به نام خدایی که در این نزدیکی است

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

ترانسفورماسیون برنج (*Oryza sativa* L.) با ژن EPSPS با استفاده از آگروباکتریوم به روش *In planta*

از:

طیبه سلامت

استاد راهنما:

دکتر محمد مهدی سوهانی

شهریور ۱۳۹۰

تقدیم به:

خانواده عزیزم و تمام آنانی که در مسیر سرنوشتم

لحظه‌ای در کنارم ایستادند

و با محبت یاریم نمودند

و بنا به تقدیر عبور کردند

باشد که بپذیرند.

برخود لازم می‌دانم از حامیان همیشگی‌ام، از **خانواده** عزیزم که عشق و زندگی را از آن‌ها آموختم، سپاسگزاری کنم. آنان که صدایشان برایم زنگ زندگی است. خالصانه بر آستان پر مهرشان سر فرود می‌آورم و بر دستانشان بوسه می‌زنم که تمام هستی من مدیون محبت‌های بی‌ادعایشان است.

از استاد بزرگوارم، **جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی** که راهنمایی اینجانب را در طول انجام پایان نامه بر عهده داشتند، و راهنمای علم و ادب بوده و هستند، تشکر می‌کنم. بی شک بدون وجود راهنمایی‌های ارزنده‌شان و دلگرمی‌های دلسوزانه‌شان، طی این مسیر برایم ناممکن بود. مسیری که با روشنایی علم و حمایت ایشان به انتها رسید.

مراتب تقدیر و تشکر خود را از اساتید مدعو، **جناب آقای دکتر شیرزادیان** و **جناب آقای دکتر سمیع زاده** که زحمت بازخوانی این تحقیق را بر عهده گرفتند اعلام می‌دارم.

از کلیه دوستان و همکلاسی‌هایم به دلیل کمک‌های بی دریغشان، بی نهایت ممنونم.

در پایان، از کلیه کسانی که به نحوی در این راه یاریم نمودند، قدردانی می‌کنم.

طیبه سلامت

شهریور ماه سال یکهزار و سیصد و نود شمسی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی.....ر
چکیده انگلیسی.....ز
مقدمه.....۲

فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱- گیاه برنج ٦
۱- ۱-۱- مراحل رشد برنج.....٦
۱- ۲- علف‌های هرز ۷
۱- ۳- کنترل (مهار) علف‌های هرز.....۸
۱- ۳- ۱- مهار شیمیایی.....۸
۱- ٤- علف‌کش‌های شیمیایی.....۸
۱-۵- طبقه‌بندی علف‌کش‌ها بر اساس گزینش ۹
۱-٦- طبقه‌بندی علف‌کش‌ها بر اساس زمان مصرف.....۱۰
۱-۷- طبقه‌بندی علف‌کش‌ها بر اساس نحوه عمل ۱۰
۱- ۸- گلایفوسیت.....۱۱
۱- ۸- ۱- توسعه علائم ۱۲
۱- ۸- ۲- نحوه عمل ۱۲
۱- ۹- مسیر شیکیمات ۱۳
۱- ۱۰- آنزیم EPSPS ۱٤
۱- ۱۱- مقاوم‌سازی نسبت به علف‌کش گلایفوسیت.....۱۵
۱-۱۲- ترانسفورماسیون ۱۵
۱-۱۲-۱- اهمیت مزایای ترانسفورماسیون.....۱٦
۱-۱۳- روش‌های مختلف ترانسفورماسیون ۱٦
۱-۱۳-۱- روش‌های مستقیم ترانسفورماسیون ۱٦
۱-۱۳-۱-۱- معایب روش ترانسفورماسیون بواسطه‌ی پروتوپلاست ۱۷
۱- ۱۳-۲- روش غیر مستقیم ترانسفورماسیون.....۲۰
۱-۱۳-۲-۱- اگروباکتریوم.....۲۰
۱-۱۳-۲-۲-اجزاء اصلی پلاسمید Ti ۲۱
۱-۱۳-۲-۳-افزایش کارایی ترانسفورماسیون و گسترش دامنه میزبانی اگروباکتریومتومفاشیینس.....۲۳
۱-۱۳-۲-٤- ترانسفورماسیون به روش *In planta* در برنج **۲٦**
۱-۱۳-۲- ۵- انواع روش‌های ترانسفورماسیون *In planta*.....۲۸

۱-۱۳-۲-٦- استرین آگروباکتریوم ۲۸
۱-۱۳-۲-۷- گروه‌بندی استرین‌های آگروباکتریوم بر اساس نوع وکتور ۲۹
۱-۱۳-۲-۸- مزیت استفاده از وکتور دوتایی برای ترانسفورماسیون و انتقال ژن ۳۰

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- ترانسفورماسیون ارقام برنج بااستفاده ازاگروباکتریوم به روش *In planta* ۳۲
۲-۲- مواد گیاهی ۳۲
۲-۳- استرین‌های اگروباکتریوم تومفاشیینس و پلاسمیدهای مورد استفاده ۳۲
۲-٤- ناقل گزارش‌گر pCAMBIA1105.1R ۳۲
۲-٥- ناقل بیانی pAJ21 ..... ۳۳
۲-٦- مراحل ترانسفورماسیون ۳٤
۲-۷- محیط‌های مورد نیاز جهت کشت باکتری ۳٥
۲-۷- ۱- محیط کشت LB ۳٥
۲-۷-۲- محیط AB ۳٥
۲-۷-۲-۱- بافر 20 X AB ۳٦
۲-۷-۲-۲- نمک 20 X AB ۳٦
۲-۷-۳- محیط القایی ۳٦
۲-۷-۳-۱- محلول ذخیره 50 mM2-(4-morpholino)-ethan sulfunic acid (MES) ۳٦
۲-۷-۳-۲- محلول ذخیره استوسیرینگون(3,5- Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon97%) ۳٦
۲-۷-٤- آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در محیط‌های کشت ۳٦
۲-۸- کشت باکتری (آگروباکتریوم تومفاشیینس) و القای ژن‌های vir ۳۷
۲-۹- محلول یوشیدا جهت آبیاری و تغذیه‌ی گیاهان ترانسفورم شده ٤۱
۲-۱۰- طرح آزمایشی مورد استفاده ٤۲
۲-۱۱- بررسی گیاهان ترانسفورم شده ٤۲
۲-۱۱-۱- استخراج DNA و استفاده از واکنش PCR ٤۳
۲-۱۱-۱-۱- الکتروفورز ٤٤
۲-۱۱-۱-۲- بافر TAE ٤٤
۲-۱۱-۱-۳- بافر بارگذاری ٤٥
۲- ۱۱-۱-٤- اتیدیوم برماید ٤٦
۲-۱۱-۱-٥- نشانگرهای اندازه DNA ٤٦
۲-۱۱-۱-٦- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای 18srRNA ٤٦
۲-۱۱-۱-۷- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای CaMV 35S ٤۸
۲-۱۱-۱-۸- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن EPSPS ٤۹

۲- ۱۱-۲- آزمایش بافت شیمیاییGUS ۵۱
۲- ۱۱-۲-۱- تهیه محلول ذخیرهX-Gluc ۵۱
۲-۱۱-۳- تست مقاومت به آنتی بیوتیک هایگرومایسین ۵۲

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر نوع تلقیح و تیمار بذور بر روی درصد جوانه زنی بذور..... ٥٤
۳-۲- تأثیر روش‌های تلقیح و غلظت‌های مختلف استوسیرینگون بر میزان تولید گیاهچه‌های ترانسفورم شده..... ٥٩
۳-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده..... ٦٥
۳-۳- ۱- تائید تلفیق DNA خارجی در ژنوم با استفاده از روش PCR..... ٦٧
۳-٤- آزمایش بافت شیمیایی GUS در برگ..... ۷۲
۳-٤-۱- بررسی کارایی ترانسفوماسیون با استفاده از آزمایش بافت شیمیایی.GUS ۷۳
۳-۵- تست مقاومت بافت برگی به آنتی بیوتیک هایگرومایسین ۷٦
۳-۵-۱- بررسی کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از روش تست آنتی بیوتیک هایگرومایسین ۷۷
۳-٦ – نتیجه‌گیری و بحث در مورد معرفی بهترین رقم، غلظت استوسیرینگون و استرین باکتری و نوع تلقیح ۸۰
۳-۷- آنالیز گیاهان نسل T1 با استفاده از واکنش PCR..... ۸۱
۳-۸- ترانسفورماسیون ارقام برنج با پلاسمید حاوی ژن EPSPS..... ۸۲
پیشنهادات..... ۸۲
منابع..... ۸٤

فهرست شکل‌ها

شکل ۱- ۱- ساختمان گلایفوسیت (N-(phosphonomethyl) glycine) ۱۲
شکل ۱- ۲- مسیر کلی شیکیمات، مسیر سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک، (بنت لی، ۱۹۹۰) ۱٤
شکل ۱- ۳- تصویر الکترونیکی اگروباکتریوم متصل به دیواره سلولی گیاه ۲۱
شکل ۱- ٤- ساختمان T- DNA ۲۱
شکل ۱- ٥- مکانیسم انتقال DNA از گیاه به باکتری ۲۳
شکل ۱- ٦- ترکیبات فنولی (مسی کولن و بینس، ۲۰۰٦) ۲٤
شکل ۱-۷- ساختار منوساکاریدهای القاگر (انکنبایور و نستر، ۱۹۹۰) ۲٥
شکل ۱-۸- وکتور دوتایی (هایی و همکاران، ۱۹۹۷ ..... ۳۰
شکل ۲- ۱- نمونه بذر برنج ۳۲
شکل ۲- ۲- نقشه پلاسمید pCAMBIA1105.1R ۳۳
شکل ۲- ۳- نقشه‌ی ناقل pAJ21 و جایگاه آنزیم برشی ۳٤
شکل ۲- ٤- آماده‌سازی و ضدعفونی بذور برنج ۳٥
شکل ۲- ٥- کشت باکتری ۳۸
شکل ۲- ٦- سانتریفیوژ محیط AB ۳۸
شکل ۲- ۷- دستگاه وکیوم ۳۹
شکل ۲ -۸- تلقیح بذور با سوزن آغشته به باکتری ۳۹
شکل ۲- ۹- بذور جوانه زده پس از نه روز ٤۰
شکل ۲- ۱۰- خیساندن بذور در آنتی بیوتیک سفوتاکسیم ٤۰
شکل ۲- ۱۱- انتقال بذور به محیط یوشیدا ٤۰
شکل ۲- ۱۲- انتقال گیاهچه‌ها به خاک مناسب ٤۲
شکل ۳- ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری و نوع تلقیح بر میزان جوانه‌زنی ٥۷
شکل ۳- ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و نوع تلقیح بر میزان جوانه‌زنی ٥۸
شکل ۳-۳- مکان مناسب تلقیح (لین و همکاران، ۲۰۰۹) ٥۹
شکل ۳-٤- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری و نوع تلقیح بر روی صفت درصد گیاهچه‌های ترانسفورم شده ٦۳
شکل ۳-٥- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و نوع تلقیح بر روی صفت درصد گیاهچه‌های ترانسفورم شده ٦٤
شکل ۳-٦- مقایسه میانگین اثر متقابل استوسیرینگون و نوع تلقیح بر روی صفت گیاهچه‌های ترانسفورم شده ٦٥
شکل ۳- ۷- DNA ژنومی استخراجی بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱٪ گیاهان T_0، M شاخص اندازه، ۱۰-۱ نمونه‌های DNA بارگذاری شده رقم‌های هاشمی و گرده ٦٦
شکل ۳-۸- محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 18s rRNA. M شاخص اندازه، ۱- کنترل منفی، لاین‌های ۵-۱ PCR ارقام هاشمی، لاین‌های ۱۰-۵ PCR ارقام کرده ٦٦

شکل ۳- ۱- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CaMV 35S، M شاخص اندازه، ۱ و ۵ و ۱۰ دارای باند bp ٤٥٠ مورد نظر هستند، ۱۱- کنترل مثبت (پلاسمید pCAMBIA1105.1R)، ۱۲- کنترل منفی ٦٧
شکل ۳- ۲- نمودار مقایسه میانگین تعیین درصد کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل باکتری و نوع تلقیح با استفاده از روش PCR ۷۱
شکل ۳-۱۱- نمودار مقایسه میانگین تعیین درصد کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل رقم و نوع تلقیح با استفاده از روش PCR. ۷۲
شکل ۳-۱۲- آزمایش بافت شیمیایی GUS در برگ گیاهان ترانسفورم شده که با شکل‌گیری رنگ آبی در بافت برگ نشان داده شده است ۷۳
شکل ۳-۱۳- آزمایش بافت شیمیایی GUS در برگ گیاهان غیر ترانسفورم شده (عدم وجود رنگ آبی در بافت برگ)... ۷۳
شکل ۳-۱٤- نمودار تعیین کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل باکتری × انواع مختلف تلقیح با استفاده از روش آزمایش بافت شیمیایی GUS ۷۵
شکل ۳-۱۵- نمودار تعیین کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل رقم× انواع مختلف تلقیح با استفاده از روش آزمایش بافت شیمیایی GUS ۷٦
شکل ۳-۱٦- تست مقاومت بافت برگی به آنتی بیوتیک هایگرومایسین، جهت تعیین گیاهان ترانسفورم شده، A: گیاهان ترانسفورم شده و B: گیاهان شاهد (غیرترانسفورم شده)..... ۷۷
شکل ۳-۱۷- نمودار تعیین کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل نژاد باکتری × انواع مختلف تلقیح با استفاده از روش تست آنتی بیوتیک هایگرومایسین ۷۹
شکل ۳-۱۸- نمودار تعیین کارایی ترانسفورماسیون اثر متقابل استوسیرینگون × انواع مختلف تلقیح با استفاده از روش تست آنتی بیوتیک هایگرومایسین ۸۰
شکل ۳-۱۹- بررسی ترانسفورماسیون گیاهان نسل T_1 با استفاده از واکنش PCR .M شاخص اندازه. ۱- کنترل -، ۸- کنترل + (پلاسمید pCAMBIA1105.1R)۲-۷ نمونه‌های بارگذاری شده‌ی DNA ۸۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- عملکرد برخی ژن های بیماریزا (سوندارشا و همکاران، ۲۰۰۹)..... ۲۲
جدول ۲- ۱- آنتی بیوتیک های مورد استفاده (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱..... ۳۷
جدول ۲-۲- ترکیبات لازم برای تهیه محیط غذایی یوشیدا..... ٤۱
جدول ۲-۳- قابلیت جداسازی قطعات DNA با استفاده از غلظت مختلف‌های ژل آگارز..... ٤۵
جدول ۲-٤- تهیه بافر 10X TAE..... ٤۵
جدول ۲- ۵- آغازگرهای مستقیم و معکوس18srRNA..... ٤٦
جدول ۲- ٦- مواد و مقادیر بهینه شده در واکنش PCR برای آغازگر18srRNA..... ٤۷
جدول ۲- ۷- واکنش PCR برای آغازگر18srRNA..... ٤۷
جدول ۲- ۸- آغازگرهای مستقیم و معکوس قطعه‌ایی از پروموتر CaMV 35S..... ٤۸
جدول۲- ۹- مواد و مقادیر بهینه شده در واکنش PCR برای آغازگر CaMV 35S..... ٤۸
جدول ۲- ۱۰- چرخه دمایی واکنش PCR برای پروموترCaMV35S..... ٤۹
جدول ۲- ۱۱- مواد و مقادیر بهینه شده در واکنش PCR..... ۵۰
جدول ۲- ۱۲- چرخه دمایی واکنش PCR برای پروموتر ژن EPSPS..... ۵۰
جدول ۲- ۱۳- مواد و غلظت‌های مورد استفاده برای آزمایش بافت شیمیایی GUS..... ۵۱
جدول ۳- ۱- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت درصد جوانه‌زنی..... ۵٤
جدول ۳- ۲- مقایسه میانگین اثرات ساده رقم و استوسیرینگون و باکتری و نوع تلقیح بر روی صفت جوانه زنی (٪)..... ۵٦
جدول ۳- ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت درصد گیاهچه‌های ترانسفورم شده..... ٦۰
جدول۳-٤- مقایسه میانگین اثرات ساده رقم، استوسیرینگون، باکتری و نوع تلقیح بر روی صفت درصد گیاهچه‌های ترانسفورم شده..... ٦۲
جدول ۳- ۵- نتایج تجزیه واریانس صفت کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از روش PCR..... ٦۸
جدول۳- ٦- مقایسه میانگین اثرات ساده رقم، استوسیرینگون، باکتری و نوع تلقیح بر روی صفت کارایی ترانسفورماسیون ۷۰
جدول ۳- ۷- نتایج تجزیه واریانس کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از آزمایش بافت شیمیاییGUS..... ۷٤
جدول ۳-۸- نتایج تجزیه واریانس کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از تست آنتی بیوتیک هایگرومایسین..... ۷۸

ترانسفورماسیون برنج (*Oryza sativa* L.) با ژن EPSPS با استفاده از آگروباکتریوم به روش *In planta*

طیبه سلامت

چکیده

ژن EPSPS مسئول کد کردن آنزیم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase، یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک در میکرواورگانیسم‌ها و گیاهان، می‌باشد. ترانسفورماسیون ژنتیکی غلات یک ابزار ضروری و قدرتمند برای انتقال ژن می‌باشد. روش‌های ترانسفورماسیون مرسوم پیچیده و وقت‌گیر هستند. تکنیک ترانسفورماسیون بوسیله اگروباکتریوم تومفاشیینس یک رویکرد مطلوب برای انتقال ژن محسوب می‌گردد. روش ترانسفورماسیون *in planta* روشی است که در آن جنین نابالغ برنج بوسیله سوزن آغشته به محلول آگروباکتریوم تلقیح می‌شود. در این روش از ۲ رقم (رقم هاشمی و رقم گرده)، دو استرین اگروباکتریوم تومفاشیینس (EHA105 و LBA4404) حامل وکتورهای pCAMBIAl105.1R و pAJ21، ۳ سطح استوسیرینگون (به ترتیب سه غلظت µM ۱۰۰، ۵۰، ۰) و ۳ نوع تلقیح (سوزن mm ۰/۵ ، وکیوم و سوزن ۷mm/ . و خراش با اسکارپل) استفاده شد. این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. بذرهای تلقیح شده جوانه زدند و تحت شرایط استریل رشد کردند. با استفاده از روش PCR، بررسی مقاومت بافت‌های برگی به آنتی بیوتیک هایگرومایسین، آزمایش بافت شیمیایی GUS و کارایی ترانسفورماسیون بررسی گردید. در نتیجه استرین EHA105 و رقم هاشمی برنج ایرانی، سوزن ۰/۵mm به همراه وکیوم در مقایسه با دیگر تیمارها دارای بیشترین کارایی ترانسفورماسیون بودند. همچنین موفقیت ترانسفورماسیون بیشتر با آنالیز نسل T_1 تایید گردید.

کلید واژه: برنج (*Oryza sativa* L.)، اگروباکتریوم تومفاشیینس، روش ترانسفورماسیون *in planta*

***In planta* Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) using *EPSPS* gene**

Tayyebe Salamat

Abstract

Gene *EPSPS* coding enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, is a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthetic pathway in microorganisms and plants. Genetic transformation of cereal crops is a powerful research and an essential tool for gene discovery. Traditional transformation methods are complex and time consuming. *Agrobacterium*-mediated transformation technique is a favorable approach for gene transfer. In this study, an in planta transformation method in which an Agrobacterium coated needle is used to inoculate a rice immature embryo has been developed. In this method two landraces rice including Hashemi and Gerde cultivars, two strains of *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105 and LBA4404) harboring pCAMBIAl105.1R and pAJ21 vectors, three levels of acetosyringone (0, 50, 100Mμ) and three types of induction (scarofication with scarpel, needle 0/5 mm and vacuum and 0/7 mm) were used. The experiment was carried on a factorial design and treatments were applied in completely randomized design (CRD) with three replications. The inoculated seeds were germinated and grew under no sterile conditions. Integration of the transgene into the genome of transgenic rice plants were confirmed using histiochemical assay of GUS activity, PCR and resistance of leaf tissues to Hygromycm antibiotic. Consequently, EHA105 strain and Hashemi rice cultivar together with the needle 0/5 mm and vacuum showed a significant transformation efficiency in comparision with the other treatments. The success of transformation was further confirmed by analysis of T_1 generation.

Key words: *Oryza sativa* L. , *Agrobacterium tumefaciens*, Transformation, *In planta*.

مقدمه

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان است و۱۱٪ از کل اراضی زراعی جهان زیر کشت برنج بوده و در طی هر سال ٦٦۰ میلیون تن برنج از این سطح برداشت شده است. این محصول ۲/۸۸ کالری / فرد/ روز را تامین می‌نماید. برنج یکی از گیاهان زراعی عمده‌ی انقلاب سبز (که در دهه ۱۹٦۰ تا ۱۹۷۰ اتفاق افتاد) محسوب می‌گردد. و تنها غله‌ای است که منحصراً برای تغذیه انسان کشت می‌شود و حدود نصف جیره غذایی ٦ میلیارد نفر از جمعیت دنیا را تشکیل می‌دهد (کارنا[1]، ۲۰۰۹).

برنج پس از گندم، مهم‌ترین محصول زراعی به شمار می‌آید. علف‌های هرز یکی از عوامل محدود کننده اصلی در زراعت برنج محسوب می‌شوند و تاثیر مستقیم در افت محصول دارند. همچنین علف‌های هرز برای دریافت نور، آب و مواد غذایی با گیاه برنج رقابت می‌کنند (جواهر دشتی، ۱۳۸۱).

برای کنترل موثر علف‌های هرز غیرانتخابی، استفاده از علف‌کش‌های پس‌رویشی (Post emergence) مانند گلایفوسیت توصیه می‌گردد. گلایفوسیت یک علف‌کش عمومی با طیف گسترده است که به منظور کنترل بسیاری از علف‌های هرز در شرایط مختلف کشاورزی و باغبانی برای گیاهان زراعی و زینتی به کار می‌رود (باقری، ۱۳۸۱). ولی این علف‌کش دارای اثر سوء بر روی گیاهان زراعی بوده و باعث از بین رفتن آنها می‌گردد. در نتیجه تولید گیاه مقاوم به گلایفوسیت ضروری می‌باشد (کهریزی[2] وهمکاران، ۲۰۰٦).

مکانیسم عمل گلایفوسیت این است که یک اثر بازدارندگی رقابت‌آمیز روی آنزیم 5- enoly pyruvyl shikimate -3- phosphate synthase (EPSPS) در مسیر شیکیمات در باکتری‌ها و گیاهان آلی دارد و هدف علف‌کش گلایفوسیت است (حقانی[3] و همکاران، ۲۰۰۷). دستکاری ژن EPSPS باکتریایی به منظور کاهش تمایل آن به گلایفوسیت و انتقال این ژن تغییر-یافته به گیاهان، یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تولید گیاهان مقاوم به گلایفوسیت می‌باشد (کهریزی و همکاران، ۲۰۰٦).

[1] -Carena
[2] - Kahrizi
[3] - Haghani

جهت انتقال ژن‌های مفید به گیاهان زراعی از روش‌های مختلف ترانسفورماسیون استفاده می‌شود. عمده‌ترین روش‌ها برای ترانسفورماسیون در غلات روش بایولیستیک و استفاده از آگروباکتریوم است (هایی[1] و همکاران، ۱۹۹۷). موفق‌ترین وپرکاربردترین سیستم‌ها برای تراریخت دائمی گیاه، سیستم‌هایی هستند که بر مبنای آگروباکتریوم می‌باشند (هایی وکومار، ۲۰۰۶). امروزه با بهبود روش‌های ترانسفورماسیون برای گیاهان تک‌لپه، گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از آگروباکتریوم تومفاشیینس[2] در ترانسفورماسیون گیاهان برنج و گندم وجود دارد که یکی از این روش‌ها، روش ترانسفورماسیون *In planta* می‌باشد (سوپارتانا[3] و همکاران، ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶).

در این تحقیق ترانسفورماسیون موفق گیاه برنج به روش *in planta* ارائه شد. در این روش تلقیح بذور برنج در داخل سوسپانسیون اگروباکتریوم تومفاشیینس و در محیط القایی انجام شد، هچنین فاکتورهای مختلف دخیل در این روش مطالعه و گیاهان ترانس‌ژنیک آنالیز شدند.

[1] - Hiei
[2]- *Agrobacterium tumefaciens*
[3] - Supartana

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱- ۱- گیاه برنج

برنج با نام علمی (*Oryza sativa* L.) گیاهی دیپلوئید (2n=2x=24) و متعلق به خانواده گرامینه‌ها (گندمیان)، که دارای انواع یک ساله و چند ساله می‌باشد. این گیاه نیاز به آب و اکسیژن فراوان دارد و در مناطق مختلف جهان کشت می‌شود. دارای ساقه‌ای با ارتفاع ٦٠ تا ٢٠٠ سانتیمتر، ماشوره‌ای، استوانه‌ای و بنددار که در قسمت گره‌ها تو خالی است. برنج علاوه بر ساقه اصلی دارای چندین ساقه فرعی نیز می‌باشد. برگهای برنج به صورت متناوب، صاف و دارای غلاف ، پهنک ، زبانک و گوشوارک هستند.

ریشه‌ی این گیاه سطحی و افشان بوده، هم‌زمان با افزایش رشد برگ‌ها بر رشد ریشه نیز افزوده می‌گردد. و در نتیجه می‌توان گفت که با افزایش تعداد پنجه‌ها تعداد برگ‌ها بیشتر شده و در نتیجه رشد ریشه‌ها نیز زیادتر می‌شود. حداکثر رشد ریشه در زمان به خوشه رفتن است.

برنج گیاهی است خود گشن و بین صفر تا ٣ درصد دگرگشنی دارد. گرده افشانی تقریباً هم‌زمان با باز شدن گلها در شرایط طبیعی روی می‌دهد. دمای مطلوب برای گرده افشانی در حدود ٣١ تا ٣٢ درجه سانتی‌گراد است. در دمای پایین‌تر از ١٠ تا ١٣ درجه‌سانتی‌گراد و همچنین بالاتر از ٦٠ درجه سانتی‌گراد گرده‌افشانی متوقف می‌گردد (صحراگرد و خداپرست، ١٣٧٨).

۱ ۱ ۱ -مراحل رشد برنج

الف - رشد رویشی (از جوانه‌زنی تا شروع تشکیل خوشه)

مرحله رویشی با جوانه زنی بذر آغاز می‌شود. ابتدا ریشه‌چه و بدنبال آن کلئوپتیل از رویان بذر خارج می‌شود. در مدت پیش‌پنجه‌زنی بعدی، ریشه‌های بذری و جانبی و اولین برگها رشد می‌کنند. مزوکوتیل، بسته به شرایط نوری، تقریبا همزمان رشد می‌کند و در سطح خاک طوقه گیاه را تشکیل می‌دهد و ریشه اصلی را بوجود می‌آورد. مرحله پنجه‌زنی رشد رویشی معمولا وقتی آغاز می‌شود که گیاهچه‌ها چهار تا پنج برگی و خودکفا هستند.

اولین پنجه معمولاً از یک جوانه جانبی در یکی از اولین یا پایین‌ترین گره‌های ساقه اصلی خارج می‌شود. پنجه‌های بعدی (یکی برای هر یک یا دو برگ) تشکیل، و هر یک بعد جایگزین یک برگ می‌شود. این پنجه‌های اولیه در گره‌های خود پنجه های ثانوی را بوجود می‌آورند و آن‌ها نیز پنجه‌های سوم را تولید می‌کنند. اغلب ارقام طی١٢٠ تا ١٧٠ روز این مرحله را سپری می‌کنند (اخگری، ١٣٨٣).

ب - دورهٔ زایشی (ازشروع تشکیل خوشه تا گلدهی)

آغاز خوشه‌دهی معمولاً بعد از اینکه تعداد پنجه‌ها به حداکثر رسید انجام می‌شود، که نشان دهنده آغاز مرحله زایشی است. مریستم اولیه خوشه یا جوانه‌ها، ابتدا در پنجه‌های اصلی تشکیل می‌شود و در نقطه رویشی داخل ساقه ماشورهای قابل رویت است. آغاز خوشه‌دهی با طویل شدن میانگره‌های فوقانی و تشکیل همزمان منافذ هوایی داخلی مشخص می‌شود. با پیشروی مرحله زایشی، انشعاب‌های خوشه، سنبلک‌ها، و اجزای گل رشد می‌کنند و قابل تشخیص می‌شوند. در مرحله بعد ظهور خوشه (خوشه‌دهی) از غلاف برگ پرچم صورت می‌گیرد.

مرحله گلدهی بلافاصله بعد از خروج خوشه‌ها شروع می‌شود. گلدهی از انتها به طرف قاعده خوشه‌ها پیشروی می‌کند و ۸-۶ روز طول می‌کشد. گل‌ها معمولاً خودگشن هستند. تخم چند روز پس از لقاح قابل مشاهده است. دانه برنج مراحل شیری، خمیری نرم، خمیری سفت، سبز بالغ و رسیدن کامل را می‌گذراند. زمان گلدهی تا رسیدن دانه بر حسب رقم و محل متفاوت است (صحراگرد و خداپرست، ۱۳۷۸).

۱-۲- علف‌های هرز

علف‌هرز گیاهی است خودرو که به طور ناشناخته در مزارع و باغ‌ها می‌روید (رستگار و همکاران، ۱۳۸٦). با افزایش جمعیت و کمی میزان عرضه غذا، هر بخشی از اراضی حاصلخیز باید مورد توجه خاص قرار گیرد و تلفات محصول توسط علف‌های هرز قابل تحمل خواهد بود. هنگامی که میلیون‌ها انسان با قحطی روبه‌رو شوند احتمالاً گیاهان زراعی غیر ضروری نظیر توتون، و غیره را تولید می‌کنند که در شمار علف‌های هزر خواهند بود، حتی گونه‌های کم‌محصول از تیره‌های اصلی گیاهان زراعی نیز که در مقابل نیازهای غذایی عملکرد مناسب را نداشته باشند، جزء این طبقه‌بندی محسوب می‌شوند. به این ترتیب علف‌های هرز برای نسل‌های حال و آینده معنی جدیدی خواهد گرفت (اسینگنتا[1]، ۲۰۰٤).

[1] - Singenta

همچنین علف‌های هرز یکی از عوامل محدود کننده اصلی در زراعت برنج محسوب می‌شوند که موجب افت محصول می-گردند (جواهر دشتی، ۱۳۸۱). علف‌های هرز به سه گروه یک‌ساله[1]، دو ساله[2] و چند ساله[3] تقسیم می‌شوند (زیمدال[4]، ۲۰۰۷).

۱-۳- کنترل (مهار) علف‌های هرز

آن درجه از مدیریت علف‌های هرز است که جمعیت علف‌های هرز را به اندازه‌ای کاهش می‌دهد که در رشد گیاه زراعی اختلال ایجاد نکنند. شمار علف‌های هرز در گیاهان زراعی به میزانی کاهش می‌یابد که عملکرد کاهش نیابد و در عملیات برداشت اختلال ایجاد نشود. کنترل شامل چهار بخش کلی زیر می‌باشد: مهار مکانیکی، مهار زراعی، مهار زیستی و مهار شیمیایی علف‌های هرز.

۱-۳-۱- مهار شیمیایی

مهم‌ترین نوع مهار است، استفاده از مواد شیمیایی که علف‌های هرز را به صورت انتخابی در میان گیاهان زراعی از بین ببرد، بخش عمده بسیاری از نظام‌های نوین مدیریت علف‌های هرز می‌باشد. همچنین با توجه به مسئله کمبود کارگر و افزایش دستمزد، مبارزه شیمیایی و استفاده از سموم مختلف علف‌کش، بهترین و ساده‌ترین و احتمالاً ارزان‌ترین طریقه مبارزه با علف-های هرز می‌باشد (خدابنده، ۱۳۸۷).

۱-٤- علف‌کش‌های شیمیایی

روش‌های مکانیکی، کشاورزی را به طور کامل تغییر داد و اکنون مواد شیمیایی آن را به سوی قله‌های جدید کارایی به پیش می‌برند. بخش اصلی کاربرد مواد شیمیایی از علف‌کش‌ها جهت کنترل گیاهان نامطلوب و آفت‌کش‌ها است. هدف از تحقیقات بر روی عملکرد علف‌کش‌ها ساخت موادی موثرتر و با ایمنی بیشتر در کشاورزی و حذف علف‌های هرز می‌باشد (غدیری، ۱۳۷٦).

---

[1] - Annual
[2] - Biennials
[3] - Perennials
[4]- Zimdahl

خصوصیات یک علف‌کش تجاری موفق عبارتند از:

۱ – در مقادیر اندک، طیف وسیعی از علف‌های هرز را از بین ببرد ؛

۲ – بتوان آن را قبل و بعد از پیدایش علف‌هرز در زمین زراعی مورد استفاده قرار داد ؛

۳ – برای گیاه زراعی سمی نباشد و تا حد امکان عوارض جانبی زیست محیطی نظیر سمیت برای سایر موجودات و حشرات مفید بر جای نگذارد ؛

٤ – دارای نیمه عمر کوتاه و جذب بالا در خاک.

۱-۵- طبقه‌بندی علف‌کش‌ها بر اساس گزینش

علف‌کش‌ها بر اساس گزینش و نحوه‌ی انتخاب به دو گروه علف‌کش‌های انتخابی[1] و علف‌کش‌های غیرانتخابی[2] طبقه‌بندی می‌شوند.

الف- علف‌کش‌های انتخابی

علف‌کش‌هایی هستند که تمامی علف‌های هرز موجود در مزرعه را بدون آسیب زدن به گیاه زراعی از بین می‌برند. این نوع علف‌کش‌ها به خاطر عدم تاثیر و یا حداقل اثرات نامطلوب که روی محصول زراعی دارند، برای مختل کردن رشد و یا کشتن علف‌های هرز به کار گرفته می‌شوند. امروزه علف‌کش‌های انتخابی در کشاورزی مدرن به عنوان یک روش کارا، با ارزش، انعطاف‌پذیر و مناسب برای کنترل علف‌های هرز در میان محصولات کشاورزی محسوب می‌شود (موناکو[3] و همکاران، ۲۰۰۲).

[1] - Selective Herbicides
[2] - Non - Selective Herbicides
[3] - Monaco