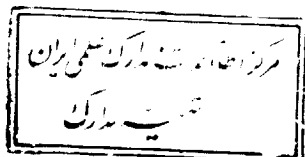


PEACE

۳۸۰ / ۲ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی



پایان نامه کارشناسی ارشد
مهندسی کشاورزی - اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه:

بررسی روش انتقال ژن به گیاه کلزا با استفاده
از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر GUS

نگارش:

معصومه پیمان

011615

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران






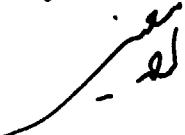
استاد مشاور:

دکتر مجید صادقی زاده

زمستان ۱۳۷۹

۳۴۸۲۴

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد
 اعضای هیئت داوران نسخه نهائی پایان نامه خانم معصومه پیمان را تحت عنوان :
 « بررسی روش انتقال ژن به گیاه کلزا با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزارشگر Gus »
 را از نظر شکل و محتوای بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی
 ارشد پیشنهاد می کنند .

امضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضای هیأت داوران
	استاد یار	دکتر مختار جلالی جواران	۱- استاد راهنما
	استاد یار	دکتر مجید صادقی زاده	۲- استاد مشاور
	استاد یار	دکتر مختار جلالی جواران	۳- مدیر گروه
	استاد یار	دکتر قاسم کریم زاده	۴- نماینده تحصیلات تکمیلی
	استاد یار	دکتر علی محمد شکیب	۵- استاد ممتحن
	استاد یار	دکتر احمد معینی	۶- استاد ممتحن



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

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

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله ای) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته اصلاح نباتات است که در سال ۱۳۷۹ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران، مشاوره جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده از آن دفاع شده است.»

ماده 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 نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند که 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 ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب معصومه پیمان دانشجوی رشته اصلاح نباتات مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

امضاء: معصومه پیمان

تاریخ: ۱۳۷۹ / ۱۲ / ۲۲

برک سبزی است نه در خور تقدیم به:

اصل عالم هستی پیامبر (ص) و اهل بیت مکرم (ع)
خاصه امام محمد باقر و امام جعفر صادق (ع) دو اسوه نکر و علم شبریت

که
چراپی و چگونه اندیشیدیم را از آمان آموخته ام.

مَنْ لَمْ يَشْكُرِ الْمَخْلُوقَ، لَمْ يَشْكُرِ الْخَالِقَ

تقدیم به :

پدر بزرگووارم، اسوه صبر و شکیبائی

مادر مهربانم، پرستوی خستگی ناپذیر

خواهر عزیزیم، ریحان همیشه بهار

برادر نازنیم .

و

تقدیم به تمام عزیزانی که خواهان موفقیت اینجانب می باشند.

تشکر و قدردانی :

همتم بدرقه راه کن ای طائر قدس که دراز است ره مقصد من نو سفرم

شکر و سپاس، که هر چه طلب کردم از خدای، بر متهای همت خود کامروا شدم .

اکنون که به لطف خدای مَنان، کار نگارش این رساله به پایان رسیده است، بر خود فرض

می دانم که از زحمات کلیه سرورانی که در مراحل مختلف انجام این پروژه، بنده را یاری

نموده اند تشکر و قدردانی نمایم. در ابتدا لازم می دانم که صمیمانه ترین تقدیرات را نثار استاد

فرزانه و بزرگوارم جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران، مدیر گروه محترم اصلاح نباتات

نمایم، که همواره اینجانب را خالصانه از گنجینه علوم و معرفت خویش بهره مند فرمودند.

همچنین از زحمات بیدریغ استاد وارسته جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده که مشاوره این

رساله را بر عهده داشته، کمال تشکر و سپاس را دارم .

جای آن دارد که جناب آقای دکتر علی محمد شکیب و جناب آقای دکتر احمد معینی، که

زحمت مطالعه و تصحیح رساله اینجانب را بر عهده داشتند، کمال قدردانی را داشته باشم و از

سایر اعضای محترم گروه نیز تقدیر و تشکر می نمایم. بجاست که از زحمات جناب آقای

مهندس مصطفی یوسف الهی، سرکار خانم مهندس ریحانه پیمان، جناب آقای دکتر علیرضا

زبرجدی و جناب آقای دکتر قنبر توحیدی فر و دیگر دوستان، به سبب همیاری خالصانه شان

تشکر و قدردانی نمایم. از کلیه پرسنل محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات، بیماری شناسی و علوم

دامی قدردانی می نمایم .

از خداوند متعال عمر با عزت همه این بزرگواران را خواهانم .

چکیده :

کلزا یکی از مطرح ترین گیاهان زراعی از لحاظ کمیت و کیفیت روغن در سطح جهان می باشد و کشت آن نیز در ایران رو به گسترش است. با توجه به ۹۳٪ واردات روغن به کشورمان، در این پروژه برای اولین بار در ایران، در دانشگاه تربیت مدرس، به اصلاح این گیاه مهم روغنی از طریق مهندسی ژنتیک (انتقال ژن)، مبادرت نمودیم. بمنظور صرفه جویی در زمان و هزینه، قبل از انتقال ژن، به بهینه سازی درصد باززایی ارقام کلزایی که از طریق بخش دانه های روغنی در سال ۱۳۷۹ بعنوان ارقام برتر معرفی گردید، پرداختیم (PF, NSA, Global,) (Hyola 308 , Maluka) در قسمت اول تحقیق، بهترین رقم Global و بهترین محیط کشت SIM مشخص گردید. در قسمت دوم تحقیق، با انتقال ژن گزارشگر GUS، بمنظور بررسی روش انتقال ژن، دو نژاد آگروباکتریوم LBA4404 و C58(pGV3103) و دو پلاسمید مختلف حاوی ژن GUS, pVW432, pBI121 بررسی گردید. با تجزیه و تحلیل آماری (نرم افزار (MSTATC)، اثرمتقابل پلاسمید آگروباکتریوم اختلاف معنی داری را نشان داد. پس از تجزیه و تحلیل اضافی، پلاسمید pVW432 و آگروباکتریوم C58(pGV3103)، با ۱۲/۵٪ باززایی (گیاه تراریخت) مشخص گردید. از جمله اهداف دیگر این پروژه، آزمون آنتی بیوتیک مختلف با مقادیر متفاوت جهت کنترل آگروباکتریوم، بعد از آلوده سازی ریز نمونه ها بوده آنتی بیوتیک سفاتوکسیم و وانکومایسین به ترتیب (200 mg l^{-1} و 50 mg l^{-1}) بعنوان بهترین ترکیب مشخص گردید. نتایج حاصل از این رساله را می توان بعنوان یک سیستم جامع به منظور انتقال

سایر ژنهای مطلوب (مقاومت به علف کش و بیماریها و ...) استفاده نمود و باززایی گیاه کامل از سلولهای تراریخت، کاملاً مشابه با ژن گزارشگر GUS می باشد.

واژگان کلیدی : کلزا- انتقال ژن - آگروباکتریوم - ژن گزارشگر GUS - باززایی - کشت بافت.

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
	فصل اول
	کلیات
۲	۱-۱- مقدمه
۳	۲-۱- تاریخچه کلزا
۴	۳-۱- مبدأ کلزا
۶	۴-۱- اهمیت و جایگاه کلزا در جهان
۸	۵-۱- علل توسعه سریع کشت کلزا در جهان
۱۱	۶-۱- میزان تولید کلزا در ایران
۱۲	۷-۱- اهداف مهم اصلاحی در کلزا
۱۴	۸-۱- اهداف مورد نظر این تحقیق
	فصل دوم
	بررسی منابع
۱۷	۲-۱- انتقال ژن و مهندسی ژنتیک
۱۷	۲-۲- اهمیت مهندسی ژنتیک و لزوم استفاده از آن در اصلاح نباتات
۱۸	۲-۳- مزایای بهنژادی گیاهان از طریق مولکولی نسبت به روشهای کلاسیک
۱۹	۲-۴- روشهای مهم انتقال ژن به گیاهان

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
۲-۴-۱- استفاده از روش بیولیستیک (Biolistic gun)	۲۰
۲-۴-۲- روش میکروانژکسیون (Micro injection)	۲۰
۲-۴-۳- استفاده از روش ایجاد خلاء نسبی	۲۰
۲-۴-۴- آگروباکتریوم	۲۱
۲-۵- مکانیسم بیماریزایی آگروباکتریوم	۲۱
۲-۶- T-DNA	۲۲
۲-۷- Virgenes و القاء خاصیت بیماریزایی در باکتری	۲۳
۲-۸- ژنهای گزارشگر	۲۶
۲-۹- معرفی چند ژن گزارشگر	۲۷
۲-۱۰- بررسی منابع	۳۰
۲-۱۰-۱- تاریخچه اصلاح کلزا	۳۰
۲-۱۰-۲- تاریخچه مهندسی ژنتیک و انتقال ژن	۳۲

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
۳۷	۳-۳-۳- ضد عفونی مواد گیاهی.....
۳۸	۳-۴-۳- استریل نمودن ظروف و لوازم آزمایشگاهی و لامینار
۳۸	۳-۵-۳- ترکیب محیط کشت
۳۹	۳-۶-۳- تهیه و آماده سازی محیط کشت
۴۲	۳-۷-۳- مراحل اجرای پروژه
۴۲	۳-۷-۳-۱- انجام آزمایشهای مختلف جهت بررسی میزان باززایی قبل از انتقال ژن ...
۴۴	۳-۷-۳-۲- مراحل انجام آزمایش جهت بهینه سازی روش انتقال ژن
۴۹	۳-۸-۳- تجزیه و تحلیل آماری

فصل چهارم

نتایج و بررسی

۵۰	۴-۱- تجزیه واریانس
۵۱	۴-۲- نتایج مقایسه میانگین بر مبنای میزان کالوس زایی ارقام منتخب.....
۵۹	۴-۳- نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر مبنای میزان گیاهان باززایی شده
۶۲	۴-۴- نتایج مقایسه میانگین ارقام از نظر میزان باززایی
۶۴	۴-۵- نتایج تجزیه واریانس بر مبنای میزان گیاهان باززایی شده بعد از انتقال ژن
۶۵	۴-۶- نتایج حاصل از تجزیه اضافی

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
۶۹	۴-۷- نتایج آزمایش انواع آنتی بیوتیک به منظور کنترل آگروباکتریوم
۷۳	نتیجه گیری نهایی
۷۵	پیشنهادات
۷۸	منابع و مأخذ
۸۳	ضمیمه

فصل اول

کلیات

تأمین مواد غذایی مایحتاج لازم برای جمعیت جهان که سریعاً در حال رشد است، از مهمترین مسائلی می باشد که بشریت هم اکنون با آن دست به گریبان است. با توجه به اینکه هر روز بر شمارگرسنگان جهان افزوده می شود و با ادامه این روند، استقلال اقتصادی و سیاسی بسیاری از ممالک جهان که ناچارند بخشی یا همه مواد غذایی مورد نیاز خود را از خارج وارد کنند به خطر خواهد افتاد. بنابراین مسأله دستیابی کشورهای وارد کننده محصولات کشاورزی به خود کفائی و امنیت غذایی بصورت حادثری مطرح می شود. این کشورها باید از هم اکنون برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز از هیچ کوششی فرو نگذارند و با طرح ریزی سیاستهای اقتصادی، تعیین اولویتها و اختصاص اولین اولویت به کشاورزی امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. نگاهی به اعداد و ارقام آماری اهمیت مسأله را قدری روشن تر می کند که بیش از ۵۰٪ غذای بشر در سطح جهانی، بوسیله غلات و مواد پروتئینی و مواد روغنی تأمین می شود (عزیزی، ۱۳۷۸).

آمار دلگرم کننده سنوات قبل نشان می دهد که در پنجاه سال گذشته، تولید محصولات کشاورزی افزایش چشم گیری یافته، در حالی که سطح اراضی زیر کشت به میزان ۶٪ تقلیل یافته است. ولی باز هم بیش از ۶۵٪ مردم جهان گرفتار گرسنگی یا سوء تغذیه هستند. اندیشمندان و دانشمندان بایست بطور جدی برای حل این معضل پیچیده اقدام نمایند و در این جهت، به نظر می رسد یکی از راههای مقابله با این معضل اجتماعی، بهنژادی گیاهان زراعی می باشد.

گرچه با استفاده از روشهای کلاسیک اصلاح نباتات تاکنون موفقیتهای چشمگیری حاصل شده است ولی یکی از معایب عمده این روشها وقت گیر و طولانی بودن آنهاست، بطوری که یک پروژه اصلاحی از مرحله شروع تا زمان معرفی رقم جدید جهت کاشت در سطح وسیع حدود ۱۰ تا ۱۵ سال طول می کشد، در صورتی که استفاده از تکنیک کشت بافت