بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

مرکز تهران شرق

پایان‌نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

گروه مهندسی کشاورزی

آنالیز مولکولی گیاهچه‌های حاصل از انتقال ژن به جنین‌های رویشی نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) از طریق بمباران ذره‌ای

بهاره دهسرا

اساتید راهنما: دکتر امیر موسوی، دکتر موسی موسوی

استاد مشاور: دکتر محمدعلی ابراهیمی

آذر ۱۳۹۰

صورتجلسه دفاع

اینجانب بهاره دهسرا دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه در پایان‌نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل قول مستقیم یا غیرمستقیم، منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده‌ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می‌دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می‌نماید که مطالب مندرج در این پایان‌نامه (رساله) نتیجه تحقیقات خودش می‌باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو: بهاره دهسرا

تاریخ و امضاء

اینجانب بهاره دهسرا دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه براساس مطالب پایان‌نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب و ...، به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو: بهاره دهسرا

تاریخ و امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

آذر ۱۳۹۰

تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوار و دلسوزم

برادر مهربانم

همسر عزیزم

پسر نازنینم رادین

...

سپاسگزاری

در اینجا از بزرگواران و عزیزانی که در انجام این تحقیق مرا یاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایم. از زحمات بی‌دریغ آقای دکتر امیر موسوی، استاد راهنمای ارجمندم تشکر و قدردانی می‌کنم که با سعه‌صدر و مساعدت‌های بسیار در طی اجرای این پایان‌نامه مرا راهنمایی نمودند و فرصتی فراهم کردند تا در حد امکان شرایط و امکانات آزمایشگاهی مناسبی برای انجام این فعالیت علمی در پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری مهیا گردد. همچنین از آقای دکتر موسی موسوی که به‌عنوان استاد راهنما همواره با ایجاد امیدها و انگیزه‌های مثبت و بیان نکات ارزنده و سازنده در جهت پیشرفت پروژه بسیار تاثیرگذار بودند. در این راه به کرات از نظرات و مشاوره‌های استاد محترم آقای دکتر محمدعلی ابراهیمی مدیریت محترم گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام‌نور تهران بهره گرفتم و از بابت هدایت‌ها و همکاری‌های بی‌دریغ و بی‌شائبه، بسیار از ایشان سپاسگزارم. همچنین از کلیه همکاران و دوستان محترم و عزیزم در واحدهای مختلف پژوهشی و اداری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به خاطر محبت‌ها و یاری‌رسانی‌های فراوان و صمیمانه متشکرم. از بزرگواران، اساتید و کارشناسان دانشگاه پیام‌نور تهران به جهت ایجاد فضای مناسب و مطلوب و حسن همکاری در تحقق اهداف علمی و پژوهشی دانشجویان قدردان و سپاسگزارم.

چکیده

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) درختی دوپایه، دیپلوییید (۲n=۲x=۳۶) و تک‌لپه بوده که به‌منظور افزایش بهره‌برداری غذایی، اقتصادی و صنعتی و نیز مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی در تولید خرما، در بیوتکنولوژی مدرن مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق، گیاهچه‌های خرمای تراریخت‌شده با سازه ژنی pBI221 (شامل پیش‌برنده CaMV 35S، ژن گزارشگر GUS و پایان‌دهنده NOS)، برای تأیید تلفیق و نسخه‌برداری تراژن و تعیین تعداد جایگاه‌های ژنی، با PCR، RT-PCR و دورگه‌سازی ساترن ارزیابی شدند. با مقایسه نتایج حاصل از چندین روش استخراج DNA ژنومی از بافت برگ، روش تغییریافته سمبروک، نسبت به سایر روش‌ها نتیجه مناسب‌تری را دربرداشت. درعین‌حال، استخراج RNA نیز به کمک سه روش رایج مورد مقایسه قرار گرفت. کیفیت و کمیت DNA و RNA از طریق تعیین میزان جذب در روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز سنجیده شد. از تفکیک محصولات تکثیریافته با آغازگرهای همگانی ۱۸S و اکتین و آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* و توالی‌های 35S و Nos بر روی ژل، قطعات مورد انتظار مشاهده گردیدند. بیان ژن انتقال‌یافته از طریق آزمون RT-PCR و به کمک آغازگرهای اختصاصی تراژن *gus* و نیز آغازگرهای ژن کنترل *اکتین*اثبات شد. پس از انجام آنالیز دورگه‌سازی به روش ساترن و مقایسه نتایج با داده‌های حاصل از RT-PCR، نمونه واجد یک نسخه از تراژن در قیاس با لاین دونسخه‌ای، مطلوب‌تر و بیان بهتری را نشان داد. ظهور لکه‌های آبی در آزمون هیستوشیمیایی GUS، عملکرد و بیان ژن *uidA* را تایید نمود. بررسی‌ها، بیانگر مناسب و مؤثر بودن روش بمباران ذره‌ای جهت انتقال ژن به گونه نخل خرما بوده و ارزیابی‌های انجام‌شده می‌توانند توسط محققین بعدی در آنالیز گیاهان تراریخت خرما استفاده گردند.

کلمات کلیدی: نخل خرما، آنالیز مولکولی، RT-PCR، دورگه‌سازی ساترن، سنجش GUS

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول_مقدمه..... ۱

۱-۱-نخل خرما..... ۲

۱-۲-گیاه‌شناسی نخل خرما..... ۳

۱-۳-اهمیت تغذیه‌ای خرما..... ٦

۱-٤-اهمیت صنعتی خرما..... ۸

۱-۵-کاربرد و اهمیت درمانی خرما..... ۸

۱-٦-اکولوژی و نیازهای اقلیمی خرما..... ۹

۱-۷-تاریخچه کشت خرما در ایران..... ۱۰

۱-۸-کشورهای تولیدکننده خرما..... ۱۱

۱-۹-مزایای زراعی و اهمیت اقتصادی خرما در ایران..... ۱۳

۱-۱۰-بررسی ارقام مختلف خرما بر اساس سازگاری با منطقه..... ۱۷

۱-۱۱-تولید و تکثیر درخت خرما..... ۱۹

۱-۱۲-ارزیابی به‌کارگیری کشت بافت به‌منظور تکثیر خرما..... ۲۰

۱-۱۳-عوامل تهدیدکننده نخل خرما و تولید محصول آن..... ۲۲

۱-۱۳-۱-تنش‌های زیستی..... ۲۲

۱-۱۳-۲-تنش‌های غیرزیستی..... ۲۲

۱-۱٤-باززایی..... ۲۳

۱-۱۵-تراریختی در خرما..... ۲٤

۱-۱٦-بمباران ذره‌ای..... ۲۵

۱-۱۷-شناسایی و ارزیابی گیاهان تراریخت‌شده..... ۲٦

۱-۱۷-۱-ژن گزارشگر و ویژگی‌های آن..... ۲۷

۱-۱۸-آنالیزهای مولکولی..... ۲۸

۱-۱۹-بررسی انتقال ژن در گیاهچه‌های تراریخت‌شده و اثبات تلفیق تراژن..... ۲۹

۱-۲۰-پیشینه کشت بافت و تراریختی خرما در ایران و جهان..... ۳۰

۱-۲۰-۱-پیشینه کشت بافت نخل خرما در دنیا..... ۳۰

۱-۲۰-۲-پیشینه کشت بافت نخل خرما در ایران..... ۳۱

۱-۲۰-۳-پیشینه شناسایی ارقام با استفاده از مارکرهای مولکولی..... ۳۱

۱-۲۰-٤-پیشینه تراریختی نخل خرما..... ۳۳

۱-۲۱-استخراج DNA و RNA از نخل خرما..... ۳٤

۱-۲۲-PCR و RT-PCR با آغازگرهای ژن‌های همگانی..... ۳۸

۱-۲۳-اهداف تحقیق..... ۳۹

فصل دوم_مواد و روش‌ها..... ٤۱

۲-۱-مواد..... ٤۲

۲-۱-۱-مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها..... ٤۲

۲-۱-۲-محلول‌ها و معرف‌ها..... ٤٢
۲-۱-۲-۱-ژل آگارز..... ٤٢
۲-۱-۲-۲-محلول رنگی بارگذاری (٦X)..... ٤٣
۲-۱-۲-۳-رنگ‌آمیزی ژل آگارز..... ٤٤
۲-۱-۲-٤-محلول اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)..... ٤٤
۲-۱-۲-٥-محلول CTAB (۱۰٪)..... ٤٥
۲-۱-۳-بافرها..... ٤٥
۲-۱-۳-۱-بافر TE..... ٤٥
۲-۱-۳-۲-بافر TNE..... ٤٥
۲-۱-۳-۳-بافر TBE ٥X..... ٤٦
۲-۱-۳-٤-بافر استخراج DNA به روش CTAB..... ٤٦
۲-۱-۳-٥-بافر شستشو برای استخراج DNA به روش CTAB..... ٤٧
۲-۱-۳-٦-بافر استخراج DNA به روش سریع..... ٤٧
۲-۱-۳-۷-بافر استخراج DNA به روش سمبروک..... ٤٨
۲-۱-۳-۸-بافر استخراج DNA به روش سمبروک تغییریافته..... ٤٨
۲-۱-۳-۹-بافر GUS ۱۰X..... ٤٩
۲-۱-٤-آنزیم‌ها..... ٤٩
۲-۱-٤-۱-آنزیم‌های برشی یا محدودالاثر..... ٤٩

۲-۱-٤-۲-سایر آنزیم‌ها..... ٤۹
۲-۱-۵-محلول‌ها و بافرهای دورگه‌سازی ساترن..... ٤۹
۲-۱-۵-۱-محلول SSC ۲۰X..... ٤۹
۲-۱-۵-۲-ترکیب محلول پیش‌دورگه‌سازی..... ۵۰
۲-۱-۵-۳-بافر مالییک اسید..... ۵۰
۲-۱-۵-٤-محلول بلوکه..... ۵۰
۲-۱-۵-۵-بافر شستشو..... ۵۱
۲-۱-۵-٦-محلول واسرشته‌سازی..... ۵۱
۲-۱-۵-۷-محلول خنثی‌سازی..... ۵۱
۲-۱-۵-۸-محلول آنتی‌بادی..... ۵۱
۲-۱-۵-۹-بافر تشخیص..... ۵۱
۲-۱-۵-۱۰-محلول سوبسترای رنگ..... ۵۲
۲-۱-٦-سازه پلاسمیدی..... ۵۲
۲-۱-۷-آغازگرها..... ۵۳
۲-۲-روش‌ها..... ۵۵
۲-۲-۱-استخراج DNA ژنومی از برگ گیاهچه‌های خرما..... ۵۵
۲-۲-۱-۱-روش CTAB..... ۵٦
۲-۲-۱-۲-ادغام دو روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) و دویل و لویل (۱۹۸۷)..... ۵۸

۲-۲-۱-۳-روش سریع استخراج DNA..... ۵۹
۲-۲-۱-٤-روش کیت با استفاده از i-genomic plant DNA extraction..... ٦۰
۲-۲-۱-۵-روش سمبروک و همکاران (۱۹۸۹)..... ٦۱
۲-۲-۱-٦-استخراج DNA با تغییراتی در روش سمبروک..... ٦۲
۲-۲-۲-غلظت‌سنجی DNA استخراج‌شده..... ٦٤
۲-۲-۳-استخراج RNAتام از بافت گیاه..... ٦۵
۲-۲-۳-۱-روش کیت با استفاده از RNX-Plus TM..... ٦۱
۲-۲-۳-۲-روش تریزول..... ٦۷
۲-۲-۳-۳-روش تریزول بهینه‌شده..... ٦۸
۲-۲-٤-بررسی کمی و کیفی RNA استخراج‌شده..... ۷۰
۲-۲-۵-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۷۰
۲-۲-٦-واکنش RT-PCR..... ۷٤
۲-۲-٦-۱-ساخت cDNA تک‌رشته‌ای از RNA..... ۷٤
۲-۲-٦-۲-ساخت cDNA دورشته‌ای از cDNA تک‌رشته‌ای..... ۷۷
۲-۲-۹-آزمون دورگه‌سازی ساترن..... ۷۷
۲-۲-۹-۱-مراحل انجام دورگه‌سازی ساترن..... ۷۷
۲-۲-۹-۲-ساخت کاوشگر به روش PCR با استفاده از Dig-dUTP..... ۷۹
۲-۲-۹-۳-تخلیص DNA ژنومی..... ۷۹

۲-۲-۹-٤-هضم آنزیمی ژنوم..... ۷۹
۲-۲-۹-٥-آماده‌سازی DNA هضم‌شده برای انتقال به غشاء..... ۸۰
۲-۲-۹-٦-انتقال DNA از ژل به غشاء..... ۸۰
۲-۲-۹-۷-دپوریناسیون..... ۸۱
۲-۲-۹-۸-واسرشته کردن DNA..... ۸۱
۲-۲-۹-۹-لوازم و وسایل انتقال نمونه DNA به غشاء..... ۸۱
۲-۲-۹-۱۰-نحوه چیدمان غشاها و ژل..... ۸۲
۲-۲-۹-۱۱-تثبیت DNA بر روی غشاء..... ۸۳
۲-۲-۹-۱۲-پیش‌دورگه‌سازی..... ۸۳
۲-۲-۹-۱۳-آماده‌سازی کاوشگر..... ۸۳
۲-۲-۹-۱٤-دورگه‌سازی..... ۸۳
۲-۲-۹-۱٥-عملیات آشکارسازی غشاء..... ۸٤
۲-۲-۹-۱٦-مراحل شستشو..... ۸٤
۲-۲-۹-۱۷-آشکارسازی غشاء..... ۸٥
۲-۲-۱۰-آزمون هیستوشیمیایی GUS..... ۸٥
۲-۲-۱۰-۱-شرایط سنجش بافتی و سلولی بتاگلوکورونیداز..... ۸٦
فصل سوم_نتایج..... ۸۷
۳-۱-بررسی مولکولی گیاهچه‌ها با آزمون PCR..... ۸۸

۳-۱-۱-استخراج DNA ژنومی از بافت برگ..... ۸۸
۳-۱-۲-تعیین خلوص و غلظت DNA..... ۹۱
۳-۱-۳-آزمون PCR با آغازگرهای همگانی ۱۸S..... ۹۵
۳-۱-٤- آزمون PCR با آغازگرهای همگانی اکتین..... ۹۵
۳-۱-۵-آزمون PCR به منظور اثبات حضور ژن *gus*..... ۹٦
۳-۱-٦-آزمون PCR با آغازگرهای عمومی ۳۵S..... ۹۷
۳-۱-۷-PCR با آغازگرهای عمومی NOS..... ۹۸
۳-۱-۸-آزمون PCR با آغازگرهای PBIN (*npt*II)..... ۹۹
۳-۲-بررسی مولکولی گیاهچه‌ها با آزمون RT-PCR..... ۱۰۰
۳-۲-۱-استخراج RNA کل از برگ گیاهچه‌ها..... ۱۰۰
۳-۲-۲-بررسی کمی و کیفی RNA استخراج‌شده..... ۱۰۰
۳-۲-۳-آزمون RT-PCR..... ۱۰۲
۳-۲-٤-انجام RT-PCR با آغازگرهای اکتین..... ۱۰۳
۳-۲-۵- تأیید نسخه‌برداری تراژن GUS با RT-PCR..... ۱۰٤
۳-۲-٦-آزمون RT-PCR با آغازگرهای PBIN (*npt*II)..... ۱۰٤
۳-۳-آزمون دورگه‌سازی ساترن..... ۱۰۵
۳-٤-سنجش GUS در گیاهچه‌های تراریخت نخل خرما..... ۱۰۸
فصل چهارم_بحث..... ۱۰۹

٤-١-آنالیزهای مولکولی گیاهچه‌های تراریخت‌شده..... ١١٠
٤-٢-بهینه‌سازی استخراج DNA ژنومی از بافت برگ خرما..... ١١٠
٤-٢-١-مشکلات موجود در استخراج DNA ژنومی از نخل خرما..... ١١١
٤-٢-٢-امتیازات روش سمبروک تغییریافته..... ١١٢
٤-٢-٣-بررسی و ارزیابی خلوص و غلظت DNA..... ١١٢
٤-٣-بررسی مولکولی گیاهچه‌های تراریخت‌شده با آزمون PCR..... ١١٣
٤-٣-١-آزمون PCR با آغازگرهای همگانی ١٨S و اکتین..... ١١٣
٤-٣-٢-PCR به منظور اثبات حضور ژن *gus*..... ١١٣
٤-٣-٣-PCR با آغازگرهای ٣٥S و NOS..... ١١٤
٤-٣-٤-بررسی PCR با آغازگرهای PBIN (*npt*II)..... ١١٤
٤-٤-بررسی مولکولی گیاهچه‌های تراریخت‌شده با آزمون RT-PCR..... ١١٤
٤-٤-١-انجام RT-PCR با آغازگرهای اکتین..... ١١٥
٤-٤-٢-تأیید نسخه‌برداری تراژن *gus* با استفاده از RT-PCR..... ١١٦
٤-٤-٣-بررسی RT-PCR با آغازگرهای PBIN (*npt*II)..... ١١٦
٤-٥-بررسی نتایج آزمون دورگه‌سازی ساترن..... ١١٦
٤-٦-ارزیابی آزمون هیستوشیمیایی GUS..... ١١٨
٤-٧-نتیجه‌گیری کلی..... ١١٨
٤-٨-پیشنهادات..... ١٢٠

٤-٩-منابع..... ١٢١

فصل اول

مقدمه

۱-۱-نخل خرما

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* L.، درختی دوپایه، دیپلوییید (۲n=۲x=۳۶)، همیشه سبز، دارای یک تنه و یک جوانه انتهایی می‌باشد (خیری[۱]، ۲۰۰۵). ارتفاع درخت خرما به ۱۰ تا ۲۰ متر یا بیش‌تر می‌رسد و دارای تنه‌ای استوانه‌ای صاف و بدون انشعاب است که آثار برگ‌های قدیمی روی آن به‌صورت برجستگی‌هایی باقی می‌ماند (شکل۱-۱). درخت خرما در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، از جمله ایران پرورش می‌یابد. این گیاه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان مناطق خشک و بیابانی آفریقای شمالی، خاورمیانه و آسیای جنوبی به‌شمار می‌آید (هودل و همکاران[۲]، ۲۰۰۳).

شکل۱-۱-درخت نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) با تنه استوانه‌ای بدون انشعاب

[۱]. Al Khairy

[۲]. Hodel et al

۱-۲-گیاه‌شناسی نخل خرما

نخل خرما از رده تک‌لپه‌ای‌ها، تیره Palmaceae، جنس *Phoenix* و گونه *P. dactylifera* است.

این گیاه هر سال ۳۰-۱۸ برگ تولید می‌کند که از نزدیک جوانه انتهایی بیرون می‌آیند. جوانه مولد برگ، معمولاً از سه سال قبل از ظهور و نمایان شدن برگ، روی تنه رشد می‌نماید و پس از آن‌که ظاهر شد، برگ اصلی را تشکیل داده و خیلی سریع به رشد ادامه می‌دهد. در قاعده هر برگ، غلاف فیبر[۱] قرار دارد که چون حلقه‌ای دور تنه درخت را فرا گرفته و نقطه رشد خرما را محافظت می‌کند. گاهی نیز جوانه مولد برگ، به‌طور ناگهانی به‌خصوص در خرماهای جوان رشد کرده و پس از دو سال پاجوش[۲] تولید می‌نماید. این پاجوش‌ها ممکن است روی ساقه به‌وجود آیند. بنابراین ساقه‌جوش[۳] یا به اصطلاح راکوب و اگر روی ریشه باشند، پاجوش ریشه[۴] را تشکیل می‌دهند. در درختانی که بارور هستند این جوانه‌ها گل‌آذین خوشه (شکل۱-۲) را به‌وجود آورده و به‌ندرت به پاجوش ساقه تبدیل می‌شوند.

---

۱. Leaf base fiber

۲. Offshoot

۳. Stem sacker

۴. Root sacker

شکل۱-۲-گل‌آذین خوشه نخل خرما در درختان بارور

اگر درخت از کشت هسته حاصل شده باشد، گل‌های آن پس از ده سالگی ظاهر شده، ولی اگر از رشد پاجوش به‌دست آید (که معمول این است) پس از ٤ تا ٥ سال گل می‌دهد. گل‌ها در اوایل ظهور در یک محفظه قهوه‌ای رنگ بافت گیاهی قرار دارند. پس از تلقیح گل‌های ماده با گرده، میوه‌ها به‌تدریج ظاهر می‌گردند.

میوه خرما جزو میوه‌های سته بوده (شکل۱-۳) و تمام قسمت پریکاری آن گوشتی و محتوی مواد غذایی است و هسته‌ای سخت، پوستی نازک و طعم شیرینی دارد و به شکل خوشه‌ای بزرگ از شاخه آویزان می‌گردد. به میوه نرسیده خرما، خارک گفته می‌شود.