دستور العمل فنی

دستورالعمل باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط اگروباکتریوم

نویسندگان

مطهره محسن‌پور

سید محمد موسوی پاکزاد

الهه معتمد

بسم الله الرحمن الرحيم

دستورالعمل باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط اگروباکتریوم

مطهره محسن‌پور، سید محمد موسوی پاکزاد، الهه معتمد

فهرست مطالب

مقدمه ۴

مواد و روش‌ها ۵

کشت بذور در محیط کشت پیش تلقیح ۶

آماده‌سازی باکتری ۸

تلقیح ۹

انتقال به محیط استراحت ۱۰

انتقال به محیط انتخابی ۱۲

انتقال به محیط پیش‌باززایی ۱۴

انتقال به محیط باززایی و ریشه‌زایی ۱۶

انتقال به محلول یوشیدا و استقرار در خاک ۱۷

نتیجه‌گیری ۲۲

منابع ۲۳

پیوست ۲۵

مقدمه

مهندسی ژنتیک، ویرایش ژنومی و تولید محصولات تراریخته از روش‌های نوآورانه و موثر برای بهبود ویژگی‌های زراعی و تغذیه‌ای و خصوصیات کمی و کیفی محصولات، تحمل تنش‌های محیطی، افزایش تولید محصولات غذایی و افزایش عملکرد محصولات هستند که می‌توانند به بهبود ویژگی‌های محصولات زراعی از جمله برنج در کنار سایر روش های اصلاحی رایج کمک کنند. در بیش از دو دهه اخیر گیاهان تراریخته مقاوم به آفات و علف‌کش با جلوگیری از خسارت گیاه در شرایط تنش‌های زیستی به حفظ عملکرد گیاه کمک کرده و با هزینه کمتر برای کشاورزان، حفاظت محیطزیست و سلامت انسان را نیز در نتیجه مصرف کمتر سموم و آفت‌کش‌های شیمیایی باعث شده‌اند. همچنین، جنبه دیگری از پتانسیل این فناوری افزایش عملکرد محصولات زراعی و بهبود خواص تغذیه‌ای یا سایر ویژگی‌های مطلوب موردنظر با انتقال ژن‌های مناسب است. ارائه دستورالعمل‌های مناسبی که بتوانند در انتقال ژن‌های مطلوب مورد نظر به محصولات گیاهی مورد استفاده قرار گیرند، گام اولیه موثری برای استفاده از پتانسیل مهندسی ژنتیک در بهبود ویژگی‌های محصولات خواهد بود.

در اولین تلاش‌ها برای انتقال ژن به برنج در اواخر سال‌های دهه ۱۹۸۰ و اوایل ۱۹۹۰ از روش‌های مستقیم مثل الکتروپوریشن، PEG یا بمباران ذره‌ای استفاده می‌شد و اولین برنج تراریخته رهاسازی شده (رخداد BGH-00827-7) نیز با روش تفنگ ژنی به دست آمده است (Ghareyazie *et al.*, 1997). روش‌هایی که از *Agrobacterium tumefaciens* استفاده می‌کردند در اوایل سال ۱۹۹۰ ایجاد شدند. از جمله مزایای استفاده از اگروباکتریوم برای انتقال ژن می‌توان به کارایی بالای انتقال ژن، الحاق نسخه‌های کمتری از T-DNA به داخل کروموزوم‌ها، انتقال قطعات بزرگ‌تری از دی‌انِ‌ا با ابتدا و انتهای مشخص و بازآرایی (Rearrangement) کمتر اشاره کرد. بنابراین، انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم نسبت به سایر تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات اخیر هم از جنین نارس برنج و هم از بذرهای رسیده به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن به کمک اگروباکتریوم استفاده شده است. نتایج گزارش‌ها نشان می‌دهند جنین‌های نارس در انتقال ژن موفق‌تر و کاراتر عمل می‌کنند ولی مشکلات کار کردن با آنها مثل نیاز به کشت مکرر گیاه در تمام فصول (Staggered planting) برای در دسترس بودن ریزنمونه و نیز مرحله جداسازی جنین نارس که کاری وقت‌گیر و خسته‌کننده است باعث شده تمایل پژوهشگران به استفاده از بذر رسیده به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن بیشتر باشد. بذور رسیده به هر تعداد که نیاز باشد همیشه در دسترس هستند و می‌توان آنها را تا مدت طولانی در آزمایشگاه نگهداری کرد ولی جنین‌های نارس هر بار به تعداد محدود در دسترس بوده و نیاز است در بازه زمانی بسیار کوتاهی مورد استفاده قرار گیرند. اما استفاده از جنین‌های نارس

به دلیل مزیت کارایی بالاتر در انتقال ژن (Hiei and Komari, 2008; Slamet-Loedin *et al.*, 2014) بیشتر مورد توجه پژوهشگران بوده است. این مزیت به ویژه زمانی بیشتر مشخص می‌شود که استفاده از آنها برای تراریزش برنج‌های ایندیکا با موفقیت همراه بوده است، زیرا در گزارش‌ها به مشکل بودن باززایی و پاسخ به انتقال ژن این برنج‌ها همیشه اشاره شده است. دستورالعملی که در این گزارش شرح داده می‌شود بر اساس تجربه نویسندگان در تراریختی برنج ایرانی رقم هاشمی است که از برنج‌های پرطرفدار تجاری ایران است. گروه ما قبلا از پروتکل‌هایی که از جنین نارس (Slamet-Loedin et al., 2014) و کالوس جنین‌زای حاصل از بذر رسیده (Ozawa, 2012) گزارش شده بود نیز برای انتقال ژن به این برنج به روش اگروباکتریوم استفاده کرده است (Zandi *et al.*, 2019, Kazemi *et al.*, 2022, Ghorbanzadeh *et al.*, 2022, Pourhang et al., 2023) و هر دو با اعمال تغییراتی موفق بوده‌اند ولی پروتکل حاضر که از بذر رسیده به روش بسیار ساده‌تری استفاده می‌کند، مشکلات روش جنین نارس اسلامت و همکاران (۲۰۱۴) را ندارد و در انتقال ژن‌های مختلف (چندین سازه) موفق عمل کرده است. در این روش که مانند روش اوزاوا و همکاران (۲۰۱۲) نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس دارای رشد مناسب و جنین‌زای حاصل از بذر رسیده برای استفاده به عنوان ریزنمونه را ندارد، از سویه اگروباکتریوم EHA105 و نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین استفاده شده است. انتظار می‌رود این پروتکل بتواند در انتقال ژن به سایر ارقام برنج نیز موفق عمل کند.

مواد و روش‌ها

مراحل انتقال ژن به بذر رسیده برنج به شرح زیر است.

۱. ضدعفونی کردن بذر

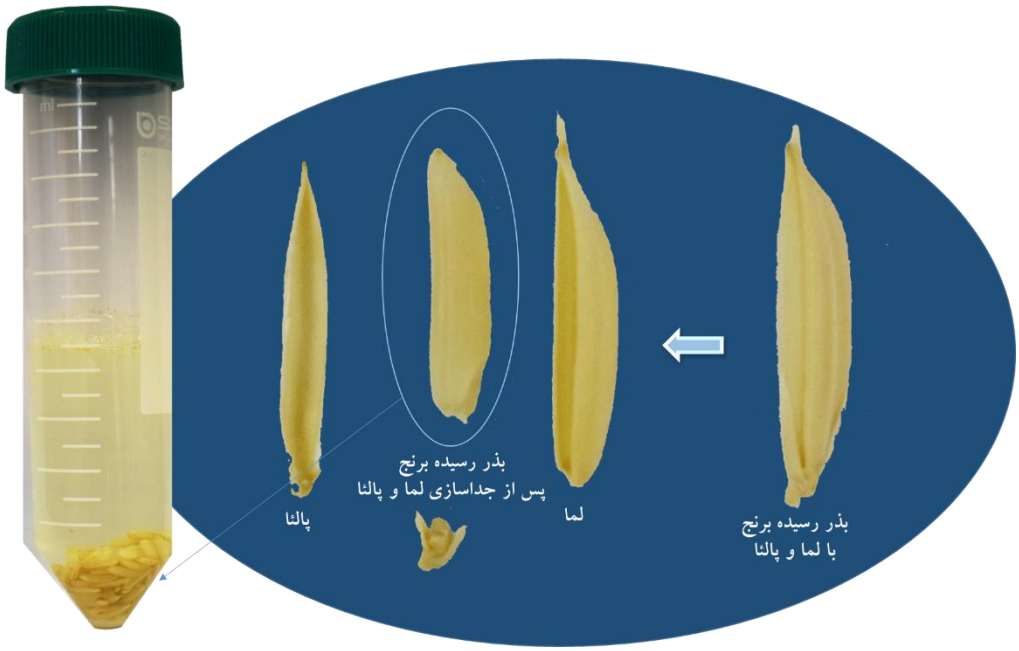
ابتدا پوسته بذور رسیده برنج جداسازی شده، و لما و پالئا از آنها جدا می‌شوند. این عمل را می‌توان با کمک پنس انجام داد. سپس بذور فاقد لما و پالئا (شکل ۱) به شرح زیر ضدعفونی می‌شوند.

الف) بذور به مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد شسته می‌شوند؛

ب) یک بار آب‌شویی انجام می‌شود؛

ج) بذور به مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم پنج درصد حاوی یک قطره توین ۲۰ شسته می‌شوند؛

د) حداقل سه بار آب‌شویی انجام می‌شود.



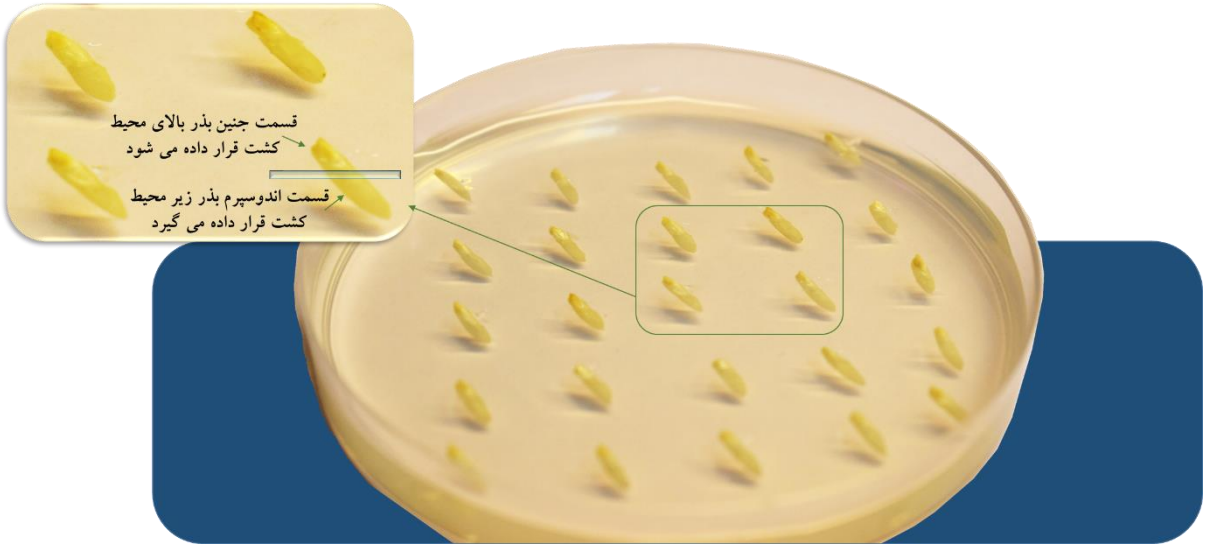
شکل ۱. جداسازی پوسته بذر رسیده برنج برای ضدعفونی. بذر برنج با لما و پالئا (راست)، بذر برنج بدون لما و پالئا (چپ).

۲. کشت بذور در محیط کشت پیش تلقیح

بذور رسیده و استریل شده برنج روی محیط کشت پیش تلقیح (جدول ۱) کشت شده و به مدت چهار تا هفت روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور ممتد قرار داده می‌شوند تا برآمدگی‌های اولیه کالوس‌مانند از محل جنین تشکیل شود. کشت بذرها باید به گونه‌ای انجام شود که آندوسپرم کاملا در محیط کشت فرو رود اما جنین روی سطح محیط باقی بماند (شکل ۲).

نکته ۱: بهتر است بذرهای استریل شده قبل از قرار گرفتن در محیط کشت خشک شوند تا کالوس‌های حاصل از آنها اصطلاحا آب نیاندازند. اما اگر تعداد بذرها به قدری زیاد است که کشت‌کردن آنها زمان‌بر است به طوری‌که باعث می‌شود جنینی که طی مراحل ضدعفونی بذر آب جذب کرده و متورم است تا وقتی که به محیط کشت انتقال یابد آب خود را از دست داده و خشک شود، آنگاه بهتر است از خشک‌کردن همه بذرها به طور همزمان پرهیز شود و هر بار تعداد کمی بذر ضدعفونی شده خشک شوند و به محیط کشت منتقل شوند

و به همین ترتیب هر بار به خشک کردن بذرها به تعداد کم اقدام کرد. جنینی که آب جذب کند و مجدداً آب از دست دهد ممکن است قوه نامیه خود را از دست بدهد.



شکل ۲. تعداد و نحوه قرارگیری بذرهای ضدعفونی شده برنج در محیط کشت پیش تلقیح.

نحوه تهیه محلول‌های ذخیره برای تهیه هر محیط کشت در انتهای این دستور العمل (پیوست ۱) ارائه شده است.

جدول ۱. ترکیبات و نحوه تهیه محیط پیش تلقیح و هم‌کشتی.

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط پیش تلقیح و هم‌کشتی	N6 major 1	۲۰ میلی لیتر	(pH 5.2)
	N6 major 2	۱۰ میلی لیتر	
	N6 major 3	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار ۵/۵ گرم آگارز نوع I اضافه می‌شود.
	N6 major 4	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 1	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 2	۱۰ میلی لیتر	استوسرینگون و تنظیم کنندگان رشد بعد از
	B5 minor 3	۱۰ میلی لیتر	

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
	B5 minor 4	۱۰ میلی لیتر	اتوکلاو و وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتیگراد رسید اضافه می‌شوند.
	B5 vitamins	۵ میلی لیتر	
	L-glutamine	۰/۰۰۶ میلی گرم	
	Aspartic acid	۰/۰۰۲ میلی گرم	
	Argenine	۰/۰۰۱ میلی گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی گرم	
	L-proline	۵۰۰ میلی گرم	
	Sucrose	۲۰ گرم	
	D-glucose	۱۰ گرم	
	Acetosyringone	۱۹/۶۲ میلی گرم حل شده در۱ میلی لیتر DMSO	
	2,4-D	۲ میلی لیتر	
	NAA	۱ میلی لیتر	
	BAP	۱ میلی لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

۳. آماده‌سازی باکتری

دو تا سه روز قبل از انجام هم‌کشتی، اگروباکتریوم حاوی سازه موردنظر بر روی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب بسته نوع سازه و ریف‌آمپی‌سین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت خطی می‌شود. یک ساعت قبل از انجام هم‌کشتی با آگروباکتریوم، حدود یک لوپ پُر از باکتری رشد کرده، از محیط LB برداشته شده و درون محیط تلقیح حاوی استوسیرینگون (جدول ۲) سوسپانسیون می‌شود. چگالی نوری (OD_{600nm}) سوسپانسیون باکتری روی ۰/۳ تنظیم می‌شود. محلول تلقیح به مدت یک ساعت درون انکوباتور تاریک ۲۵ درجه قرار داده شده تا برای انتقال ژن آماده شود.

جدول ۲. ترکیبات و نحوه تهیه محیط تلقیح

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط تلقیح	B5 Vitamins	یک میلی لیتر	(pH 5.2)
	AA macro salts stock	یک میلی لیتر	
	AA iron stock	۱۰ میلی لیتر	این محیط کشت فیلتر استریل می شود و در ۴ درجه نگهداری می شود.
	Glycine	یک میلی لیتر	
	L-glutamine	۷۶۷ میلی گرم	
	Aspartic acid	۲۶۰ میلی گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی گرم	
	Sucrose	۲۰ گرم	
	D-Glucose	۱۰ گرم	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

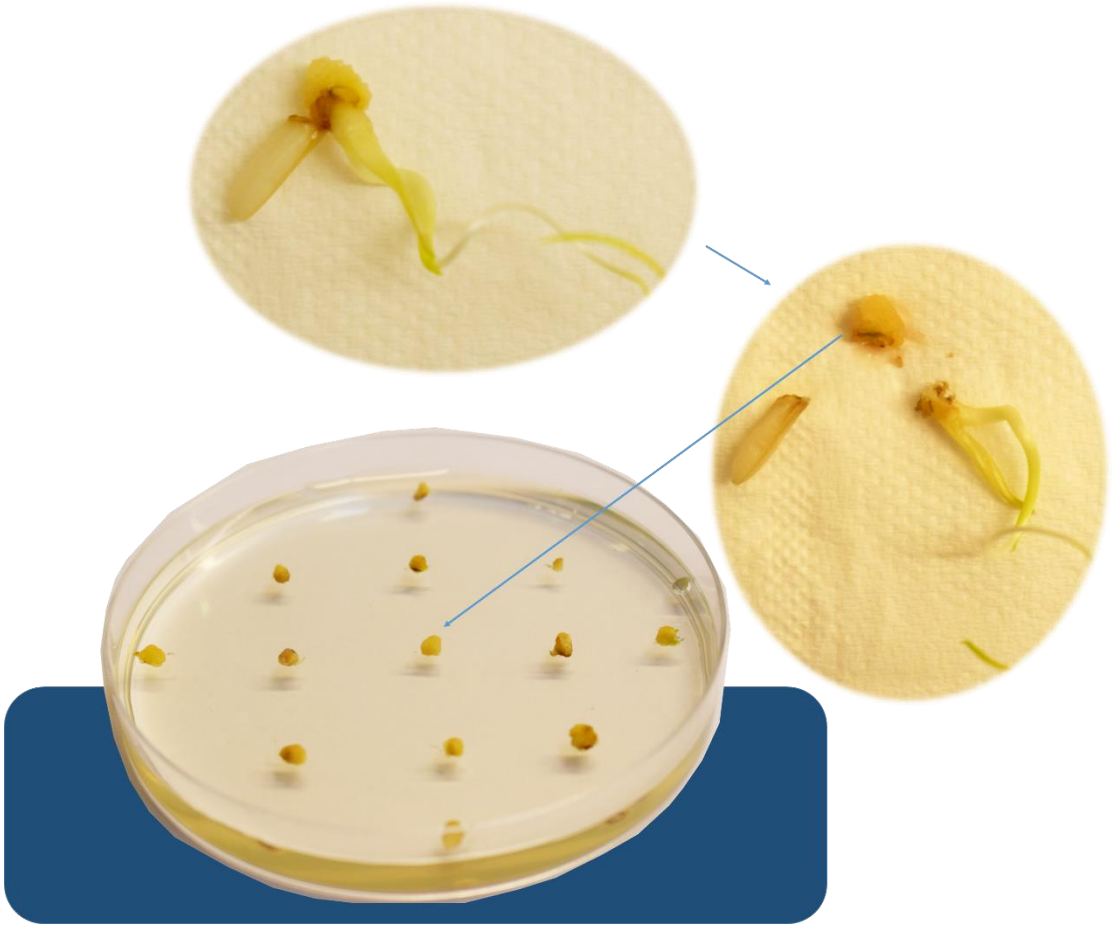
٤. تلقیح

میزان ده میکرولیتر از محلول آگروباکتریوم حاوی پلاسمید روی قسمت برآمدگی‌های ریز کالوس مانند بذوری که چهار تا هفت روز در محیط پیش‌تلقیح کشت شده‌اند چکانیده می‌شود. ریزنمونه‌های تلقیح شده به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک در محیط هم‌کشتی (جدول ۱) قرار داده می‌شوند.

شکل ۳. بذور برنج در محیط پیش‌کشتی پس از چهار روز و برآمدگی‌های کالوس اولیه ایجاد شده از قسمت جنین در بذرهای آماده برای تلقیح.

۵. انتقال به محیط استراحت

پس از این مدت، هر ریز نمونه شامل سه قسمت اصلی کالوس، آندوسپرم و جوانه است که کالوس به وسیله اسکالپل و پنس از آندوسپرم و جوانه جدا می‌شود و روی کاغذ صافی استریل خشک شده و به محیط استراحت (جدول ۳) انتقال داده می‌شود (در هر پتری‌دیش حداکثر ۱۵ نمونه قرار داده می‌شود). ریزنمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مداوم (شدت نور Lux ۷۰۰۰-۶۰۰۰) قرار می‌گیرند.



شکل ۴. نحوه جدا کردن کالوس برنج از آندوسپرم و جوانه و استقرار کالوس‌ها بر روی محیط استراحت.

جدول ۳. ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت استراحت برنج.

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط استراحت	N6 major 1	۲۰ میلی لیتر	(pH 5.8)
	N6 major 2	۱۰ میلی لیتر	
	N6 major 3	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار ۵ گرم ژلرایت اضافه شود. تنظیم کنندگان رشد بعد از اتوکلاو و وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتیگراد رسید اضافه می شوند.
	N6 major 4	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 1	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 2	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 3	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 4	۱۰ میلی لیتر	
	B5 vitamins	۵ میلی لیتر	
	L-glutamine	۳۰۰ میلی گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی گرم	
	L-proline	۵۰۰ میلی گرم	
	Mannitol	۳۶ گرم	
	Maltose	۲۰ گرم	
	2,4-D	۱ میلی لیتر	
	NAA	۱ میلی لیتر	
	BAP	۰/۲ میلی لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی لیتر	
	Carbenicillin	۱ میلی لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

٦. انتقال به محیط انتخابی

پس از رشد کالوس‌ها به اندازه مناسب در محیط استراحت، آنها به محیط کشت انتخابی (جدول ۴) حاوی هیگرومایسین B (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل می‌شوند و در نور ممتد، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری می‌شوند (مرحله انتخاب اول)، سپس کالوس‌ها تقسیم شده (هر کالوس را می‌توان به ۴ قسمت تقسیم کرد) و روی محیط انتخابی تازه به مدت ۱۰ روز قرار داده می‌شوند (مرحله انتخاب دوم). سرانجام در مرحله انتخاب سوم کالوس‌های جنین‌زا از کالوس‌های سیاه جداسازی شده و ۱۰ روز دیگر در محیط انتخابی

تازه واکشت می‌شوند. طی این مراحل کالوس‌های مقاوم، رشد می‌کنند. تعداد کالوس در هر پتری از ۱۵ کالوس (مرحله انتخابی اول) تا چهار کالوس (مرحله انتخابی سوم) و بسته به اندازه آنها متغیر است.

شکل ۵. رشد کالوس‌های تراریخته احتمالی برنج بر روی محیط کشت انتخابی و توقف رشد کالوس‌های غیر تراریخته.

جدول ۴. ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت انتخابی برنج.

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط انتخابی	N6 major 1	۲۰ میلی لیتر	(pH 5.8)
	N6 major 2	۱۰ میلی لیتر	
	N6 major 3	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار ۵ گرم ژلرایت اضافه شود.
	N6 major 4	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 1	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 2	۱۰ میلی لیتر	تنظیم کنندگان رشد بعد از اتوکلاو و وقتی دمای محیط کشت به
	B5 minor 3	۱۰ میلی لیتر	
	B5 minor 4	۵ میلی لیتر	
		۳۰۰ میلی گرم	

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
	B5 vitamins	۵۰۰ میلی گرم	۵۵ درجه سانتیگراد رسید اضافه می‌شوند.
	L-glutamine	۵۰۰ میلی گرم	
	Casamino acid	۳۶ گرم	
	L-proline	۲۰ گرم	
	Mannitol	۱ میلی لیتر	
	Maltose	۱ میلی لیتر	
	2,4-D	۰/۲ میلی لیتر	
	NAA	۱ میلی لیتر	
	BAP	۱ میلی لیتر	
	Cefotaxime	۰/۶ میلی لیتر	
	Carbenicillin		
	Hygromycin		

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

۷. انتقال به محیط پیش‌باززایی

کالوس‌های مقاوم جنین‌زا در محیط کشت انتخابی به محیط کشت پیش‌باززایی (جدول ۵) منتقل و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه و نور ممتد نگهداری می‌شوند. هرچه تعداد کمتری نمونه در هر محیط کشت قرار داده شود، احتمال باززایی آن به دلیل دسترسی بهتر به مواد غذایی موجود در محیط کشت، بیشتر می‌شود.

شکل ۶. باززایی کالوس‌های تراریخته احتمالی برنج در محیط پیش باززایی.

جدول ۵. ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت پیش باززایی برنج.

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط پیش باززایی	B5 minor	۱۰ میلی لیتر	(pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی لیتر	
	MS2	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار ۱۰ گرم آگارز نوع ۱ اضافه شود.
	MS3	۱۰ میلی لیتر	
	MS4	۱۰ میلی لیتر	
	MS vitamins	۵ میلی لیتر	تنظیم کنندگان رشد بعد از اتوکلاو و وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتیگراد رسید اضافه می شوند.
	Maltose	۳۰ گرم	
	Sorbitol	۲۰ گرم	
	NAA	۵ میلی لیتر	
	Kinetin	۲ میلی لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی لیتر	
	Hygromycin	۱ میلی لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

۸. انتقال به محیط باززایی و ریشه‌زایی

کالوس‌های مناسب دارای جوانه‌های ریز در محیط کشت پیش‌باززایی انتخاب و به محیط باززایی و سپس به محیط توسعه ریشه منتقل می‌شوند تا برای انتقال به محلول یوشیدا و در نهایت خاک آماده شوند.

شکل ۷. استقرار جوانه‌های ریز حاصل از کالوس‌های برنج در محیط باززایی (سمت راست)، رشد جوانه‌ها در محیط باززایی پس از ده روز (وسط) و استقرار گیاهچه در محیط توسعه ریشه (سمت چپ).

جدول ۶. ترکیبات و نحوه تهیه محیط پیش تلقیح برنج.

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محیط باززایی	B5 minor	۱۰ میلی لیتر	(pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی لیتر	
	MS2	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار
	MS3	۱۰ میلی لیتر	۳ گرم ژلرایت اضافه
	MS4	۱۰ میلی لیتر	شود.
	MS vitamins	۵ میلی لیتر	تنظیم کنندگان رشد
	Sucrose	۳۰ گرم	بعد از اتوکلاو و وقتی
	NAA	۱ میلی لیتر	دمای محیط کشت به
	Kinetin	۲ میلی لیتر	۵۵ درجه سانتیگراد
	Cefotaxime	۱ میلی لیتر	رسید اضافه می شوند.
	Hygromycin	۱ میلی لیتر	
محیط توسعه ریشه	B5 minor	۱۰ میلی لیتر	(pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی لیتر	
	MS2	۱۰ میلی لیتر	بعد از تنظیم pH مقدار
	MS3	۱۰ میلی لیتر	۲ گرم ژلرایت اضافه
	MS4	۱۰ میلی لیتر	شود.
	MS vitamins	۵ میلی لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).

۹. انتقال به محلول یوشیدا و استقرار در خاک

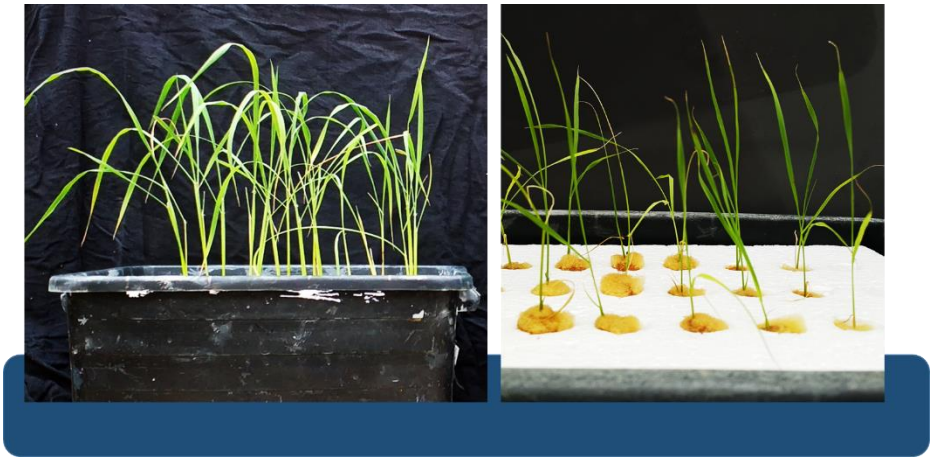
گیاهچه‌های درون لوله پس از ده روز دارای ریشه و اندام هوایی مناسبی برای انتقال به محلول یوشیدا (محلول هیدروپونیک) خواهند بود. استقرار گیاهچه‌های برنج در محلول یوشیدا ضمن ایجاد سازگاری با محیط خارج از شیشه، فرصت رشد کافی آنها را قبل از انتقال به گلدان فراهم می‌کند. برای این کار محلول یوشیدا (جدول ۷) داخل یک ظرف با اندازه مناسب ریخته شده و از یک شناور یا یونولیت دارای حفره‌های مناسب برای استقرار گیاهچه‌ها استفاده می‌شود. هر گیاهچه درون یکی از حفره‌ها و به کمک تکه‌ای ابر استقرار می‌یابد، به‌طوری‌که

پس از قرار دادن شناور روی محلول یوشیدا، ریشه‌ها درون محلول قرار گیرند. در هفته اول استقرار هر روز pH کنترل شود و پس از آن می‌توان هفته‌ای دوبار به کنترل pH اقدام کرد. محلول یوشیدا نیز هر هفته نیاز به تعویض دارد و باید محلول تازه در اختیار گیاهان قرار داده شود.

جدول ۷. ترکیبات و نحوه تهیه محلول یوشیدا برای گیاه برنج.

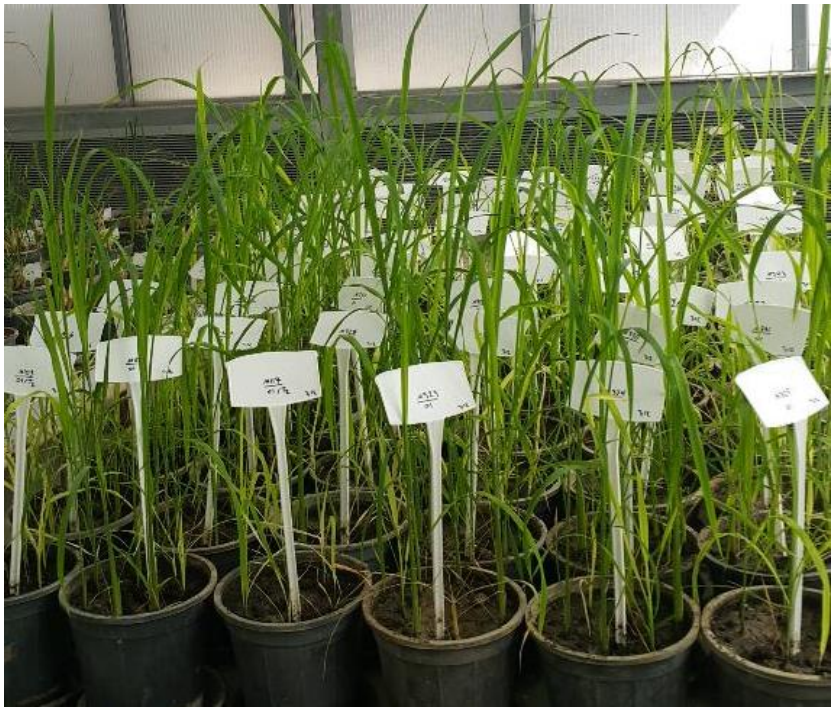
نوع محیط کشت	نام محلول ذخیره	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار برای اضافه کردن به یک لیتر	توضیحات
محلول یوشیدا	A	NH_4NO_3	۴۵.۷ گرم	- ابتدا هر یک از محلول‌های ذخیره در حجم یک لیتر تهیه می‌شوند. برای تهیه محلول F، اجزای این محلول ذخیره به ترتیب در مقداری آب مقطر حل می‌شوند و سپس ۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ (H_2SO_4) به آنها اضافه می‌شود. سپس با آب مقطر استریل به حجم یک لیتر رسانده می‌شود. - به ازای هر چهار لیتر محلول یوشیدا ۵ میلی‌لیتر از هرکدام از محلول‌های ذخیره اضافه می‌شود و pH نهایی روی ۵ تا ۵.۵ تنظیم می‌شود.
	B	$NaH_2PO_4.2H_2O$	۲۰.۱۵ گرم	
	C	K_2SO_4	۳۵.۷ گرم	
	D	$CaCl_2$	۴۴.۳ گرم	
	E	$MgSO_4.7H_2O$	۱۶۲ گرم	
	F	$MnCl_2.4H_2O$	۷۵۰ میلی گرم	
		$(NH_4)6Mo7O_{24}.4H_2O$	۳۷ میلی گرم	
		H_3BO_3	۴۶۷ میلی گرم	
		$ZnSO_4.7H_2O$	۱۷.۵ میلی گرم	
		$CuSO_4.5H_2O$	۱۵.۵ میلی گرم	
		$FeCl_3.6H_2O$	۳.۸۵ گرم	
		Citric Acid(H_2O)	۵.۹۵ گرم	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (پیوست ۱).



شکل ۸. گیاهچه‌های برنج پس از انتقال ژن در محیط یوشیدا.

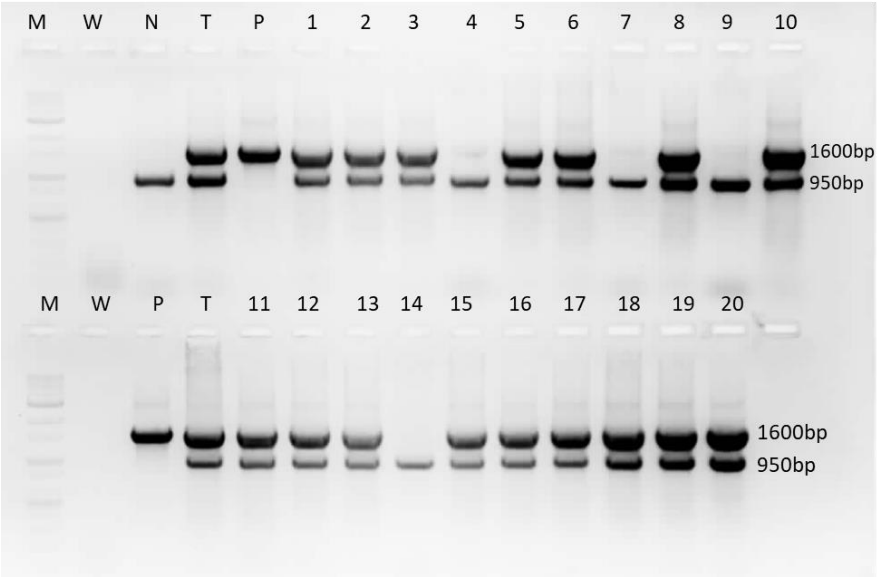
پس از گذشت چهار هفته از استقرار گیاهچه‌های برنج در محلول یوشیدا می‌توان آنها را به گلدان انتقال داد. برای این منظور گلدان‌هایی که به نسبت ۲ به ۱ از خاک و پیت ماس پُر شده را از قبل آبیاری کرده و سپس حفره‌ای در گل حاصل ایجاد و گیاهچه، در حالی‌که توسط انگشتان دست حفاظت می‌شود به داخل گل وارد خواهد شد. لازم است قسمت طوقه گیاهچه زیر سطح خاک قرار بگیرد زیرا این کار باعث می‌شود ریشه‌ها از قسمت طوقه رشد کرده و در نتیجه باعث قوی‌تر شدن گیاه می‌شود.



شکل ۹. گیاهچه‌های برنج پس از انتقال ژن در گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی.

آنالیز مولکولی

گیاهان حاصل از مراحل انتقال ژن پس از استخراج DNAی ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مختص سازه و آغازگرهای ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به عنوان ژن کنترل داخلی، مورد تجزیه تحلیل قرار می‌گیرند. در تولید گیاهان تراریخته آنالیزهای دقیق‌تری نیز برای اثبات الحاق تراژن(ها) و بررسی ایجاد صفت موردنظر در مراحل بعدی تحقیق انجام می‌شود.



شکل ۱۰. نمونه‌ای از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای گیاهان برنج تراریخته تولید شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی با استفاده از دستورالعمل حاضر، با آغازگرهای مختص سازه (حاوی ژن تحمل به علف‌کش: باند مورد انتظار حدود ۱۶۰۰bp) و آغازگرهای کنترل داخلی ژنوم برنج (RG100: باند مورد انتظار حدود ۹۵۰bp) با الگوی DNAی استخراج شده از ۲۰ گیاه برنج در نسل در حال تفرق T1.

نمونه‌هایی که حضور هر دو باند مربوط به تراژن و کنترل داخلی را نشان می دهند، تراریخته هستند (نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰). نمونه‌هایی که تنها باند کنترل داخلی را نشان می‌دهند غیرتراریخته هستند (نمونه های شماره ۴، ۷، ۹ و ۱۴).

M، نشانگر اندازه وزن ملکولی (1Kb Plus-Biofact company)؛ P، پلاسمید (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته قبلا تایید شده به عنوان کنترل مثبت؛ N، گیاه شاهد غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ سایر چاهک‌ها گیاهان برنج حاصل از انتقال ژن در نسل T1.

نتیجه‌گیری

مهندسی ژنتیک در دهه‌های پیش رو به نقش آفرینی خود در تامین امنیت غذایی ادامه خواهد داد. تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و صفاتی که از دیدگاه مصرف کننده جذاب‌تر باشند مانند بهبود ارزش تغذیه‌ای و همچنین تولید مواد با ارزش پزشکی صفات نسل آینده مهندسی ژنتیک و تراریخته‌ها را از آن خود خواهد کرد. فناوری‌های جدیدتر مثل روش‌های ویرایش ژنومی پیشرفت بیشتری خواهد داشت و امنیت غذایی و سلامت انسان و محیط زیست را بیش از پیش متحول خواهد ساخت. استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی در وهله اول نیازمند استفاده از دستورالعملی کارا و تکرار پذیر برای انتقال ژن‌های مطلوب با سازه‌های مهندسی ژنتیک و یا سازه‌های ویرایش ژنومی است. در این گزارش دستورالعملی برای انتقال ژن به بذر رسیده برنج با استفاده از اگروباکتریوم ارائه شد. این دستورالعمل ساده و تکرارپذیر بوده و در انتقال ژن‌های متعددی در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی موفق عمل کرده است. این روش نسبت به روش تفنگ ژنی بسیار کم هزینه‌تر است و کارایی بالاتری دارد. کارایی انتقال ژن با این روش حدود ۴۰ درصد برآورد شده است. همچنین این روش مشکلات استفاده از جنین نارس را در انتقال ژن به برنج منتفی می‌کند. جنین نارس همیشه در دسترس نیست و تهیه آن نیاز به کشت دائم برنج در تمام ایام سال برای دستیابی به ریزنمونه مناسب دارد که کاری وقت‌گیر و جاگیر است زیرا نیاز به تجهیزاتی مثل گلخانه با شرایط مناسب برای کشت برنج برای تهیه ریزنمونه جنین نارس خواهد داشت. همچنین روش ارائه شده در این دستورالعمل نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس جنین‌زا از بذر رسیده برنج و استفاده از آن به عنوان ریزنمونه برای تلقیح را نیز منتفی می‌کند. انتقال ژن به برآمدگی‌های کالوس‌مانند چهار تا هفت روزه حاصل از بذر رسیده با موفقیت در این روش به دست آمده است. استفاده از روش‌های اصلاح سنتی در محصولات زراعی، به دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر، ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. به علاوه روش‌های اصلاح سنتی زمان‌بر و پر هزینه هستند. انتقال ژن به ارقام بازارپسندی مثل برنج رقم هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد با استفاده از مهندسی ژنتیک باعث می‌شود که چنین صفاتی در گیاهان تراریخته حاصل مانند همتای غیرتراریخته خود حفظ شوند و ویژگی جدیدی حاصل از انتقال یک یا تعداد معدودی ژن مشخص به گیاه اضافه شود یا ویرایش یک یا چند ژن مشخص در گیاه صورت گیرد. همچنین محصولات حاصل از مهندسی ژنتیک برخلاف سایر محصولات تحت آزمایشات ارزیابی احتمال خطر قرار می‌گیرند و اصول ایمنی زیستی به تضمین بهره‌برداری از فواید بیوتکنولوژی مدرن و سلامت انسان و محیط زیست کمک خواهد کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۰۱-۰۵-۰۵-۰۱۹-۹۸۰۱۰ تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین با گرامیداشت یاد و خاطره استاد بزرگوار جناب آقای دکتر قره‌یاضی که تجربیات ارزشمند خود را بی‌دریغ در اختیار قرار دادند علو درجات این استاد شهید را از درگاه پروردگار علیم مسئلت داریم.

منابع

Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, de Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS, Bennett J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA (b)* gene. Molecular Breeding 3, 401–414.

Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamouti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad M, Moatamed E, Mapar M, Ebadi AA, Ghaffari MR, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B, Mohsenpour M. 2022. Identificatioan and investigation of *DRO1* gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with *OsCKX4* gene to improve root structure. Crop Biotechnology 11, 49–62.

Hiei Y, Komari T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols 3, 824–834.

Kazemi M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi Pakzad M, Moatamed E, Mapar M, Ebadi AA, Ghaffari MR, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B, Mohsenpour M. 2022. Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. Agricultural Biotechnology Journal 14, 1–20.

Ozawa K. 2012. A high-efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (Oryza sativa L.). Transgenic Plants. Springer, 51–57.

Pourhang L, Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamuti, M, Mousavi Pakzad S.M, Moatamed E, Mapar M, Ebadi A.K, Zamani K, Ghareyazie B and Mohsenpour M 2023. Multi-gene transformation evaluation of a serine/threonine protein kinase with a gene from the cytokinin oxidase/dehydrogenase family and a transcription factor induced under stress from the NAM-ATAF-CUC family to rice. Modares Journal of Biotechnology, 14 (1) Under press.

Slamet-Loedin IH, Chadha-Mohanty P, Torrizo L. 2014. Agrobacterium-mediated transformation: rice transformation. Cereal Genomics. Springer, 261–271.

Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B. 2019. Transformation of *DRO1, OsNAC5, OsEXPA8* genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. Gene Eng Biosafety J 8 (1), 77-89.

پیوست‌ها

مواد مورد نیاز و محلول‌های ذخیره

محلول‌های ذخیره مورد نیاز در انتقال ژن به بذر رسیده برنج در جدول ۸ نشان داده شده است.

جدول ۸. محلول‌های ذخیره برای تهیه محیط‌های کشت برنج.

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
N6 Major 1 (یک لیتر)	KNO_3	۱۴۱/۵ گرم
N6 Major 2 (یک لیتر)	$MgSO_4.7H_2O$	۱۸/۵ گرم
	$(NH_4)_2SO_4$	۴۶/۳ گرم
N6 Major 3 (یک لیتر)	$KH2PO_4$	۴۰ گرم
N6 Major 4 (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	۱۶/۶ گرم
B5 Minor 1 (یک لیتر)	$FeSO_4.7H_2O$	۲/۷۸۵ گرم
	$Na_2EDTA.2H_2O$	۳/۷۲۵ گرم
B5 Minor 2 (یک لیتر)	$MnSO_4.4H_2O$	۱ گرم
	$ZnSO_4.H_2O$	۰/۲ گرم
	H_3BO_3	۰/۳ گرم
B5 Minor 3 (یک لیتر)	KI	۰/۰۷۵ گرم
B5 Minor 4 (یک لیتر)	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲۵ گرم
	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم
B5 Vitaminها (۱۰۰ میلی لیتر)	Thiamin HCL	۲۰۰ میلی گرم
	Pyridoxine HCl	۲۰ میلی گرم
	Nicotinic acid	۲۰ میلی گرم
	Myoinositol	۲۰۰۰ میلی گرم
AA macro salts (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	۱/۵ گرم
	$MgSO_4.7H_2O$	۲/۴۹ گرم
	$NaHPO_4.2H_2O$	۱/۷ گرم
	KCl	۲۹/۵ گرم

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
AA micro salts (یک لیتر)	$CoCl_2.6H_2O$	۲۵ میلی گرم
	$CuSO_4.5H_2O$	۲۵ میلی گرم
	H_3BO_3	۳۰۰۰ میلی گرم
	KI	۷۵۰ میلی گرم
	$MnSO_4$	۸/۹ میلی گرم
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۲۵۰ میلی گرم
	$ZnSO_4.7H_2O$	۲۰۰۰ میلی گرم
AA iron stock (یک لیتر)	$FeSO_4.7H_2O$	۲/۷۸ گرم
	$Na_2EDTA.2H_2O$	۳/۷۳ گرم
Glycine (یک لیتر)	Glycine	۵/۷ گرم
MS1 (یک لیتر)	KNO_3	۹۵ گرم
	NH_4NO_3	۸۲/۵ گرم
MS2 (یک لیتر)	$MgSO_4.H_2O$	۳۷ گرم
	$MnSO_4.4H_2O$	۲/۲۳ گرم
	$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۸۶ گرم
	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم
MS3 (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	۴۴ گرم
	KI	۰/۰۸۳ گرم
	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم
MS4 (یک لیتر)	KH_2PO_4	۱۷ گرم
	H_3BO_3	۰/۶۲ گرم
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲۵ گرم
MS vitaminها (۱۰۰ میلی لیتر)	Nicotinic acid	۱۰ میلی گرم
	Pyridoxine HCl	۱۰ میلی گرم
	Thiamine HCl	۲ میلی گرم
	Glycine	۴۰ میلی گرم
	Myoinositol	۲۰۰۰ میلی گرم
BAP (۱۰ میلی لیتر)	۱۰ میلی گرم	۱۰ میلی گرم BAP را در ۲۰۰ میکرولیتر NaOH یک نرمال

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
		حل کرده و با آب استریل به حجم می رسانیم، سپس فیلتر استریل کرده و در ۴ درجه نگهداری می‌شود.
2,4-D (۵۰ میلی لیتر)	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم 2,4-D را در ۲ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حل کرده و با آب استریل به حجم می‌رسانیم، سپس فیلتر استریل کرده و در ۴ درجه نگهداری می‌شود.
Kinetin (۲۵ میلی لیتر)	۲۵ میلی گرم	۲۵ میلی گرم kinetine را در NaOH یک نرمال حل کرده و با آب استریل به حجم می‌رسانیم، سپس فیلتر استریل کرده و در ۲۰- درجه نگهداری می‌شود.
NAA (۲۰ میلی لیتر)	۲۰ میلی گرم	۲۰ میلی گرم NAA را در NaOH یک نرمال حل کرده و با آب استریل به حجم می‌رسانیم، سپس فیلتر استریل کرده و در ۴ درجه نگهداری می‌شود.
Carbenicillin (۱۰ میلی لیتر)	۱ گرم	یک گرم کربنی سیلین را در آب استریل حل و فیلتر استریل کرده در ۲۰- نگهداری می‌شود.
Cefotaxime sodium (۵۰ میلی لیتر)	۵ گرم	پنج گرم سفوتاکسیم را در چهار میلی لیتر آب استریل حل و فیلتر استریل کرده در ۲۰- نگهداری می‌شود.

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
Hygromycine B	۵۰ میلی گرم در لیتر	

سایر محلول‌های ذخیره در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.