بسم الله الرحمن الرحيم

تعهدنامه‌ی اصالت اثر و رعایت حقوق دانشگاه

تمامی حقوق مادّی و معنوی مترتب بر نتایج، ابتکارات، اختراعات و نوآوری‌هایِ ناشی از انجام این پژوهش، متعلق به **دانشگاه محقق اردبیلی** می‌باشد. نقل مطلب از این اثر، با رعایت مقرّرات مربوطه و با ذکر نام دانشگاه محقق اردبیلی، نام استاد راهنما و دانشجو بلامانع است.

اینجانب **لیلی هنرمند** دانش‌آموخته‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی **مهندسی کشاورزی** گرایش **اصلاح نباتات** دانشکده **علوم کشاورزی** دانشگاه **محقق اردبیلی** به شماره‌ی دانشجویی **۹۰۳۳٤٤۳۱۱۸** که در تاریخ **۹۲/۱۲/۱۸** از پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود تحت عنوان **تراریختی اسپرس با استفاده از نوک ساقه و *آگروباکتریوم تومه-فاسینس*** دفاع نموده‌ام، متعهد می‌شوم که:

۱) این پایان‌نامه را قبلاً برای دریافت هیچ‌گونه مدرک تحصیلی یا به عنوان هرگونه فعالیت پژوهشی در سایر دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی داخل و خارج از کشور ارائه ننموده‌ام.

۲) مسئولیت صحّت و سقم تمامی مندرجات پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود را بر عهده می‌گیرم.

۳) این پایان‌نامه، حاصل پژوهش انجام شده توسط اینجانب می‌باشد.

٤) در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و مقرّرات مربوطه و با رعایت اصل امانتداری علمی، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در متن و فهرست منابع و مآخذ ذکر نموده‌ام.

۵) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده یا هر گونه بهره‌برداری اعم از نشر کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان‌نامه را داشته باشم، از حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فنّاوری دانشگاه محقق اردبیلی، مجوزهای لازم را اخذ نمایم.

٦) در صورت ارائه‌ی مقاله‌ی مستخرج از این پایان‌نامه در همایش‌ها، کنفرانس‌ها، سمینارها، گردهمایی‌ها و انواع مجلات، نام دانشگاه محقق اردبیلی را در کنار نام نویسندگان (دانشجو و اساتید راهنما و مشاور) ذکر نمایم.

۷) چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن (منجمله ابطال مدرک تحصیلی، طرح شکایت توسط دانشگاه و ...) را می‌پذیرم و دانشگاه محقق اردبیلی را مجاز می‌دانم با اینجانب مطابق ضوابط و مقرّرات مربوطه رفتار نماید.

نام ونام خانوادگی دانشجو: **لیلی هنرمند**

امضا

تاریخ

دانشکده علوم کشاورزی

گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

عنوان

تراریختی اسپرس با استفاده از نوک ساقه و *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*

استاد راهنما

دکتر ناصر زارع

اساتید مشاور

دکتر رسول اصغری زکریا

دکتر پریسا شیخ‌زاده مصدق

پژوهشگر

لیلی هنرمند

اسفند ماه ۱۳۹۲

دانشکده علوم کشاورزی

گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

عنوان

تراریختی اسپرس با استفاده از نوک ساقه و *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*

پژوهشگر

لیلی هنرمند

ارزیابی و تصویب شده‌ی کمیته‌ی داوران پایان‌نامه با درجه‌ی .....

نام و نام خانوادگی	مرتبه‌ی علمی	سمت	امضاء
دکتر ناصر زارع	استادیار	استاد راهنما و رییس کمیته‌ی داوران	
دکتر رسول اصغری زکریا	دانشیار	استاد مشاور	
دکتر پریسا شیخ‌زاده مصدق	استادیار	استاد مشاور	
دکتر علی اصغری	دانشیار	داور	

اسفند ماه ۱۳۹۲

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به

خدایی که آفرید و به مولایی که مهربانی و صبوری را به تصویر کشید

به آنان که مهر آسمانی‌شان آرام‌بخش آلام زمینی‌ام است

به استوارترین تکیه‌گاهم، دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

گران سنگ‌تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه‌ام، غبار خستگی‌تان را بزداید.

به برادران و خواهرم

که با هم آغاز کردیم و در کنار هم آموختیم.

به همسر عزیزم

که سایه مهربانیش سایه‌سار زندگیم می‌باشد.

قدردانی

الهی ادای شکر تو را هیچ زبان نیست و دریای فضل تو را هیچ کران نیست و سر حقیقت تو بر هیچ کس عیان نیست، هدایت کن بر ما را هی که بهتر از آن نیست.

سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است. اکنون که با استعانت از درگاه ایزد منان دریچه ای نو از علم و دانش بر من پدیدار شد با خضوع و افتادگی تمام مراتب سپاس و قدردانی خود را صمیمانه تقدیم می نمایم به همه کسانی که مشفقانه در این پژوهش مرا یاری نمودند.

سپاس ویژه من تقدیم به پدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوارم، که همواره بر کوتاهی و درشتی من قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و به برادران و خواهرم که همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم بوده اند.

با سپاس بی دریغ خدمت همسر مهربانم

از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر ناصر زارع که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند، از استاد صبور و با تقوا، جناب آقای دکتر رسول اصغری زکریا و خانم دکتر پریسا شیخ زاده مصدق، که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند و از استاد فرزانه و دلسوز جناب آقای دکتر علی اصغری که زحمت داوری این پژوهش را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

برای دوستان عزیزم به خصوص خانم مهندس فاطمه یوسفی و همه کسانی که با همدلی ها و مساعدت های خود در به ثمر رسیدن این اثر مرا یاری نمودند، آرزوی توفیق و سربلندی می نمایم.

لیلی هنرمند- ۱۳۹۲/۱۲/۱۴

نام خانوادگی دانشجو: **هنرمند** نام: **لیلی**

عنوان پایان‌نامه: **تراریختی اسپرس با استفاده از نوک ساقه و *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس***

استاد راهنما: **دکتر ناصر زارع**

اساتید مشاور: **دکتر رسول اصغری زکریا و دکتر پریسا شیخ‌زاده مصدق**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده: **علوم کشاورزی** رشته: **مهندسی کشاورزی**

گرایش: **اصلاح نباتات** تاریخ دفاع: **۱۳۹۲/۱۲/۱۸** تعداد صفحات: **۱۰۵**

چکیده

بکارگیری مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی پتانسیل بالایی در افزایش ایمنی غذایی و تولید محصولات دارویی برای بهبود سلامت انسان را دارد. نیاز روزافزون به پروتئین‌های حیوانی، بهبود گیاه علوفه‌ای اسپرس (*Onobrychis sativa*) از طریق دستورزی‌های ژنتیکی و سیستم‌های باززایی درون شیشه‌ای را حائز اهمیت می‌نماید. استفاده از امواج فراصوت می‌تواند کارایی تراریختی به کمک *آگروباکتریوم* را افزایش دهد. در این تحقیق، به منظور بهینه‌سازی شرایط لازم برای رشد نوک ساقه، تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP، زآتین و TDZ به همراه NAA و IBA مورد بررسی قرار گرفت. علاوه‌براین، تأثیر امواج فراصوت بر زنده‌مانی و رشد نوک ساقه و تراریختی آن‌ها به کمک سویه‌های LBA4404 و EHA101 *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس* مطالعه گردید. نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی تأثیر معنی‌داری روی پاسخ رشدی ریزنمونه‌ها نشان دادند. بهترین پاسخ رشدی از نظر درصد ساقه‌دهی و تولید ساقه‌های چندگانه و رشد مناسب آن‌ها به همراه کمترین میزان کالوس‌زایی در محیط MS حاوی IBA ۰/۱ mgL^{-1} و BAP ۳ mgL^{-1} بدست آمد. امواج فراصوت درصد ساقه‌دهی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها را تحت تأثیر قرار داد. به طوری‌که، با افزایش زمان امواج فراصوت درصد ساقه‌دهی کاهش و برعکس درصد کالوس‌زایی افزایش یافت. با این حال، در زمان ۳۰ ثانیه امواج فراصوت و پایین‌تر از آن، درصد ساقه‌دهی و تعداد ساقه در هر ریزنمونه نسبت به مدت زمان‌های دیگر بالاتر و کالوس‌زایی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها کمتر بود. در این تحقیق، غلظت مناسب کانامایسین برای انتخاب ساقه‌های تراریخت ۷۰ mgL^{-1} کانامایسین با میزان کشندگی بالای ۹۰٪ مشخص شد. بررسی بیان موقت نشان داد که استفاده از سویه‌ی LBA4404 و سونیکاسیون به مدت ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ ثانیه با امواج فراصوت در بافر MS حاوی ۲۱٪ ساکارز، درصد نوک ساقه‌های GUS مثبت را نسبت به عدم استفاده از امواج فراصوت به ترتیب ٦/۳، ۷/۲، ۵/۵ و ٤/۵ برابر افزایش داد. نتایج حاصل از بررسی گیاهان تراریخت پایدار نیز نشان داد که سویه‌ی LBA4404 نسبت به EHA101 از کارایی تراریختی بیشتری برخوردار است. اعمال تیمار امواج فراصوت کوتاه مدت (۵ تا ۱۵ ثانیه) باعث افزایش معنی‌دار درصد تراریختی شد ولی با افزایش مدت زمان تیمار امواج فراصوت، کارایی تراریختی به شدت کاهش یافت. بیشترین درصد ساقه‌های سبز مقاوم به کانامایسین در ترکیب سویه‌ی LBA4404 و زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ ثانیه امواج فراصوت به ترتیب با میانگین ۱۷/۵٪، ۲۰٪ و ۱۵/۸۲٪ بدست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (بدون امواج فراصوت) و سایر ترکیبات تیماری بود. وجود و بیان ژن *gus A* در ساقه‌های مقاوم به کانامایسین تولید شده از طریق سنجش GUS تأیید گردید.

کلید واژه: اسپرس، *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*، امواج فراصوت، انتقال ژن، نوک ساقه، *Onobrychis sativa*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- گیاهشناسی اسپرس ٤

۱-۲-۱- پراکنش جغرافیایی ٤

۱-۲-۲- ویژگی‌های گیاهشناسی ٤

۱-۲-۳- آفات و مشکلات بالقوه ٥

۱-۲-٤- برنامه‌های اصلاحی اسپرس ٦

۱-۳- کشت بافت ۷

۱-۳-۱- تعریف کشت بافت گیاهی ۷

۱-۳-۲- نقش تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاهی ۸

۱-۳-۲-۱- اکسین ۸

۱-۳-۲-۲- سایتوکینین ۹

۱-٤- نوک ساقه ۹

۱-٥- انتقال ژن ۱۲

۱-٥-۱- بیان موقت و پایداری ژن ۱۲

۱-٥-۲- انتقال ژن پایدار ۱٤

۱-٥-۳- روش‌های انتقال ژن و محدودیت‌های آن‌ها ۱٤

۱-٥-۳-۱- روش‌های فیزیکی انتقال ژن ۱٥

۱-٥-۳-۲- روش‌های بیولوژیکی ۱۷

۱-٦- دستورزی ژنتیکی گیاهان با *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس* ۱۸

۱-٦-۱- طبقه‌بندی سویه *آگروباکتری* ۱۸

۱-٦-۲-*آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*..... ۱۸
۱-٦-۳- دامنه میزبانی..... ۱۸
۱-٦-٤- تراریختی توسط *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*..... ۱۹
۱-٦-٥- مزایا و معایب انتقال ژن از طریق *آگروباکتریوم*..... ۲۰
۱-٦-٦- حامل‌های انتقال بر اساس پلاسمیدTi..... ۲۱
۱-٦-۷- ناقلین جفتی یا ناقلین دوتایی..... ۲۱
۱-٦-۸- پیشبر و توالی تنظیم DNA..... ۲۳
۱-٦-۹- ژن‌های گزارش‌گر و ژن‌های گزینش‌گر..... ۲۳
۱-٦-۱۰- عوامل مؤثر بر تراریختی با *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*..... ۲٤
۱-۷- امواج فراصوت یا امواج فراصوت..... ۲٥
۱-۷-۱- اثر حرارتی..... ۲٦
۱-۷-۲- اثر غیرحرارتی یا مکانیکی..... ۲٦
۱-۸- تراریختی توسط *آگروباکتریوم* - امواج فراصوت (SAAT)..... ۲۸
۱-۹- کاربردهای دستورزی گیاهان..... ۳۱
۱-۹-۱- تولید پروتئین‌های خارجی..... ۳۱
۱-۹-۲- اصلاح ژنتیکی گیاهان برای تولید فرآورده‌های مؤثر..... ۳۲
۱-۹-۲-۱- پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر..... ۳۲
۱-۹-۲-۲- بهبود متابولیت‌های اولیه و ثانویه..... ۳۲
۱-۹-۲-٤- واکسن‌های خوراکی- دارویی زیستی..... ۳۳
۱-۹-۳- زیست پالایی..... ۳۳
۱-۹-٤- افزایش بهره‌وری گیاهان زراعی با اصلاح ظرفیت فیزیولوژیکی و فتوسنتزی..... ۳٤
۱-۹-٥- افزایش بهره‌وری گیاهان زراعی با کاهش محدودیت‌های خارجی..... ۳٤
۱-۹-٥-۱- بکارگیری مواد مغذی..... ۳٤

۱-۹-۵-۲- افزایش مقاومت به تنش‌های غیرزنده..... ۳۵
۱-۹-۵-۳- بهبود مقاومت به بیماری‌ها..... ۳۵
۱-۹-٦- کاهش استفاده از مواد شیمیایی مضر توسط افزایش مقاومت گیاهان در برابر علفکش‌ها و آفات ۳۵
۱-۹-۷- افزایش کیفیت تغذیه‌ای گیاهان زراعی ۳٦
۱-۱۰- اهداف پژوهش..... ۳٦

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- بهینه‌سازی محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ی نوک ساقه..... ۳۸
۲-۱-۱- مواد گیاهی..... ۳۸
۲-۱-۲- ضدعفونی وسایل..... ۳۸
۲-۱-۳- آماده‌سازی ریزنمونه..... ۳۸
۲-۱-۳-۱- غلاف‌زدایی و ضدعفونی بذور..... ۳۸
۲-۱-۳-۲- تهیه‌ی ریزنمونه..... ۳۹
۲-۱-٤- کشت ریزنمونه‌های نوک ساقه به منظور بهینه‌سازی باززایی درون شیشه‌ای..... ۳۹
۲-۲- تأثیر امواج فراصوت بر باززایی ریزنمونه‌های نوک ساقه..... ٤۰
۲-۳- پلاسمید و سویه‌ی *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*..... ٤۱
۲-۳-۱- استخراج پلاسمید pBI121 از باکتری *E. COLI* با استفاده از روش MINIPREP..... ٤۱
۲-۳-۲- تراریختی باکتری *آگروباکتریوم تومه‌فاسینس*..... ٤۲
۲-٤- آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری جهت تلقیح..... ٤٤
۲-۵- بهینه‌سازی غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط انتخابی برای کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده..... ٤٤
۲-٦- آماده‌سازی و تلقیح ریزنمونه‌ها برای تراریختی نوک ساقه‌ها به کمک *آگروباکتریوم*..... ٤۵
۲-۷- بررسی تراریختی موقت ریزنمونه‌های نوک ساقه..... ٤٦
۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها..... ٤٦

فصل سوم: نتایج و بحث

۳- نتایج و بحث ٤٩

۳-۱- آزمایش اول: بهینه‌سازی محیط کشت ٤٩

۳-۱-۱- کالوس‌زایی ٤٩

۳-۱-۲- ساقه‌دهی ٥١

۳-۱-۳- ساقه‌های چندگانه ٥٢

۳-۱-٤- تعداد ساقه در هر ریزنمونه ٥٣

۳-۱-٥- شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ٥٤

۳-۲- آزمایش دوم: تأثیر تیمار امواج فراصوت بر رشد درون شیشه‌ای نوک ساقه ٥٦

۳-۲-۱- کالوس‌زایی ٥٧

۳-۲-۲- ساقه‌دهی ٥٩

۳-۲-۳- تعداد ساقه در هر ریزنمونه ٦٠

۳-۲-٤- ساقه‌های چندگانه ٦٠

۳-۲-٥- شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ٦١

۳-۳- آزمایش سوم: انتقال وکتور pBI121 به *آگروباکتری* ٦٣

۳-٤- آزمایش چهارم: بهینه‌سازی غلظت مناسب کانامایسین در محیط انتخابی برای تراریختی ریزنمونه نوک ساقه اسپرس ٦٥

۳-٥- آزمایش پنجم: انتقال ژن *GUS* به روش SAAT در گیاه اسپرس ٦٨

۳-٥-۱- بیان موقت ٦٨

۳-٥-۲- تأثیر سویه‌ی *آگروباکتریوم* و امواج فراصوت بر تراریختی اسپرس ٧٧

۳-٦- نتیجه‌گیری کلی ٨٦

۳-۹- پیشنهادات ٨٨

فهرست منابع و مآخذ ٨٩

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقه اسپرس..... ٤٩

جدول ۳-۲- میانگین صفات اندازه‌گیری شده در رشد و ساقه‌دهی درون شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقه اسپرس..... ٥٠

جدول ۳-۳- تجزیه واریانس تیمار امواج فراصوت بر رشد درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس ٥٧

جدول ۳-٤- میانگین صفات اندازه‌گیری شده در رشد و ساقه‌دهی گیاه اسپرس تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت..... ٦١

جدول ۳-٥- تجزیه واریانس ساقه‌های سبز مقاوم به کانامایسین برای بهینه‌سازی غلظت کانامایسین (میلی-گرم در لیتر)..... ٦٦

جدول ۳-٦- تجزیه واریانس بیان موقت GUS در ریزنمونه نوک ساقه اسپرس تحت تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتری*، بافر سونیکاسیون و امواج فراصوت..... ٦٩

جدول ۳-۷- تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتری*، بافر سونیکاسیون و امواج فراصوت بر بیان موقت GUS در اسپرس..... ٧٣

جدول ۳-۸- تجزیه واریانس تراریختی ریزنمونه نوک ساقه اسپرس تحت تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتری* و امواج فراصوت (٤-٦ هفته پس از هم‌کشتی)..... ٧٨

جدول۳-۹- تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتریوم* و امواج فراصوت در تراریختی اسپرس..... ٧٨

جدول ۳-۱۰- تجزیه واریانس تراریختی ریزنمونه نوک ساقه اسپرس تحت تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتری* و امواج فراصوت (۸-۱۱ هفته پس از هم‌کشتی)..... ٧٩

جدول ۳-۱۱- محلول استخراج شماره‌ی یک..... ١٠١

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- بذور تک غلافه و گل بالغ اسپرس ٦
شکل ۱-۲- نوک ساقه و لایه‌های سلولی تشکیل‌دهنده ناحیه‌ی مرسیتمی نوک ساقه ۱۰
شکل ۱-۳- روش‌های مختلف انتقال ژن ۱۷
شکل ۱-٤- پلاسمید دوتایی pB1121 ..... ۲۳
شکل ۱-۵- حباب‌های تولید شده در طی امواج فراصوت ۲٦
شکل ۱-٦- تصویر دینامیک حفره‌های صوتی ۲۷
شکل ۱-۷- میکروزخم‌های حاصل از تیمار امواج فراصوت روی لپه‌های نابالغ سویا با میکروسکوپ الکترونی ۲۹
شکل ۱-۸- بیان موقت در جنین‌های بالغ پنبه ۳۱
شکل ۲-۱- کشت شبانه باکتری در دستگاه شیکر- انکوباتور ٤٤
شکل ۳-۱- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی سایتوکینین بر صفت کالوس‌زایی ریزنمونه نوک ساقه اسپرس ۵۰
شکل ۳-۲- کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس ۵۱
شکل ۳-۳- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سایتوکینین بر رشد ساقه‌های چندگانه ۵۲
شکل ۳-٤- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سایتوکینین بر تعداد ساقه در هر ریزنمونه ۵۳
شکل ۳-۵- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی سایتوکینین بر شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ۵٤
شکل ۳-٦- کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت ۵۸
شکل ۳-۷- درصد کالوس‌زایی تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت ۵۹
شکل ۳-۸- درصد ساقه‌دهی تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت ٦۰
شکل ۳-۹- نقشه فیزیکی پلاسمید pBI121 ..... ٦٤
شکل ۳-۱۰- تأیید تراریختی باکتری *آگروباکتری* ٦٤
شکل ۳-۱۱-کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس برای بهینه‌سازی غلظت کانامایسین ٦٦

شکل ۳-۱۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر رشد ریزنمونه نوک ساقه اسپرس..... ٦٧
شکل ۳-۱۳- تأثیر سویه *آگروباکتری* بر ایجاد ریزنمونه‌های GUS مثبت احتمالی در بیان موقت..... ۷۰
شکل ۳-۱٤- تأثیر نوع بافر سونیکاسیون بر ایجاد ریزنمونه‌های GUS مثبت احتمالی در بیان موقت ۷۰
شکل ۳-۱۵- تأثیر امواج فراصوت بر ایجاد ریزنمونه‌های GUS مثبت احتمالی در بیان موقت..... ۷۱
شکل ۳-۱٦- افزایش لکه‌های آبی رنگ ناشی از ژن *GUS* تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت بر ریزنمونه نوک ساقه در طی بیان موقت..... ۷٤
شکل ۳-۱۷- بررسی ریزنمونه‌های نوک ساقه GUS مثبت در طی بیان موقت..... ۷۵
شکل ۳-۱۸- تأثیر نوع سویه‌ی *آگروباکتری* در تراریختی نوک ساقه اسپرس..... ۷۹
شکل ۳-۱۹- تأثیر تیمار امواج فراصوت در تراریختی نوک ساقه اسپرس..... ۸۱
شکل ۳-۲۰- پایداری گیاهان تراریخت..... ۸۱

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- مقدمه

گیاهان منبع مهم مواد غذایی و دارویی برای انسان‌ها محسوب می‌شوند. تراریختی ژنتیکی گیاه، ابزاری قدرتمند برای مطالعه تنظیم و بیان ژن، نمو گیاه، دست‌کاری و آنالیز فرایندهای بیوشیمایی و ادغام ژن‌هاست. این ابزار هم‌چنین پتانسیل افزایش ایمنی غذایی در کشورهای در حال توسعه و تولید محصولات دارویی برای بهبود سلامت انسان در سراسر جهان را دارد (اقلشام و همکاران[1]، ۲۰۰۱؛ نلسون، ۲۰۰۱). در این میان گیاهان علوفه‌ای نیز سهم بسزایی در تأمین غذای بشری و سلامت محیط زیست با تبیین سلامت دام دارند (سیدشریفی و حکم‌علی‌پور، ۱۳۸۹). از جمله این گیاهان، لگوم مقاوم اوراسیایی به نام اسپرس[2] است که با ویژگی‌های ارزشمند خود در ردیف گیاهان سودمند و مورد توجه دام می‌باشد (ساگلام،۲۰۱۰).

اصلاح نباتات تلفیق صفات دلخواه از واریته‌های مختلف گیاهی به منظور تولید گیاهانی با کیفیت برتر می‌باشد. با این وجود، این روش‌ها معمولاً وقت‌گیر و مشکل بوده و از شانس موفقیت بالایی برخوردار نیستند. خصوصاً اینکه اصلاح نباتات سنتی به تلاقی مصنوعی گیاهان در داخل یک گونه یا گونه‌های بسیار نزدیک محدود می‌گردد. حال با استفاده از مهندسی ژنتیک به عنوان ابزاری برای معرفی صفات سودمند جدید در تولیدات کشاورزی، محیط زیست، تغذیه و سلامت بشر می‌توان ژن یا ژن‌های دلخواه را از هر موجودی به گیاه میزبان انتقال داد (فارسی و جلال‌زاده، ۱۳۸۷). بکارگیری مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای فراهم نمودن غذا جهت رویارویی با نیازمندی‌ها در آینده نزدیک مورد نیاز است و می‌توان پیشرفت-های زیادی را در چارچوب زمانی کوتاه‌تر نسبت به روش‌های مرسوم که در گذشته صورت گرفته‌اند، انجام داد (کوله و تیموتی، ۲۰۰۸). تولید در واحد سطح و افزایش دامنه سازگاری گیاهان زراعی در برابر عوامل محدودکننده‌ی محیطی از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی از منطقی‌ترین راهبردها برای تأمین غذای نسل

1.Eaglesham et al
2. Sainfoin (*Onobrychis sativa*)

در حال رشد می‌باشد. اخیراً بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک امید دستیابی به گیاهان زراعی با عملکرد بالا را افزایش داده است (فلاور، ۲۰۰٤). لذا، توسعه‌ی فناوری انتقال ژن به گیاهان زراعی، از راهبردهای اساسی در استفاده از این فناوری جهت دستیابی به ارقام پرمحصول به شمار می‌آید (جدی و همکاران، ۱۳۸۹؛ ساگلام، ۲۰۱۰).

گیاهان ترانسژنیک پتانسیل قابل توجهی در کمپلکس تولیدات زیستی و پروتئین‌های درمانی انسانی به سبب سهولت دستکاری ژنتیکی، عدم آلودگی با پاتوژن‌های انسانی و قیمت پایین بیوماس تولید دارند (لیو و همکاران، ۲۰۰۵). با این حال، پیش نیاز اصلی برای اکثر پروتوکل‌های انتقال ژن به گیاه، وجود یک سیستم بهینه و کارا برای باززایی درون شیشه‌ای[1] گیاه است. با توجه به این که باززایی گیاه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی و ریخت‌زایی به ویژه در لگوم‌ها به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ است، امکان دستکاری ژنتیکی همه ژنوتیپ‌ها و ارقام امکان‌پذیر نیست (مکلین و همکاران، ۱۹۹۱؛ فونتانا و همکاران، ۱۹۹۳؛ ازجان، ۱۹۹۵؛ زانگ و همکاران، ۲۰۱۰)، ولی کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه[2] مستقل از ژنوتیپ بوده و بدستکاری‌های کشت بافتی نیاز کمتری دارد. بهینه‌سازی یک سیستم تراریختی با استفاده از نوک ساقه امکان دستکاری ژنتیکی همه ارقام و ژنوتیپ‌های برتر را فراهم خواهد نمود (گولد و همکاران، ۱۹۹۱؛ آراگائو و همکاران، ۱۹۹۸؛ زاپاتا و همکاران، ۱۹۹۹؛ استکلین و ارابی، ۲۰۰۵؛ ساینی و جیوال، ۲۰۰۵).

هر روش انتقال ژن با محدودیت‌هایی از قبیل بهره‌وری پایین، پروتوکل‌های پیچیده و یا هزینه‌های بالا مواجه هستند. هم‌چنین، بسیاری از سلول‌ها به یک یا چند روش اختصاصی پاسخ می‌دهند ولی در این زمینه روش‌های مکانیکی کاربرد زیادی پیدا کرده‌اند (لیو و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر تلاش‌ها برای افزایش کارایی تراریختی روی امواج فراصوت[3] در روشی موسوم به SAAT[4] متمرکز شده است که برای تراریختی بسیاری از گونه‌های گیاهی تک لپه‌ای، دو لپه‌ای و بازدانگان کاربرد دارد (تریک و فاینر، ۱۹۹۷). روش‌های مختلف زخم‌زنی بافت گیاهی مثل امواج فراصوت می‌تواند برای افزایش کارایی تراریختی به

1. Invitro
2. Shoot apex
3. Ultrasound
4. Sonication Assisted *Agrobacterium* Transformation

کمک *آگروباکتریوم* به کار گرفته شود. از طرف دیگر بافت زخمی شده اغلب محرک‌های فرایند انتقال T-DNA را تولید می‌کند (استاشل و همکاران، ۱۹۸۵).

۱-۲- گیاهشناسی اسپرس

۱-۲-۱- پراکنش جغرافیایی

اسپرس یک لگوم علوفه‌ای مقاوم اوراسیایی است (ساگلام،۲۰۱۰) که به جنس ***Onobrychis***، قبیله *Hedysarreae* و تیره *Fabaseae* تعلق دارد. جنس اسپرس بیش از ۱۰۰ گونه می‌باشد. مبدأ اولیه اسپرس نواحی شرقی دریای مدیترانه و آسیای شرقی است. در ایران حداقل ٦۰ گونه از این گیاه یافت می‌شود (سیدشریفی و حکم‌علی‌پور، ۱۳۸۹) و گونه‌های *sativa* و *viciifolia* از گسترده‌ترین گونه‌ها هستند (آهوجا و همکاران، ۱۹۸۳).

۱-۲-۲- ویژگی‌های گیاهشناسی

اسپرس گیاهی چند ساله، دگرگشن (آهوجا و همکاران، ۱۹۸۳) با عدد پایه‌ی کروموزومی x = ۷ می‌باشد. تمام جمعیت‌های مربوط به مناطق مختلف ایران تتراپلوئید ($2n = 4x = 28$) هستند (ولش و همکاران، ۲۰۰۳؛ رنجبر و همکاران، ۲۰۰۹، ۲۰۱۰). برخی از گونه‌های این جنس به عنوان زینتی و علوفه‌ای کشت می‌گردند (رنجبر، ۲۰۰٤، ۲۰۰۷، ۲۰۰۸).

این گیاه در برابر سرمای زمستانی و سرخورطومی یونجه، پایدارتر از یونجه بوده و علوفه‌ی خشک آن قابل هضم‌تر از یونجه است (سیدشریفی و حکم‌علی‌پور، ۱۳۸۹). آزمایشات تغذیه MSU نشان داد که در رژیم غذایی خوک، ارزش غذایی اسپرس معادل یونجه است (کاش و همکاران، ۱۹۹۳). تامسون و همکاران (۱۹۷۱) و واگهورن و همکاران (۱۹۸۱) بهبود ۵۰ درصدی در جذب خالص روده‌ای اسیدآمینه‌ها را در مقایسه حیوانات مصرف‌کننده‌ی علوفه‌ی اسپرس و یونجه با نیتروژن یکسان، در اسپرس مشاهده نمودند. به علاوه میزان مصرف اختیاری اسپرس در گوسفندان و گاوها، نسبت به گراس‌ها ۲۰ تا ۲٤٪ و نسبت به یونجه و

شبدر قرمز ۱۰ تا ۲۹٪ بالاتر بوده است (واگهورن و همکاران، ۱۹۹۰؛ گریگس و متچس، ۱۹۹۱؛ کارنزوس و همکاران، ۱۹۹٤).

ارزش غذایی اسپرس بسیار بالا بوده و برگ‌های آن این ارزش غذایی را طولانی‌تر از یونجه حفظ می‌کنند و می‌توان برگ‌ها را زمانی‌که گیاهان در مرحله‌ی ۵۰ درصد گل‌دهی قرار دارند، بدون کاهش ارزش غذایی آن‌ها برداشت کرد (کاش و همکاران، ۱۹۹۳) و در شرایط کمبود رطوبت ریزش برگ‌های آن کمتر از یونجه است (اکبرزاده، ۱۳۷٤). علاوه‌براین، در مقایسه با یونجه دارای الیاف کمتری می‌باشد (سیدشریفی و حکم‌علی‌پور، ۱۳۸۹). کیفیت پروتئین ٦۸ درصدی اسپرس با ۷۱ درصدی یونجه برابری می‌کند (کالدی و همکاران، ۱۹۷۹). این گیاه به عنوان عضوی از خانواده‌ی لگومینوز میزان نیتروژن و مواد آلی خاک را با تثبیت نیتروژن اتمسفری بهبود می‌بخشد، دارای نیاز فسفری پایین بوده و به علت سیستم ریشه‌ای عمیق در برابر خشکی نیز مقاوم است (ساگلام، ۲۰۱۰). اسپرس در بهار زودتر از یونجه سبز می‌شود و در تابستان دیرتر از یونجه خشک می‌گردد. بدین ترتیب، طول دوره سبز ماندن آن نسبت به یونجه بیشتر است (استیون و مونسن، ۲۰۰٤). اسپرس بلند قدتر از یونجه بوده و قادر به رشد و نمو در ارتفاع ۳ پایا یا بیشتر می‌باشد. ساقه به ظاهر راست اما نرم و خوش خوراک، گل‌های صورتی کم رنگ دارد (ولش و همکاران، ۲۰۰۳)، (شکل ۱-۱). اسپرس حاوی عصاره‌ی تانن می‌باشد که علاوه بر جلوگیری از نفخ، نقش قابل توجهی در فرایند جذب پروتئین علوفه توسط حیوانات دارد (پاپیلی، ۱۹۸۹) و بهترین کیفیت عسل را به دلیل رشد عمودی آن تولید می‌نماید (دابس، ۱۹٦۷؛ کالدی و همکاران، ۱۹۷۹؛ اوگله و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، ویژگی‌هایی از این قبیل باعث شده که این گیاه انتخاب اول حیوانات محسوب شود.

۱-۲-۳- آفات و مشکلات بالقوه

اگرچه اسپرس به بسیاری از آفات یونجه مقاوم است، اما زنده‌مانی آن در دراز مدت در شرایط آبی یا مرطوب به دلیل بیماری‌های ریشه و طوقه محدود شده است (موریل و همکاران، ۱۹۹۸). پاتوژن‌های ریشه از طریق زخم‌زنی توسط حشرات مغذی ریشه مثل سرخرطومی وارد گیاه می‌شوند (تایلی و همکاران،