استفاده از ژن کد کننده آنزیم ایزوپنتنیل ترانسفراز (IPT) برای به تاخیر انداختن پیری برگ در رز مینیاتوری گلدانی (*Rosa hybrida* cv. Linda)

هدایت زکی زاده (۱)، رناته مولر (۲)، سریدوی سریسکانداراجا (۳) و مارگارت سرک (۴)

۱- گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان، ۲- گروه علوم کشاورزی دانشکده علوم زیستی دانشگاه کپنهاک، دانمارک، ۳- گروه علوم گیاهی و ژنتیک جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، ۴- انستیتوی گیاهان زینتی، دانشگاه هانوفر آلمان

پیری برگ مهمترین عامل کاهش کیفیت در بسیاری از محصولات کشاورزی، از جمله گیاهان زینتی می‌باشد. پیری برگ نتیجه یک سری واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در مراحل پایانی رشد برگ است. در رزهای مینیاتوری نیز، زردی و ریزش برگ، و ریزش گل و جوانه، مشکل بزرگی در بازاریابی این گیاهان است. در بین هورمون‌های گیاهی، سایتوکینین‌ها مهمترین مواد تنظیم کننده کاهش دهنده پیری هستند. در تحقیق حاضر، گیاهان تراریخته با استفاده از ژن دخیل در بیوسنتز سایتوکینین (*IPT*) تحت کنترل آغازگر اختصاصی پیری (*SAG12*) به دست آمد. برای انتقال ژن از دو سویه AGL1 و GV3850 از آگروباکتریوم تومیفاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) استفاده شد. این سویه‌ها در بردارنده ناقل(+)pSG529 حامل ژن شیمری SAG12-IPT بودند. کالوس‌های رویانزا حاوی رویان‌های بدنی بالغ به عنوان ریزنمونه مناسب برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. برای رقیق کردن محلول باکتری قبل از مرحله تلقیح ریز نمونه‌ها، از محیط‌های half-MS، Min-A، LB و YEP استفاده شد. نتایج ساترن بلات نشان داد که چهار لاین تراریخته با ۱ تا ۶ کپی از ژن مورد نظر به دست آمد. گیاهان تراریخته فقط زمانی که سویه AGL1 برای انتقال ژن استفاده شد، به دست آمد. همچنین بالاترین درصد انتقال ژن (۱۰٪) زمانی بود که محیط half-MS برای رقیق کردن محلول آگروباکتریوم استفاده شد. گیاهان تراریخته از نظر مورفولوژیکی تفاوتی با گیاهان شاهد نداشتند. با این‌حال ریشه زایی درون شیشه‌ای در این گیاهان بسیار مشکل بود. ارزیابی‌های اولیه نشان داد که زردی برگ در گیاهان تراریخته حدودا یک هفته به تأخیر افتاد. ارزیابی بیشتر این گیاهان در آزمایشات گلخانه ای مورد نیاز است.

واژه های کلیدی: آگروباکتریوم، انتقال ژن، پیری برگ، سایتوکینین، SAG12-IPT

مقدمه

پیری و زرد شدن برگ مهمترین عامل کاهش کیفیت در بسیاری از محصولات کشاورزی، از جمله سبزیها و گیاهان زینتی، در طی مراحل مختلف تولید، پس از تولید، حمل و نقل و فروش می باشد. پیری برگ نتیجه یک سری واکنشهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در مراحل پایانی رشد برگ، از مرحله بلوغ تا مرگ، می باشد (۸). تحقیقات زیادی برای بهتر شناختن این پدیده و یافتن روشهایی برای کاهش اثرات مخرب آن بر روی محصولات کشاورزی، به ویژه گیاهان زینتی انجام شده است. در رز های مینیاتوری نیز، زردی و ریزش برگ، و ریزش گل و جوانه، می تواند بزرگترین مشکل در طی بازاریابی باشد (۹). پیری برگ تحت تأثیر عوامل مختلف داخلی و خارجی از جمله هورمونهای گیاهی قرار دارد (۶و۸). از بین هورمونهای گیاهی، سایتوکینین ها مهمترین مواد تنظیم کننده کاهش دهنده پیری هستند (۵و۶). نشان داده شده که پیری برگ همراه با کاهش محتوی سایتوکینین برگ است و همچنین نشان داده شده که اسپری برگ با سایتوکینین می تواند پیری برگ را در برخی گیاهان به تأخیر اندازد (۵). در رز مینیاتوری، اسپری برگ با سایتوکینین زردی برگ را کاهش داد (۹). بنابراین تولید گیاه تراریختی که بتواند در آغاز پیری هورمون سایتوکینین تولید کند، می تواند در به تأخیر

انداختن پیری و در نتیجه کیفیت بهتر محصول مؤثر باشد. در این زمینه، گیاهان تراریخته با ژن تولید سایتوکینین (*IPT*) تحت کنترل آغازگر اختصاصی پیری (*SAG12*) تولید شده اند (۱،۲،۴و۷). در تحقیق حاضر، ژن مورد نظر (SAG12-IPT) به گیاه رز مینیاتوری منتقل شد.

مواد و روشها

این تحقیق در بخش باغبانی دانشکده علوم زیستی دانشگاه کپنهاک انجام شد. از آنجائیکه باززایی کل گیاه از یک ریزنمونه مناسب برای انتقال ژن (در رز، کالوس رویانزا و رویان بدنی) ، پیش نیاز یک انتقال ژن موفق می باشد، باززایی ارقام انتخاب شده از طریق رویان زایی بدنی مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). کالوس های رویانزا حاوی رویانهای بدنی بالغ از رقم مورد نظر (لیندا) بعنوان ریزنمونه مناسب برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند. برای انتقال ژن از دو سویه AGL1 و GV3850 از آگروباکتریوم تومیفاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) استفاده شد. این سویه ها با ناقل pSG529(+)حامل ژن SAG12-IPT تراریخت شدند. هر دو سویه در محیط کشت مایع LB حاوی ریفآمپیسیلین و جنتامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در روی شیکر دورانی با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه به مدت یک شب رشد یافتند. محلول باکتری بدست آمده، در چهار محیط کشت مختلف شامل محیطهای half-MS، Min-A، LB و YEP به نسبت یک به ۲۰ رقیق شدند و تحت شرایط مشابهی روی شیکر قرار گرفتند تا غلظت آنها (OD_{600}) به حدود ۰/۸ تا ۱/۰ برسد. کالوسهای رویانزا پس از تلقیح در محلولهای رقیق شده، به مدت دو روز روی محیط کشت بدون آنتی بیوتیک قرار گرفتند. سپس با محلول حاوی آنتی بیوتیک شسته شده و برای باززایی روی محیط حاوی هورمون و آنتی بیوتیک قرار داده شدند. پس از دو هفته ریزنمونه ها به محیط حاوی کانامایسین منتقل شدند. هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار شامل یک پتری دیش حاوی ده کالوس رویانزا (هر قطعه ۱۰۰ میلی گرم) بود. باززایی شاخه ها و تکثیر آنها طبق گزارش قبلی انجام شد (۱۰). گیاهان باززایی شده برای تأیید انتقال ژن و تعیین تعداد کپی های ژن در هر نمونه با روشهای PCR و ساترن بلات مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی کاهش پیری آزمایشات اولیه ای روی بافتهای تولید شده در کشت بافت صورت گرفت. بدین صورت که گیاهان شاهد و تراریخته به مدت سه هفته در تاریکی قرار گرفتند و میزان زرد شدن برگها در روزهای معین بررسی شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که گیاه تراریخته فقط هنگامیکه سویه AGL1 به کار رفت، بدست آمد. همچنین زمانی که محیط کشت MS برای رقیق کردن محلول باکتری به کار رفت، بیشترین درصد انتقال ژن (۱۰٪) دیده شد. در حالیکه استفاده از محیط کشت YEP منتج به بازدهی ۳/۳ درصد انتقال ژن شد و استفاده از محیطهای LB و Min-A منجر به تولید گیاه تراریخت نشد. استفاده از دو محیط کشت LB و YEP برای رقیق کردن محلول باکتری، منجر به رشد بیش از اندازه باکتری روی ریز نمونه ها شد. به منظور جلوگیری از رشد باکتری در مرحله باززایی، از سه آنتی بیوتیک مختلف (سفوتاکسیم، تیمنتین و ونکومایسین) استفاده شد. نشان داده شده است که استفاده از آنتی بیوتیکها باززایی گیاه را در مراحل بعدی دچار مشکل می کند. بنابراین بهتر است برای رقیق کردن باکتری از محلولهایی استفاده شود که باعث رشد بیش از اندازه باکتری نشود.

برای اطمینان از انتقال تمام توالی ژن مورد استفاده، از پرایمرهای مربوط به پروموتور (*SAG12*) و نیز ژن (*IPT*) مورد نظر در PCR استفاده شد. باندهای مربوطه در روی ژل آگارز گویای انتقال کل ژن به داخل گیاهان بود. همچنین نتایج

ساترن بلات نشان دهنده تولید چهار لاین مختلف با یک تا شش کپی از ژن بود.یکی از این لاینها در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

ریشه زایی شاخساره های تراریخته بسیار مشکل بود. مقدار زیادی کالوس در انتهای ساقه قرار گرفته در محیط ریشه زایی تشکیل شد ولی ریشه به میزان بسیار پایینی تشکیل شد. دلیل این امر تولید هورمون سایتوکاینین در این شاخساره ها تحت شرایط تنش ایجاد شده در محیط ریشه زایی بود. میزان بالای هورمون سایتوکینین مانع از تولید ریشه، در شرایط درون شیشه ای، روی شاخساره ها شد. آزمایشات بعدی نشان داد که ریشه زایی قلمه ها در گلخانه و در محیط خاکی و شرایط مرطوب که تنش کمتری ایجاد می کند، راحت تر صورت می گیرد. ژن *IPT* تحت کنترل آغازگرهای مختلفی به گیاهان انتقال یافته و بررسی گردیده است (۵). با توجه به اینکه آغازگر اختصاصی پیری (*SAG12*) فقط در شروع مرحله پیری بیان می شود، انتظار می رود هورمون سایتوکاینین در مواقع نا خواسته تولید نشود. با اینحال بیان این ژن در میزان پایین قبل از شروع پیری در مواردی گزارش شده است.

نتایج آزمایش مربوط به کاهش زردی برگ در یکی از لاینهای گیاهان تراریخته نشان داد که زرد شدن برگها در تاریکی به میزان حدود یک هفته به تأخیر افتاد. همچنین آزمایشات اولیه با استفاده از اتیلن نشان داد که گیاهان تراریخته به تیمار اتیلن مقاومت نشان دادند. آزمایشات بیشتر گلخانه ای برای تأیید این نتایج و نیز تست تنشهای دیگر از قبیل تنش خشکی روی گیاهان تراریخته مورد نیاز می باشد.

منابع

1. Chang H, Jones ML, Banowetz GM, Clark DG (2003) Overproduction of Cytokinins in Petunia Flowers Transformed with P_{SAG12}-IPT Delays Corolla Senescence and Decreases Sensitivity to Ethylene. Plant Physiology 132: 2174 - 2183
2. Chen LFO, Hwang JY, Charng YY, Sun CW, Yang SF (2001) Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. Molecular Breeding 7: 243 – 257
3. Dohm A (2003) Genetic transformation. In: Encyclopedia of Rose Science, Roberts AV, Debener T, Gudin S (Eds.), Elsevier Inc., San Diego, CA, USA, pages: 15-25
4. Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science 270: 1986 – 1988
5. Gan S**,** Amasino RM (1996) Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. BioEssays 18 (7): 557-565.
6. Gan S, Amasino RM (1997) Making Sense of Senescence. Plant Physiology 113: 313-319
7. McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJRM, Stoopen GM, Davelaar E, Rhijn JHA, Power JB, Davey MR (2001) Effects of P_{SAG12}-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. Plant Physiology 127: 505 - 516
8. Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. New Phytologist 126: 419-448.
9. Tjosvold SA, Wu MJ, Reid MS (1994) Reduction of postproduction quality loss in potted miniature roses. Hort Science 29 (4): 293-294
10. Zakizadeh H, Debener T, Sriskandarajah S, Frello S, Serek M (2008) Regeneration of miniature potted rose (*Rosa hybrida* L.) via somatic embryogenesis. European Journal of Horticultural Science 73: 111-117

Using Isopentenyl transferase (IPT) encoding gene for leaf senescence retardation in miniature potted rose (*Rosa hybrida* 'Linda')

Abstract

Leaf senescence is a major cause of quality loss in many agricultural crops including ornamental plants. Leaf senescence is a result of the sequence of biochemical and physiological events in the final stage of leaf development. In some miniature rose cultivars, leaf yellowing, flower, bud and leaf abscission can be major problems during marketing. Among phytohormons, cytokinins are the most important senescence-retarding growth regulators. In the present study, transgenic plants with *IPT* gene under the control of senescence-specific promoter (SAG12) were obtained. Two strains of *Agrobacterium tumefaciens,* AGL1 and GV3850, harboring the binary vector pSG529(+) containing the P_{SAG12}-IPT chimeric gene were used for transformation. Embryogenic callus containing mature somatic embryos was used as explant for transformation. Four different media (LB, YEP, Min-A or half-MS,) were used for dilution of overnight culture of *Agrobacterium* before inoculation. Southern blot analysis confirmed obtaining of four transgenic lines with integration of 1-6 copies of the related construct. Transgenic shoots were obtained only when AGL1 was used for transformation. Also, the highest transformation frequency (10%) was achieved when ½ MS medium was used for the dilution of overnight culture of *Agrobacterium*. Transgenic plants were morphologically true-to-type and indistinguishable from control shoots. However, adventitious root induction was more difficult in transgenic shoots compared to the control shoots. Preliminary experiments on *in vitro* shoots showed that transgenic plants stayed green for a longer period than the control plants. Also they are more resistant to ethylene treatment than the control plants. More analysis in greenhouse is required to confirm the results.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, gene transfer, leaf senescence, Cytokinin, SAG12-IPT