ترانسفورماسیون برنج به روش *in planta* با واسطه اگروباکتریوم تومی فاسینس

اندیشه پور مسئله گو[۱]*، گیتا ناصری[۱]* و محمد مهدی سوهانی[۲]

۱- به ترتیب دانشجویان کارشناسی ارشد و ۲- هیات علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان. * کار مشترک

چکیده:

در انتقال ژن گیاهان از دو متد انتقال توسط اگروباکتریوم وبمباران ریز ذرات بطور گسترده استفاده می شود. انتقال توسط اگروباکتریوم منجر به تلفیق پایدارتر یک قطعه مشخص DNA درون ژنوم گیاه و تعداد کپی های کمتر می گردد و معمولا نیاز به اصلاحات کمتری نسبت به بمباران ذره ای دارد. در این روش ابتدا *Agrobacterium tumefaciens* در سیستم کشت بافت به بافت هایی که به طور فعال تکثیر می شوند مانند جنین های نابالغ وکالوس تلقیح می شوند، متعاقبا سلول های تراریخته روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک مناسب انتخاب می شوند و سرانجام گیاهان روی محیط کشت باززایی می شوند. این روش ها نیاز به شرایط استریل دارند که وقت گیر می باشد، هم چنین عیب اصلی آنها جهش های سوماکلونی مکررا است که در کشت های سلولی رخ می دهند. برخی از گیاهان مانند تک لپه ای ها نیز نسبت به باززایی واکنش خوبی نشان نمی دهند. انتقال به روش *in planta* فاقد این معایب است. در روش حاضر بذرهای برنج از سه رقم هاشمی، حسنی و غریب بعد از استریل شدن دو روز خیسانده شدند که پس از این مدت ناحیه جنین در بذر شروع به سفید شدن می کند. در این مرحله با استفاده از سوزن آغشته به سوسپانسیون های اگروباکتریوم که حامل یکی از وکتورهای pPZPY112 pPBI101 pPZPY122, (ABRC) بودند تلقیح انجام شد. منطقه مریستم محوری جنین محل مورد تلقیح بوده است، جایی که بعدا ریشه چه از آن خارج می شود. بذرها بر روی کاغذ صافی و در بستر پرلایت قرار گرفته و در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد به مدت ۹ روز در تاریکی نگهداری شدند. سپس بذرها در دمای اتاق در محلول سفوتاکسیم به غلظت ۱۰۰۰ pp m و به مدت یک ساعت خیسانده شدند. در نهایت بذرها در گلدان های حاوی خاک مناسب برنج در شرایط غیر استریل کاشته شدند. جهت اثبات انتقال وکتورهای مورد نظر، پس از رشد گیاهان DNA ژنومی از برگ ها استخراج وبا آغازگر پروموتر CaMV35s واکنش PCR انجام شد. کارایی این روش حدودا ۳٪ تخمین زده شد.

واژه های کلیدی: ترا سفورماسیون، اگروباکتریوم، برنج