مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۱ (۱۰۱- ۹۱)

عوامل مؤثر در انتقال ژن گزارشگر *uidA* با استفاده از اگروباکتری به گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

حسین هنری[۱]، هوشنگ علیزاده[۲]*، علی اکبر شاه نجات بوشهری[۳]، سید علی پیغمبری[۴]، مختار جلالی جواران[۵] و روح اله براهمیپور[۶]

۱، استادیار دانشگاه امام حسین(ع)، ۲، ۳، ۴، ۶، استادیار، استاد، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۵، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۷/۱۰)

چکیده

گیاه کاهو با توجه به نوع مصرف و وزن تازه آن از پتانسیل مطلوب به عنوان یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌های خوراکی برخوردار است. پیش نیاز نیل به این هدف، بهینه‌سازی مسیر کشت بافت و انتقال ژن به این گیاه است. برای بهینه‌سازی انتقال ژن با کمک *اگروباکتری* (*Agrobacterium tumefaciens*) به کاهو از ناقل دو تایی pBI121 که دارای ژن گزارشگر *gus* تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S و ژن گزینشگر *npt II* با پیشبرنده NOS استفاده شد. در آزمایش اول دو رقم گیاه کاهو (TN-96-41، TN-96-39) و دو سویه *اگروباکتری* (LBA4404 و C58) با تراکم های (OD_{600nM}) ۰/۴ و ۰/۶ و سه سطح ۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ µM/L استوسرنگان و سه زمان تلقیح ۲، ۴ و ۷ دقیقه و با سه تکرار در قالب طرح فاکتوریل به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که رقم TN-96-39 و سویه باکتری LBA4404 برای عمل تراریختی مناسب‌تر بودند. در تیمار غلظت‌های مختلف *اگروباکتری* و سطوح مختلف استوسیرنگان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. زمان تلقیح ۲ دقیقه نسبت به دو سطح دیگرتلقیح، نتایج بهتری را نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات فوق، آزمایش دیگری با رقم TN-96-39 و سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه بر روی لپه‌های سه روزه و برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که جوانه‌های برگی و لپه‌ها برای عمل انتقال ژن مناسب می‌باشند که به ترتیب ۲۳٪ و ۱۹٪ ریزنمونه‌ها بر روی محیط انتخابی قادر به رشد بودند. ارزیابی حضور ژن‌های *gus* و *npt II* در گیاهان تراریخته در نسل‌های T0 و T1 از طریق PCR و آزمون بیان ژن *gus* نشان داد که حداقل یک نسخه از ژن *gus* در ژنوم گیاه جا گرفته و بیان یافته است.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، اگروباکتری، کاهو، کشت بافت، *gus*

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات دنیا و دارای وزن تازه بالایی است. درحال حاضر، کاهو در۷۶ کشور جهان کشت، و از برگ‌های آن به عنوان سالاد استفاده می‌شود (Honari et al., 2009 ; Peighambari et al., 2007 ; Lelivelt et al ., 2005 ;

* نویسنده مسئول: هوشنگ علیزاده تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۰۱۴۰۳ E-mail: halizade@ut.ac.ir

Frugis et al., 2004; Curtis et al., 1999).

امروزه به منظور تولید کالوس، باززایی گیاه کامل، ایجاد تنوع سوماکلونال و انتقال ژن‌های خارجی جهت تولید گیاهان تراریخته کاهو، کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی تحت شرایط درون‌شیشه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. در اغلب روش‌های انتقال ژن، جهت تولید پروتئین، یک سیستم کشت بافت کارآ با فراوانی بالای باززایی ضروری است. در برنامه‌های انتقال ژن، اولین قدم در تراریختی گیاهان مختلف، بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای آنها است. در گیاهان دولپه‌ای از برگ، لپه، ساقه، بذر جوانه زده و ریشه مویینه به عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود. درگیاهان تک‌لپه‌ای از بافت‌های مختلف مانند جنین بالغ، جنین نارس، کلئوپتیل، پرچم، میکروسپور و خوشه نارس قطعه قطعه شده به عنوان ریزنمونه استفاده شده است (Evans et al., 2003). تولید کالوس جنین‌زا و ایجاد یک سیستم باززایی ساده و روان، کارآیی لازم را برای بسیاری از ژنوتیپ‌های گیاهان فراهم می‌سازد. تولید کالوس و قابلیت باززایی عمدتاً تحت تأثیر ژنوتیپ، شرایط فیزیولوژیک جداکشت، نوع محیط کشت و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Lelivelt et al., 2005; Basu et al., 2004). کشت بافت در کاهو با اهداف انتقال ژن‌های مختلف به کروموزوم و کلروپلاست انجام می‌شود. بتا گلوکورونیداز (*gus*) ژن باکتریایی *uidA* (به طور تقریبی ۱۸۰۰ bp) کد کننده آنزیمی بنام بتاگلوکورونیداز است که به عنوان یکی از معمولترین ژن‌های گزارشگر برای بررسی بیان ژن در گیاهان به شمار می‌آید (Basu et al., 2004).

برای باززایی درون شیشه ای گیاه کاهو از قطعات مختلف مانند لپه، (Torres et al., 1993; Okubara et al., 1997; Pileggi et al., 2001; McCabe et al., 2001; Sun et al., 2006)، و برگ (Niki et al., 2001; Lelivelt et al., 2005; Kanamoto et al., 2006; Honari et al., 2009)، استفاده شده است. در تولید کالوس و باززایی گیاه کامل، تنظیم غلظت اکسین و سیتوکینین و مقدار نور و دما از اهمیت خاصی برخودار است. Torres et al. (1993) و Pileggi et al. (2001) برای باززایی گیاه از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (pH، ۵/۷) و به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت نور و تاریکی و دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند. در بررسی‌های دیگر (Niki et al., 2001; Sun et al., 2006)، از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *NAA* و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *BAP* استفاده شده است. Torres et al. (1993) از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر *BA* و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین به جای *NAA* برای ساقه‌زایی استفاده کردند. Kanamoto et al. (2006) از محیط کشت ½MS عاری از هورمون و Pileggi et al. (2001) از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌دهی در گیاه کاهو استفاده کرده‌اند.

برای بهینه‌سازی انتقال ژن در گیاه کاهو از ژن‌های گزارشگر *gus* و *GFP* استفاده زیادی شده است (Torres et al., 1993; Okubara et al., 1997; Pileggi et al., 2001; Sun et al., 2006; Niki et al., 2001; McCabe et al., 2001; Lelivelt et al., 2005; Kanamoto et al., 2006).

این پژوهش، با هدف بهینه‌سازی انتقال ژن به ارقام بومی ایرانی کاهو با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* صورت گرفت، زیرا این گیاه می‌تواند بعنوان یک بیوراکتور در جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب داروئی و تولید واکسن‌های خوراکی در تحقیقات آتی مطرح باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذور دو رقم TN-96-39 و TN-96-41 گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) با قدرت باززایی بالا (Honari et al., 2009) از بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه و در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران مورد مطالعه قرار گرفتند. بذور کاهو به مدت ۲۵ دقیقه در محلول توین-۲۰ (۰/۱٪) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل و انتقال به ظرف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب استریل به مدت ۴±۶۸ ساعت سبز شدند. سپس لپه‌ها بر روی محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۰/۲ mg/l (BA) و ۰/۲ mg/l (NAA) با pH، ۵/۷ مستقر شدند (Honari et al., 2009) تا با اگروباکتری‌های حاوی پلاسمید دارای ژن *gus* آلوده شوند.

سویه های اگروباکتری

ناقل pBI121(Clontech) حاوی ژن گزارشگر *gus* با پیشبرنده CaMV 35S، ژن نشانگر *npt II* با پیشبرنده NOS و دو سویه LBA4404 و C58 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در این آزمایش به‌کار گرفته شدند و تراریختی به روش انجماد و ذوب صورت گرفت (Wang, 2006). به محیط کشت LB (Sambrook & Russell, 2001) اتوکلاو شده، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین اضافه شد و باکتری‌ها در آن رشد داده شدند. محیط کشت LB مایع با دو سویه اگروباکتری تلقیح و در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. با عمل سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) باکتری‌ها در OD_{600}=۰/۸ جمع‌آوری و در محیط کشت MS رقیق و معلق به مدت ۲ ساعت مجدداً رشد داده شدند.

تراریختی و باززائی گیاهان

ریزنمونه‌های دو رقم گیاه کاهو (TN-96-41، TN-96-39) (Honari et al., 2009) و دو سویه *اگروباکتری* [LBA 4404 و C58 (pGV3101)] با چگالی نوری (OD_{600nM}) ۰/۴ و ۰/۶ و سه سطح ۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ µM/L استوسرنگان و سه زمان تلقیح ۲، ۴ و ۷ دقیقه و محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی BA۰/۲ mg/L، NAA ۰/۰۵ mg/L با pH ۵/۷ و فاقد هرنوع آنتی‌بیوتیک منتقل، و به مدت ۱، ۲، ۳ و ۶ روز هم‌کشتی در محیط تاریک نگهداری شدند. این طرح به صورت یک آزمایش فاکتوریل با سه تکرار اجرا گردید. نمونه‌ها به محیط کشت جدید حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به مقادیر ۲۰، ۳۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و سفاتا کسین ۵۰۰ میلی‌گرم در لیترمنتقل و هر دو هفته یکبار به محیط کشت جدید با همان ترکیب انتقال داده شدند. با توجه به نتایج آزمایش اول، آزمایش دیگری به اجرا در آمد که در آن از رقم TN-96-39 و سویه باکتری LBA 4404 استفاده شد. تلقیح به مدت ۲ دقیقه بر روی لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

گیاهچه‌های باززایی شده به محیط‌های کشت MS ۰/۱ mg/L، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۱ با غلظت هورمونی NAA و pH ۵/۷ (سه تیمار) و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انتقال پیدا کردند. گیاهان ۴۵ روز پس از ریشه‌دار شدن گیاهچه‌ها و انتقال آنها به گلدان، به گل نشستند. به منظور جلوگیری از دگرگشنی و فرار دانه‌های گرده، ساقه‌های گل‌دهنده با استفاده از پاکت ایزوله شدند. بذرگیری ۲/۵ ماه بعد از کاشت در گلدان صورت گرفت. برای نرمال‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (با تبدیل داده) و برای تجزیه تحلیل آماری از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

آنالیزPCR گیاهان تراریخت

پس از انتخاب جوانه‌های باززایی شده از محیط گزینشگر و تولید گیاه، DNA ژنومی تراریخت‌های احتمالی به روش CTAB (Murray & Thompson,1980) استخراج و با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی ژن *gus* و یک جفت آغازگر اختصاصی *npt II* با توالی‌های زیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (جدول ۱) صورت گرفت.

gus1 For. 5 -TGGATTCCGGCATAGTTAAA-3
(600 bp product)
GUS1Rev.5-GTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3
GUS2 For.
5-GTCGACGGAGGTTTATGTTACGTCCTGTAGA-3
(1800 bp product)
GUS2 Rev.
5-CCAAGCTTCATTATTGTTTGCCTCCCTGCT-3
npt ii for. 5 -GAACAAGATGGATTGCACG-3
(782 bp product)
npt ii rev. 5 -GAAGAACTCGTCAAGAAGG-3

ارزیابی هیستوشیمیایی فعالیت GUS

با روش Jefferson et al. (1987) بافتهای گیاهان تراریخت احتمالی و شاهد به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی بافت‌ها، از اتانول برای رنگ بری و حذف کلروفیل بافت‌ها استفاده شد تا رنگ آبی حاصل از انتقال ژن در بافت‌های تراریخت ظاهر گردد. از گیاهان غیر تراریخت به

عنوان کنترل منفی استفاده به عمل آمد.

جدول۱- اجزاء واکنش PCR و برنامه اجرائی آن

اجزاء	غلظت	شرایط بهینه برای PCR			
آب دو بار تقطیر	تا 25µl	مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	تعداد چرخه	زمان (دقیقه)
$MgCl_2$	1.5 mM	واسرشت اولیه	۹۵	۱	۵
10X PCR Buffer	1X	واسرشت ثانویه	۹۴	۳۵	۱
dNTP mix	0.2 mM	جوش خوردن	۵۲	۳۵	۱
Taq Polymerase	1 unit	تکثیر	۷۲	۳۵	۱
Forward Primer	50 ng	تکثیر ثانویه	۷۲	۱	۷
Reverse Primer	50 ng				
DNA Template	25 ng				

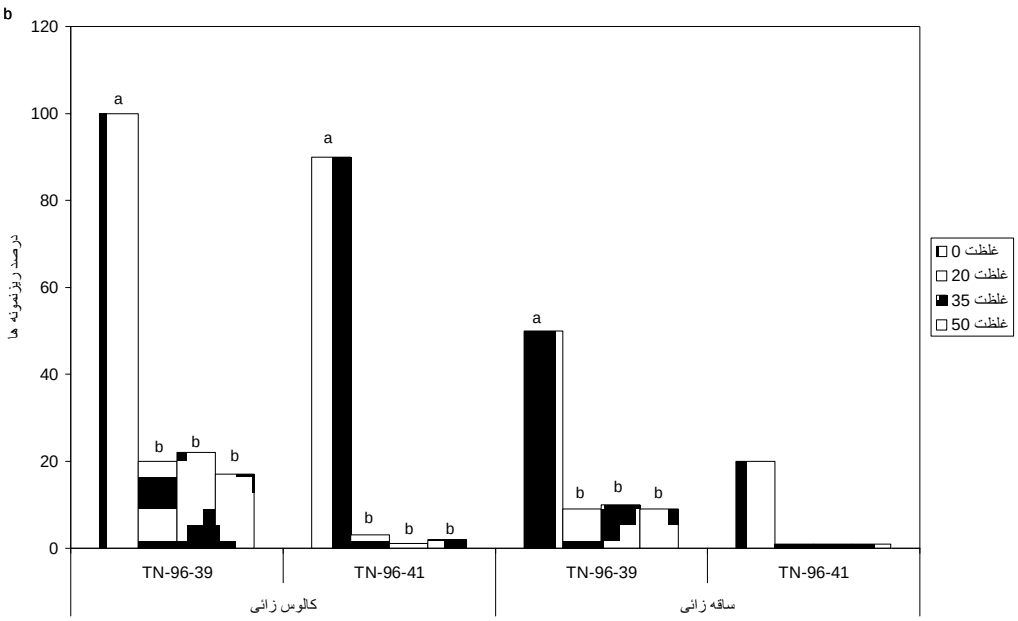
نتایج

کالوس‌زایی و ساقه‌زایی

با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱)، تأثیر غلظت کانامایسین (میلی‌گرم در لیتر) و دو رقم گیاه کاهو TN-96-41 و TN-96-39 بر روی کالوس‌زایی و ساقه‌زایی ریزنمونه‌های تراریخت شده در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بودند اما اثر متقابل بین غلظت کانامایسین و ارقام معنی‌دار نشد. از بین سه تیمار انتخابی (۲۰، ۳۵ و ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین در لیتر) بیشترین نسبت کالوس‌زایی و ساقه‌زایی نسبت به شاهد (۲۲ و ۱۰ درصد) در رقم TN-96-39 مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که TN-96-39بهترین رقم برای تراریخت بوده و حداقل غلظت کانامایسین برای کالوس‌زایی و ساقه‌زایی کاهو۲۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

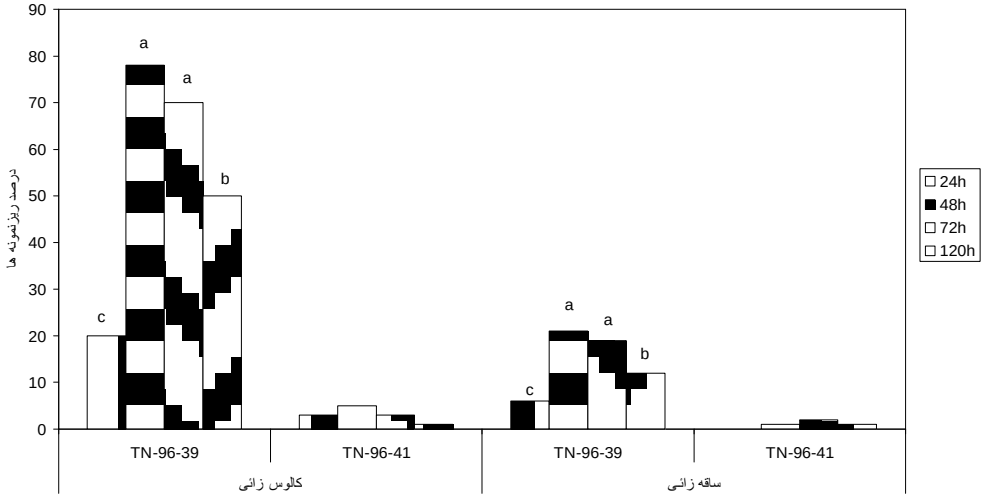
نوع رقم و مدت هم‌کشتی

نتایج به دست آمده نشان داد (شکل۲) که ارقام کاهو و مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها به ترتیب برای صفات کالوس‌زایی و ساقه‌زایی در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دارند اما اثر متقابل بین ارقام و مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها معنی‌دار نشد. از بین ۴ تیمار انتخابی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ و ۱۲۰ ساعت هم‌کشتی)، در



*حروف متفاوت روی ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار درسطح ۱٪ است.

شکل۱- تأثیر غلظت کانامایسین (بر حسب میلی‌گرم در لیتر) بر درصد ریزنمونه‌های دارای کالوس و درصد ریزنمونه‌های دارای ساقه در دورقم TN-96-39 و TN-96-41 کاهوی تراریخت شده



* حروف متفاوت روی ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ است.

شکل ۲- تأثیر مدت زمان هم‌کشتی *اگروباکتری* و ریزنمونه‌ها بر میزان کالوس‌زایی و ساقه‌زایی دو رقم TN-96-39 و TN-96-41 کاهوی تراریخت شده احتمالی (برحسب ساعت و برحسب درصد)

مدت زمان ۴۸ ساعت هم‌کشتی، بیشترین نسبت کالوس‌زایی و ساقه‌زایی (۷۸ و ۲۱ درصد) در رقم TN-96-39 مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که مدت زمان ۴۸ ساعت هم‌کشتی، بهترین زمان و TN-96-39 بهترین رقم برای تراریخت شدن می‌باشند.

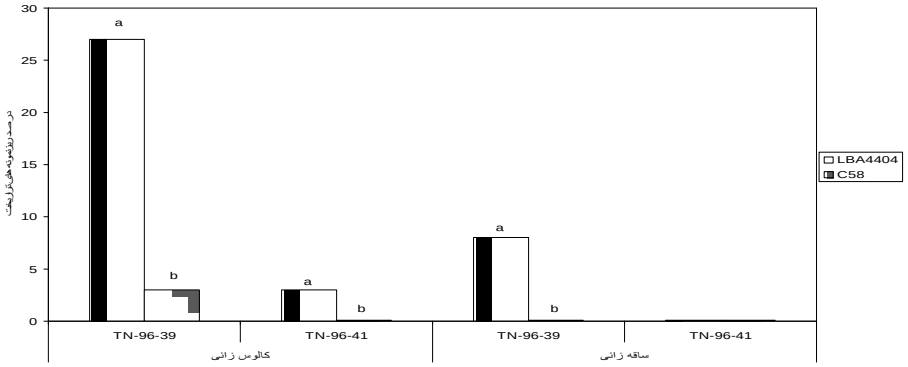
نوع رقم و سویه اگروباکتری

نتایج (شکل۳) نشان داد که تأثیر ارقام کاهو و سویه *اگروباکتری* برای صفات کالوس‌زایی و ساقه‌زایی در سطح احتمال ۱٪ معنی دار شد، اما اثر متقابل بین ارقام و سویه *اگروباکتری* معنی‌دار نشد. از بین دو سویه *اگروباکتری* انتخابی [LBA4404 و C58 (pGV3101)] بیشترین نسبت کالوس‌زایی و ساقه‌زایی (۲۷ و ۸ در صد) در رقم TN-96-39 بوسیله سویه اگروباکتری LBA4404 مشاهده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که سویه اگروباکتری LBA4404 بهترین سویه و TN-96-39 بهترین رقم کاهو برای انتقال ژن بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که اثر نوع ریزنمونه (سه روزه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی) در رقم TN-96-39 بر صفات کالوس‌زایی و ساقه‌زایی معنی‌دار نشده است. تأثیر همین ریزنمونه‌ها در رقم TN-96-39 و سویه آگروباکتری LBA4404 بر صفت ساقه‌زایی در سطح احتمال (۵٪) معنی‌دار بوده و اثر متقابل بین رقم و سویه *اگروباکتری* معنی‌دارنشد. ریزنمونه‌های TN-96-39 و سویه *اگروباکتری* LBA4404 در زمان تلقیح به مدت ۲ دقیقه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند. این در حالیست که اثر متقابل رقم و سویه *اگروباکتری* و تلقیح به مدت ۲ دقیقه در موفقیت تراریختی کاهو در مرحله کالوس‌زائی و ساقه‌زائی معنی‌دار نشد.

کاهوی رقم TN-96-39، سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه (بر روی لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی) تأثیر معنی‌داری بر کالوس‌زایی نداشتند (شکل ۴). سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه (بر روی لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی) تأثیر معنی‌داری بر ساقه‌زایی در سطح ۵٪ نداشتند. نتایج مقادیر میانگین صفت تولید ریشه (جدول ۲) نشان داد که NAA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ، در محیط کشت ½MS برای ریشه‌دار شدن مناسب‌تر است. با افزایش و کاهش غلظت املاح محیط کشت MS مدت زمان ریشه‌دار شدن افزایش یافت.

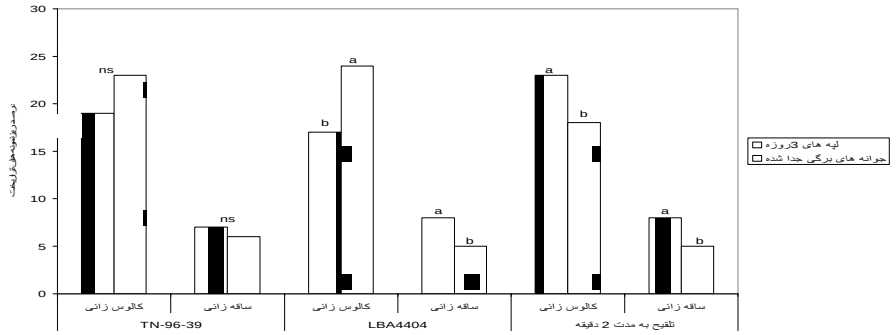
در شاخه های ریشه‌دار شده (شکل ۵-E)، بعد از

۴۵ روز گـل‌هـا ظـاهر و بعـد از ۷۵ روز بـذور حاصـل، برداشت شدند.



* حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار درسطح ۱٪ است.

شکل۳- تأثیر سویه LBA4404 و C58 *اگروباکتری* و ارقام کاهوی TN-96-39 و TN-96-41 در موفقیت تراریختی کاهو در مرحله کالوس‌زائی و ساقه‌زائی



* حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

شکل ۴- تأثیر ریزنمونه‌های لپه‌های سه روزه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی رقم TN-96-39 کاهو و سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه در موفقیت تراریختی کاهو

جدول ۲- مقایسه میانگین زمان‌های لازم (روز) برای تولید ریشه در محیط کشت MS با غلظت های متفاوت املاح

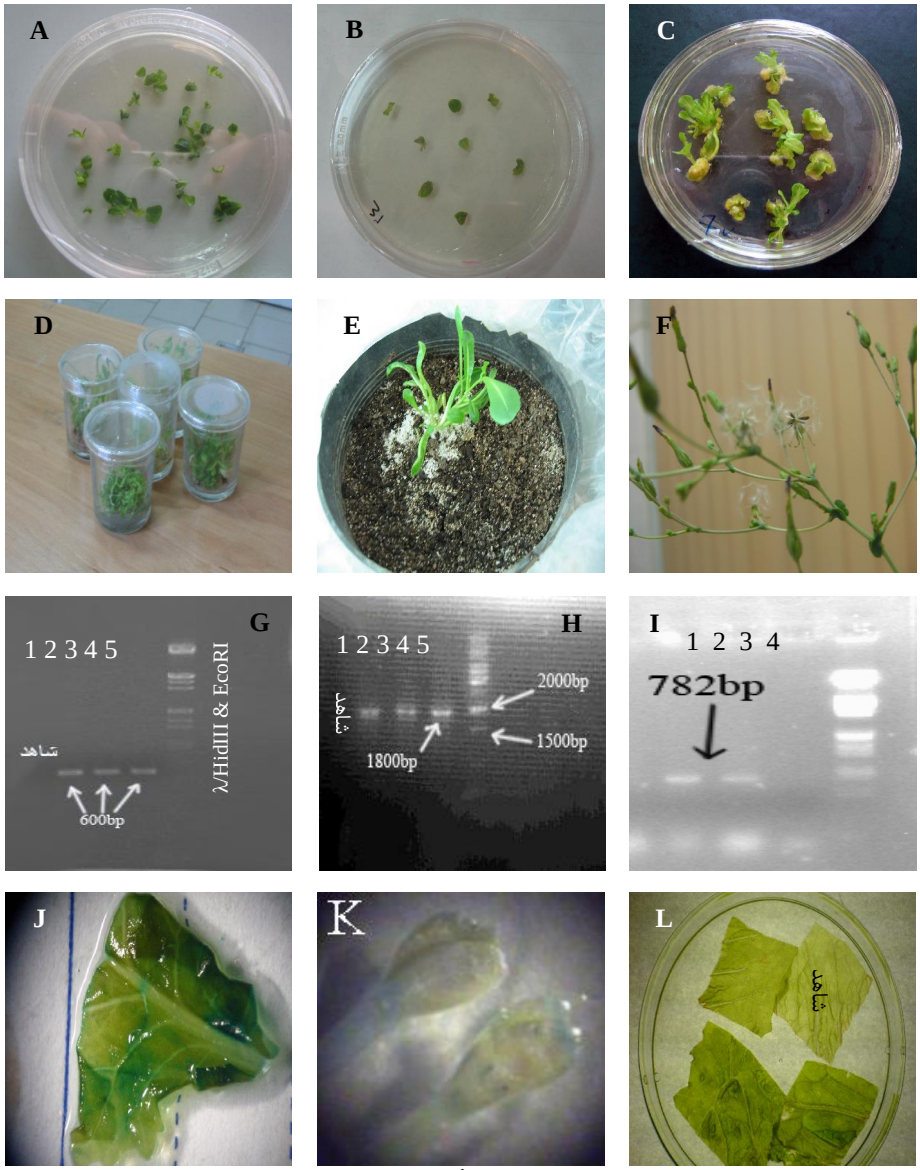
محیط کشت / غلظت mg/L NAA	۱ MS	۰/۵MS	۰/۲۵MS
۰/۱	۳۰b	۱۲a	۴۵c

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌داربودن تیمارها درسطح ۱٪ است.

(محیط کشت ½MS برای ریشه‌دار شدن مناسب‌تر است)

جدول ۳- مقایسه میزان تفرق ژن *gus* و مقاومت به کانامایسین (*npt II*) در لاین‌های مختلف از گیاهان تراریخت نسل دوم (T۱)

لاینهای T0 / متغیرها	گیاهان T1 $gus^{+}nptII^{+}$	گیاهان T1 $gus^{-}nptII^{-}$	X^2	P
۱	۲۵	۱۱	۰/۵۹۳	۰/۴۴۱
۲	۲۷	۱۰	۰/۰۸۱	۰/۷۷۶
۳	۳۰	۱۱	۰/۰۷۳	۰/۷۸۷
۴	۲۴	۹	۰/۳۵۳	۰/۵۵۲
۵	۲۳	۸	۰/۰۱۱	۰/۹۱۷
۶	۲۶	۱۰	۰/۱۴۸	۰/۷



شکل ۵- مراحل مختلف انتقال ژن گزارشگر *uidA* به گیاه کاهو و تأیید مولکولی گیاهان تراریخت: A) مرحله پیش کشت ریزنمونه‌های برگ لپه کاهو؛ B) ریزنمونه‌ها در مرحله هم‌کشتی؛ C) مرحله باززائی ریزنمونه‌ها در محیط حاوی کانامایسین؛ D) مرحله ریشه‌زائی گیاهچه‌های تراریخت در محیط ریشه‌زائی حاوی آنتی‌بیوتیک؛ E) انتقال به گلدان؛ F) تولید بذر؛ G) تکثیر قطعه ۶۰۰ bp با آغازگرهای اختصاصی ژن *uidA* (شاهد گیاه غیر تراریخت) (۱)، گیاهان تراریخت (۴ و ۳، ۲) و نشانگر وزنی (λ/HindIII+ EcoRI) (۵). H- تکثیر قطعه ۱۸۰۰ bp با آغازگرهای اختصاصی ژن کامل *uidA* (شاهد گیاه غیر تراریخت) (۱)، گیاهان تراریخت (۴ و ۳، ۲) و نشانگر وزنی (λ/HindIII+ EcoRI) (۵)؛ I) تکثیر قطعه ۷۸۲ bp با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* (شاهد گیاه غیرتراریخت) (۳)، گیاهان تراریخت (۲ و ۱) و نشانگر وزنی (λ/HindIII+ EcoRI) (۴)؛ J) آزمون هیستوشیمیائی آنزیم بتاگلوکورنیداز در برگ گیاهان T_0؛ K) آزمون هیستوشیمیائی آنزیم بتاگلوکورنیداز در برگ لپه حاصله از بذر گیاه تراریخت نسل اول (T_1)؛ L) آزمون هیستوشیمیائی آنزیم بتاگلوکورنیداز در برگ گیاهان T_1 و شاهد غیر تراریخت.

آنالیز گیاهان تراریخته

بذور گیاهان تراریخت احتمالی بطور جداگانه (در گلدان) کاشته شدند. آنالیز حضور ژن‌های *gus* و *npt II* در جدول ۳ درج شده است. با توجه به میزان درصد اطمینان و نسبت ۳:۱ استفاده شده برای گیاهان T1 می‌توان گفت که حداقل یک کپی از هر دو ژن در گیاهان تراریخت شده وجود دارد. نتایج مربوط به PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* و *npt II* برای گیاهان T0 در شکل ۵ (G-H-I) نشان داده شده است. با توجه به قطعات بدست

آمده می‌توان گفت که حداقل یک کپی از هر دو ژن در گیاه مورد نظر وجود دارد. نمونه‌های برگی بدست آمده از گیاهان T0 تحت آزمون ارزیابی فعالیت ژن *gus* قرار گرفتند که نتایج آن در شکل ۵ (J) نشان داده شده است. برای ارزیابی بذور جوانه زده، بذور شاهد و نسل T0 به مدت ۴۸ ساعت در پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب استریل قرار گرفتند که نتایج آن در شکل ۵ (K) نشان داده شده است. برگ‌های حاصله از گیاهان T1 نیز مورد آزمون هیستوشیمیائی *gus* قرار گرفتند که نتایج بدست آمده در شکل ۵ (M) مشاهده می‌شود.

بحث

هدف عمده در این تحقیق مشخص نمودن بهترین رقم کاهوی ایرانی است که بهترین سیستم باززایی را داشته و به تراریختی پاسخ مثبت بدهد. نتایج حاصل از بررسی دو رقم کاهو TN-96-41 و TN-96-39 بر روی کالوس‌زایی و ساقه‌زایی ریزنمونه‌های تراریخت شده نشان داد که دو رقم کاهو نسبت به ترا ریختی پاسخ‌های متفاوتی دارند. ارقام TN-96-41 و TN-96-39 به ترتیب دارای کمترین و بیشترین کالوس‌زایی (۳ و ۲۰ درصد) و ساقه‌زایی (۰ و ۹ درصد) بودند. Honari et al. (2009) دو رقم TN-96-39 و TN-96-41 را بعنوان بهترین ارقام ایرانی از لحاظ کالوس‌زایی و جنین‌زایی و باززایی معرفی نمودند. برای انتقال ژن به گیاه کاهو از ارقام مختلف استفاده شده است. محققین از رقم Kaiser، رقم South Bay، رقم Grand Rapids و رقم Cisco استفاده کرده‌اند (Sun et al., 2006; Torres et al., 1993; Pileggi et al., 2001; Kanamoto et al., 2006). در انتخاب برای تراریختی ارقام، دو فاکتور، کشت بافت درون‌شیشه‌ای و پاسخ مثبت به تراریختی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردارند که مبنای کاری Kanamoto et al. (2006) بوده است. بررسی دامنه تحمل ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک کانامایسین نشان داد که گیاه کاهو به غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر واکنش نشان داده و ریزنمونه‌های تراریخت نشده سبزینه خود را از دست داده و رشد آنها متوقف می‌شود. اگر ساقه‌های گیاه کاهوی تراریخت نشده در محیط کشت MS جهت تولید ریشه قرار گیرد ساقه‌ها کم کم سفید شده و پس از ماه‌ها قادر به تولید ریشه نیستند. Torres et al. (1993)، Okubara et al. (1997)، Pileggi et al. (2001) و Niki et al. (2001) برای تراریختی و باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه کاهو حداقل ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده کرده‌اند. استفاده از رقم TN-96-39 برای تراریختی و حداقل ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در چهارهفته اول پیشنهاد می‌شود. نتایج انتخاب رقم و مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها جهت کالوس‌زایی و ساقه‌زایی در سطح احتمال ۰۱٪ و ۰۵٪ معنی‌دار شدند. Torres et al. (1993) از زمان ۴۸ ساعت و Pileggi et al. (2001)، از ۷۲ ساعت هم‌کشتی استفاده کردند. مدت زمان ۴۸ ساعت هم‌کشتی بهترین زمان و TN-96-39 بهترین رقم برای تراریختی پیشنهاد می‌شود. نتایج انتخاب رقم کاهو و سویه اگروباکتری به ترتیب برای صفات کالوس‌زایی و ساقه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. Torres et al. (1993) از سویه *اگروباکتری* A208 و Pileggi et al. (2001) از سویه *اگروباکتری* LBA4404 استفاده کردند. سایرین در گیاهان دیگر هم از سویه *اگروباکتری* LBA4404 استفاده کرده‌اند. رشد این باکتری با آنتی‌بیوتیک سفاتاکسین به آسانی قابل کنترل بوده و با توجه به نتایج بدست آمده سویه *اگروباکتری* LBA4404 بهترین سویه و TN-96-39 بهترین رقم برای انتقال پیشنهاد می‌شود.

انتخاب ریزنمونه مناسب جهت کالوس‌زایی، ساقه‌زایی و بدست آوردن گیاه کامل بسیار مهم می‌باشد. درگیاهان تک‌لپه از بافت‌های مختلف مانند جنین بالغ، جنین نارس، کلئوپتیل، پرچم، میکروسپور و خوشه نارس قطعه قطعه شده به عنوان جداکشت استفاده شده است. در گیاهان دولپه‌ای از برگ، لپه، ساقه، بذور جوانه زده و ریشه

مویینه به عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود (Evans et al., 2003). نتایج رقم کاهوی TN-96-39 و سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه بر روی لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی در شکل ۴ آمده است. استفاده از لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی رقم TN-96-39، تفاوت معنی‌داری در کالوس‌زایی نشان ندادند. برای سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه بر روی لپه‌های سه روزه، برگ‌های یک ماهه و جوانه‌های برگی جدا شده از سطح جنین‌های سوماتیکی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ برای ساقه‌زایی مشاهده شد. سه سطح استوسیرنگان به منظور تحریک *اگروباکتری* جهت انتقال ژن تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. اثر متقابلی بین سویه باکتری، استوسرنگان و مدت زمان تلقیح مشاهده نشد. با توجه به نتایج آنالیز آماری می‌توان گفت که سویه باکتری LBA4404 و تلقیح به مدت ۲ دقیقه و لپه‌های سه روزه رقم TN-96-39 گیاه کاهو بهترین شرایط برای تراریختی می‌باشند. بررسی منابع نیز نشان می دهد که لپه‌ها بهترین ریزنمونه برای تراریختی و کشت بافت ارقام مختلف کاهو هستند. Kanamoto et al. (2006)، Lelivelt et al. (2005) و Niki et al. (2001) از برگ‌ها و Sun et al. (2006) و Pileggi et al. (2001)، Torres et al. (1993) و Okubara et al. (1997) از لپه گیاه کاهو به عنوان ریزنمونه استفاده کرده‌اند. استفاده از برگ و لپه در آزمایش‌ها متداول بوده و نتایج تحقیق حاضر با نتایج افراد فوق‌الذکر تطابق دارد. نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمونی اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها نشان داد که ارقام مختلف کاهوی ایرانی با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کالوس‌زایی و جنین‌زایی نشان می‌دهند. رقم TN-96-39 بهترین کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی را در بین دو رقم نشان داد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). معمولاً در گیاهان با افزایش نسبت غلظت هورمونی BA به NAA، شاخه‌زایی در نمونه‌ها افزایش می‌یابد. در این آزمایش با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین شاخه‌زایی مشاهده شد. در صورت کم‌اهمیت بودن کالوس‌زایی در آزمایش و با هدف باززایی مستقیم، بهترین غلظت هورمونی، غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA می‌باشد. برای شاخه‌زایی، Lelivelt et al. (2005) و Sun et al. (2006)، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، Kanamoto et al. (2006) از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و Torres et al. (1993) و Pileggi et al. (2001)، از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده کرده‌اند. در این ارتباط، اختلاف مشاهده شده ممکن است در نتیجه استفاده از ژنوتیپ‌های مختلف و نور باشد.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محیط کشت MS نشان داد که ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA درمحیط کشت ½MS برای ریشه دارشدن مناسب‌تر است. ریزنمونه‌ها در کوتاهترین زمان در این محیط ریشه‌دار شدند. نمونه‌ها با افزایش یا کاهش غلظت محیط کشت، در مدت زمان طولانی‌تری ریشه‌دار شدند. با ایجاد رقابت در بین نمونه‌ها برای ریشه‌زایی، هرچه مقدار محیط کشت در داخل لیوان کمتر باشد تعداد ریشه‌های تولید شده در مدت زمان معین بیشتر خواهد بود. با افزایش مقدار NAA در کشت، کالوس‌های سفید در اطراف نمونه بوجود می‌آیند و به مرور زمان به سمت باززایی تمایل پیدا می‌کنند. Kanamoto et al. (2006) محیط کشت MS ۱/۲ و عاری از هورمون و Pileggi et al. (2001) از NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی در گیاه کاهو استفاده کردند.

نتایج مربوط به آنالیز PCR ژن‌های *gus* و *npt II* در شکل ۵ (H-J-G) ارائه شده‌اند. با توجه به قطعات بدست آمده می‌توان گفت که حداقل یک نسخه از هر دو ژن در

گیاه مورد نظر وجود دارد و وضعیت ژن‌ها نسبت به همدیگر به حالت پیوسته می‌باشد. آنالیز مربوط به حضور ژن‌های *gus* و *npt II* در گیاهان T_1 در جدول ۳ درج شده است. با توجه به میزان درصد اطمینان و نسبت ۳:۱ استفاده شده برای گیاهان T_1، می‌توان گفت که حداقل یک نسخه از هر دو ژن در گیاهان تراریخت شده وجود دارد. با توجه به یافته‌های پژوهشی از تراریختی و کشت بافت ارقام مختلف کاهوی ایرانی (Honari et al., 2009) و نتایج این بررسی، رقم TN-96-39 برای انتقال ژن، پیشنهاد می‌شود. در عین حال، توصیه می گردد که از ترکیب هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA* و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر *BA* برای کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی و از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر *NAA* و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر *BA* برای شاخه‌زایی و باززائی مستقیم و از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر *NAA* و محیط کشت ½MS برای ریشه‌زائی استفاده شود.

REFERENCES

1. Basu, C., Kausch, A. P. & Chandlee, J. M. (2004). Use of *β*-glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turf grasses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 7-10.
2. Curtis, I. S., He, C., Jordi, W. J. R. M., Davelaar, E., Power, J. B., De Laat, A. M. M. & Davey, M. R. (1999). Promoter deletions are essential for transformation of lettuce by the T-*cyt* gene: the phenotypes of transgenic plants. *Annals of Botany*, 83, 559-567.
3. Evans, D. E., Colemen, J. O. D. & Kearns, A. (2003). Plant cell culture. Bio Scientific publishers. 10-11.
4. Frugis, G., Giannino, D., Mele, G., Nicolodi, C., Chiappetta, A., Bitonti, M. B., Innocenti, A. M., Dewitte, W., Van Onckelen, H. & Mariotti, D. (2001). Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiology*, 126, 1370-1380.
5. Honari, H., Alizadeh, H., Boshehri, A. A., Peighambari, S. A. & Jalali, M. (2009). In vitro regeneration of Iranian varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 39, 173-180.(In Farsi)
6. Jefferson, R. A., Burgess, S. M., and Hirsh, D. (1986) ß-glucuronidase from *Escherichia coli* as a genefusion marker. *Proc. National Academy of Science USA*, **83**, 8447-8451.
7. Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yokota, A. & Tomizawa, K. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) Plastids. *Transgenic Research*, 15, 205-217.
8. Lelivelt, C. L. C., McCabe, M. S., Newell, C. A., deSnoo, C. B., van Dun, K. M. P., Birch-Machin, I., Gray, J. C., Mills, K. H. G. & Nugent, J. M. (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 58, 763-774.
9. McCabe, M. S., Garratt, L. C., Schepers, F., Jordi, W. J. R. M., Stoopen, G. M., Davelaar, E., van Rhijn, J. H. A., Power, J. B. & Davey, M. R. (2001). Effects of P_{SAG12}-*ipt* gene expression on development and denescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127(2), 505-516.
10. Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8, 4321–4325.
11. Niki, T., Nishijima T, Nakayama, M., Hisamatsu, T., Oyama-Okubo, N., Yamazaki, H., Hedden, P., Lange, T. & Mander, L. N. (2001). Production of dwarf lettuce by overexpressing a pumpkin gibberellin 20-oxidase gene. *Plant Physiology*, 126, 965-972.
12. Okubara, P. A., ArroyoGarcia, R., Shen, K. A., Mazier, M., Meyers, B. C., Ochoa, O. E., Kim, S., Yang, C. H. & Michelmore, R. W. (1997). A transgenic mutant of *Lactuca sativa* (lettuce) with a T-DNA tightly linked to loss of downy mildew resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,10(8), 970-977.
13. Peighambari, S. A., Honari, H., Alizadeh, H., Kalhorzadeh, P., Boshehri, A. A. & Jalali, M. (2007). Gene Transformation to Lettuce (*Lactuca sativa* L.). International conference on Plant Transformation Technologies. Vienna Austria.
14. Pileggi, M., Pereiara, A. A. M., Silva, J. D., Pileggi, S. A. V. & Verma, D. P. S. (2001). An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(2), 191-196.
15. Sambrook, j., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning*. Edition 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2222p
16. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma, B. & Ezura, H. (2006). Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *Federation European Biochemical Societies Lett.* 580(2), 620-6.
17. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma B. & Ezura H. (2006). Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *Federation European Biochemical Societies Letters*, 23,580(2), 620-6.

18. Torres, A. C., Cantliffe, D. J., Laughner, B., Bieniek, M., Nagata, R., Ashraf, M. & Ferl, R. J. (1993). Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 279-285.
19. Wang, K. (2006). *Agrobacterium* Protocols Second Edition Volume1, Methods in molecular biology; 343. Humana Press Inc. 484p