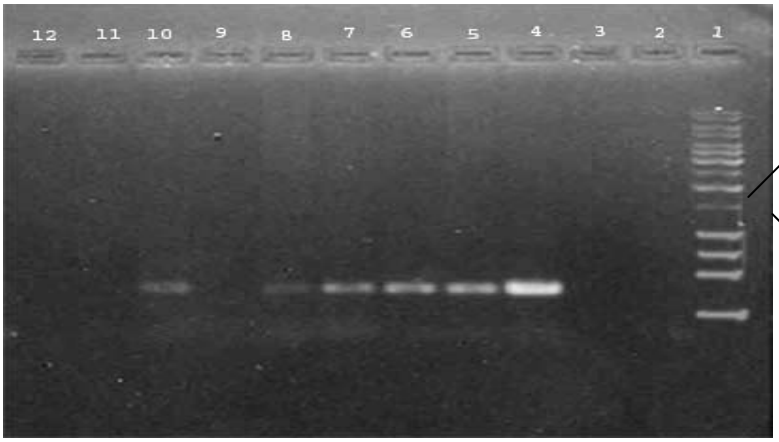
نوع سوسپانسيون	نوع جداكشت	مدت زمان هم كشتي	تعدادكل جداكشت آلوده شده	تعداد شاخساره سبز با تست مثبت GUS	تعداد شاخساره سبز با PCR مثبت	درصد تراريزش
سوسپانسيونI	مريستم انتهايي	۴۸	۲۵۰	-	-	-
		۷۲	۲۵۰	-	-	-
		۱۲۰	۲۵۰	-	-	-
	محور جنيني	۴۸	۲۵۰	-	-	-
		۷۲	۲۵۰	۱	۱	%۰/۴
		۱۲۰	۲۵۰	-	-	-
سوسپانسيونII	محور جنيني	۷۲	۳۰۰	۳	۳	%۱
		۱۲۰	۳۰۰	۱	۱	%۰/۳

شکل ۱- شاخساره های القایی مجور جنینی که در محیط انتخابی سفید شده اند



شکل ۲- شمایی از بیان ژن *gus* در بافت برگچه گیاهچه تراریخت احتمالی در مقایسه با شاهد

شکل ۳- شاخساره های باززا شده در محیط انتخابی



شکل۴- نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز دی ان آ گیاهچه‌هاي تراریخته احتمالي براي ژن *gus*

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

۱-نشانگر مولكولي (Ladder)

۲-كنترل منفي

۳- DNA گیاه شاهد

۴- كنترل مثبت (پلاسمید pBI121)

۵- چاهكهاي ۵ الي ۱۱ DNA گیاهچه‌هاي T_0 اندازه باند *gus* (۴۰۰ bp)

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop