زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و سوم، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۲۹-۴۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷

تولید سویای تراریخت با استفاده از ریزنمونه نیمه بذر

سمیه هوشیار، محمدباقر باقریه نجار *، مهناز اقدسی و احمد عبدل‌زاده
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

چکیده

سویا (*Glycine max*) یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و منبعی غنی جهت تولید روغن و پروتئین در جهان است و تلاش‌های فراوانی برای بهبود ژنتیکی آن با استفاده از روش‌های زادآوری سنتی و مهندسی ژنتیک انجام شده است. اما اصلاح سویا با روش سنتی با توجه به خودلقاح بودن این گیاه و تنوع ژنتیکی کم واریته‌های آن، مشکل آفرین است و استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک جهت انتقال ژن به سویا به یک سیستم کارا برای تولید لاین‌های تراریخت پایا احتیاج دارد. در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از نخستین تلاش برای تولید سویای تراریخت با استفاده از ریزنمونه نیمه بذر، با واسطه آگروباکتریوم در کشور گزارش می گردد. به این منظور، دانه‌های سویا از ارقام DPX و گرگان ۳ پس از استریل سطحی و یک شب آب نوشی برش خورده، ریزنمونه‌های نیمه بذر آماده گردید. در ادامه، ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 تلقیح گردیدند. گیاهان باززایی شده‌ای که روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین به رنگ سبز باقی مانده بودند جهت تأیید حضور ژن انتخاب شد. واکنش PCR، تعیین توالی و آزمون GUS سنجی انتقال، حضور و بیان موفق این ژن را در گیاهان باززایی شده هر دو رقم نشان داد. رقم DPX عملکرد بهتری در مقایسه با رقم گرگان ۳ از نظر درصد تراریزش دارا بود. مزیت اصلی استفاده از ریزنمونه نیمه بذر جهت انتقال ژن به سویا، سادگی و کارآیی بالای آن است و می‌تواند در آینده جهت انتقال ژن‌های مفید به‌کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium tumefaciens*، انتقال ژن، ریزنمونه نیمه بذر، ژن گزارشگر *GUS*، سویا

مقدمه

گیاه سویا (*Glycine max*) در همه نواحی آب و هوایی جهان به عنوان یکی از با ارزش‌ترین محصولات کشاورزی و منبعی غنی جهت تولید روغن و پروتئین کشت می‌شود و به علت حساسیت بالا به تنش‌های محیطی به ویژه شوری و خشکی، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش مقاومت آن در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی صورت گرفته است (Tran and Nguyen, 2009). اصلاح سویا با روش سنتی با توجه به خودلقاح بودن این گیاه و تنوع ژنتیکی اندک واریته‌های آن با

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mb.bagherieh@gu.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۷۱۳۲۲۴۵۸۸۲

مشکل رو به رو است (Christou *et al*., 1990) و اصلاح ژنتیکی سویا با روش‌های نوین مهندسی ژنتیک امری ضروری به نظر می‌رسد (Slater *et al*., 2008). در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوانی در جهت تولید سویای تراریخت و تجاری‌سازی کشت آن در سطح جهان انجام شده به طوری که از ۱۰۰ میلیون هکتار سویای کشت شده در سال ۲۰۱۱، ۷۵ درصد آن تراریخت بوده است (James, 2011).

اگرچه سویا یک گیاه دولپه و یک میزبان طبیعی برای آگروباکتریوم به شمار می‌رود، به عنوان یک گیاه سرسخت در برابر تراریزش توسط آگروباکتریوم شناخته شده و موفقیت‌های محدودی از تراریختی ژنتیکی بافت‌های مختلف سویا توسط آگروباکتریوم گزارش شده است (Mello-Farias and Chaves, 2008). در حال حاضر دو نوع سیستم باززایی تراریختی ژنتیکی با واسطه آگروباکتریوم در سویا مرسوم است که در یکی از آنها از گره لپه و در دیگری از جنین‌زایی سوماتیک استفاده می‌شود. نخستین گزارش تولید سویای تراریخت با استفاده از آگروباکتریوم توسط Hinchee و همکاران (۱۹۸۸) ارایه شد که در آن از گره‌های لپه (cotyledonary node, CN) به عنوان ریزنمونه استفاده شده بود. در این روش، بریدگی‌های دقیقی روی گره‌های لپه مشتق از جوانه‌های ۵ تا ۷ روزه ایجاد می‌گردد، سپس لپه‌ها با آگروباکتریوم تلقیح شده و جهت تشکیل نوشاخه‌ها و باززایی روی محیط کشت بافت قرار می‌گیرند. در روش‌های بهبود یافته، ریزنمونه انتخابی مشتق از دانه بالغ سویا به نام "نیمه بذر" استفاده شد که ضمن کارآیی بالا نیازمند ایجاد زخم دقیق روی ریزنمونه‌ها نیست (Paz *et al*., 2006).

آگروباکتریوم یک باکتری بیماریزای گیاهی است که حاوی پلاسمیدی نسبتا بزرگ به نام پلاسمید Ti است که قابلیت انتقال ژن به گیاه را دارد. برای تولید گیاه تراریخت توالی هدف را بین مرزهای انتهایی بخشی از پلاسمید به نام T-DNA قرار می‌دهند تا همراه با آن به صورت تصادفی به سلول گیاه منتقل شده و با ژنوم گیاه ادغام گردد (Alimohammadi and Bagherieh-Najjar, 2009). انتقال ژن به گیاه از طریق آگروباکتریوم، نیازمند یک سیستم پایدار باززایی گیاه کامل از یک سلول تراریخته است که باید برای گیاهان مختلف بهینه‌سازی گردد.

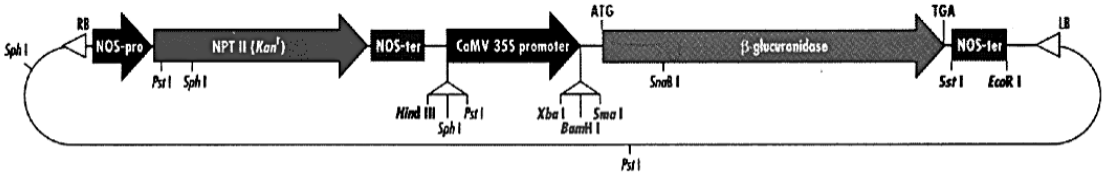
سویای رقم DPX که از ارقام وارداتی بومی شده در کشور است که نسبت به برخی بیماری‌ها مانند پوسیدگی زغالی و نماتود سیست سویا مقاومت نسبی دارد، اما رقم گرگان ۳ یک رقم حساس به این بیماری‌ها است (Hezarjaribi *et al*., 2013). با توجه به کمبود اطلاعات در خصوص به‌نژادی و تراریختی این ارقام در کشور، در پژوهش حاضر بهینه‌سازی سیستم نیمه بذر برای انتقال ژن به این دو رقم با استفاده از آگروباکتریوم حاوی ژن *GUS* به عنوان ژن گزارشگر شرح داده شده و به عنوان یک روش موفق جهت انتقال ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پیشنهاد گردیده است.

مواد و روش‌ها

دانه‌های بالغ ارقام DPX و گرگان ۳ جهت آزمایش های تراریختی از مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شدند (شکل ۲-A). این بذرها با استفاده از گاز کلر حاصل از مخلوط نمودن ۳/۵ میلی‌لیتر

کلریدریک اسید و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ژاول به مدت ۱۶ ساعت درون دسیکاتور استریل شد.

آماده‌سازی آگروباکتریوم: در پژوهش حاضر از آگروباکتریوم سویه LBA4404 و پلاسمید pBI121 تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری استفاده گردید. پلاسمید pBI121 حاوی T-DNA است که قابلیت انتقال به گیاه و ادغام شدن درون ژنوم آن را دارد. ناحیه T-DNA دارای ژن‌های *نئومایسین فسفوترانسفراز II* (مقاومت به کانامایسین) و توالی ژن *بتاگلوکورونیداز* (*GUS*) است (شکل ۱). از این پلاسمید برای ترانسفورماسیون سلول‌های آگروباکتریوم *توماقاسینس* سویه LBA4404 با روش شوک حرارتی استفاده گردید (Liu and Binns, 2003). کلونی‌های تشکیل شده در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین (نشانگر انتخابی نوع و سویه باکتری) و کانامایسین (نشانگر انتخابی پلاسمید) آزمون شدند. سپس سلول‌های آگروباکتریوم برای مراحل بعدی ذخیره گردیدند. برای نگهداری باکتری‌ها، یک میلی‌لیتر از باکتری کشت شده در محیط LB مایع با یک میلی‌لیتر محلول استوک گلیسرولی حاوی ۶۵ درصد گلیسرول، ۰/۱ مولار سولفات منیزیم و ۰/۰۲۵ مولار تریس به خوبی مخلوط و در ازت مایع ذخیره گردید.

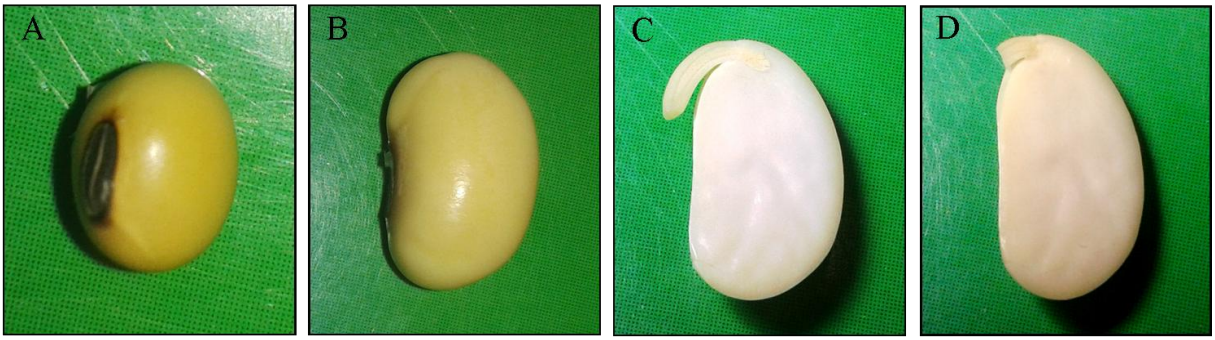


شکل ۱- ساختار T-DNA پلاسمید pBI121 حامل ژن گزارشگر GUS و ژن مقاومت به کانامایسین NPT II (Clonetech catalogue 1996/97)

آماده‌سازی آگروباکتریوم جهت تلقیح با روش اصلاح شده Paz و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت. در این مرحله باکتری از استوک گلیسرولی برداشته شد و روی پلیت حاوی محیط کشت LB جامد دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (نشانگر انتخابی نوع و سویه باکتری) و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین (نشانگر انتخابی پلاسمید) کشت گردید. پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از این مدت، تک کلونی از روی پلیت برداشته و در ۳ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی همان آنتی بیوتیک‌ها، درون انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد با ۲۰۰ دور بر دقیقه کشت شد. پس از ۱۶ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط پیش کشت برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین و ریفامپسین کشت شد. این محیط روی انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه و ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت یک شب قرار داده شد تا OD آن در طول موج ۶۵۰ نانومتر به ۰/۷ تا ۱ برسد. محلول آگروباکتریوم با دور ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ (مدل 200R، Micro، آلمان) گردید. روشناور حذف شد و رسوب در محیط آلودگی (جدول ۱) حل گردید. OD محلول آلودگی در طول موج ۶۵۰ نانومتر بین ۰/۷ تا ۰/۸ تنظیم گردید.

آماده کردن ریزنمونه ها و آلودگی: بذرهای

استریل حدود ۲۰ ساعت در آب مقطر استریل آب‌نوشی شدند (شکل ۲-B). ابتدا یک برش طولی در امتداد محور بذر زده شد، دو نیمه بذر از هم جدا شد و پوسته بذر حذف گردید (شکل ۲-C). سپس محور جنینی از ۳ میلی‌متر مانده به انتها قطع گردید. جوانه متصل به گره لپه نیز حذف گردید و ریزنمونه نیمه بذر آماده شد (شکل ۲-D). ریزنمونه های نیمه بذر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با آگروباکتریوم تلقیح شدند. پس از تلقیح، ریزنمونه ها روی محیط همکشتی (جدول ۱) پوشانده شده با کاغذ صافی (جهت کاهش رشد بی‌رویه باکتری) به صورتی که سطح صاف ریزنمونه محیط کشت را لمس کند قرار گرفتند. پلیت‌ها درون اتاق کشت یا ژرمیناتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.



شکل ۲- مراحل آماده‌سازی ریزنمونه نیمه بذر. بذر سویا قبل از آب‌نوشی (A)، پس از ۱۶ ساعت آب‌نوشی (B)، پس از دو نیم شدن و حذف پوسته (C)، آماده شدن ریزنمونه نیمه بذر با قطع محور جنینی از ۳ میلی‌متر مانده به انتها و حذف جوانه انتهایی متصل به گره لپه (D).

شرایط کشت و باززایی: مراحل و ترکیبات هورمونی لازم جهت کشت بافت و باززایی گیاه عمدتا بر اساس یافته‌های Abbasi (۲۰۱۱) همراه با تغییراتی به این شرح انجام شد: پس از ۵ روز همکشتی، ریزنمونه‌ها شستشو داده شد و در محیط شاخه‌زایی ۱ (جدول ۱) که محیط کشت B5 (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی هورمون سیتوکینینی BAP و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (جهت حذف آگروباکتریوم‌های اضافی در محیط کشت) است به صورتی که سطح صاف ریزنمونه رو به بالا باشد با زاویه ۳۰ تا ۴۵ درجه فرو برده شدند (قسمت انتهایی گره لپه در داخل محیط) و در اتاق کشت یا ژرمیناتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ قرار گرفتند.

پس از ۱۴ روز نوشاخه‌های باززایی شده از روی نواحی گره لپه و ناحیه رأسی ریزنمونه‌ها حذف و محور جنینی به حدود ۳ میلی‌متر برگردانده شد. ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی ۲ (جدول ۱) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (جهت حذف آگروباکتریوم) و کانامایسین (جهت انتخاب ریزنمونه های تراریخت) منتقل و برای ۱۴ روز دیگر در شرایط مشابه نگهداری شدند. پس از این مدت، لپه ها از ریزنمونه ها جدا شد و یک برش جدید روی پایه ریزنمونه هم‌سطح با محیط کشت زده شد. سپس ریزنمونه ها به محیط افزایش طول ساقه که محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کانامایسین بود، منتقل شدند (جدول ۱). واکشت هر دو هفته یک بار صورت گرفت.

جدول ۱- ترکیب محیط‌های کشت استفاده شده جهت تراریختی و باززایی سویا

محیط کشت	ترکیب
محیط آلودگی	۱/۱۰ ترکیبات محیط کشت B_5، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۳/۹ گرم بر لیتر MES، pH=۵/۴، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3، ۱/۶۷ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر استوسیرینگون
محیط همکشتی	۱/۱۰ ترکیبات محیط کشت B_5، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۳/۹ گرم بر لیتر MES، pH=۵/۴، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3، ۱/۶۷ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر استوسیرینگون، ۵ گرم بر لیتر آگار، ۱۵۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر DTT
محیط شستشو	محیط کشت B_5، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۵۹ گرم بر لیتر MES، pH= ۵/۷، ۱/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ گرم بر لیتر سفوتاکسیم
محیط شاخه‌زایی ۱	محیط کشت B_5، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۵۹ گرم بر لیتر MES، pH= ۵/۷، ۱/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ گرم بر لیتر سفوتاکسیم، ۸ گرم بر لیتر آگار
محیط شاخه‌زایی ۲	محیط کشت B_5، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۵۹ گرم بر لیتر MES، pH= ۵/۷، ۱/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، ۸ گرم بر لیتر آگار
محیط افزایش طول ساقه	محیط کشت MS، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۵۹ گرم بر لیتر MES، pH= ۵/۷، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آسپاراژین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال-پیرو گلوتامیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3، ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین ریبوزاید، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین
محیط ریشه‌زایی	۱/۲ محیط کشت MS، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۵۹ گرم بر لیتر MES، pH= ۵/۷، ۱ یا ۲ میلی‌گرم IBA، و یا همچنین با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۰/۵ میلیگرم در لیتر IAA و یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA

انتخاب ریزنمونه‌های تراریخت در طول مرحله افزایش طول ساقه با استفاده از غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین صورت گرفت. ریزنمونه هایی که حدود ۲ سانتی‌متر رشد نموده بودند از پایه جدا شده و به محیط ریشه‌زایی (جدول ۱) انتقال یافتند. ریشه‌زایی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر IBA با ترکیبی از دو هورمون IBA و IAA شامل ۱ میلی گرم بر لیتر IBA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA و همچنین ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA و ۱ میلی گرم بر لیتر IAA بر روی ریزنمونه‌های تراریخت آزمایش شد.

تحلیل مولکولی ریزنمونه‌های تراریخت با استفاده از PCR و توالی یابی: DNA ژنومی با روش آماده‌سازی سریع DNA (rapid DNA preparation) بر پایه روش Edwards و همکاران (۱۹۹۱) از برگ‌های جوان و سبز ریزنمونه‌های تراریخت احتمالی پس از دو هفته روی محیط کشت حاوی کانامایسین استخراج شد. برای ارزیابی کیفیت DNA استخراجی، از الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. روی DNA استخراج شده از ریزنمونه های تراریخت احتمالی و DNA گیاه شاهد به عنوان شاهد منفی و پلاسمید pBI121 به عنوان شاهد مثبت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی T-DNA تکثیر کننده قطعه ای ۲۱۰۰ جفت بازی از ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS*) صورت گرفت. یکی از آغازگرهای استفاده شده روی پروموتور 35S

(5'-CGCACAATCCCACTATCCTTCG-3') و دیگری روی NOS-terminator (5'-CGCGATAATTTATCCTAGTTTGC-3') قرار داشت. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکروگرم DNA ژنومیک، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر dNTP (غلظت ۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میکرولیتر $MgSO_4$ (غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X و ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase بود. واکنش ابتدا ۳ دقیقه در ۹۴ درجه و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۹ درجه، ۳ دقیقه ۷۲ درجه و در ادامه ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. به منظور تأیید کامل حضور ژن گزارشگر *GUS* در ژنوم گیاهان تراریخت، توالی یابی قطعه تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی T-DNA انجام شد. به این منظور، حجم مشخصی از محصول PCR، DNA ریزنمونه‌های تراریخت به همراه آغازگرهای *NOS* و 35S جهت تعیین توالی به شرکت BIONEER (کره جنوبی) ارسال شد. توالی یابی از هر دو سر قطعه انجام گردید (دو بار خوانش در جهت مثبت و منفی). هر دو توالی تعیین شده از دو سر قطعه توسط نرم‌افزار Clone Manager نسخه ۶ و بر اساس اطلاعات موجود از پلاسمید pBI121 در پایگاه اطلاعات NCBI بررسی گردید.

آزمون رنگ‌آمیزی هیستو شیمیایی *GUS*: جهت تأیید حضور ژن *GUS* در ریزنمونه‌های تراریخت احتمالی از آزمون رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS بر پایه روش Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) و Kosugi و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد. به این منظور، بافت برگی از گیاهان تراریخت احتمالی که ۲۸ روز روی محیط حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین زنده مانده بودند جدا شد و در محلول رنگ‌آمیزی شامل ۸۰ میلی‌مولار Na_2HPO_4 (pH=8)، ۸ میلی‌مولار Na_2EDTA، ۰/۸ درصد (حجمی-حجمی) تریتون X، ۱/۶ درصد (حجمی-حجمی) دی متیل سولفوکسید، ۲۰ درصد (حجمی-حجمی) متانول، ۰/۳۸ میلی مولار K_4FeCN_6 و ۱ میلی‌مولار X-glucuro CHA salt به مدت یک روز در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس بافت توسط اتانول رنگ‌زدایی شد.

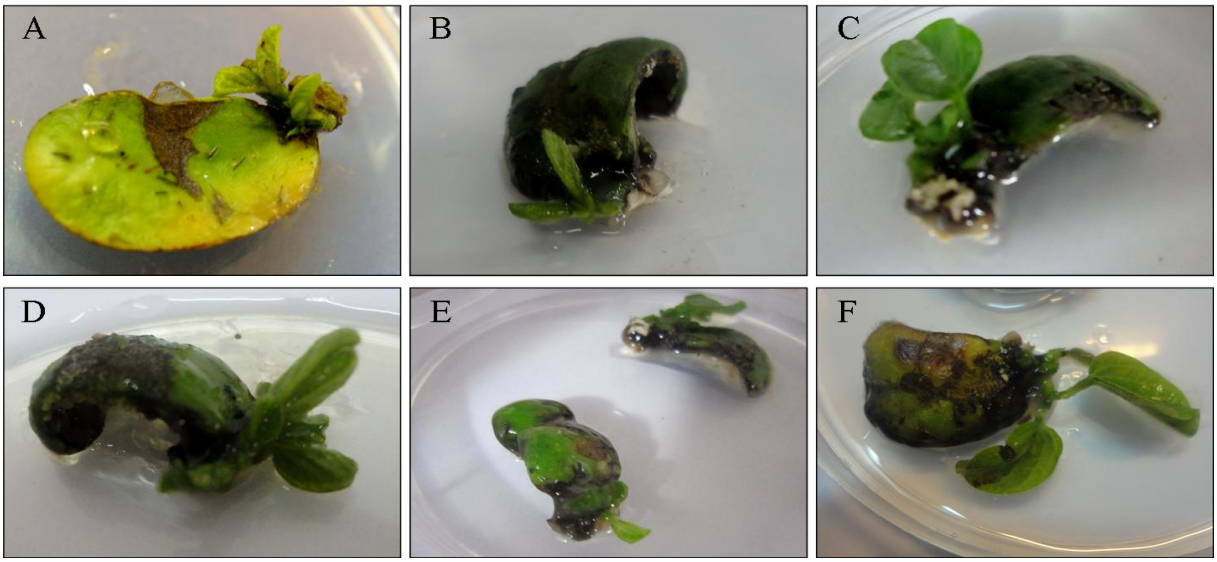
نتایج

با توجه به اهمیت دو رقم DPX و گرگان ۳ در تولید سویای کشور و با در نظر گرفتن این مطلب که میزان باززایی در حبوبات تحت تأثیر ژنوتیپ است و از طرفی فقدان اطلاعات مورد نیاز در این خصوص، بهینه‌سازی شرایط باززایی و انتقال ژن در این ارقام ضروری است. از آنجا که در انتقال ژن به گیاه سویا ریزنمونه نیمه بذر از سادگی و کارآیی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها برخوردار است (Paz *et al.*, 2006). بنابراین در این تحقیق، از ریزنمونه نیمه بذر استفاده گردید.

باززایی گیاهان تراریخت: دو و چهار هفته پس از همکشتی درصد شاخه‌زایی در دو رقم DPX و گرگان ۳ تعیین و به ترتیب معادل ۵۷ و ۶۳ در صد برآورد شد (جدول ۲). پس از حذف این شاخه‌ها و قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط شاخه‌زایی حاوی کانامایسین به عنوان انتخابگر، درصد شاخه زایی برای ارقام DPX و گرگان ۳ به ترتیب ۳۲/۵ و ۲۶ درصد به دست آمد. تصاویر مربوط به شاخه‌زایی در این دو مرحله در شکل ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۲- مقایسه میزان شاخه‌زایی در دو رقم DPX و گرگان ۳ (مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است). *درصد باززایی از (نسبت ریزنمونه‌های دارای یک یا چند نوشاخه به تعداد ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم ×۱۰۰) به دست آمد.

نوع رقم	تعداد ریزنمونه‌های تلقیح شده	درصد باززایی پس از ۲ هفته *	درصد باززایی پس از ۴ هفته
DPX	۸۳	۵۶/۶±۰/۴۴	۳۲/۷±۰/۹۱
Gorgan3	۵۴	۶۵/۳±۱/۱۷	۲۶/۱±۰/۴

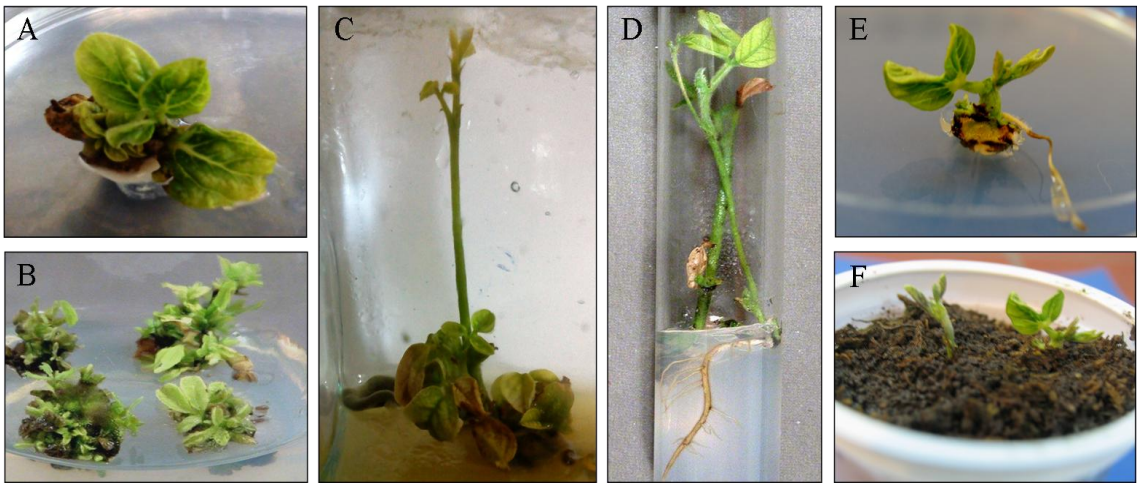


شکل ۳- شاخه‌زایی در محیط شاخه‌زایی بدون کانامایسین دو هفته پس از همکشتی (A و B) و در محیط حاوی کانامایسین چهار هفته پس از همکشتی (C و F)

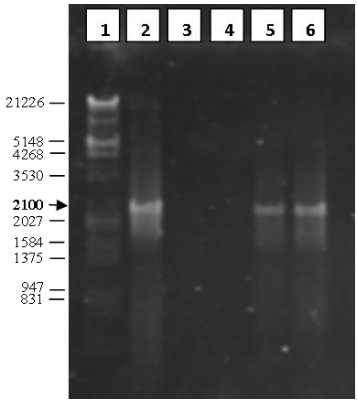
افزایش طول ساقه تا دو سانتی‌متر در ۶ ریزنمونه پس از ۸ هفته روی محیط افزایش طول ساقه حاوی کانامایسین صورت گرفت. سایر گیاهان در این محیط از بین رفتند. تصاویر مربوط به این مرحله از باززایی در شکل ۴ مشاهده می‌شود.

ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها در غلظت‌های ۲ میلی گرم بر لیتر IBA و ترکیب هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر IBA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA صورت گرفت (شکل ۴-D و E). شاخه‌های باززایی شده ریشه‌دار به خاک سبک (ترکیب خاک جنگل و ورمیکولیت به نسبت ۱:۳) انتقال یافتند (شکل ۴-F).

تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته با PCR و توالی‌یابی: روی DNA استخراج شده از ریزنمونه‌های تراریخت احتمالی و DNA گیاه شاهد به عنوان شاهد منفی و پلاسمید pBI121 به عنوان شاهد مثبت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی T-DNA (35S و NOS) صورت گرفت و نتیجه حاصل روی ژل آگاروز مشاهده شد (شکل ۵). با توجه به محدوده اتصال آغازگرها، باند حدود ۲۱۰۰ bp در ریزنمونه‌های تراریخت که مشابه باند نمونه شاهد است، نشانگر انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های تراریخت است. از آب به عنوان شاهد منفی PCR و از DNA سویای غیر تراریخت شاهد به عنوان شاهد منفی استفاده شد که عدم حضور باند در ستون DNA شاهد، نشانه نبود هم‌ساختی بین آغازگرها و ژنوم سویا و در واقع اختصاصی بودن باند تکثیر شده است.



شکل ۴- مراحل باززایی گیاه تراریخت و انتقال آن به خاک. افزایش طول ساقه (A تا C)، ریشه‌زایی (D و E)، انتقال به خاک (F)



شکل ۵- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی T-DNA. ستون ۱ نشانگر. ستون ۲ محصول پلاسمید pBI121 به طول حدود bp ۲۱۰۰ به عنوان شاهد مثبت. ستون ۳ آب به عنوان شاهد منفی و ستون ۴ سویای غیرتراریخت شاهد. ستون‌های ۵ و ۶ ریزنمونه‌های تراریخت.

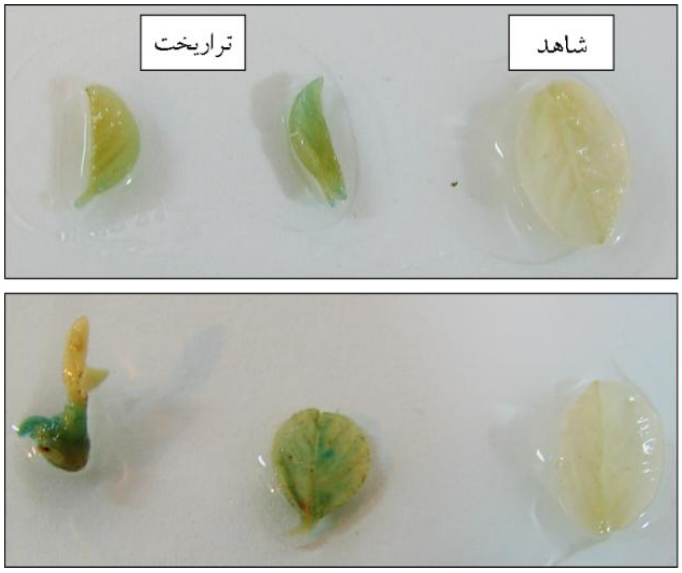
به منظور تأیید کامل اختصاصی بودن قطعه تکثیر شده و حضور ژن گزارشگر *GUS* در ژنوم گیاهان تراریخت، توالی‌یابی با آغازگرهای اختصاصی T-DNA انجام شد. هر دو توالی تعیین شده از دو سر قطعه توسط نرم‌افزار Clone Manager نسخه ۶ و بر اساس اطلاعات موجود از پلاسمید pBI121 در پایگاه اطلاعات NCBI بررسی گردید. همچنین بلاست این توالی در پایگاه NCBI صورت پذیرفت. هم ساختی نسبتا کاملی بین نتیجه تعیین توالی و این اطلاعات وجود داشت که نشان از تأیید قطعی حضور ژن *GUS* در ژنوم ریزنمونه‌های تراریخت دارد.

آزمون هیستوشیمیایی GUS: برای تأیید بیان ژن گزارشگر *GUS* در ریزنمونه های تراریخت احتمالی از آزمون رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS استفاده شد. به این منظور، بافت برگی از گیاهان تراریخت احتمالی که ۱۴ روز روی محیط حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین زنده مانده بودند جدا شد و در محلول رنگ آمیزی به مدت یک روز قرار گرفت. سپس توسط اتانول رنگ‌زدایی شد. نقاط آبی رنگ که نشانه حضور و بیان ژن *GUS* در بافت برگی است در شکل ۶ مشاهده می‌شود و درصد ریزنمونه های GUS مثبت در دو رقم DPX و گرگان ۳ در جدول ۳ گزارش شده است.

از ۲۰۴ ریزنمونه کشت شده در این پژوهش ۹ گیاه تراریخت به دست آمد که دارای نتایج مثبتی در آزمون PCR یا ارزیابی GUS بودند. بنابراین درصد تراریزش در پژوهش حاضر برابر با ۴/۴۱ بوده است.

جدول ۳- مقایسه میزان ریزنمونه‌های دارای ارزیابی GUS مثبت در دو رقم DPX و گرگان ۳. درصد ریزنمونه‌های GUS مثبت از (نسبت ریزنمونه‌های GUS مثبت به تعداد ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم × ۱۰۰) به دست آمد.

نوع رقم	تعداد ریزنمونه‌های تلقیح شده	تعداد ریزنمونه‌های GUS مثبت	درصد ریزنمونه‌های GUS مثبت
DPX	۸۳	۵	۶
Gorgan3	۵۴	۲	۳/۷



شکل ۶- رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS در ریزنمونه‌های سویا. گیاه شاهد در سمت راست قرار دارد.

بحث

سویا یکی از مهم ترین محصولات کشاورزی است که نه تنها به دلیل ظرفیتش در تولید روغن بلکه به دلیل نقش آن در تغذیه انسان‌ها وحیوانات دارای اهمیت ویژه ای است. اگرچه سویا یک گیاه دو لپه و یک میزبان طبیعی برای آگروباکتریوم به شمار می‌رود، به عنوان یک گیاه سرسخت در برابر تراریزش به وسیله آگروباکتریوم شناخته شده است (Mello-Farias and Chaves, 2008). روش‌های مختلفی جهت تراریزش سویا توسط آگروباکتریوم شناخته شده است که در این میان سیستم نیمه بذر به دلیل سهولت و کارآیی قابل قبول از اهمیت خاصی برخوردار است (Paz *et al.*, 2006). با توجه به این که در ایران مطالعات محدودی در خصوص تراریزش با استفاده از ریزنمونه نیمه بذر انجام شده است، در پژوهش حاضر انتقال ژن گزارشگر *GUS* با واسطه آگروباکتریوم به گیاه سویا گزارش می‌شود. چندین عامل از جمله: ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه و نوع وکتور بر تراریختی ژنتیکی گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم مؤثر است و در این میان، ژنوتیپ نقش اساسی را در باززایی سویا از طریق کشت

بافت بازی می‌کند که برای هر رقم باید شرایط کشت بافت، جهت باززایی بهینه‌سازی شود (Bailey *et al.*, 1993؛ Sairam *et al.*, 2003). با توجه به اهمیت دو رقم DPX و گرگان ۳ که دارای عملکرد بالا و سطح زیرکشت گسترده در کشور هستند و با در نظر گرفتن نبود اطلاعات مورد نیاز جهت تراریختی ژنتیکی این دو رقم بهینه‌سازی شرایط باززایی و انتقال ژن در این ارقام انجام شد. نتایج پژوهش حاضر انتقال موفقیت‌آمیز ژن گزارشگر *GUS* به هر دو رقم را نشان می‌دهد. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که رقم DPX نسبت به رقم گرگان ۳ از نظر درصد تراریزش وضعیت نسبتا مطلوب‌تری دارد.

جهت شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های گره لپه، استفاده از هورمون سیتوکینینی بنزیل آمینو پورین (BAP) ضروری است و فعالیت مریستمی را در سلول‌ها، جهت نمو نوشاخه القا می‌کند (Wright *et al.*, 1986). در پژوهش حاضر، از غلظت ۵ میکرومولار BAP جهت شاخه‌زایی استفاده شد و شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها در هر دو رقم به خوبی صورت گرفت. Paz و همکاران (۲۰۰۶) غلظت‌های: ۵، ۱۵ و ۱۰۰ میکرومولار BAP را به عنوان غلظت‌های بهینه جهت شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های گره لپه رقم ویلیامز گزارش کرده‌اند که نشان می‌دهد افزایش غلظت سیتوکینین BAP اثر چندانی بر افزایش شاخه‌زایی در این نوع ریزنمونه ندارد در حالی که نوع سیتوکینین استفاده شده در مراحل باززایی این ریزنمونه مؤثر بوده است و افزودن سیتوکینین زآتین ریبوزید امکان افزایش طول بیشتری را نسبت به سایر سیتوکینین‌ها به ساقه باززایی شده می‌دهد (Zia *et al.*, 2010).

در پژوهش حاضر برای القای ریشه در شاخه‌های باززایی شده از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی IBA و IAA استفاده شد و ریشه‌زایی تنها در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA مشاهده شد. Paz و همکاران (۲۰۰۶) و Zia و همکاران (۲۰۱۰) در ارقام سویا متفاوت از غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA جهت القای ریشه در شاخه‌های باززایی شده با سیستم نیمه بذر استفاده نموده‌اند. اما در پژوهش حاضر استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در محیط کشت، در هیچ یک از ریزنمونه‌ها ریشه تولید نکرد. به نظر می‌رسد که این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باشد.

جمع‌بندی

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که علیرغم سرسختی بالای سویا در مقابل تراریزش ژنی توسط آگروباکتریوم (Mello-Farias and Chaves, 2008)، تراریختی ژنتیکی آن با استفاده از ریزنمونه نیمه بذر و غلظت‌های مناسب سیتوکینین و اکسین با کارآیی قابل قبول، امکان‌پذیر است. Paz و همکاران (۲۰۰۶) درصد تراریزش با استفاده از ریزنمونه نیمه بذر را بین ۱/۴ تا ۸/۷ درصد گزارش کردند. درصد تراریزش در این بررسی حاضر ۴/۴۱ درصد بود که با در نظر گرفتن کارآیی سایر روش‌های تراریختی ژنتیکی سویا، کارآیی مطلوبی به نظر می‌رسد.

در ادامه این پژوهش، انتقال ژن‌های دخیل در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به

سویا در حال انجام است. همچنین می‌توان از این روش در جهت ایجاد گیاهان مقاوم به علف‌کش‌ها به ویژه گلیفوسیت و افزایش تولید سویا در کشور همگام با سایر کشورها بهره‌مند شد. امید است ادامه موفقیت‌آمیز این تحقیق به تولید گیاهان تراریخت مقاوم به تنش منجر شود که بدون شک با تکثیر این گیاهان بخشی از اهداف توسعه پایدار و کشاورزی پاک در کشور محقق خواهد شد.

سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات سرکار خانم نوشین مقدم به خاطر مساعدت در انجام آزمایش‌ها و از دانشگاه گلستان به خاطر حمایت مالی پژوهشی قدردانی می‌نمایند.

منابع

Abbasi, Z. (2011) Optimization of soybean tissue culture for transformation with the *DREB1A* gene. MSc thesis, Golestan University, Gorgan, Iran (in Persian).

Alimohammadi, M. and Bagherieh-Najjar, M. B. (2009) Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. African Journal of Biotechnology 8(20): 5142-5148.

Bailey, M. A., Boerma, H. R. and Parrott, W. A. (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 29(3): 102-108.

Christou, P., McCabe, D. E., Matinell, B. J. and Swain, W. F. (1990) Soybean genetic transformation-commercial production of transgenic plants. Trends in Biotechnology 8: 145-151.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50(1): 151-158.

Hezarjaribi, E., Raeisi, S. and Babaei. H. R. (2013) Katoul, a new soybean cultivar for cultivation in Golestan province. Seed and Plant Improvement 29(3) :621-622 (in Persian).

Hinchee, M. W., Connor Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, C. S. and Horsch, R. B. (1988) Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. Nature Biotechnology 6(8): 915-922.

James, C., (2011) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Brief No. 43. Ithaca, New York, USA.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6(13): 3901-3907.

Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y. (1990) An improved assay for β-glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β-glucuronidase activity. Plant Science 70(1): 133-140.

Liu, Z. and Binns, A. N. (2003) Functional subsets of the VirB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in VirB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. Journal of Bacteriology 185(11): 3259-3269.

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.

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.

Paz, M. M., Martinez, J. C., Kalvig, A. B., Fonger, T. M. and Wang, K. (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. Plant Cell Reports 25(3): 206-213.

Sairam, R. V., Franklin, G., Hassel, R., Smith, B., Meeker, K., Kashikar, N. and Goldman, S. L. (2003) A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 75(1): 79-85.

Slater, A., Scott, N. W. and Fowler, M. R. (2008) Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. Oxford University Press, New York.

Tran, L. S. and Nguyen, H. T. (2009) Future biotechnology of legumes. In: Nitrogen fixation in crop production (Eds. Emerich, W. D. and Krishnan, H.) 265-308. The American Society of Agronomy, Madison.

Wright, M. S., Koehler, S. M., Hinchee, M. A. and Carnes, M. G. (1986) Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Reports 5(2): 150-154.

Zia, M., Rizvi, Z. F., Rehman, R. and Chaudhary, M. F. (2010) Agrobacterium mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): some conditions standardization. Pakistan Journal of Botany 42(4): 2269-2279.