بهینه سازی انتقال ژن به سیب زمینی با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*

ابراهیم دورانی علیایی ـ محمد فارسی ـ عبد الرضا باقری ـ بهزاد قره یاضی[1]

تاریخ دریافت ۸۱/۳/۱۳

چکیده

نظر به اینکه موفقیت در انتقال ژن علاوه بر ژنوتیپ گیاهی ، به روش مورد استفاده نیز بستگی دارد، برای تراریختی سیب زمینی از جداکشت‌های میانگرهی ، برگی و ریز غده‌ای استفاده گردید. برای این منظور پلاسمید pBI121 به عنوان حامل ژن *gus* تحت کنترل پروموتور CaMV 35S استفاده شد. پس از انتخاب بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، گیاهان تراریخته به روش باززایی مستقیم از جدا کشتهای برگی بدست آمدند. گیاهانی که وضعیت تراریختی آنها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تایید قرار گرفت ، برای رنگ آمیزی *gus* مورد استفاده قرار گرفتند. ۹۶٪ این گیاهان بیان ژن *gus* را در برگ، ریشه و غده نشان دادند در حالی که بیان آن در ساقه قابل ردیابی نبود. بیان این ژن در گیاهان تراریخته بعد از سه بار واکشت نشان داد که ژن انتقالی از پایداری خوبی برخوردار می باشد. در این مقاله انتقال ژن به سیب زمینی رقم کوسیما و تظاهر دائمی بتاگلوکورونیداز در بسیاری از بافتهای گیاه سیب‌زمینی مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: سیب زمینی، انتقال ژن، آگروباکتریوم

مقدمه

یکی از جدیدترین فناوریها که در چند دهه اخیر توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌است، استفاده از بیولوژی سلولی‌مولکولی می‌باشد. با استفاده از این علم، انسان قادراست سلولهای زنده را تحت سلطه و رهبری قرار دهد و در جهت اهداف خود بکار گیرد . بیوتکنولوژی به طور اعم و مهندسی‌ژنتیک به طور اخص به ابزار قدرتمندی در دست بشر تبدیل شده‌است که استفاده از آنها در سطح جهانی روز به روز در حال افزایش است (۱۱).

ایران با سطح زیر کشت ۱۶۸ هزار هکتار یکی از مهمترین کشورهای تولید کننده سیب زمینی می باشد (۱). با توجه به محدودیت منابع آب و خاک، افزایش تولید در واحد سطح اصولی ترین و منطقی ترین راه کار برای افزایش تولید آن در جهت تامین تقاضای جمعیت در حال رشد کشور می تواند باشد، که نیازمند اصلاح گیاهان با صفات زراعی مطلوب می‌باشد. در سالهای اخیر علاوه بر روشهای کلاسیک، به خاطر پاسخ مثبت این گیاه به فنون کشت بافت و انتقال ژن، از روشهای مبتنی بر علوم سلولی و مولکولی، شامل هیبریداسیون سوماتیکی و انتقال ژن، برای اصلاح این گیاه به طور وسیع استفاده شده است (۱۳).

انتقال ژن به گیاهان، بویژه سیب زمینی، علاوه بر اینکه به ژنوتیپ گیاهی بستگی دارد، روش مورد استفاده نیز در موفقیت تراریختی نقش اساسی ایفا می کند و ژنوتیپ های مختلف با استفاده از جداکشتهای مختلف قابل تراریختی هستند (٤). چندین روش برای تراریختی سیب‌زمینی از طریق آگروباکتریوم

۱ـ به ترتیب، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد دانشکده کشاورزی و پژوهشگر پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج

بر اساس جداکشت‌های[1] مورد استفاده، ابداع شده‌است (۵). شرمن و بون (۱٦) روشی را برای انتقال ژن به سیب‌زمینی پیشنهاددادند که در آن جداکشتهای غده‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. در این روش دیسکهای غده‌ای پس از آلوده شدن با آگروباکتریوم در محیط گزینشی وادار به ساقه‌زایی مستقیم می‌شوند. این روش در ژنوتیپهایی که به باززایی از غده جواب مثبت می‌دهند بهترین روش می‌باشد (٤). همزمان بلوک (۳) استفاده از جدا کشت‌های برگی را برای این کار گزارش کرد بعدها استفاده از ریزغده[2] و میانگره به عنوان جداکشت نیز توسعه‌یافت که مزیت استفاده از ریزغده به جای غده یکی در استریل بودن آنها و دیگری در قابل تولید بودن آنها در زمان دلخواه می‌باشد. چشمک‌های موجود در ریزغده‌ها که دارای جوانه‌های کامل و یا مریستم‌های رویشی هستند به عنوان هدف برای انتقال دی‌ان‌آ از آگروباکتریوم به آن محسوب می‌شوند.

باززایی گیاهان تراریخته از جداکشتهای برگی به سه مرحله مجزا شامل کالوس‌زایی، باززایی و توسعه ساقه‌چه‌ها تقسیم می‌شوند. دستورالعمل های منتشره برای این منظور به روشهای یک مرحله‌ای، که تمام مراحل در یک محیط انجام می گیرد، روش دو مرحله‌ای که کالوس زایی در یک محیط و باززایی و توسعه ساقه‌چه‌ها در محیط دیگری انجام می گیرد، و بالاخره روش سه مرحله‌ای که در آن هر سه مرحله در سه نوع محیط کشت مجزا انجام می گیرد، تقسیم می‌شوند. روش دومرحله‌ای را وب وهمکاران (۱۸) بکاربردند، که در این روش جداکشتها برای کالوس‌زایی ٦-۳ هفته در محیط MS با هورمونهای NAA, BAP, GA3 قرار گرفتند. سپس برای باززایی به محیط بدون اکسین منتقل شدند. امروزه در اغلب آزمایشگاه‌ها از این روش استفاده می‌شود. در این مقاله استفاده از روش تک‌مرحله‌ای برای تراریختی سیب زمینی (رقم کوسیما) گزارش می گردد.

انتقال ژن به گیاه از طریق آگروباکتریوم علاوه بر اینکه نیازمند یک سیستم پایدار بازیافت گیاه کامل از یک تک سلول تراریخته می باشد، نژاد باکتری، شرایط و غلظت و مدت زمان همکشت با باکتری نیز، برای ژنوتیپ گیاهی باید بهینه گردد. جهت بدست آوردن دستورالعمل مناسب برای انتقال ژن، ژنهای گزارشگر براحتی و به طور موفقیت آمیز می توانند مورد استفاده قرار گیرند (۹ و ١٤) بعلاوه ژنهای گزارشگر به خاطر تشخیص ساده تولیداتشان در مطالعات مربوط به اجزای تنظیم کننده نسخه برداری و میزان بیان ژنها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۱۵). برخی از این ژنهای گزارشگر از قبیل β-D-گلوکورونیداز و لوسی فراز باکتریایی و لوسی فراز کرم شب تاب ، با لکه دار کردن بافت گیاهی ردیابی می شوند. رایج ترین این سیستم ها سیستم *gus* برگرفته شده از باکتری اشریشیا کولی می‌باشد. با توجه به حساس بودن ، ارزان بودن و راحتی کار با این سیستم و نظر به اینکه فعالیت این ژن به طور طبیعی در گیاهان قابل ردیابی نیست، از آن به طور تجاری به عنوان ژن نشانگر برای بهینه سازی انتقال ژن و آنالیز بیان ژن در گیاهان استفاده می‌شود (۱۰). این ژن یک آنزیم پایداری را کد می کند که شکافته شدن زنجیره بتا گلوکورونیداز را کاتالیز می کند و بعد از هیدرولیز سوبسترای بی‌رنگ ۵- برومو- ٤- کلرو-۳-ایندول β-D-گلوکورونیک اسید، به رنگ آبی قابل مشاهده است. در این مقاله تراریختی سیب زمینی با این ژن به عنوان ژن گزارشگر، با استفاده از جدا کشت های برگی و میانگرهی و ریز غده‌ای گزارش می گردد.

مواد و روشها

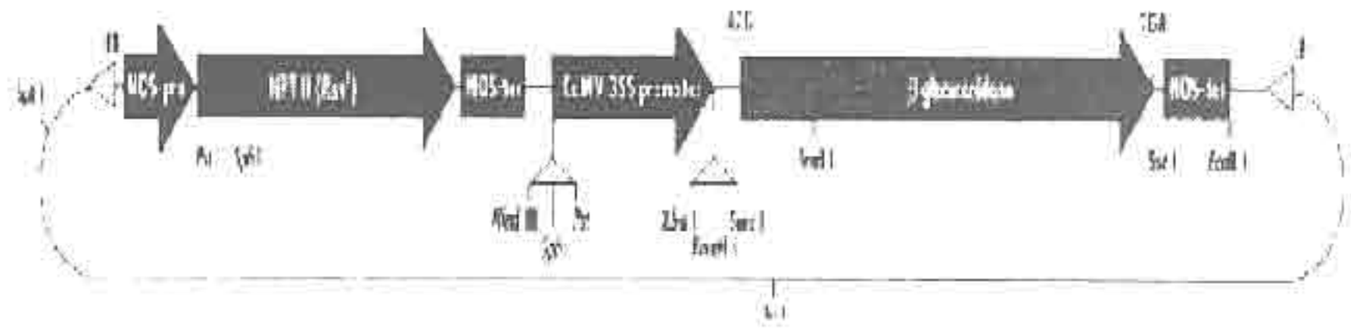
مواد گیاهی: در آزمایشات مقدماتی برای تعیین بهترین ژنوتیپ و محیط کشت مناسب برای کالوس‌زایی و باززایی، سه واریته دزیره، آگریا و کوسیما مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهچه‌های عاری از ویروس این سه رقم از مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه گردیدند.

باکتری و پلاسمید : در این آزمایش از LBA4404 آگروباکتریوم، که دارای سیستم حاملی دو گانه می باشد، و نژاد DH5α اشریشیاکولی[1] در کارهای تراریختی و همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمید pBI ۱۲۱ به عنوان حامل ژن *gus* مورد استفاده قرار گرفت (شکل-۱)

تکثیر گیاهچه ها: گیاهچه‌ها تحت شرایط استریل به قطعات ۱/۵ - ۱ سانتی متری تقسیم شدند، بطوری که هر کدام حداقل دارای یک میانگره با جوانهٔ جانبی و برگ مربوطه بودند. هر یک از این قطعات در محیط کشت MS[2] مایع تکمیل شده با ۳ میلی گرم در لیتر پنتونیک اسید قرار گرفتند تا به گیاه کاملی

1- *E.coli*

2- Murashige and Skoog



شکل-۱) نقشه فیزیکی پلاسمید pBI121 که در آن ژن *gus* تحت کنترل پروموتور 35S و خاتمه دهنده[1] nos قرار گرفته است.

تبدیل گردند.

برای بدست آوردن دستورالعمل مناسب برای کالوس‌زایی، آزمایشات مقدماتی بر اساس پروتکل های منتشر شده انجام شد (۱۳). در نهایت از تیمار های هورمونی بکار رفته، محیط R بانمکهای MS تکمیل شده با ۳ میلی گرم در لیتر BAP ، ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر GA3، برای کالوس زایی و باززایی رقم کوسیما استفاده گردید.

برای تولید ریز غده، گیاهچه‌های کامل درمحیط MS تکمیل شده با ٦ ٪ ساکارز واکشت گردیده و درمحیط تاریک ودر دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا ریز غده تولید گردید.

کشت آگروباکتریوم برای انجام عمل همکشت: یک کلنی از باکتری در ۵ میلی لیتر محیط LB دارای آنتی بیوتیک کانامایسین و ریفامپیسین کشت شد و در طول شب در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. روز بعد ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع دارای ۲۰۰ میکرومول استوسیرینگون[2] با ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر از این کشت تلقیح گردید و یک شب دیگر در شیکر انکوباتور قرار داده شد. باکتری با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. تحت شرایط استریل محیط کشت باکتریایی دور ریخته شده و رسوب باکتری در دو میلی‌لیتر محیط MS حل گردید.

تلقیح جداکشتها با باکتری: برگهای سبز تیره گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت جدا شدند و یک نوار ۲-۱ میلی‌متری از قاعدهٔ برگ حذف گردید. در حاشیهٔ برگ زخمهای کوچکی با استفاده از اسکالپل تیز ایجاد گردید. میانگره‌های ساقه‌ای به قطعات ۱ - ۰/۵ سانتی‌متری تقسیم گردیدند. برای جلوگیری از پلاسیده شدن، جداکشتها به محض جدا شدن در پتری‌دیش حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MS بدون هورمون قرارداده شد.

از تقسیم ریزغده ها دیسک‌های یک میلیمتری حاصل شدند. بعد از تهیه همه جداکشتها، ۳۰۰ میکرو لیتر از باکتری آماده شده به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰دقیقه در نور کم به آرامی تکان داده شد. سپس جداکشتهای برگی و میانگرهی بدون خشک شدن به محیط R بدون آنتی بیوتیک، منتقل و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٢٤ درجه سانتیگراد با سیکل نوری ١٦:٨ (روشنایی: تاریکی) ساعت قرار داده شد. دیسک های غده‌ای به محیط MS تکمیل شده با ۰/۳ میلی گرم در لیتر **NAA**، یک میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر زآتین منتقل گردیدند.

برای گزینش گیاهان تراریخته جداکشتها پس از دو روز هم‌کشت شدن با باکتری به همان محیط کشت باززایی مربوطه، تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین مونوسولفات و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم (و یا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربانسیلین)، منتقل شدند. عمل واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یک بار روی محیط کشت مذکور انجام گردید. در مورد جدا کشتهای برگی و میانگرهی، در هر بار واکشت جداکشتهایی که در انتهای بریده کالوس تولید نکرده بودند، حذف گردیدند. نمونه‌ها هر روز بازرسی شده و به محض مشاهده کوچکترین آثاری از رشد باکتری در اطراف جداکشتها، پس از شستشو در آب استریل به محیط جدید منتقل شدند. بعد از ۳-۲ ماه ساقه‌های باززایی شده، که طولشان به۲- ۱/۵ سانتی متر رسید ، برای ریشه‌زایی به لوله‌های کشت شیشه‌ای ۱۵۰-۲۵ میلی متری دارای محیط MS بدون هورمون تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم (و یا ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کربانسیلین[3]) منتقل شدند.

غربال مولکولی گیاهان تراریخته:

استخراج دی‌ان‌آ از گیاهچه‌های تراریختهٔ بالقوه: دی ان آی برگهای گیاهان تراریخته به روش دلاپورتا و همکاران استخراج

1- Nopalin synthtase 2- Acetosyringone 3- Carbencillin

گردید (٦) و گیاهان باززایی شده در محیط آنتی بیوتیک‌دار برای ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز غربال گردیدند.

رنگ آمیزی گیاهان برای ژن گاس: محلول رنگ آمیزی با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل ، یک میلی لیتر در لیتر Triton 100X ، ۲۰۰ سی سی در لیتر متانول و یک میلی گرم در لیتر X- Gluc تهیه گردید و محلول حاصل با بافر فسفات (۵۰ mM Na2 HPO4 و ۵۰ mM NaH2PO4) به حجم نهایی رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم شد. نمونه های تهیه شده از برگ، ریشه، ساقه و غده گیاهان تراریخته به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی به صورت شناور در این محلول قرار داده شدند. سپس نمونه ها جهت مطالعه و نگهداری به الکل ۷٦ درصد منتقل گردیدند.

نتایج و بحث

از جداکشت های ریز غده ای هیچ کدام از ارقام سیب زمینی گیاه تراریخته ای باززایی نشد. بعد از آزمایشات مقدماتی که برای کالوس‌زایی و باززایی ارقام مورد استفاده انجام گرفت، محیط کشت مناسب برای باززایی مستقیم از دیسک های برگی و میانگرهی برای رقم کوسیما بهینه گردید. دو رقم دزیره و آگریا به علت درصد باززایی کم از این جدا کشتها، برای تراریختی مورد استفاده قرار نگرفتند.

به علت قدرت زیاد رشد باکتری، برای همکشت از غلظت‌های پایین آن استفاده شد. بعد از انتقال جداکشت‌ها به محیط باززایی دارای ۵۰ میلی گرم درلیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، تمایز شاخساره های بالقوه تراریخته در انتهای بریده جداکشتهای برگی قابل مشاهده بود. وارد کردن زخمهای کوچک به حاشیه برگها در موفقیت تراریختی اثر مستقیمی داشت. هر چند که بریدن برگ تنها در قاعده آن، بهترین مکان برای باززایی شاخساره تراریخته محسوب می گردد (۳) ولی برخی از گیاهان تراریخته از همین زخمهای حاشیه ای بدست آمده‌اند.

بعد از اینکه شاخساره‌های باززایی شده در محیط آنتی‌بیوتیک‌دار به اندازه ۳-۲ سانتی‌متر رشد کردند (شکل ۲) به محیط MS دارای ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل گردیدند. گیاهانی که ژن مقاومت به کانامایسین (*npt II*) را همراه ژن *gus* دریافت کرده بودند، در محیط دارای آنتی‌بیوتیک به راحتی ریشه داده و ریشه آنها به خوبی توسعه پیدا کرد. بدیهی است که گیاهان شاهد و گیاهان باززایی شده غیر تراریخته قادر به ریشه‌زایی در این محیط نبوده و پس از مدتی از بین رفتند (شکل ۳).

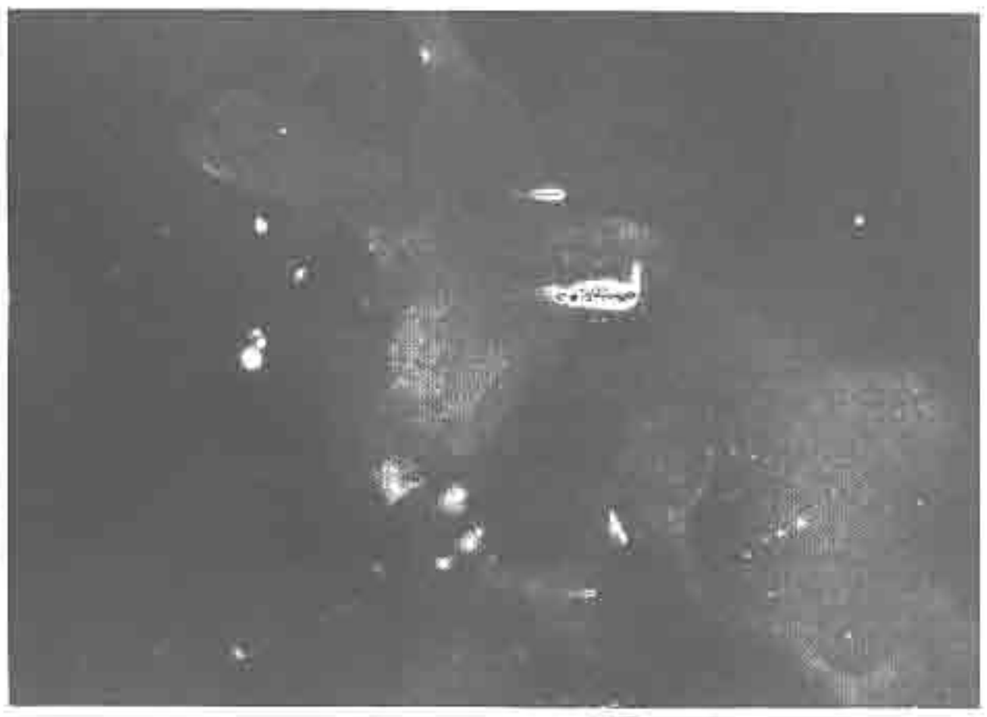
نتایج حاصل از پی‌سی‌آر ژنوم سه گیاه تراریخته در شکل ٤ آورده شده است. در این آزمایش علاوه بر دی‌ان‌آ گیاهان تراریخته، از دی‌ان‌آ پلاسمیدی به عنوان کنترل برای عمل درست آغازگرها و به عنوان مولکولهای استاندارد[1] برای قطعه قابل تکثیر، از دی‌ان‌آ گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی و کنترل برای عدم وجود توالی آغازگرها در ژنوم طبیعی سیب‌زمینی، از آب به عنوان شاهد منفی و برای کنترل عدم آلودگی مواد، استفاده گردید.

بافت های گیاهان تراریخته که در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای ژن *npt II* باند مورد نظر را نشان داده بودند، برای ارزیابی بیان ژن *gus* مورد استفاده گرفتند. ۹٦ درصد گیاهانی که باند مورد نظر را در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان داده بودند، بیان ژن *gus* را در برگ و ریشه، ساقه و غده به خوبی نشان دادند(شکل ٥). برخلاف انتظار از پیش‌بینی CaMV 35S، بیان این ژن در ساقه ها قابل ردیابی نبود که احتمالا به خاطر عدم کار آیی پیش بر CaMV 35S برای بیان در این بافت باشد. در حالی که بیان آن در برگ، ریشه و غده ها کاملا یکنواخت و مشخص بود. نمونه های حاصل از سومین واکشت گیاهان تراریخته بیان ژن *gus* را به همان خوبی گیاهان لمه نشان دادند که بیانگر پایداری خوب ژن منقل شده می باشد.

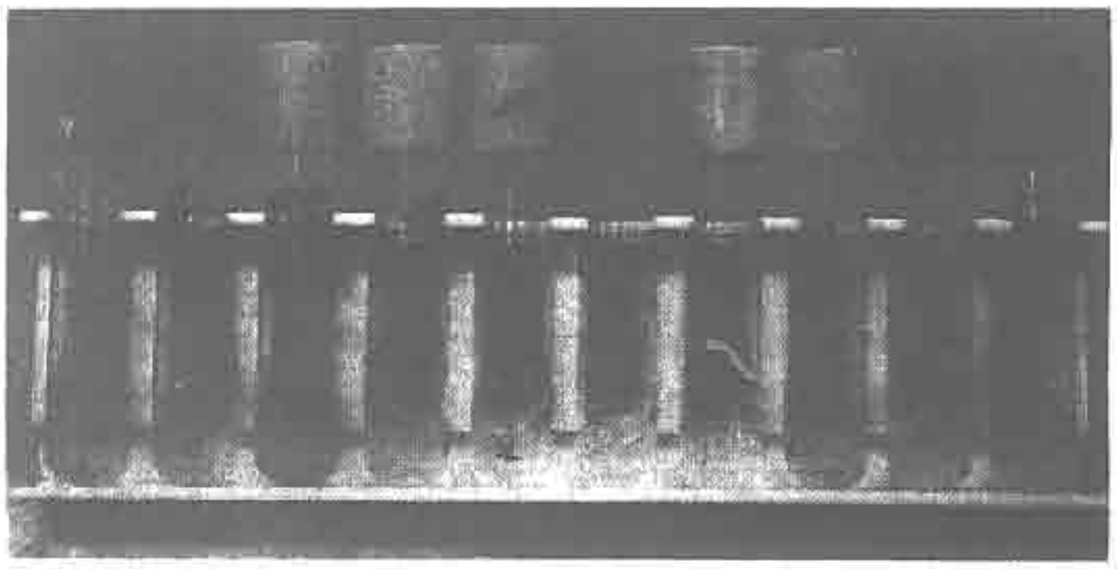
در همه دستورالعمل های منتشرشده برای تراریختی سیب‌زمینی از دو نوع محیط کشت با ترکیبات هورمونی متفاوت برای کالوس‌زایی و و باززایی استفاده می‌شود (۲، ۳ و ٤). در این روشها بعد از اینکه جداکشتها در حضور هورمون اکسین وادار به کالوس‌زایی شدند، برای تولید شاخساره به محیط کشت عاری از اکسین منتقل گردیدند.

در این تحقیق گیاهان تراریخته بدون استفاده از دو نوع ترکیب هورمونی، و تنها در یک محیط کشت، از جدا کشتهای

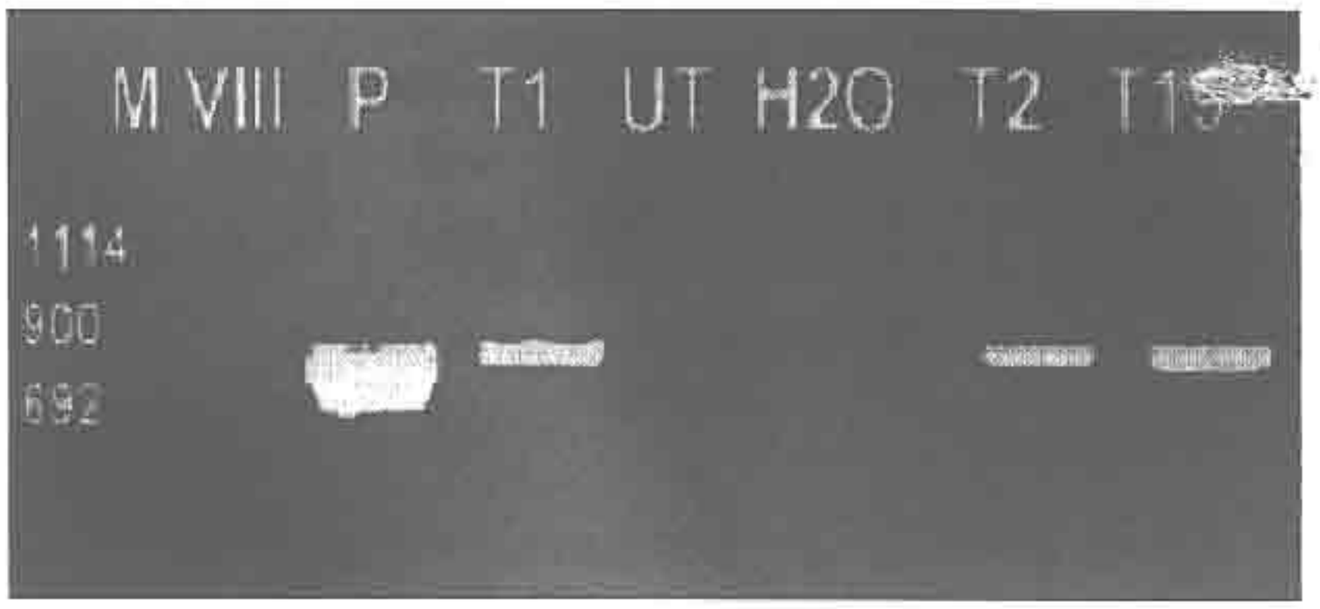
1- Size Marker



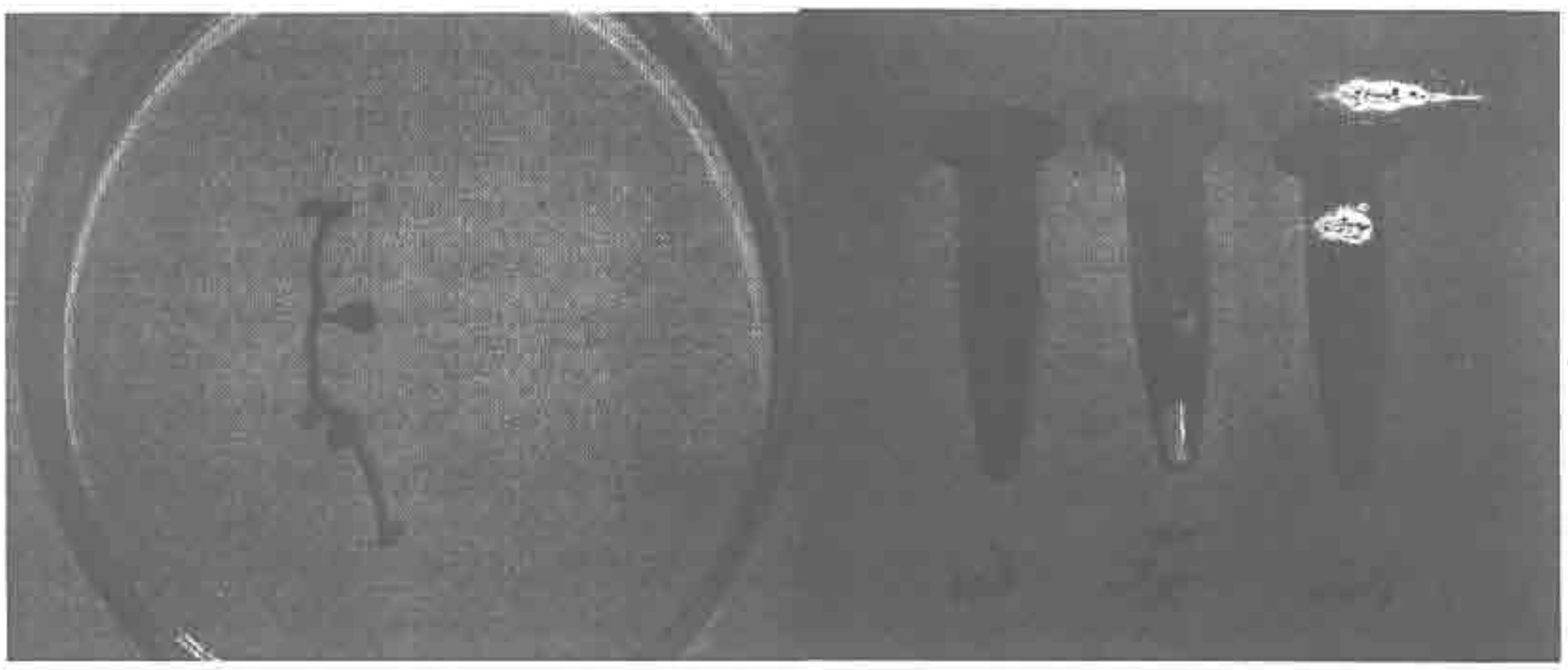
شکل۲- باززایی گیاهچه تراریخته از کالوسهای تراریخته در حضور ماده گزینشگر



شکل۳- گزینش گیاهچه‌های بدست آمده برای ریشه دهی در محیط دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کاناماپسین: سه گیاهچه وسطی که غیر تراریخته هستند در این محیط قادر به ریشه زایی نبوده اند.در حالی که همه گیاهان تراریخته در این محیط تولید ریشه کردند.



شکل ٤- نتایج حاصل از الکتروفورز فراورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن NPTII که در آن دی‌انآ مورد استفاده به ترتیب عبارتند از: VIII به عنوان نشانگر؛ P پلاسمید PBI121 استخراج شده از آگروباکتریوم؛ T1 و T2وT19گیاهان تراریخته ؛ H2O آب؛ UT گیاه غیر تراریخته



شکل ٥- بیان ژن گاس در بافتهای مختلف (ریشه، برگ، غده) گیاهان تراریخته

برگی به طور مستقیم باززایی گردیدند. روش یک مرحله‌ای برای تراریزش سیب‌زمینی تنها توسط کیل و همکاران (۱۲) گزارش شده است. آنها از این روش برای تراریختی لایه مغذی کشت سوسپانسیون سلولی توتون استفاده کرده‌اند. از آن به بعد گزارشی مبنی بر باززایی مستقیم شاخساره های تراریخته از جدا کشت‌های برگی و میانگرهی منتشر نشده‌است. به شناخت ما، این دومین گزارش برای تراریختی سیب زمینی از روش باززایی مستقیم می‌باشد. مزیتی که این روش برای تراریختی نسبت به روش دو و سه مرحله‌ای دارد، در این است که در این روش چون شاخساره‌ها از سلولهای بریده شده به طور مستقیم و یا به واسطهٔ تعداد تقسیم سلولی محدود بدست می‌آید از تنوع و جهش کمی برخوردار خواهدبود که در کشت بافت سلولی سیب‌زمینی به عنوان یکی از معایب مطرح می‌باشد.

از میانگره‌های رقم کوسیما و دیسکهای غده ای هر سه رقم، بعد از همکشتی با آگروباکتریوم در محیط گزینشگر، هیچ نوع کالوس و یا شاخساره تراریخته‌ای تولید نشد. در حالیکه در محیط شاهد از همین جدا کشت ها شاخساره‌های متعددی به طور مستقیم باززایی شد. جداکشت‌های برگی برای تراریختی رقم کوسیما بهترین نتیجه را دادند به طوری که تمام گیاهان تراریخته بالقوه بدست آمده از این جداکشت‌ها باززایی شدند و از جداکشت‌های ساقه‌ای گیاه تراریخته احتمالی تولید نگردید و این جدا کشتها بدون تولید کالوس، نکروزه شده و از بین رفتند. هر چند که جداکشت‌های برگی به عنوان بهترین جداکشت برای تراریختی سیب‌زمینی محسوب می گردند ولی گزارش‌های موفقیت آمیزی از باززایی گیاهان تراریخته از جدا کشت‌های میانگرهی و ریز غده‌ای نیز منتشر شده است (۸). دال و هامپسون (٤) برای تراریختی پنج رقم سیب‌زمینی از جدا کشت‌های میانگرهی استفاده کردند. آنها مشاهده کردند که بین ارقام و جداکشتهای مورد استفاده در درصد باززایی گیاهان تراریخته تفاوت معنی‌داری وجود دارد و تعداد گیاهان تراریخته برای جداکشت‌های برگی/ میانگرهی سه رقم مورد استفاده توسط ایشان به ترتیب برابر با ۹/۳۳، ٤۳/۲۲ و ۳ بود.

آگروباکتریوم نه تنها در آلوده‌کردن گونه‌های گیاهی مختلف، کارآیی متفاوتی دارد، بلکه ژنوتیپ گیاه مورد استفاده، نوع جداکشت، سن جداکشت، pH محیط کشت و حتی شرایط فیزیولوژیکی جداکشت در موفقیت انتقال ژن از باکتری به سلول گیاهی مؤثر می‌باشد(۱۰). علاوه بر گیاه، نژاد باکتری مورد استفاده نیز در موفقیت تراریختی مهم می‌باشد و بین نژاد باکتری و ژنوتیپ گیاهی واکنش مستقلی اتفاق می‌افتد. در مطالعه‌ای که وان و همکاران (۱۷) بر روی نژادهای مختلف باکتری و ژنوتیپهای گل داودی انجام‌دادند، مشخص گردید که حساسیت به باکتری در حد بالایی وابسته به ژنوتیپ می باشد و از ١٤ ژنوتیپ مورداستفاده، تنها چهار ژنوتیپ به دو نژاد باکتری حساسیت نشان‌دادند. دیو و همکاران (۷) اثر سه نژاد باکتری را در تراریختی یونجه مورد آزمون قرارداندکه تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها، برای تراریختی توسط باکتری وجودداشت. آنها مشاهده کردند که بین یک ژنوتیپ و ژنوتیپ های نتاج آن، تفاوت زیادی در قابلیت تراریختی با آگروباکتریوم وجود دارد به طوری که از ۲۰٪ ازجداکشتهای ژنوتیپ والد آلوده شده به باکتری، گیاه تراریخته به دست آمد. درحالیکه از ژنوتیپ نتاج آن، هیچ گیاه تراریخته ای بدست نیامد.

از جدا کشت‌های میانگرهی و از دیسک‌های ریزغده‌ای هیچکدام از ارقام مورد استفاده گیاه تراریخته ای بدست نیامد. این درحالی است که تابحال از تراریزش ارقام آگریا و کوسیما گزارشی منتشر نشده است و تنها گزارشاتی از تراریزش دزیره آنهم بااستفاده از جدا کشتهای برگی و غده‌ای وجود دارد. دال و هامپسون (٤) نشان دادند که تراریختی سیب زمینی علاوه بر ژنوتیپ به روش یا جدا کشت مورد استفاده نیز بستگی دارد و ارقام مختلف با استفاده از جداکشت های مختلف قابل تراریختی هستند.

از جدا کشتهای میانگرهی رقم کوسیما گیاه تراریخته‌ای تولید نگردید این امر احتمالا به خاطر عدم توانایی آگروباکتریوم در آلوده کردن این واریته می باشد. این در حالی است که این جدا کشت‌ها در محیط شاهد باززایی خوبی داشتند. در آزمایش دال و هامپسون (٤) از پنج ژنوتیپ سیب‌زمینی، که به کشت‌بافت در حد مطلوبی پاسخ مثبت می‌دادند، تنها از سه ژنوتیپ موفق به باززایی گیاه تراریخته شدند و دو رقم دیگر توسط آگروباکتریوم آلوده[1] نگردید. ایشیق و همکاران (۱۰) با استفاده از جداکشتهای

1- Inoculation

ریزغده‌ای موفق به بازیافت گیاهان تراریخته در یازده ژنوتیپ از بیست ویک ژنوتیپ به کار رفته شدند. واکنش بین باکتری و ژنوتیپ گیاهی مهمترین توجیه برای این نتایج می تواند باشد. ژنوتیپ گیاهی برای پاسخ به تراریزش و آلودگی با آگروباکتریوم نقش کلیدی بازی می کند. در برخی ژنوتیپ‌ها از جداکشت برگی وغده‌ای و یا یکی از این‌ها استفاده می گردد. بسته به پاسخ واریته برای باززایی از هر یک از این جداکشتها، از آن برای تراریختی استفاده می شود.

بیان خوب ژن *gus* در گیاهان تراریخته در بافتهای برگی و غده نشان دهنده قابلیت پروموتور CaMV 35S در رونویسی از ژن های بیگانه در این بافت ها می تواند باشد. این موضوع در انتقال ژنهای مفید به این گیاه از قبیل انتقال ژنهای ایجاد مقاومت به بید سیب‌زمینی، که بیان آن در این بافت‌ها مورد نظر می‌باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است. در راستای این طرح، انتقال ژن‌های حشره‌کش باکتریایی به سیب‌زمینی در موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی در حال انجام است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر فراهم آوردن شرایط انجام این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

۱- آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۱۳۷۸-۱۳۷۹، ۱۳۸۰. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصاد، دفتر آمار ور برنامه ریزی

2- Arpaia, S., G. Mennella, V. Onofaro, E. Perri, F. Sunseri, and G.L. Rotina. 1997. Production of transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato beetle (*Leptinotarsa desremlineata*). Theor. Appl. Genet. 95:329-334.

3- Blouk, M. D. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using Agrobacterium tumefaciens. Theor. Appl. Genet. 76: 767-774.

4- Dal, P.J., and K.K. Hampson. 1995. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum*). Euphytica. 85:101-108.

5- De. B.M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using Agrobacterium tumefactans. Theor. Appl. Genet. 76: 767-774.

6- Dellaporta, S., G. Wood, J. Hicks. 1983. A plant DNA mini–preparation version II. Plant Mol Bio Rep. Vol:1 19-21

7- Du, S., L. Erickson and S. Bowwley. 1994. Effect of plant genotype on transformation of cultivated alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 3: 330-334.

8- Gulina, I.V., O.A. Shalga, M.V. Mironor, E.V. Revenkova, A.S. Kraer, G.E. Pozmogora, G.Y. Yakovleva, and K.G. Skryabin. 1994. Expression of a modify genes for the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Var. tenebrionis in transgenic potato plants. Mol Biol. 28:748-753.

9- Hull, G.A., and D. Martine. 1995. The β-Gloucuronidase (gus) Reporter gene system. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 49. Plant gene transfer and expression protocols. H. Jones', Humana press Inc.,Totowa,NJ.

10- Ishige, T., M. Ohshima, and Y.Ohashi. 1991. Transformation of Japanese potato cultivars with the β-glucuronidase gene fused with the promoter of the pathogeneses related 1a protein gene of tobacco. Plant Science. 73:167-174.

11- Kasha, K.J. 1999. Biotechnology and world foods supply. Genome. 42: 642-645.

12- Keil, M., I.J. Sanchez-Serrano and L. Willmitzer. 1989. Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of single member of protease inhibitor II gene family. EMBO Journal. 8: 1323- 1330.

13- Kumar, A. 1995. Agrobacterium-mediated transformation of potato genotype. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 44. Agrobacterium protocols. K.M.A. Gartland and M.R. Davry.Human press Inc, Totowa.Nj.121-128

14- Old. R.W. and S.B. Primrose. 1994. Principles of gene manipulation an introduction to genetic engineering. Black Will Science. London.

15- Schrott, M. 1988. Selectable marker and reporter gene. In: I. Potrykus and G. Spangenberg (Eds.), Gene teransfer to plants. Springer-Verlage, Berlin Heidilberg. Germany. PP. 325-336.

16- Sheerman S.,M.W. Bevan. 1988. A rapid transformation method for Solanum

17- Van W.M.E., J. Jone, H.B.M. Huitema, and H.J.M. Dons. 1991. Genetic transformation of Chrysanthemum using wild type *Agrobacterium* Strains; strain and cultivar specificity. Plant Cell Rep. 9: 505-508.

18- Web. K.J., E.D.Osifo, and G.G. Henshaw. 1993. Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum*). Plant Sci. Let. 30: 108.

Optimization of *Agrobacterium* - mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*) with *gus* gene

E. Doranie-oliaie - M. Farsi - A. R. Bagheri - B. Ghreyazie [1]

Abstract

Efficiency of gene transfer to plants depends on genotype of plants and the adopted method. Three varieties of potatoes, Desire, Agria and Cosima were included in this experiment and three types of explant, internode, leave and microtubers were produced from each genotype. PBI 121 plasmid with *gus* gene under control of CaMV 35S promoter was used as vector . Positive transgenic plants were directly regenerated from leaf discs in the presence of kanamycin as a selectable agent. Transgenic plants were confirmed using PCR. Positive plants were used in *gus* assay. A high percentage (96%) of these plants showed *gus* expression of the gene in transformed plants. Even after three sub-culture they indicated a considerable stability of the inserted gene.

Keywords: Potato, *Agrobacterium*, genetic transformation, *gus*, PCR

1- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University Mashhad and Reserch Institute of Biotechnology, Karaj Respectively