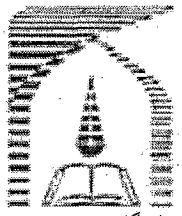
۱۰۹۹۳۷

۸۷/۱/۱۰۸۹۵۰
۸۸/۲۲



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکدهٔ کشاورزی

رساله برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته اصلاح نباتات

گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک

با عنوان :

بررسی کشت میکروسپور در تعدادی از ژنوتیپ های گندم هگزاپلوئید و بهینه سازی انتقال ژن گزارشگر *uidA* به مواد هاپلوئیدی آندروژنیک

نگارش :

شاهرخ قرنجیک

استاد راهنما:

دکتر احمد معینی

اساتید مشاور:

دکتر امیر موسوی- دکتر هوشنگ علیزاده

۱۳۸۸ /۱/ ۱۷

بهار ۱۳۸۷

۱۰۹۹۳۷

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای شاهرخ قرنجیک رساله دکتری تخصصی خود را با عنوان :

بررسی کشت میکروسپور در تعدادی از ژنوتیپ های گندم هگزاپلوئید و بهینه سازی انتقال ژن گزارشگر *uidA* به مواد هاپلوئیدی آندروژنیک، در تاریخ ۸۷/۱۱/۲۱ ارائه کردند.

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آن را برای تکمیل درجه دکتری تخصصی پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر احمد معینی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	-
۳- استاد مشاور اول	دکتر امیر موسوی	استادیار	
۴- استاد مشاور دوم	دکتر هوشنگ علیزاده	استادیار	
۵- استاد ناظر	دکتر مختار جلالی	دانشیار	
۶- استاد ناظر	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۷- استاد ناظر	دکتر محمد رضا زمانی	استاد	
۸- استاد ناظر	دکتر بدرالدین طباطبایی	دانشیار	
۹- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مختار جلالی	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

۸۷/۱۲/۱۵

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر احمد معینی، مشاورهٔ جناب آقای دکتر امیر موسوی و جناب آقای دکتر دکتر هوشنگ علیزاده از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ٤ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ٤ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ٦ اینجانب شاهرخ قرنجیک دانشجوی رشته اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: شاهرخ قرنجیک

تاریخ و امضاء: ۱۳۸۷/۱۲/۱۷

تقدیم به :

همسر صبور و مهربانم

و

دختر نازنینم رکسانا

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس سزاوار خداوند سبحان است که جهان را بر اساس علم، عدل و حکمت آفرید و به بشر آموخت که نیل به سعادت در گرو دانش، تفکر و پیمودن راه راست است. و او را سپاس می گویم که توان انجام این تحقیق را به من عطا فرمود. اکنون که با توکل به خداوند منان، این تحقیق به پایان رسیده است، به رسم ادب بر خود لازم می دانم که از زحمات همه عزیزانی که در اجرای این رساله مرا یاری نموده اند تشکر و قدردانی نمایم:

در آغاز، از همسرگرامی و مهربانم که در تمامی مراحل انجام این رساله همواره مشوق و پشتیبان من بوده و کوتاهی ها و قصورم را با بردباری تمام تحمل نموده اند، از صمیم قلب تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر احمد معینی، استاد راهنمای فرزانه ام که نه تنها در تمام مراحل انجام، تدوین و نگارش این تحقیق یاری ام دادند بلکه بودن با ایشان سراسر درس اخلاق و فروتنی بود، کمال سپاسگزاری را دارم.

از اساتید گرانقدر مشاور، جناب آقای دکتر امیر موسوی و جناب آقای دکتر هوشنگ علیزاده که از راهنمایی ها و پیشنهادات ارزنده شان در طول اجرای این رساله استفاده نموده ام و علاوه بر کسب دانش از محضرشان، افتخار درک زوایای روشن و مثبت اخلاقیشان برایم مقدور گردید، کمال تشکر و امتنان را دارم.

از اساتید محترم ناظر، جناب آقای دکتر محمد رضا زمانی، جناب آقای دکتر بدرالدین طباطبایی، جناب آقای دکتر مختار جلالی و جناب آقای دکتر حمید دهقانی که با صبر و حوصله فراوان این رساله را مطالعه نموده و نظرات ارزنده ایشان موجب افزایش بار علمی رساله حاضر گردید، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از اساتید بزرگوار، جناب آقای دکتر قاسم کریم زاده و جناب آقای دکتر رضا قلی میر فخرایی که همواره با تجربیات و مساعدتهای ارزنده خود مرا یاری نمودند، بی نهایت سپاسگزارم.

از اساتید راهنمای دوره تحقیقاتی خارج از کشور، جناب آقای پروفسور German Spangenberg و جناب آقای دکتر Ulrik John، در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ایالت ویکتوریای استرالیا، که نهایت همکاری و مساعدت را در طول دوره با اینجانب داشتند و فرصت آشنایی با تکنیک های نوین بیولوژی مولکولی را برایم فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می نمایم.

از کارشناس محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات، جناب آقای مهندس ایری، کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی، سرکار خانم مهندس آزموده و نیز کلیه کارمندان و پرسنل زحمتکش دانشکده کشاورزی و دانشگاه تربیت مدرس، که هر کدام از ایشان به نحوی در انجام این پژوهش یاری ام داده بودند، بسیار سپاسگزارم.

از کلیه اساتید بزرگوار و همچنین کارمندان محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی، به خاطر مساعدت های بی دریغ و همکاری صمیمانه ای که در طول انجام این رساله داشته اند، کمال سپاسگزاری و تشکر را دارم.

از کلیه دوستان عزیزی که ذکر نام همه ایشان برایم مقدور نبوده ولی در طی این مدت از ابراز محبت و همکاری نسبت به بنده دریغ ننموده و به عناوین مختلف یار و یاورم بوده اند، کمال تشکر را دارم.

و در پایان از اعضای خانواده ام، که همواره مشوقم بوده اند و در فراز و نشیب های این مسیر یاری ام داده اند، کمال سپاسگزاری و تشکر را دارم.

خلاصه :

این پژوهش، با بررسی پاسخ به آندروژنز در تعداد ۸ رقم از گندم های ایرانی به نامهای مغان۱، تجن، فلات، اترک ،امید، توباری، قدس و مرودشت، مشخص نمود که ارقام ایرانی دارای پتانسیل ژنتیکی مطلوبی برای تولید جنین در کشت میکروسپورهای ایزوله بوده و نتایج بررسی اولیه نشان داد که دو رقم فلات و مغان۱ با بیشترین میزان تولید جنین در واحد سنبله (به ترتیب با میانگین ۸۱/۵۸±۱۴۲۷ و ۵۴/۵۵ ± ۱۱۰۸)، نسبت به ارقام دیگر برتری دارند. در این بخش همچنین، مهمترین عوامل کنترل کننده و تأثیرگذار در پاسخ آندروژنیک در گندم شامل، نوع پیش تیمار، تراکم میکروسپورها در محیط کشت، جداسازی میکروسپورهای زنده از مرده، نوع و ترکیب محیط کشت جنین زایی، مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان تولید جنین در واحد سنبله (۱۵۹±۲۱۳۳) زمانی حاصل شد که سنبله های حاوی میکروسپورها در مرحله رشدی مناسب در رقم فلات، پس از حدود یک هفته نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، به مدت ۴۸ ساعت در معرض پیش تیمار شیمیائی (شامل ۲-هیدروکسی نیکوتینیک اسید، توفوردی و بنزیل آمینوپورین) قرار گرفته و پس از جداسازی میکروسپورهای زنده از مرده بر روی شیب غلظت مالتوز ۲۱٪ ، با تراکم مطلوب $4\times10^{3}\ ml^{-1}$ و در محیط کشت NPB99 حاوی چند عدد تخمدان زنده گندم کشت شدند. در بخش دیگری از این پژوهش، امکان انتقال سازه های ژنی حاوی ژنهای GUS (*uidA*) و *bar* به جنین های هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپورگندم، با دو روش بمباران ذره‌ای و روش آگروباکتریوم ارزیابی شد. بر اساس نتایج این تحقیق، در روش بمباران ذره‌ای زمانی که ریز نمونه ها ۶ ساعت قبل و ۱۶ ساعت بعد از بمباران در معرض پیش تیمار فشار اسمزی (0.4 M مالتوز) قرار گرفتند و از ذرات طلای با قطر µm ۱، دیسک ۱۳۵۰psi، فاصله 9 cm از بافت هدف و یکبار شلیک استفاده گردید، بیشترین میزان بیان ژن و تولید گیاهچه های سبز در جنین های هاپلوئید گندم مشاهده گردید. همچنین، به منظور ارزیابی بیان پایدار ژن در هر دو روش بمباران ذره‌ای و آگروباکتریوم، جنین‌های هاپلوئید پس از بمباران و تلقیح با سویه آگروباکتریوم AGL-0، به محیط انتخابی حاوی علفکش فسفینوتریسین (باستا) منتقل شدند. در مرحله بعد، گیاهچه های رشد یافته بر روی محیط انتخابی، به خاک منتقل شده و در معرض آنالیزهای مولکولی قرار گرفتند. بررسی های مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA و RNA، الحاق پایدار ژن های GUS (*uidA*) و*bar* به داخل ژنوم گندم و همچنین انجام رونویسی از این ژنها را به اثبات رسانید. همچنین آزمون هیستوشیمیایی ژن GUS در بافت های رویشی گیاهچه های تراریخت نیز، تولید پروتئین مربوطه را از طریق ایجاد لکه های آبی در این بافت ها تأیید نمود. با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل بخش مولکولی، میانگین میزان تولید گیاهان تراریخت در روش زیست پرتابی ۵/۲ ٪ و در روش آگروباکتریوم ۱/۷۴ ٪ از گیاهان باززایی شده در رقم فلات، تعیین گردید. تحقیق حاضر اولین گزارش از کشت موفقیت آمیز میکروسپور های گندم در ایران است که طی آن امکان تراریختی مواد هاپلوییدی گندم نیز مورد مطالعه قرار گرفته و گیاهان تراریخت از ارقام ایرانی فلات و مغان۱ بدست آمد.

واژگان کلیدی: گندم هگزاپلوئید، کشت میکروسپور، هاپلوئید، انتقال ژن، ژن گزارشگر، گندم تراریخت

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه ۱

۲- بررسی منابع ۵

۲-۱- گندم و اهمیت آن ۵

۲-۲- تولید گیاهان هاپلوئید ۵

۲-۳- مزایا و کاربرد گیاهان هاپلوئید ٦

۲-٤ - روشهای تولید گیاهان هاپلوئید ۷

۲-٤-۱- تولید خود به خودی گیاهان هاپلوئید ۷

۲-٤-۲- روش حذف کروموزومی ۷

۲-٤-۳- استفاده از ژن هاپلوئیدی ۸

۲-٤-٤-ماده زایی (ژینوژنز) درون شیشه ای ۰۸

۲-٤-۵- نرزایی (آندروژنز) درون شیشه ای ۹

۲-۵- عوامل موثر بر آندروژنز ۱۱

۲-۵-۱- شرایط رشد گیاهان مادری ۱۲

۲-۵-۲- مرحله نموی میکروسپور ۱۲

۲-۵-۳- محیط کشت القا ساختارهای جنینی ۱۳

۲-۵-٤- شرایط کشت میکروسپوها ۱٤

۲-۵-۵- پیش تیمار میکروسپورها ۱۵

۲-٦- شاخص های القای جنین زایی در میکروسپورها ۱۷

۲-۷- کنترل ژنتیکی جنین زایی در گندم ۱۷

۲-۸- روشهای انتقال ژن به سلولهای گیاهی ۱۹

۲-۸-۱- روش مبتنی بر آگروباکتریوم ۱۹

۲-۸-۲- روش های مستقیم انتقال ژن ۲۲

۲-۸-۳- روش انتقال ژن بمباران ذره‌ای ۲۳

۲-۸-٤- مقایسه روش انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم با روش بمباران ذره‌ای ۲۵

۲-۹- روشهای تراریختی مواد هاپلوئیدی ۲٦

۲-۹-۱- روش بمباران ذره ای ۲٦

۲-۹-۲- روش آگروباکتریوم ۲۹

۲-۱۰- ژنهای گزارشگر ۳۱

۲-۱۰-۱- آنزیم β- گلوکرونیداز (GUS) ۳۲

۲-۱۰-۲- پروتئین فلورسنت سبز (GFP) ۳۳

۲-۱۱- نشانگرهای گزینشگر ۳٤
۲-۱۱-۱- نئومایسین فسفوترانسفراز II (NPTII) ۳۵
۲-۱۱-۲- فسفینو تریسین استیل ترانسفراز (PAT) ۳۵
۳- مواد و روشها ۳۸
۳-۱- کشت میکروسپورهای ایزوله ۳۸
۳-۲- تعیین زمان برداشت سنبله‌ها جهت کشت میکروسپور ٤۰
۳-۳- محیط جدا سازی میکروسپورها ٤۲
۳-٤- محیط های کشت رویان زایی میکروسپورها ٤۲
۳-۵- محیط کشت باززایی گیاه ٤۲
۳-٦- مراحل انجام کشت میکروسپور گندم ٤۳
۳-۷- شمارش رویان ها و انتقال آنها به محیط باززایی گیاه ٤۷
۳-۸- تیمار گیاهچه ها با کلشیسین و انتقال به خاک ٤۹
۳-۹- صفات مورد بررسی ۵۱
۳-۱۰- آزمایشات انجام شده در بخش کشت میکروسپور ۵۱
۳-۱۱- تجزیه و تحلیل داده های مربوط به آزمایشات کشت میکروسپور ۵۳
۳-۱۲- مواد و روشهای مورد استفاده برای انتقال ژن به مواد هاپلوئیدی ۵٤
۳-۱۲-۱- مواد و وسایل لازم برای بمباران ذره ای ۵۲
۳-۱۲-۲- طرز تهیه ذرات طلا (میکروکریر) برای بمباران ذره ای ۵٦
۳-۱۲-۳- آماده سازی بافت هدف جهت بمباران ۵۷
۳-۱۲-٤- روش انجام بمباران رویان های حاصل از کشت میکروسپور ۵۷
۳-۱۲-۵- سنجش هیستوشیمیایی GUS برای جنین های بمباران شده ۵۹
۳-۱۳- آزمایشات انجام شده جهت بهینه سازی شرایط انتقال ژن و باززایی گیاهان ۵۹
۳-۱٤- انتقال ژن به روش مبتنی بر آگروباکتریوم ٦۲
۳-۱٤-۱- پلاسمید مورد استفاده و سویه آگروباکتریوم ٦۲
۳-۱٤-۲- روش انتقال پلاسمید به آگروباکتریوم ٦۲
۳-۱٤-۳- روش انتقال ژن توسط آگروباکتریوم ٦۳
۳-۱۵- مواد و روش‌ها برای آزمایشات مولکولی ٦۵
۳-۱۵-۱- مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها ٦۵
۳-۱۵-۲- سویه باکتری‌های استفاده شده در آزمایشات انتقال ژن ٦٦
۳-۱۵-۳- روش تهیه ذخیره از باکتری ونگهداری در دمای ^{o}C ۷۰- ٦٦
۳-۱۵-٤- طرز تهیه محیط LB ٦٦
۳-۱۵-۵- نحوه ساخت، نگهداری و افزودن آنتی بیوتیک‌ها به محیط کشت ٦۷
۳-۱۵-٦- تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* ٦۸

۳-۱۵-۷- تراریختی سلولهای مستعد با روش فریز – ذوب (سمبروک و همکاران، ۲۰۰۱)..... ٦٩
۳-۱۵-۸- استخراج DNA پلاسمیدی به روش تجزیه قلیایی یا مینی پرپ..... ۷۰
۳-۱۵-۹- استخراج DNA ژنومی از گیاه گندم..... ۷۳
۳-۱۵-۱۰- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA..... ۷٦
۳-۱۵-۱۱- الکتروفورز با ژل آگارز..... ۷٦
۳-۱٦- آنالیز گیاهان تراریخت ۷۷
۳-۱٦-۱- آزمون PCR ۷۸
۳-۱٦-۲- آزمون RT-PCR ۷۹
۳-۱٦-۳- آنالیز فنوتیپی گیاهان تراریخت..... ۸۲
٤- نتایج و بحث ۸٤
٤-۱- نتایج آزمایشات کشت میکروسپور ۸٤
٤-۱-۱- نتایج آزمایش اول: بررسی امکان جنین زایی میکروسپور های ایزوله در ارقام گندم هگزاپلوئید ایرانی..... ۸۵
٤-۱-۲- نتایج آزمایش دوم: بررسی اثر پیش تیمارهای مختلف بر روی القاء جنین زائی میکروسپورهای گندم ۸۹
٤-۱-۳- نتایج آزمایش سوم: بررسی اثر تراکم میکروسپورها در محیط کشت بر جنین زایی میکروسپورهای گندم..... ۹٦
٤-۱-٤- نتایج آزمایش چهارم : بررسی تأثیر تفکیک میکروسپورهای زنده و مرده بر میزان ۹۸
٤-۱-۵- نتایج آزمایش پنجم: مقایسه اثر محیط های کشت مختلف بر جنین زایی میکروسپورهای گندم..... ۱۰۰
٤-۲- بهینه سازی انتقال ژن *uidA* به روش بمباران ذره‌ای ۱۰۳
٤-۲-۱- تائید حضور ژن GUS با استفاده از آزمون PCR در پلاسمید ۱۰٤
٤-۲-۲- هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراجی با استفاده ازآنزیم‌های *Bgl* II و *Pml* I..... ۱۰٤
٤-۲-۳- آزمایش اول: بررسی اثر نوع دیسک و فاصله نگهدارنده بزرگ حامل تا بافت هدف..... ۱۰۵
٤-۲-۵- آزمایش سوم: بررسی اثر تعداد شلیک و فاصله نگهدارنده بزرگ حامل تا بافت هدف بر روی میزان بیان ژن گزارشگر (*uidA*)..... ۱۰۹
٤-۲-٦- آزمایش چهارم: بررسی اثر نوع پیش تیمار اسمزی بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم در رقم فلات..... ۱۱۲
٤-۲-۷- آزمایش پنجم: بررسی اثر مقدار ذرات طلا و غلظت DNA در هر بار شلیک، بر میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات ۱۱۳
٤-۲-۸- آزمایش ششم: بررسی اثر سن جنین های انتخابی، بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم ۱۱۵
٤-۲-۹- آزمایش هفتم: بررسی اثر اندازه ذرات طلا و فاصله شلیک تا بافت هدف بر روی درصد باززایی گیاه از جنین های بمباران شده ۱۱۷

٤-٣- آنالیز گیاهان تراریخت ١٢٠
٤-٣-١- آزمون هیستوشیمیایی گیاهان تراریخت گندم ١٢٢
٤-٣-٢- بررسی مولکولی گیاهان انتخابی (تراریخت احتمالی) ١٢٣
٤-٣-٣- نتایج حاصل از روش آگروباکتریوم ١٢٧
٤-٣-٤- فراوانی تراریختی ١٣٢
٤-٤- نتیجه گیری نهایی ١٣٨
٤-٥- پیشنهادات ١٣٩

فهرست جداول

جدول ۲- ۱- ژنهای نشانگر گزینشگر که در انتقال ژن، مورد استفاده قرار می گیرند..... ۳٤

جدول۳-۱- اجزاء محیط های کشت استفاده شده برای جنین زایی میکروسپورهای گندم هگزاپلوئید. ٤۳

جدول ۳-۲- محیط کشت‌های مورد استفاده برای تراریزش گندم با آگروباکتریوم..... ٦٥

جدول٤-۱- نتایج تجزیه واریانس برای صفت جنین زایی در کشت میکروسپور ارقام مختلف گندم ۸٥

جدول٤-۲ - نتایج تجزیه واریانس اثر رقم، نوع پیش تیمار و مدت پیش تیمار بر میزان جنین زایی در کشت میکروسپور گندم ۹۰

جدول٤-۳- نتایج تجزیه واریانس اثر رقم و تراکم میکروسپورها بر صفت جنین زایی در کشت میکروسپور ارقام (فلات و مغان۱) گندم..... ۹۷

جدول٤-٤- نتایج تجزیه واریانس اثر تفکیک میکروسپورهای زنده بر میزان جنین زایی میکروسپور ارقام (فلات ومغان۱) گندم..... ۹۹

جدول٤-٥- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر میزان جنین زایی در کشت میکروسپور رقم فلات ۱۰۰

جدول٤-٦- تجزیه واریانس اثر نوع دیسک و فاصله نگهدارنده بزرگ حامل تا بافت هدف بر میزان بیان ژن گزارشگر *uid*A در جنین های هاپلوئید گندم در رقم فلات..... ۱۰٦

جدول٤-۷- نتایج تجزیه واریانس اثر اندازه ذرات طلا و نوع دیسک بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *(uidA)* در جنین های هاپلوئید گندم ۱۰۸

جدول٤-۸- نتایج تجزیه واریانس اثر تعداد شلیک و فاصله نگهدارنده بزرگ حامل تا بافت هدف بر روی میزان بیان گذرای ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم ۱۱۰

جدول٤-۹- تجزیه واریانس اثر نوع پیش تیمار استرس بر میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات..... ۱۱۲

جدول٤-۱۰- نتایج تجزیه واریانس اثر مقدار ذرات طلا و غلظت DNA در هر بار شلیک، بر میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات ۱۱٤

جدول٤-۱۱- تجزیه واریانس اثر سن جنین های انتخابی، بر میزان بیان ژن گزارشگر(*uid*A) در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات..... ۱۱٦

جدول٤-۱۲- تجزیه واریانس اثر اندازه ذرات طلا و فاصله شلیک تا بافت هدف بر روی درصد باززایی گیاهان کل و گیاه سبز از جنین های هاپلوئید بمباران شده رقم فلات ۱۱۷

جدول٤-۱۳- نتایج حاصل از آنالیز گیاهان تراریخت تولید شده به دو روش بمباران ذره ای و آگروباکتریوم..... ۱۳۳

فهرست اشکال

شکل ۲-۱- نمایش شماتیک مراحل نمو میکروسپورها ۱۳

شکل ۲-۲ - دستگاه بیولیستیک مدل PDS- 1000/He، ساخت کمپانی BioRad آمریکا ۲٤

شکل ۲-۳ - اجزای دستگاه بیولیستیک (PDS- 1000/He)، مورد استفاده درپروسه بمباران ذره ای. ۲٤

شکل۲ -۴- ساختار شیمیایی علف کش بیالافوس ۳۵

شکل ۳-۱- کشت گیاهان مادری گندم در اتاق رشد جهت کشت میکروسپور ۳۹

شکل۳-۲- مزرعه کشت گیاهان مادری گندم جهت کشت میکروسپور ٤۰

شکل۳-۳- میکروسپورهای گندم هگزاپلوئید، در مرحله رشد و نموی مناسب ٤۱

شکل۳-٤- نمایش شماتیک مراحل نمو دانه گرده ٤۱

شکل۳-۵- شمارش کروموزومی سلول های مریستمی انتهای ریشه ۵۰

شکل ۳- ٦- دستواره های استفاده شده در آزمایشات انتقال ژن ۵٤

شکل ۳-۷ - جنین‌های هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپور، در محیط اسمتیک جهت بمباران ۵۷

شکل ۳-۸- الکتروفورز DNA ژنومی گندم بر روی ژل آگارز۰/۸٪ ۷۷

شکل٤-۱- مقایسه میانگین تعداد جنین در واحد سنبله در ارقام مختلف گندم هگزاپلوئید ایرانی ۸٦

شکل٤-۲- مراحل تولید گیاهان هاپلوئید گندم از طریق کشت میکروسپور (رقم فلات). ۸۷

شکل٤-۳- تشکیل جنین از میکروسپورهای القاء شده گندم در محیط کشت جنین زایی NPB99 ..... ۸۹

شکل٤-٤- اثر متقابل رقم، انواع پیش تیمار و طول دوره پیش تیمار بر روی جنین زایی میکروسپورهای گندم در رقم فلات (A) و مغان (B). ۹۱

شکل ٤-۵- روند تکوین میکروسپور گندم به سمت تشکیل جنین هاپلوئید ۹۳

شکل٤-٦- تأثیر تراکم میکروسپورها در محیط کشت بر روی جنین زایی میکروسپورهای گندم ۹۸

شکل٤-۷- تأثیر تفکیک میکروسپورهای زنده و مرده بر روی میزان جنین زایی میکروسپورها ۹۹

شکل٤-۸- مقایسه بین اثر محیط های کشت مختلف بر روی جنین زایی میکروسپورهای گندم در رقم فلات ۱۰۱

شکل٤-۹ : الکتروفورز محصولات PCR پلاسمید استخراج شده، با استفاده از آغازگرهای ژن GUS، بر روی ژل آگارز ۱٪ ۱۰٤

شکل٤-۱۰- محصول هضم دوگانه پلاسمید حاوی ژن GUS با آنزیم‌های *Bgl* II و *Pml I* ۱۰۵

شکل٤-۱۱- اثر متقابل نوع دیسک و فاصله شلیک تا بافت هدف بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uid*A در جنین های هاپلوئید گندم ۱۰۷

شکل ٤-۱۲- مقایسه بیان موقت ژن گزارشگر *uid*A (نقاط آبی) در جنین های هاپلوئید بمباران شده گندم ۱۰۷

شکل٤-۱۳- اثر متقابل اندازه ذرات طلا و نوع دیسک بر روی میزان بیان ژن گزارشگر (*uid*A) در جنین های هاپلوئید گندم ۱۰۹

شکل٤-١٤- اثر متقابل تعداد شلیک و فاصلهٔ نگهدارنده بزرگ حامل تا بافت هدف بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم..... ١١١
شکل٤-١٥- اثر نوع پیش تیمار استرس بر روی میزان بیان ژن گزارشگر (*uidA*) در جنین های هاپلوئید ١١٣
شکل٤-١٦- اثر مقدار ذرات طلا و غلظت DNA در هر بار شلیک، بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات..... ١١٥
شکل٤-١٧- اثر سن جنین های انتخابی، بر روی میزان بیان ژن گزارشگر *uidA* در جنین های هاپلوئید گندم رقم فلات ١١٦
شکل ٤-١٨- مقایسه فراوانی باززایی گیاهان (سبز و آلبینو) در جنین های بمباران شده با استفاده از ذرات ١µm و فاصله ٩ cm (A) ، و ذرات ١/٦ µm و فاصله ٦ cm (B) ١١٨
شکل٤-١٩- اثر متقابل اندازه ذرات طلا و فاصله شلیک تا بافت هدف بر روی درصد باززایی گیاهان کل (A) و باززایی گیاهان سبز (B) از جنین های هاپلوئید بمباران شده در رقم فلات..... ١١٩
شکل ٤-٢٠- انتقال گیاهچه‌های سبز باززایی شده به محیط انتخابی. ١٢٠
شکل٤-٢١- انتقال گیاهچه‌ها به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت انتخابی ریشه زایی ١٢١
شکل٤-٢٢- سنجش هیستوشیمیایی GUS بر روی گیاهچه های تراریخت گندم برای اطمینان از بیان این ژن ١٢٣
شکل٤- ٢٣ : نتایج الکتروفورز محصولات PCR گیاهان تراریخت، با آغازگرهای اختصاصی ژن GUS ١٢٤
شکل٤- ٢٤ : نتایج الکتروفورز محصولات PCR گیاهان تراریخت، با آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* ١٢٥
شکل٤- ٢٥ : نتایج الکتروفورز محصولات RT-PCR در دو نمونه از گیاهان تراریخت گندم ١٢٦

شکل٤-٢٦- نتایج الکتروفورز محصول PCR پلاسمیدpCAMBIA ، با آغازگرهای اختصاصی ژن GUS..... ١٢٧
شکل٤-٢٧- هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراجی از آگروباکتریوم با آنزیم‌های *BamH I*، *Bgl* II و *BstE II*.... ١٢٨
شکل٤-٢٨- بررسی ریز نمونه‌های تلقیح شده، بر روی محیط انتخابی..... ١٢٩
شکل٤-٢٩ - الگوی توده ای (A) و نقطه ای (B) بیان ژن گزارشگر GUS، در جنین های هاپلوئید گندم، پس از تلقیح با آگروباکتریوم ١٣٠
شکل٤-٣٠ - بیان ژن گزارشگر GUS، در گیاهچه در حال باززائی (الف) و در اندام رویشی گیاهچه های گندم (ب) ١٣١
شکل٤- ٣١ : نتایج الکتروفورز محصولات PCR گیاهان تراریخت با آگروباکتریوم، با آغازگرهای اختصاصی ژن GUS ١٣١
شکل٤- ٣٢ : نتایج الکتروفورز محصولات PCR گیاهان تراریخت حاوی ژن *bar*، با آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* (باند ٥٦٤ bp) بر روی ژل آگارز ١٪ ١٣٢

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

رشد بی‌رویهٔ جمعیت جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه، همواره دغدغه تولید غذا را برای بشر به همراه داشته و گسترش کمی و کیفی محصولات زراعی و فرآورده های کشاورزی را می طلبد. جمعیت دنیا درآغاز قرن بیست و یکم متجاوز از ۶ میلیارد نفر می باشد که کمبود غذا، قحطی و گرسنگی دامنگیر بیش از ۷۰۰ میلیون نفر بوده و بالغ بر سه میلیارد نفر هم از سوء تغذیه رنج می برند (Aulinger,2002). در این راستا تلاش روز افزون محققین، در جهت افزایش محصولات غذایی بویژه در سالهای اخیر، نوید بخش بوده و توانسته است با استفاده از تکنولوژی های جدید، در جهت افزایش کمی و کیفی فرآورده‌های غذایی مورد نیاز این جمعیت عظیم گام بردارد.

گندم نان *(Triticum aestivum L.)* در بین گیاهان زراعی از جایگاه و اهمیت ویژه ای برخوردار است، بطوریکه نزدیک به ۴۰ درصد غذای اصلی مردم جهان را تشکیل می‌دهد. زراعت این غله در مقایسه با سایر غلات اهمیت بیشتری داشته و بیش از ۳۰ درصد سطح زیر کشت غلات جهان را به خود اختصاص داده است و از این نظر حائز رتبه اول می‌باشد. طبق آمار FAO در سال ۲۰۰۵ میلادی مقدار محصول این غله در جهان ۶۳۰ میلیون تن بوده است که از این مقدار، ۱۴ میلیون تن در ایران تولید شده است (www. FAO. Org, 2006). آنچه گندم را از میان غلات بعنوان قوت غالب متمایز ساخته است ویژگی هایی نظیر ارزش غذایی، متناسب بودن با دستگاه گوارش انسان، سهولت تبدیل و نگهداری، تولید مواد زاید قابل استفاده و غیر مضر، تنوع و مرغوبیت فراورده‌های آن، عملکرد بالا و مقاومت نسبی در برابر آفات است.

بهبود ژنتیکی گندم در سالهای اخیر با هدف افزایش عملکرد دانه، بهبود کیفیت، کاهش خسارت محصول ناشی از شرایط محیطی نامناسب و همچنین توسعه مقاومت در مقابل انواع آفات و عوامل بیماری زا، در سرتاسر جهان مورد توجه قرار گرفته است (Patnaik and Khurana, 2001). در روش های کلاسیک، بهبود ژنتیکی در گندم با استفاده از برنامه‌های گسترده تلاقی و سپس گزینش سیستماتیک ترکیبات جدید و مفید صورت می‌گیرد.

هاپلوئید[1] اصطلاحی است که به نصف تعداد طبیعی کروموزوم‌های هر گونه اشاره می‌کند. تولید گیاهان هاپلوئید از اهمیت بسزایی برای تحقیقات به نژادی و انتقال ژن برخوردار می باشند، زیرا با دو برابر کردن تعداد کروموزوم های گیاهان هاپلوئید، هاپلوئیدهای مضاعف شده[2] بدست می آیند که کاملاً خالص[3] هستند.

استفاده از هاپلوئیدها، در برنامه های به نژادی به منظور تولید گیاهان کاملاً خالص تاکنون در تعداد کمی از گونه های زراعی میسر شده است. امروزه محققین از طریق هاپلوئیدهای مضاعف شده توانسته اند ارقام جدیدی از غلات بویژه جو، ذرت، برنج و گندم را اصلاح و معرفی نمایند(Shugar, 1998). تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده به روش های مختلفی در گیاهان زراعی انجام می گیرد.

آندروژنز[4] یا نرزایی یکی از روش‌های موفق تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد. در این روش گیاه هاپلوئید از اندامهای نر گیاه (بساک و میکروسپور) حاصل می‌شود. با اینکه کشت بساک به عنوان معمول ترین روش تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده در جهت به نژادی برخی از گونه ها مورد استفاده می باشد، اما سیستم کشت میکروسپورهای ایزوله روشی است که در سال های اخیر به لحاظ مزایای آن نسبت به کشت بساک مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. در روش کشت میکروسپورهای ایزوله، مشکل دخالت دیواره بساک بر طرف می شود و پتانسیل تولید گیاهان هاپلوئید در این روش نیز بیشتر است. به علاوه میکروسپور، ماده ژنتیکی مناسبی برای مطالعات جهش ژنی و انتقال ژن در تراریختی ژنتیکی است.

راندمان کم تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده از طریق آندروژنز در برخی از ژنوتیپ های گندم، گاهاً بهره‌برداری از این روش بالقوه قدرتمند را برای مهندسی ژنتیک در این گیاه زراعی محدود کرده است. بنابراین، بهبود در فراوانی القاء جنین، همچنین بهینه سازی شرایط کشت و باززایی گیاه سبز، با هدف بدست آوردن پروتکلی موثر برای کشت میکروسپور و بساک گندم ضروری به نظر می رسد.

تولید گیاهان تراریخت از طریق بافت های هاپلوئید یکی از اهداف با ارزش در مهندسی ژنتیک به شمار می آید، زیرا پس از انتقال ژن به بافت هاپلوئید و مضاعف کردن تعداد کروموزم های آن، می توان گیاهان تراریخت کاملاً خالص برای ژن انتقال یافته را باززایی کرد و ضمناً در صورت استفاده از میکروسپورها به عنوان بافت هدف، می توان به گیاهان تراریخت غیر شیمر نیز دست یافت (Dormann,1999).

1- Haploid
2- Doubled Haploid
3- Homozygous
3- Androgenesis

شایان ذکر است که تولید واریته های تراریخت، در دهه اخیر، به عنوان ابزار جدیدی برای اصلاح صفات کمی و کیفی محصولات زراعی بسرعت گسترش یافته است، به طوریکه از سال ۱۹۹۶ تا سال ۲۰۰۷، سطح زیر کشت جهانی محصولات تغییر یافته ژنتیکی[1] (GM) بیش از ۶۰ برابر شده است. بر طبق آمار، سطح زیر کشت گیاهان زراعی تراریخت در سال ۲۰۰۷ بالغ بر ۱۱۴ میلیون هکتار بود که به وسیله ۵۵ میلیون کشاورز در ۲۳ کشور جهان کشت شده است (Clive James, 2007).

در بین غلات، گندم آخرین گیاهی است که در آن تغییرات ژنتیکی صورت گرفته است که شاید عمده ترین دلیل آن بزرگ بودن اندازه ژنوم گندم (تقریباً ۱۷۰۰۰ مگا باز) و هگزاپلوئید بودن آن باشد که امکان تغییرات ژنتیکی را در آن با مشکل مواجه می سازد.

برای بررسی ژن انتقال یافته، اثر عوامل مختلف بر انتقال ژن، برآورد فراوانی تراریختی[2] و نیز محل بیان ژن، از ژنهای گزارشگر[3] استفاده می شود. این ژنها عمدتاً پروتئینی با فعالیت آنزیمی را رمز می کنند که بیان آن به راحتی ۴۸-۲۴ ساعت بعد از انتقال ژن قابل مشاهده است. ژن *uidA* (GUS) که آنزیم بتا گلوکورونیداز را رمز می کند، به طور گسترده ای برای بهینه کردن سیستم انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد.

در کشور ما، بیوتکنولوژی شاخه ای تازه از علم است که در سال های اخیر مورد اقبال محققان قرار گرفته است. پیش از این، علیرغم تلاش‌های زیادی که برای بدست آوردن جنین از کشت میکروسپورهای برخی از گیاهان خانواده غلات نظیر جو و ذرت در ایران صورت گفت، متاسفانه هیچ یک از آنها با موفقیت همراه نبودند (خاوری خراسانی، ۱۳۸۴: عابدینی، ۱۳۸۰)

بطور کلی، هدف این تحقیق، بررسی امکان تولید گیاهان خالص با استفاده از تکنیک کشت میکروسپور در تعدادی از ژنوتیپ های گندم هگزاپلوئید ایرانی و بهینه سازی این روش برای تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده گندم در ایران می باشد که می تواند علاوه بر صرفه جوئی در هزینه ها، برنامه های به نژادی گندم را تسریع نموده و مکمل مناسبی برای روشهای رایج به نژادی باشد. از سویی امکان انتقال ژن به مواد هاپلوییدی گندم برای تولید گیاهان تراریخت مورد بررسی قرار گرفته است تا در صورت موفقیت بتوان در آینده ژن(های) کنترل کننده صفات مطلوب زراعی (نظیر مقاومت به آفات یا بیماریها، مقاومت به علف‌کش‌ها و غیره) را منتقل کرده و پس از دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها، گیاهان تراریخت کاملاً هموزیگوت تولید کرد.

1- Genetically Modified
2- Transformation
3- Reporter genes

فصل دوم

بررسی منابع