مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۱۰۴۴-۱۰۲۵)

روش تراریزش سریع با کارایی بالا در یونجه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید برای تظاهرژن‌های *Sn* و بتا-گلوکورونیداز(*gus*)

سید محسن حسام زاده حجازی[۱]، سیروس عبد میشانی[۲]، عبدالهادی حسین زاده[۳]، هوشنگ علیزاده[۴]، رضا توکل افشاری[۵] و سرجیو آرچیونی[۶]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥، دانشجوی سابق دکتری، استاد دانشگاه تهران و استادیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج ٦، موسسه تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهان علوفه‌ای- ایتالیا
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۲۲

خلاصه

در این مقاله روشی ساده و مؤثر برای باززایی گیاهان تراریخته یونجه چندساله *Medicago sativa* var. Rgsy27(2n=4x=32) و یونجه یکساله *Medicago truncatula* var. R108-1(c4) (2n=2x=16) توسط ژن *Sn* و ژن گزارشگر *gus* شرح داده شده است. با اجرای این روش که بستگی به نوع نژاد آگروباکتریوم و ژنوتیپ‌های مورد استفاده دارد، گیاهان تراریخته(transgenic) ایجاد شده با هر نوع ریزنمونه از برگ در مدت ۱/۵ تا ۲ ماه بدست خواهند آمد، و از نظر سطوح پلوئیدی و باروری نیز هیچگونه تغییری مشاهده نخواهد شد. از عوامل مؤثر و کلیدی که نقش بسزایی در رسیدن به گیاه یونجه تراریخته در مدت زمان کوتاه دارد، می‌توان محیط‌های کشت مناسب مورد استفاده جهت کال‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها، نژاد آگروباکتریوم و ژنوتیپ‌های یونجه مورد استفاده را نام برد. لذا این دستورالعمل مؤثرترین و سریعترین روشی است که برای جنس *Medicago* بدست آمده است. عمل تراریزش ریز نمونه‌ها توسط *Agrobacterium tumefaciens*، حامل پلاسمیدهای pBI121.1 (ناقل دوتایی شامل ژن *gus*) و pBI121.*Sn* صورت گرفته است. ژن *Sn* یک ژن bHLH در گیاه ذرت است که درمسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها (condensed tannins) نقش تنظیم‌کنندگی دارد. توانایی پرو آنتوسیانیدین‌ها در تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها سبب شده که تاثیر زیادی بر ارگانیسم‌های تجزیه کننده پروتئین و در نهایت کاهش خطر نفخ در حیوانات داشته باشند. از ریز نمونه‌های حاصل ازلاین‌های Rgsy27 و R108-1(c4) بیش از ۹۰ درصد کالوس‌های پیش جنین‌زا تولیدشد وبیش از۸۵ درصد جنین‌های باززایی شده به گیاه کامل تبدیل شدند. کارایی تراریزش لاین Rgsy 27 با نژادهای *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده ارتباط داشت، در حالیکه در موردلاین R108-1(c4) این وابستگی وجود نداشت. اثرژن *Sn* انتقال یافته به گیاه یونجه در برگها و ریشه‌ها به دوصورت کاهنده و افزاینده پروآنتوسیانیدین قابل بیان بود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم تومفسینس، باززایی، پروآنتوسیانیدین، ژن Sn ، ژن gus ، یونجه

مقدمه

در بین نباتات علوفه‌ای، یونجه بدلیل خوشخوراکی و دارا بودن ذخائر غذایی و تاثیر مهم آن دراصلاح زمین‌های زراعی اهمیت خاصی دارد. یونجه را می‌توان به عنوان علوفه سبز برای تغذیه حیوانات بکار برد منتهی گاوهای شیری و گوشتی را نباید تنها باعلوفه سبز یونجه تغذیه نمود زیرا سیری، با مصرف بیش

مکاتبه کننده: سید محسن حسام‌زاده
e-mail: smhessamzadeh@rifr.ac.ir

از حد پروتئین همراه بوده و باعث نفخ و در نهایت موجب مرگ ناگهانی حیوان می‌شود. عوامل ایجاد نفخ، می‌تواند گیاه، حیوان، فاکتورهای محیطی و میکروبی باشد. از فاکتورهای محیطی می‌توان تغییر دما و قرار گرفتن درسایه و از فاکتورهای زراعی می‌توان بکار بردن کود را نام برد که بر ترکیبات شیمیایی گیاهان تاثیر داشته و در نتیجه موجب گرایش به سمت ایجاد نفخ می‌شود. در بعضی از ژنوتیپ‌ها افزایش میزان روشنایی با افزایش میزان پروآنتوسیانیدین ارتباط مستقیم دارد. عوامل گیاهی مرتبط با ایجاد نفخ می‌تواند پکتین‌ها، ساپونین‌ها، پروتئین‌های قابل حل در آب، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، آنزیم‌ها، فنول‌ها و ساختمان دیواره سلولی باشد. اما تاکنون فقط حضور پروآنتوسیانیدین‌ها یا CT ها[1] (گروهی از فلاونوئیدها)، استحکام دیواره سلولی و میزان تجزیه پروتئین را در ارتباط با عامل ایجاد نفخ مؤثر دانسته‌اند (۳). نقش فلاونوئیدها به عنوان رنگدانه‌های اصلی قرمز، آبی و ارغوانی در گیاهان، باعث شده که سالیان متمادی به این تولیدات ثانویه گیاهی توجه زیادی شود. از اولین وصف در مورد اثرات باز و اسید روی رنگدانه‌های گیاهی توسط روبرت بویل در سال ۱۶۶۴ میلادی تا تشخیص ساختمانی و ژن‌های تنظیم کننده در اواخر قرن بیستم اطلاعات زیادی در مورد ساختمان‌ها، فعالیت شیمیایی و بیوسنتز این ترکیبات جمع‌آوری شده است. فلاونوئیدها نقش کلیدی در سیگنال‌دهی بین گیاهان و میکروبها، نر باروری تعدادی از گونه‌ها، خواص ضد میکروبی، بازدارنده تغذیه‌ای و حفاظت از نور ماوراء بنفش را به عهده دارند (۴۸). جهت رفع مشکل نفخ در حیوانات بر اثر خوردن علوفه تازه یونجه ضروری است که از طریق مهندسی ژنتیک، کیفیت گیاه یونجه از نظر صفت نفخ زایی بهبود یابد. از آنجائیکه اولا تلاش درجهت انتقال ژن کنترل کننده بیوسنتز پروآنتوسیانیدین با روش ایجاد دورگ غیر جنسی بین اسپرس و یونجه به دلیل غالب بودن DNA یونجه، نسبت به اسپرس در گیاهان هیبرید و ناپایدار بودن مقادیر ناچیزتانن القاء شده در برگ برخی از گیاهان باززایی شده و همچنین همبستگی منفی بین مقدار تانن و سن گیاه (۲۶، ۴۲، ۲۳) فاقد نتیجه مطلوب بوده است; ثانیا دورگ غیرجنسی بین برگ یونجه و کشت سوسپانسیون *Lotus pedunculatus* نیز به دلیل کم بودن تعداد گیاهان باززایی شده و مقادیر ناچیز و ناپایدار تانن، نیز از نتیجه مطلوبی برخوردار نبوده است، ثالثا گرچه موتانت‌های طبیعی و یا القاء شده، جهت تظاهر CTها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان مختلف و گونه‌های علفی شامل سورگوم، جو، نخود، آرابیدوسیس، برنج و *Lotus japonicus* اثرات قابل توجهی داشته‌اند (۲۰، ۲۴، ۴۱). ولی تا بحال هیچ موتاسیونی که موثر بر القاءتظاهر CTها در برگ گیاه یونجه یا گونه‌های وابسته باشد، یافت نشده است و با وجود تنوع سوماکلونالی از نظر میزان فلاوان –۳–ال در جوانه‌های برگی یونجه، جداسازی تانن از آنها صورت نگرفته است و این خصیصه نیز در گیاه یونجه پایدار نبوده است (۳۷). لذا استفاده از روش بسیار دقیق، دربکارگیری تکنولوژی DNA نوترکیب، جهت تولید گیاهان حاوی پروآنتوسیانیدین نیاز می‌باشد.

پروآنتوسیانیدین‌ها ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا هستند که با نام"condensed tannins" نیز شناخته می‌شوند، در حقیقت آنها تولیدات ثانویه پلی فنولیک گیاهی بوده که با پروتئین‌ها پیوند یافته و قابلیت هضم پروتئین را کاهش می‌دهند. لذا به عنوان ترکیبات ضدتغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شوند. غلظت‌های نسبتا کم از پروآنتوسیانیدین‌ها کافی است تا ایمنی از نفخ[2] را در گیاهان علوفه‌ای القاء نماید. در تجزیه و تحلیل‌های‌صورت‌گرفته،آستانه بحرانی غلظت پروآنتوسیانیدین‌ها برای پیشگیری از نفخ حدود نیم درصد وزن خشک علوفه تخمین زده شده است (۲۵). این مواد در دیواره سلولی یا در داخل واکوئل‌ها در ساقه‌ها، پوست درختان، برگها، گلها و بذرها یافت می‌شوند. این ترکیبات در گیاهان خشبی و چوبی بطور چشمگیری وجود دارند اما در برخی از گیاهان علوفه‌ای نیز یافت شده‌اند. به دلیل توانایی پروآنتوسیانیدین‌ها برای تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، آنها می‌توانند تاثیر چشمگیری بر ارگانیسم‌ها داشته باشند. ایجاد نفخ در حیوانات پس از مصرف

1 . Condensed tannins

2 . Bloat safety

علوفه تازه بعضی ازگیاهان مانند یونجه که هم اکنون بوسیله مواد شیمیایی کنترل می‌شود دارای اثرات سوء بر تولیدات حیوانی می‌باشد. تحقیقات انجام شده و در حال انجام روی پروآنتوسیانیدین‌ها یا (CTs) اساسا از نظرنحوه تولید و القا، در گیاه و نقش آنها در بهبود کیفیت علوفه می‌باشد (۳۴). تقریبا تمام آنزیم‌های شرکت کننده در مسیر بیوسنتز کلاس‌های مختلف فلاونوئید، تعیین شده وتعداد زیادی از ژن‌های موجود در مسیر بیوسنتز کلون شده‌اند. تعداد زیادی از ژنهای رمز کننده آنزیم‌های بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در گیاه ذرت و گل میمون و گل اطلسی و گیاه آرابیدوپسیس شناخته و کلون شده‌اند. مکانهای ژنی و ژنهای ساختمانی جدا شده از هریک از گیاهان ذکر شده بطور خلاصه در (جدول ۱) نشان داده شده است (۱۷). ژنهای تنظیم کننده‌ای که تظاهر ژنهای ساختمانی را در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها در تعدادی از گیاهان کنترل می‌کنند، شناسایی شده‌اند. این ژنها در شدت و خصوصیات‌بیوسنتزآنتوسیانین‌هاو پروآنتوسیانیدین‌ها و بطور کلی تظاهر تعدادی از ژنهای ساختمانی تاثیر می گذارند. این تاثیر از طریق فعالیت ژنهای ساختمانی با سنجش آنزیمی یا سنجشmRNA، قابل بررسی و تایید می‌باشد. ژنهای تنظیم کننده در گیاهان ذرت، گل میمون و گل اطلسی و آرابیدوپسیس بطور خلاصه در (جدول ۲) نشان داده شده است. بنابراین بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها نیازمند عمل تعداد زیادی ژن بوده و با عوامل محیطی از قبیل نور، دما، مواد غذایی و استرس‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند. ژن‌های تنظیم کننده درگیاه ذرت به دو خانواده تقسیم می‌شوند. اولین خانواده ژنی به ژنهای خانواده *R / B* مربوط است. پروتئین هایی که توسط این خانواده رمز می‌شوند دارای همولوژی در توالی با پروتئینهای پیوند شونده به DNA یافت شده درانکوپروتئین *myc* حیوانی بوده ومؤثر برتنظیم زمان، توزیع و مقدار رنگدانه‌های آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین‌ها در ذرت می‌باشند. این خانواده شامل یکسری از ژنهای تنظیم کننده لوکوس *R* (شامل ژنهای *S , Lc, Sn*) و لوکوس *B* می‌باشد (۱۳).

جدول ۱- ژنهای ساختمانی رمز کننده آنزیم های مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها در گیاهان مختلف

آنزیم	ذرت		گل میمون		گل اطلسی		آرابیدوپسیس	
	مکان ژنی	کلون*	مکان ژنی	کلون	مکان ژنی	کلون	مکان ژنی	کلون
Chalcone synthase(CHS)	*c2*	+	*nivea*	+	م-ن**	+	*tt4*	+
	whp	+						
Chalcone isomerase(CHI)	م-ن	+	م-ن	+	*Po*	+	*tt5*	+
Flavanone 3-hydroxylase(F3H)	م-ن	-	*incolorata*	+	*An3*	+	*tt6*	+
Flavanone 3'-hydroxylase(F3'H)	*Pr*	-	*eosina*	-	***Ht1/Ht2*	+	*tt7*	+
Flavanone 3'5'-hydroxylase(F3'5'H)	م-ن	-	م-ن	-	*Hf1*	+	م-ن	
					Hf2	+		
Dihydroflavonol reductase (DFR)	*A1*	+	*pallida*	+	*An6*	+	*tt3*	+
Anthocyanidin synthase (ANS)	*A2*	+	*Candica*	+	م-ن	+	*tt19*	+
Flavonoid 3-glucosyltransferase(3GT)	*Bz1*	+	م-ن	+	م-ن	+	م-ن	
Anthocyanin acyltransferase (AAT)	م-ن	-	م-ن	-	*Gf*	-	م-ن	
Anthocyanin methyltransferase (AMT)	م-ن	-	م-ن	-	****Mf1/Mf2*	+	م-ن	
Glutathione S-transferase(GST)*****	*Bz2*	+	م-ن	-	*An13*	+	م-ن	

* : +، نشان دهنده کلون شدن cDNA یا ژن است; (-) ، نشان دهنده عدم کلون شدن ژن است. **: مکان ژنی مشخص نشده است.

***: کلونی که نشان دهنده فعالیت F3'H می‌باشد تشخیص داده شده ولی ژن مشابه Ht1 یا Ht2 نبوده است .

**** : مکان ژنی بایستی تا این زمان تشخیص داده شده باشد ***** : شناسایی آنزیم از طریق توالی همولوگ حدس زده شده است.

جدول ۲- ژنهای تنظیم کننده بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها، موجود در گیاهان مختلف

گیاه	لوکوس	کلون*	ژنهای تنظیم شده**
ذرت	*R*	+	CHS,DFR,3GT
	R(S)	+	CHS,DFR,3GT
	R(Sn)	+	CHS,DFR,3GT
	R(Lc)	+	CHS,DFR,3GT
	B	+	DFR, 3GT
	C1	+	CHS,DFR,3GT
	Pl	+	CHS,DFR,3GT
	Vp1	+	*C1*
گل میمون	*Delila*	+	F3H, DFR, ANS, 3GT
	Eluta	_	F3H, DFR, ANS, 3GT
	Rosea	_	F3H, DFR, ANS, 3GT
گل اطلسی	*An1*	_	CHS,DFR,ANS,3GT,3RT,AMT,GST,F3'5'H
	An2	+	CHS,DFR,ANS,3GT,3RT,AMT,GST,F3'5'H
	An4	+	CHS,DFR, ANS, 3GT, 3RT,AMT,GST,F3'5'H
	An11	_	CHS, DFR, ANS, 3RT,AMT,GST,F3'5'H
آرابیدوپسیس	*ttg1*	+	DFR
	ttg2	+	DFR
	tt8	+	DFR
	tt2	+	DFR, CHS , CHI
	tt3	+	DFR, CHS , CHI
	tt4	+	DFR, CHS , CHI
	tt5	+	DFR, CHS , CHI
	ANL2	+	DFR

* : +، نشان دهنده کلون شدن cDNA یا ژن است; (ــ)، نشان دهنده عدم کلون شدن ژن است.

** : نام کامل آنزیم را در جدول ۱ ببینید.

جایگاه ژن *S n* عملا شبیه جایگاه های ژن *R* [1] و *B* در گیاه ذرت بوده بطوریکه ژن *Sn* بطور متمایز حذف رنگدانه های آنتوسیانین را در بافت خاص نهال معین و سلول های گیاهی کنترل می کند. با توجه به شباهت مولکولی ژن *Sn* و ژن *R* ،پروب های DNA ژن *R* برای متمایز کردن چندین آلل *S n* استفاده شده است. آنالیز نورترن بلات مشخص نموده است که همه آلل ها ی *S n* رمزگردان یک رونوشت ۲/۵ کیلو بازی است که در بافت خاص سازگار با توزیع آنتوسیانین ها تظاهر می‌یابند. تظاهر ژن*Sn* وابسته به نور بوده و تنها آلل *Sn:bol3* باعث رونویسی mRNA ژن *Sn* در تاریکی می شود و تولید رنگدانه در نهال های رشد یافته در تاریکی را موجب می گردد. بنابراین آلل *S n:bol3* مستقل از نور بوده ودارای دو وجه تمایز با دیگر آلل های ژن *S n* است. یکی اینکه، دارای ظرفیتی است که باعث تولید رنگدانه در تاریکی می شود و دیگر اینکه دارای پاسخ بیشتر به نور بر حسب تجمع رنگدانه است که حدودا شش برابر دیگر آلل ها است (۴۴).

بنا براین در حالت *Sn:bol3* ، نور به عنوان یک افزاینده جهت تظاهر ژن عمل نموده و باعث افزایش مقدار رنگدانه در بافت ها می شود. ارتباط ساختاری بین ژن های *R*، *B*، *LC* و *Sn* در ذرت ممکن است با فرض منشا تکاملی مشترک بهتر توضیح داده شود. این ژن ها می توانند تولیدات تکاملی یک ژن منفرد اجدادی باشند که ضمن دو نسخه شدن از یکدیگرنیز دور شده اند و بدین ترتیب باعث ایجاد یک خانواده متنوع ژنی از طریق رویداد های مکرر و متوالی گردیده اند. آنالیز بخشی از توالی حاصل از ژن *Sn* نشان دهنده تشابه قابل توجه توالی با cDNA ژن *LC* می باشد، هرچند پلی مورفیسم زیادی بین آنها وجود دارد، از جمله منطقه ۱۴۶ جفت بازی در انتهای '5، که این منطقه قابل رونویسی است ولی ترجمه نمی شود. ژن *Sn* در همه نژادهای گیاه ذرت تظاهر نمی‌یابد و بطور جغرافیایی محدود به گروه نژادهایی از ذرت در ناحیه Bolivia می باشد. آنالیزژنتیکی و مولکولی گسترده، در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در گیاه ذرت، بیش از ۲۰ لوکوس در برگیرنده تولید رنگدانه را تشخیص داده است. چهار لوکوس *R*،*B*، *C1* و *Pl* بطور هماهنگ فعالیت های حداقل سه ژن ساختمانی مسیر بیوسنتز را تنظیم می‌کنند. ژن های *B* و *R* تنوع آللی گسترده ای در ارتباط با بافت خاص و زمان نمو سنتز آنتوسیانین از خود نشان می دهند. ژن های *C 1* و *Pl* در حقیقت همولوگ یکدیگر بوده و اخیرا ژن *Pl* با استفاده از توالی ژنومی *C1* به عنوان پروب کلون شده است (۱۱). در بافت های گیاهی با وجود لوکوس B یا R جهت فعال نمودن مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در حضور نور، وجودژن *C1* ضروری نمی‌باشد (۱۳). تمام آلل های مطالعه شده در مورد ژن *S n* بر بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۰ ذرت بوده ودر حدود دو واحد نقشه تا لوکوس Rفاصله‌دارد(۱۲).

1 . Red plant color gene

تحقیقات انجام شده در مورد گیاه تراریخته *L . corniculatus* حامل ترانس ژن *Sn* نشان می‌دهد که فنوتیپ‌ها از نظر پروآنتوسیانیدین(CT) در مقایسه با گیاه کنترل تغییر یافته اند. با توجه به اینکه این گیاه بطور طبیعی CT در نوک ریشه ها سنتز می کند، هفت گیاه تراریخته ، افزایش CT رادر سطح ریشه ها نشان دادند و۴۰ گیاه تراریخته بطور معجزه آسایی سطح CT را در برگ ها کاهش داده بودندو همچنین سطح آنزیم های DFR [1]، LAR [2]بطور قابل توجهی کاهش یافته بود ولی با کاهش CT سطح آنزیم CHS کاهش نیافته بود. بنابراین ژن *S n* می‌تواند اثر متقابلی با ژن های درون زاد myc که برای سنتز DFR وLAR لازم است داشته باشد (۴۳). مشکل جدی در تولید گیاه یونجه تراریخته، باززایی تعدادزیادی گیاه غیرتراریخته است که در طی انتخاب و جدا سازی *in vitro* بدست می‌آید. یکی از روش‌های مرسوم در ایجاد گیاه یونجه تراریخته استفاده از ذرات شتاب دار است .مطلوبترین نتایج با کوتیلدون های بالغ بدست آمده است، یعنی زمانی که بمباران ذره بعداز ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت خیساندن کوتیلدون در آب صورت گرفته باشد (۷). باززایی و تراریزش گیاه یونجه بطور وسیعی با استفاده از کوتیلدون های نابالغ یا جنین های حاصل از کوتیلدون های نابالغ (بعد ازگذشت ۲۵ روز از گرده افشانی) بهبود یافته است. ایجاد گیاه یونجه تراریخته، محدود به دو عامل اصلی است که عبارت از، موانع تحمیل شده توسط روش تراریزش و باززایی ضعیف بافت ها و سلول های کشت شده می باشند. در حال حاضر گیاه یونجه عمدتا با استفاده از آگروباکتریوم تومفسینس تراریزش می شود و آگروباکتریوم دارای نژادهای مختلفی بوده و تنها بعضی از نژادهای معین باعث آلوده نمودن برخی از ژنوتیپ های یونجه می شوند، ضمنا فقط بعضی از واریته ها ی یونجه دارای باززایی نسبتا خوبی می‌باشند. گیاه یونجه دارای صفات خاصی است، از جمله اینکه این گیاه اتوتتراپلوئید بوده و در اصلاح دارای خود ناسازگاری می‌باشد و محققین معتقدند که جنین زایی رویشی در این گیاه غیر قابل توارث است و بطور نسبی توسط چند ژن کنترل می‌شود (۷).

1. Dihydroflavonol 4-reductase
2. Leucoanthocyanidin reductase

محیط های کشت مورد استفاده جهت باززایی گیاهان تراریخته و غیر تراریخته یونجه عمدتا محیط کشت تغییر یافته B-5 گامبورگ (۱۴)، محیط کشت MS (۳۰)، محیط کشت بلیدز (BO, BII, Boi2Y) (۱) و محیط کشت شنک و هیلد برانت SH (۳۸) بوده است. با استفاده از این محیط های کشت ، و ریز نمونه های حاصل از کوتیلدون و هیپو کوتیل زمان بسیار زیادی جهت باززایی صرف می شود و فراوانی گیاهان باززایی شده در مورد بعضی از واریته ها نیز قابل توجه نبوده است (۱۶، ۲۲، ۴۵). در گیاه یونجه انتخاب ژنوتیپ هایی با باززایی بالا از دیر باز توسط محققین مورد نظر بوده است (۶، ۵، ۴، ۲۸، ۲۹، ۳۱). از آنجائیکه باززایی این گیاه وابسته به ژنوتیپ گیاه می باشد، این محققین پس از تلاش های فراوان به این نتیجه رسیدند که سه فاکتور در کنترل باززایی یونجه از طریق جنین زایی سوماتیکی در شرایط آزمایشگاهی که عبارت از ، کیفیت ساختاری و کمیت منبع اکسین با منشا خارجی ، غلظت هورمون سیتوکینین با منشا خارجی ، میزان و طبیعت ازت احیا شده در محیط کشت باززایی دخالت دارد. در سال ۱۹۹۰ محققین، اغلب کولتیوار های یونجه را از ۹ رقم بومی که در سال های ۱۸۵۰ تا ۱۹۴۷در آمریکای شمالی بوجود آمده بود می دانستند و ۳ رقم از آنها را بسیار مفید برای باززایی معرفی کردند(۳۳). ضرورت اولیه و مهم در کاربرد تکنولوژی کشت بافت برای گیاه یونجه ، فراهم نمودن ژرم پلاسمی است که واکنش مساعدی نسبت به باززایی نشان می دهد (۴). با استفاده از بکارگیری نتایج حاصل از کارهای گسترده ا ی که محققین جهان در سال های متمادی در این راستا انجام داده اند وبکار گیری ژن های جدید(*Sn* ، *BAN* ، *SP1*، *try* ، *LC* و ...) که تغییر دهنده مسیر بیوسنتز فلاونوئید ها شناخته شده اند ، برای اولین بار اثر بیان آنها در گیاه یونجه مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج بدست آمده طی چند مقاله انتشار خواهد یافت. دراین مقاله ضمن معرفی مناسب ترین محیط کشت جهت باززایی گیاهان تراریخته یونجه توسط ژن های *gus* و *Sn* نسبت به معرفی ژن *Sn* که مؤثر بر القاء پروآنتوسیانیدین ها درشاخ و برگ گیاه یونجه که عموما بر اساس نتایج تحقیقات به دست آمده (۳، ۸، ۳۲، ۳۵، ۳۹ ، ۴۰) عاری از این ماده مهم می‌باشد می پردازد.

مواد و روش‌ها

الف- کلیات

بذور لاین‌های Rgsy27 و R108-1 (c4) در گلدان های محتوی ماسه- خاک برگ به نسبت (۱:۲) در گلخانه ای با ۶۰ درصد رطوبت نسبی ودوره نوری ۱۶ ساعته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۱۵ درجه سانتی گراد در شب و دوره آبیاری متناوب کشت شدند. برای انجام آزمایشات کشت بافت و عمل تراریزش از برگهای نسبتا جوان وسالم متعلق به گیاهان ۴ تا ۶ هفته ای استفاده شد . پس از استریلیزاسیون سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۷ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵تا۱۰ ثانیه ودر نهایت ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، برگها به قطعات مربع شکل کوچک (۵×۵ میلیمتر مربع) تقسیم شده ودر ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع M_1 حاوی نژاد های آگروباکتریوم ، قرار گرفتند. قطعات برگی موجود در محیط کشت آلوده به آگروباکتریوم به مدت ۲۰ دقیقه در محیط خلاء با فشار ۶۵۰Psi و سپس جهت نفوذ آگروباکتریوم ها ،در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱تا۳ ساعت قرار گرفتند. بعد از خشک کردن قطعات برگی در شرایط استریل و خارج نمودن محلول باکتریایی ، نسبت به انتقال قطعات برگ به محیط کشت جامد M_2 بدون آنتی بیوتیک و محتوی استوسیرینگون(۹/۸ میلی گرم بر لیتر)اقدام شد وبه مدت ۳ روز در تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. جهت ایجاد و القاء کالوس پیش جنین زا ، بعد از شستشوی قطعات برگی با آب مقطر استریل و خشک نمودن آنها، به محیط کشت جامد M_3 که شامل آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) و آگمنتین (۸۰۰ میلیگرم در لیتر) بود انتقال یافتند.سپس در تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند و هر دو هفته یک بار محیط کشت تعویض شد. جهت جنین زایی ، کالوس های ایجاد شده به محیط کشت جامد M_4 که فقط شامل ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین وفاقد هر گونه هورمون بود انتقال داده شدند ودر شرایط ۱۲ ساعت روز با میزان روشنایی ۱۳۰ $\mu E/m^2/s$ نگهداری شدند. بعد از ایجاد گیاهچه، جهت ریشه زایی به محیط کشت بدون هورمون ½ M_4 انتقال یافتند. پس از ۲تا۴ هفته ،گیاهان تراریخته بدست آمده به گلخانه ای با شرایط ویژه انتقال داده شدند به نحوی که گیاهان در روز های اول در شرایط کاملا اشباع از آب قرار گرفتند و سپس شرایط رشدی تغییر یافته و به صورت طبیعی در آمد.

ب) محیط هاي کشت مورد استفاده

کلیه موادشیمیایی مورد استفاده در محیط کشت از شرکت Sigma و کلیه آنزیم های مصرفی از شرکت Fermentas تهیه شد.

محیط کشت M_1 ترکیبی از ۴ محلول I , II , III , IV بود که ابتدا این محلولها بطور جداگانه بصورت استوک تهیه شدند و سپس جهت تهیه یک لیتر محیط کشت M_1 به ترتیب از ۱۵۰ میلی لیتر، ۱میلی لیتر، ۱ میلی لیتر و ۲۰ میلی لیتر محلول های, I، II، III وIV همراه با۱۰۰ میلی گرم مایو اینوزیتول،۳۰ گرم ساکارز، ۴ میلی‌گرم 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم BAP با تنظیم pH برابر ۵/۸ استفاده شد.

محلول I : ترکیبی از نمک های پر مصرف موجود در محیط کشت N6 (۱۰) شامل ۲ گرم سولفات منیزیم آبدار، ۲۸ گرم نیترات پتاسیم ، ۵ گرم سولفات آمونیم ، ۲ گرم کلرید کلسیم آبدار و۴ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات است که به حجم یک لیتر رسید.

محلول II : ترکیبی از نمک های کم مصرف موجود در محیط کشت SH (۱۰) شامل ۱ گرم سولفات منگنز آبدار ، ۵۰۰ میلی گرم اسید بوریک ، ۱۰۰ میلی گرم سولفات روی آبدار، ۱۰۰ میلی گرم یدور پتاسیم ، ۱۰ میلی گرم اکسید مولیبدون دی سدیم آبدار، ۲۰ میلی گرم سولفات مس آبدار و ۱۰ میلی گرم کلرید کبالت آبدار است که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

محلول III : ترکیبی از ویتامین های مورد مصرف موجود در محیط کشت SH (۳۸) شامل ۵۰۰ میلی گرم اسید نیکوتینیک ، ۵۰۰ میلی گرم تیامین هیدرو کلراید و ۵۰۰ میلی گرم پیریدوکسین هیدروکلراید است که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

محلول IV : ۷ گرم نمک اتیلن دی آمین تترا استیک اسید- فریک به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

محیط کشت M_2 از ترکیب مواد محیط کشت M_1 همراه با ۳ گرم فیتاژل ، ساخته شد.

محیط کشت M_{21} همان محیط کشت M_2 است. با این تفاوت که شامل هورمون 2,4-D به میزان ۲ میلی گرم برلیتر بوده و فاقد هورمون BAP می باشد.

محیط کشت M_{22} همان محیط کشت M_2 است. با این تفاوت که شامل هورمون BAP به میزان ۱میلی گرم برلیتر بوده و فاقد هورمون 2,4-D می باشد.

محیط کشت M_3 از ترکیب مواد محیط کشت M_2 همراه با ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک آگمنتین (ترکیبی از ۱ گرم آموکسی سیلین و ۲۰۰میلی‌گرمC lavulanic acid) و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین ساخته شد.

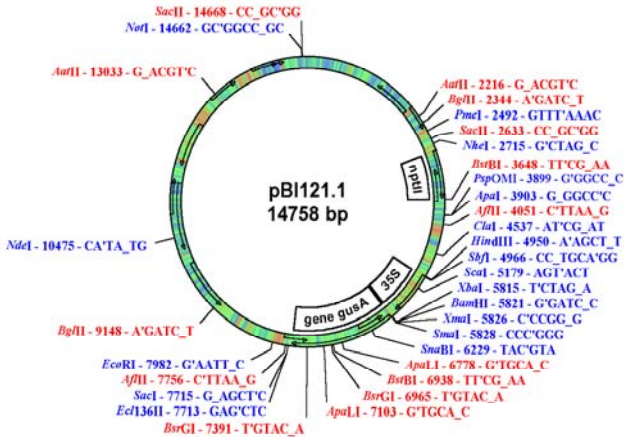
محیط کشت M_4 با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر، یک میلی لیتر، یک میلی لیتر و ۲۰ میلی لیتر به ترتیب از محلولهای I, II, III, IV ، ۱۰۰ میلی گرم مایواینوزیتول[1]، ۲۰ گرم ساکارز و ۷ گرم کالیس آگار[2] ورساندن حجم به یک لیتر با تنظیم pH برابر ۵/۸ ساخته شد.

جهت رشد نژادهای آگروباکتریوم EHA105 و LBA4404 از محیط کشت YEP همراه با آنتی بیوتیک ریفامپیسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)و برای رشد باکتری *Ecoli* شامل پلاسمید ها از محیط کشت LB همراه با آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر)استفاده شد (۳۶).

ج- نژادهاي *A.tumefaciens* و پلاسمید هاي استفاده شده براي عمل تراریزش

در این تحقیق جهت تولید گیاهان تراریخته از دو نژاد *A.tumefaciens* استفاده شد. هرچند نژاد LBA4404 برای تراریزش گیاه توتون بسیار مؤثربوده است ولی این نژاد برای تراریزش تمام گونه های یونجه کافی و مؤثر نبوده است (۱۵، ۲۲، ۴۶). در این تحقیق علاوه بر نژاد LBA4404 ، از نژاد EHA105 نیز استفاده شد. پلاسمید pBIN19 با اندازه ۱۱/۷۷۷کیلو جفت باز که یک ناقل دوتایی[3] بوده و مناسب جهت تراریزش گیاهان می باشد، پس از افزودن کاست GUS به آن باعث ایجاد ناقل دوتایی جدیدی به نام pBI121.1 با اندازه ۱۴/۷۵۸ کیلو جفت باز شد.

T-DNA این ناقل دوتایی جدید شامل ژن *npt*II[4] و ژن *uidA* از Esherchia coli،که رمزگردان ژن *gus* است بود. ژن های *npt*II و *uidA* تحت کنترل راه انداز CaMV35S بودند (۱۸) (شکل ۱).



شکل ۱- ناقل دوتایی pBII21.1 با اندازه ۱۴۷۵۸ جفت باز

پلاسمید pRK2013 با اندازه ۴/۸ کیلو جفت باز به عنوان پلاسمید helper مورد استفاده قرار گرفت.پلاسمید pBI121.*Sn* با اندازه ۱۵/۴۴۰ کیلو جفت باز که با جایگزینی ژن *Sn* به جای ژن*gus* با برش پلاسمید pBI121.1 بوسیله آنزیم های *Sma*I و *Eco*RI و حذف ژن gus ایجاد شد. این پلاسمید ها بوسیله تکنیک آمیزش سه والدی (۴۷) به نژادهای آگروباکتریومی EHA105 و LBA4404 منتقل شدند و جهت تشکیل کلونی روی محیط کشت YEP شامل آنتی بیوتیک های ریفامپیسین و کانامایسین قرار گرفته و جهت رشد به مدت ۲ روز در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدندو جهت صحت کلونی های تشکیل شده از نظر وجود ژن های *Sn* و *gus* ، با

1. Myo-inositol
2. Kalys- agar
3. Binary vector
4. Neomycin phosphotransferase II(*npt* II)

استفاده از پرایمر های FW: 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و Rev: 5'-CTTCTCTCGTCGCTTTCGCTC-3' برای تشخیص ژن *Sn* و پرایمرهای FW:5'-GGCCAGCGTATCGTGCTGCG-3' و REV:5'-GGTCGTGCACCATCAGCACG-3' برای تشخیص ژن *gus* از روش PCR استفاده شد.

د- سنجش آنزیمي β -Glucuronidase (GUS)

برای تشخیص هیستو لوژیکی فعالیت ژن *gus* ، ۱۰۰ میکرون از قسمت های مختلف بافت گیاهی از جمله گره ها، ریشه ها، برگها، ساقه ها و گلهای حاصل از گیاهان تراریخته که توسط میکروتوم تهیه شدند ،پس از تثبیت در پارا فرمالدئید ۳٪ و شستشو در ۱۰۰mM سدیم فسفات با pH برابر ۷، در محلول رنگ شامل X-gluc (۲mM) به مدت ۲۰ دقیقه تحت وکیوم قرار گرفته و سپس در طی یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار گرفتند (۱۹).

هـ- توارث ترانس ژن *Sn* و *gus* در گیاهان تراریخته

آنالیز تفرق ژنی[1] ترانس ژن ها در نتاج گیاهان تراریخته حاصل ازلاین هایP1،Rgsy27 و R108-1(c4) انجام شد و نتاج ۵ گیاه T_0 تراریخته بعد از خودگشنی برای ساختارهای pBI121.1 و pBI121.*Sn* بررسی شد. ۵۰ گیاه T_1 از گیاهان تراریخته با ساختارpBI121.1 انتخاب شدند و با *Rhizobium meliloti* تلقیح شدند. سنجش آنزیمی فعالیت ژن *gus* بر طبق بند (د)انجام شد.

و- سنجش شيمي بافتي پرو آنتوسيانيدين‌ها در گياهان تراريخته با روش DMACA-HCL

سلول های شامل CT ، بعد از حذف کلروفیل های برگ و رنگ آمیزی با DMACA [2] قابل مشاهده خواهند شد. با استفاده ازروش DMACA-HCL، پرو آنتوسیانیدین های قابل حل حتی با مقادیر ناچیز ، بطور کمی اندازه گیری شد. روش butanol- HCl نیزجهت تشخیص مقادیر کمتر از ۰/۴ میلی گرم بر گرم ماده خشک پرو آنتوسیانیدین های غیر قابل حل استفاده شد (۴۹). این معرف در واکنش با پروآنتوسیانیدین ها تحت شرایط اسیدی باعث ایجاد رنگ آبی می شود.

1. Segregation analysis
2. 4-Dimethylamino cinnamaldehyde-HCL

ز-جدا سازي DNA ژنومي و آناليزساترن بلات:

استخراج DNA ژنومی گیاه مطابق روش Chang (۴۹)و آنالیز ساترن بلات بر طبق روش Sambrook انجام شد (۳۶). بعد از هضم آنزیمیDNA توسط آنزیم *Hind*III، عمل الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام و سپس ژل آگارز به غشاء نایلونی Hybond N+ (Amersham) بر طبق دستورالعمل ذکر شده توسط سازنده غشاء منتقل شد. غشاء متوالیا" با کاوشگرهای نشاندار *gus* , *npt*II , *Sn* دورگ گردید. برای تهیه کاوشگر، با استفاده از روش (کلنی -PCR) (۳۶) و استفاده از پرایمر های مخصوص جهت ژن های *gus, Sn,npt*II نسبت به تکثیر قسمتی از ژن ها اقدام شد و پس از جدا سازی در ژل آگارز۱٪ نوار های ایجاد شده به ترتیب در محل تقریبی ۶۹۹ جفت باز ، ۸۳۰ جفت باز و ۷۰۲ جفت باز بریده شد و توسط کیت مخصوص (QIAEX II)، DNA مربوط به کاوشگرها استخراج و خالص شدند.تهیه کاوشگر *gus* با استفاده ازالیگونوکلئوتیدهای W:5'-GGCCAFGCGTATCGTGCTGCG-3' و REV:5'-GGTCGTGCACCATCAGCACG-3' مطابق با ۷۰۲ جفت باز قطعه PCR حاصل از نوکلئوتید های پایین دست محل شروع ترجمه *gus* انجام شد.

تهیه کاوشگر *npt*II با استفاده از الیگونوکلئوتید های FW : 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' و REV : 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' مطابق با ۶۹۹ جفت باز قطعه PCR حاصل از نوکلئوتید های پایین دست محل شروع ترجمه *npt*II انجام شد .

تهیه کاوشگر *Sn* با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای FW : 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و REV:5'-CTTCTCTCGTCGCTTTCGCTC-3' مطابق با ۸۳۰ جفت بازقطعه PCR قرار گرفته بین نوکلئوتید های ۸۴۱-۱۶۷۱ از توالی کامل ۲۵۷۲ جفت باز ژن*Sn* انجام شد.

جهت نشان دار نمودن کاوشگرها از کیت Ready-To-Go [DNA labeling Beads(-dCTP)] ساخت شرکت Amershame استفاده شد.

ح-آنالیز RNA گیاهان تراریخته

برای آنالیز RT-PCR از سطوح رونویسی ژن *Sn*، ژن *DFR* (یکی از ژن های عمومی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین ها) و ژن خانه دار *EF-1α* [1] موجود درگیاهان *M.sativa* و *M.truncatula*، RNA کل از بافت برگی گیا هان تراریخته و غیر تراریخته (کنترل)، با استفاده ازکیت مخصوص (Nucleo Spin RNA plant) محصول شرکت (Macherey- NAGEL) استخراج شد، وبا استفاده از آنزیم Strata Script نسبت به سنتز اولین رشته cDNA اقدام شد. سپس با استفاده از پرایمر های FW: 5'-TCTGGCTGTGCAACGCGCACC-3' و Rev: 5'-CTTCTCTCGTCGCTTTCGCTC-3' برای‌ترانس ژن*Sn*وپرایمرهای FW:5'-CTAACATGAAGAAGGTGAAG-3' و Rev:5'-TGGCATTGTCGGCATTAGAAAGG-3' برای ژن *DFR* و پرایمرهای FW:5'-ATTGTGGTCATTGGCCACGT-3' و Rev:5'-CCAATCTTGTACACATCCTG-3' برای ژن خانه‌دار*EF-1α*، سطوح رونویسی *Sn* و*DFR* و *EF-1α* در گیاهان یونجه تراریخته تعیین شدند. جهت کنترل، نسبت به عدم حضور DNA همراه با RNA، نمونه های RNA هم در حضور و هم در عدم حضور Starta Script تهیه شدند و سپس بر طبق دستورالعمل، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل سه مرحله PCR به ترتیب در دماهای ۹۴درجه سانتی گراد (۱۰ثانیه) ،۵۰ درجه سانتی گراد (۲۰ ثانیه) ، ۷۲ درجه سانتی گراد (۴۵ ثانیه) و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (۱۰ دقیقه) عمل PCR صورت گرفت.جهت نرمالیزه کردن و تایید نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR از ژن خانه دار *EF-1α* استفاده شد.

ط-تعیین سطوح پلوئیدي در گیاهان تراریخته

برگهای ۴تا۶ هفته ای حاصل از گیاهان تراریخته رشد یافته در گلخانه، جهت تعیین مقدار DNA هسته به روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACScan و تحت بررسی قرار گرفتند (۲، ۲۱) و سطوح پلوئیدی آنها استنباط شد، در این راستا از گل اطلسی (*petunia hybrida L.*) به عنوان استاندارد استفاده شده است (۲۷) .همچنین شمارش کروموزومی در گیاهان تراریخته و کنترل برای تعیین سطوح پلوئیدی انجام شد.

نتایج

جهت افزایش تبدیل جنین به گیاه کامل در ژنوتیپ R108-1 ، اقدام به انجام ۴ نسل باززایی متوالی از طریق کشت بافت شد که در نهایت باعث تولید ژنوتیپ R108-1(c4) گردید و عمل تراریزش توسط ژن های *gus* و *Sn* بر روی این ژنوتیپ جدید صورت گرفت. تشکیل کالوسهای پیش جنین زا و جنین زایی رویشی لاین R108-1(c4) از ریز نمونه های برگی روی محیط کشت M_2 با مقادیر مختلف هورمونی 2,4-D و BAP روی ۱۰۰ ریز نمونه برای هر آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از محیط کشت M_2، حداکثر بعد از ۱۶ روز تشکیل کالوسهای پیش جنین زا آغاز شد . نتایج (جدول ۳) نشان می دهد، زمانی که ریز نمونه ها روی محیط کشت M_{21} قرار گرفتند تشکیل جنین های مستقیم و غیر مستقیم از لاین R108-1(c4) صورت نگرفته است . با قرار گرفتن ریز نمونه ها بر محیط کشت M_2 ، ۱۰۰ درصد ریز نمونه ها پس از چهار هفته کالوس های جنینی تشکیل دادند. زمانی که کالوس های تشکیل شده از لاین R108-1(c4) در محیط کشت M_{21} به محیط کشت M_4 انتقال یافتند حدود ۷۰ درصد کالوس ها ایجاد چند جنین (۶-۳ جنین در هر ریز نمونه) وتشکیل گیاهچه هایی در مدت زمان ۳تا۴ هفته نمودند(جدول ۴). بنابراین با استفاده از محیط کشت M_{21} ، بعد از ۷ تا ۸ هفته، گیاهچه ها ی تراریخته از لاین R108-1(c4) بدست آمدند. زمانی که کالوس ها ی پیش جنین زا حاصل از محیط کشت M_2 به محیط کشت M_4 منتقل شدند ، همگی کالوس ها ایجاد جنین نمودند(۱۵-۱۳ جنین در هر ریزنمونه)و۹۰ درصد این جنین ها به گیاهچه تبدیل شدند. بنابر این استفاده از محیط کشت M_2 باعث ایجاد گیاهچه بیشتر در هر ریز نمونه نسبت به استفاده از محیط کشت M_{21} شده است. برای رسیدن به باززایی با فراوانی بالا، جنین ها از کالوس ها جدا گردید و به

1. House keeping gene

محیط کشت M_{22} به مدت یک هفته قبل از انتقال به محیط کشت M_4 انتقال یافتند در این صورت ۳۰ درصد جنین ها چندین جنین ثانویه تشکیل داده(شکلA۲) و ۲۵ درصد این جنین های ثانویه به گیاهچه تبدیل شدند. با استفاده از محیط کشتM_{21}، ۵۰ در صد ریز نمونه های حاصل از ژنوتیپ Rgsy27 تشکیل کالوس های پیش جنین زا دادند (جدول۳) و ۵۰ درصد ریز نمونه ها مستقیماتولید جنین نمودند(جدول۳) (شکلB ۲،۲C). تشکیل جنین غیر مستقیم روی این محیط کشت مشاهده نشد. ریز نمونه های واقع در روی محیط کشت M_{22} ، جوانه هایی بطور مستقیم با فراوانی اندک تشکیل دادند(جدول۳). روی محیط کشت M_2 ، ۱۰۰ درصد ریز نمونه ها تولید کالوس های جنین زا در طی ۴ هفته نمودند. زمانی که کالوس های جنین زای حاصل از محیط کشت M_{21} به محیط کشت M_4 منتقل شدند، ابتدا جنین ها و سپس گیاهچه ها بدست آمدند.با استفاده از محیط کشت M_{21} ، تشکیل ۸ جنین بطور متوسط در هر ریز نمونه بطور نرمال مشاهده شد (جدول۴). زمانی که از محیط کشت M_2 استفاده شد تعداد جنین بطور متوسط در هر ریز نمونه به دو برابر افزایش یافت. بنابر این استفاده از محیط کشت M_2 در تولید جنین های رویشی بسیار مؤثر تردر لاینRgsy27 نسبت به R108-1(c4) عمل نموده است .زمانی که کالوس های پیش جنین زا حاصل از محیط کشت M_2 به محیط کشت M_4 منتقل شدند ، آنها نیز طی ۱تا۲ هفته تشکیل جنین هایی را دادند که بعدا" تبدیل به گیاهچه شدند (شکل ۲D). بطور کلی تعداد جنین های تولیدشده از ریز نمونه های واقع در محیط کشت M_2 نسبت به محیط کشت M_{21} بیشتر بود (تقریبا" ۲ برابر). لازم به ذکر است چنانچه ریز نمونه ها به محیط کشت M_{22} منتقل شوند و بعد از ۲ هفته به محیط کشت M_4 انتقال یابند ، تشکیل مستقیم جنین های ثانویه از جنین های اولیه صورت می گیرد. در این صورت تمام جنین های ثانویه قادر خواهند بود به گیاه کامل تبدیل شوند. بنابراین از طریق یک روش نسبتا" ساده، از ریز نمونه‌های حاصل از *M.sativa* var.Rgsy27 و *M.truncatula* var.R108-1(c4) در طی ۱/۵- ۲ ماه گیاهچه ها بدست آمدند. در زمان مشابه ، دو تفاوت مهم بین لاین های Rgsy27 و R108-1(c4) مشاهده شد. یکی اینکه در همه گیاهچه های حاصل از لاین Rgsy27 ، پس از انتقال به محیط کشت M_4 ½ ریشه ایجاد شد (شکلE۲) و گیاهچه ها بطور نرمال رشد نمودند در حالیکه تشکیل و رشد ریشه در لاین R108-1(c4) پس از انتقال به محیط کشتM_4 ½ غالبا" متوقف می شد، مگر اینکه محیط کشت مرتبا" تعویض می گردید. دیگر اینکه درصد تشکیل جنین رویشی ثانویه و باززایی در لاین Rgsy27 نسبت به لاین R108-1(c4) بر اساس شمارش گیاهان بسیار بیشتر بود.

بررسی تظاهر ژن *Sn* درلاین‌هایRgsy27 وR108-1(c4) با هدف مطالعه امکان تنظیم آنتوسیانین‌ها و پرو آنتوسیانیدین‌ها در این گیاهان صورت گرفت. این فرایند بر اساس کشت توأم ریز نمونه‌ها با نژادهای مختلف *A.tumefaciens* (EHA105 و LBA4404) که حامل راه انداز 35S و ژن *Sn* از گیاه ذرت و ژن گزارشگر *gus* و نشانگر انتخابی *npt*II بودند صورت گرفت. تعداد قطعه برگ انتخاب شده جهت انجام عمل تراریزش از هر یک از دو لاین ۱۰۰عدد بود. بر اساس داده های (جدول ۵) بیشترین در صد تعداد گیاهان تراریخته حاصل از دو لاین، دو نژاد باکتریایی و دو ژن مورد استفاده مربوط به لاین Rgsy27 ونژادآگروباکتریوم EHA105 (۲۵/۸٪ ، ۲۵٪) بود. کمترین در صد نیز مربوط به لاین Rgsy27 و نژاد اگروباکتریوم LBA4404(۹٪ ،۸/۵٪) بود. بنابراین کارایی تراریزش لاین Rgsy 27 بستگی به نژاد مورد استفاده ازآگروباکتریوم تومفسینس دارد، در حالیکه در موردلاین-R108 1(c4)، این بستگی وجود ندارد. استفاده از روش مورد استفاده در تراریخت نمودن گیاهان و محیط های کشت مورد استفاده موجب القاء و تبدیل۱۰۰ - ۹۰ درصد جنین ها به گیاه کامل شد(جدول ۴). از لاین R108-1(c4)، ۱۰۰ درصد گیاهان تراریخته بارور بودند که بطور متوسط ۱۵۰۰ بذر از هر گیاه تراریخته بدست آمد.

از لاین Rgsy27، تنها ۸۵ درصد گیاهان تراریخت باززایی شده، بارور بودند. این نتایج نشان می‌دهد که مارکر انتخابی کانامایسین می‌تواند در هر دوگونه گیاهی به نحوه موثری مفید باشد.

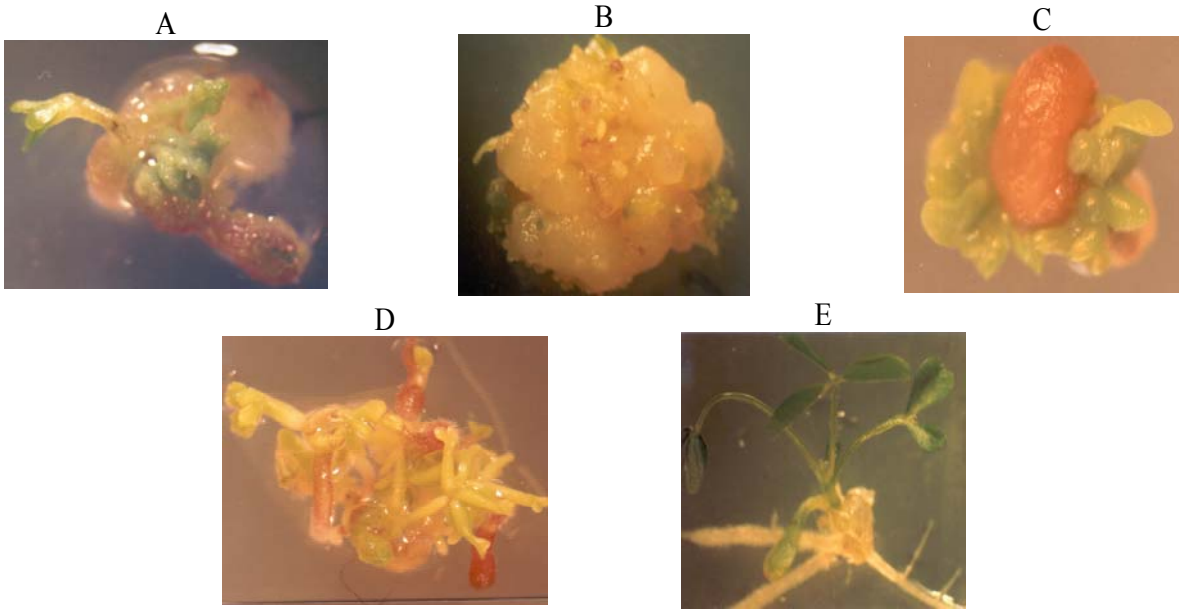
جدول ۳- اثر هورمون ها بر تشکیل کالوس های پیش جنین زا و القاء جنین در دو لاین Rgsy27 وR108-1(c4)

لاین	محیط کشت				
	M_{21}			M_{22}	M_2
	کالوس پیش جنین زا	جنین های مستقیم	جنین‌های غیر مستقیم	کالوس پیش جنین زا	کالوس پیش جنین زا
Rgsy27	٪۵۰	٪۵۰	۰	۰	٪۱۰۰
R108-1(c4)	٪۱۰۰	۰	۰	۰	٪۱۰۰

جدول ۴- اثر محیط کشت های مختلف روی جنین زایی و باززایی ریز نمونه های تراریخته حاصل از گیاه یونجه

نموجنین و باززایي ریزنمونه ها	M_{21}		M_2	
	Rgsy27	R108-1(c4)	Rgsy27	R108-1(c4)
درصد ریزنمونه هاي مولد جنین	۱۰۰%	۷۰ %	۱۰۰%	%۱۰۰
تعداد جنین در هر ریز نمونه*	٤-۱۲	۳-٦	۱۰-۲۳	۱۳-۱۵
درصد تبدیل جنین ها به گیاهچه ها	۱۰۰ %	۷۵-٦۵%	۱۰۰%	۹۰%

* .تعداد جنین بر اساس نوع آگروباکتریوم مورد استفاده



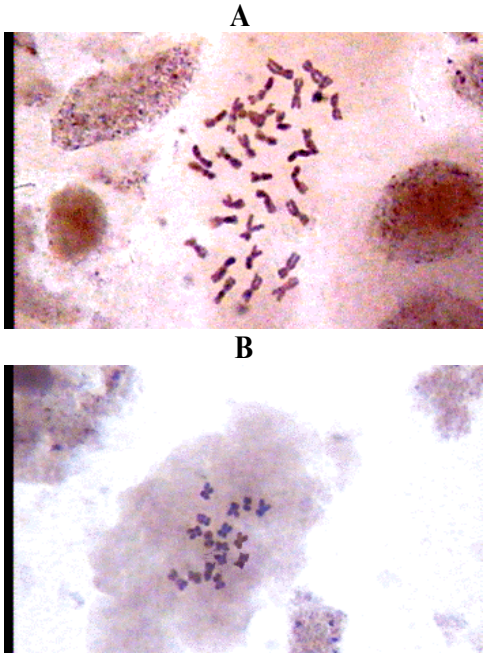
شکل ۲- کال زایی و باززایی در یونجه تراریخته.(A)تشکیل جنین های ثانویه در لاین Rgsy27 (B) تشکیل کالوس پیش جنین زا (نقاط سبز رنگ وشفاف)(C)تولید مستقیم جنین از ریز نمونه ها(D)تولید جنین های قابل باززایی در لاین های تراریخته(E)تولید گیاه کامل تراریخته توسط ژن *Sn* .

جدول ۵- تعداد گیاه تراریخته بدست آمده از دو لاین ودو نژاد باکتریایی ودو ژن*Sn* و *gus* با استفاده از محیط کشت M_2

گیاه	LBA4404		EHA105	
	$p^{BI121.Sn}$	$p^{BI121.1}$	$p^{BI121.Sn}$	$p^{BI121.1}$
Rgsy27	۹۰	۸۵	۵۷۵	۵۹۴
R108-1(c4)	۲۶۹	۲۸۰	۳۱۰	۳۲۶

سطح پلوئیدی ۲۰ گیاه تراریخته حاصل از لاین‌های Rgsy27 و R108-1(c4) توسط دستگاه فلوسیتومتر و شمارش کروموزومی مورد بررسی قرار گرفت. تمام گیاهان تحت بررسی بدون تغییر در سطوح پلوئیدی به ترتیب تتراپلوئید ودیپلوئید باقی ماندند(شکل ۳A، ۳B)و اندازه ژنوم آنها از محدوده ۰/۹۳ تا ۰/۹۷ پیکوگرم برای لاین R108-1(c4) و

۳/۶۴تا ۳/۶۹ پیکو گرم برای لاین Rsy27 متغییر بود. بنابراین باززایی با روش شرح داده شده در این مقاله هیچ تغییری را در سطوح پلوئیدی گیاهان باززایی شده بوجودنیاورد.



شکل۳-تعداد کروموزوم های لاین های تراریخته .(A) تعداد کروموزوم لاین تراریخته Rgsy27(2n =2x=32)(B) تعداد کروموزوم لاین تراریخته(2n=2x=16) R108-1(c4).

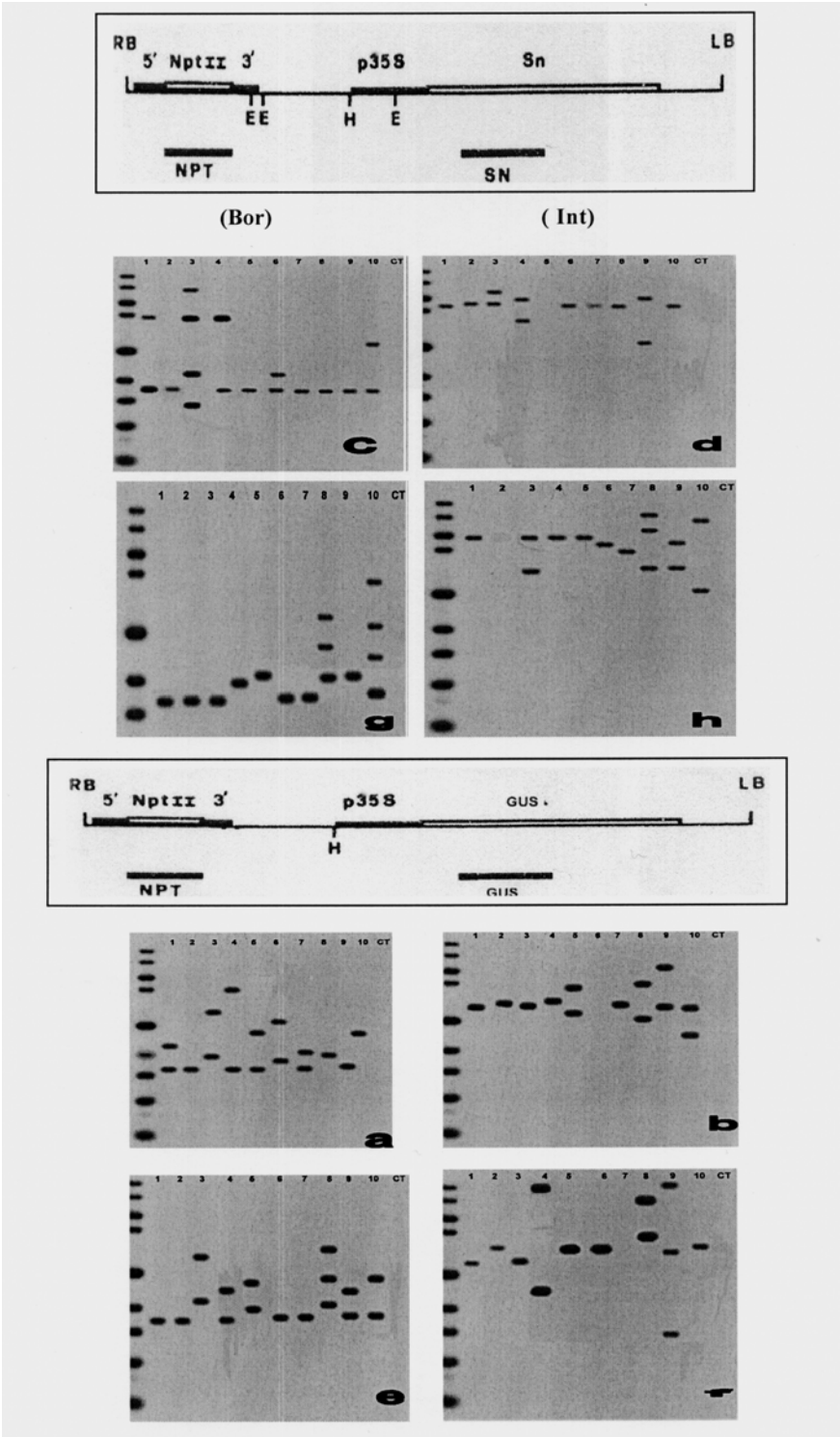
حضور ژن های *Sn* و*gus* بطور جداگانه در۱۰ گیاه تراریخته همراه با گیاه غیرتراریخته (کنترل) توسط آنالیز ساترن بلات در لاین های(c4)R108-1 (شکل۴a،۴b،۴e،۴f) و Rgsy27 (شکل۴c،۴d،۴g،۴h)مورد بررسی قرار گرفت.در هر مورد، یک قطعه داخلی(int) ویک قطعه از کناره های (Bor) T-DNA با پروب های خاص هیبرید شدند. اندازه های مورد انتظار از قطعات مخصوص هر ساختار در گیاهان تحت بررسی به درستی تشخیص داده شد، به استثنای مواردی درلاین‌های تراریزش شده با ساختارهای pBI121.1 و pBI121.*Sn* که به ترتیب فاقد نواری برای ژن‌های *gus*و*Sn* بودند. مواردی هم که در هر دو لاین تعداد قطعات *gus* و *Sn* بیش از یک نسخه مشاهده شد. تعداد (Bor) هایT-DNA تشخیص داده شده در این گیاهان نشان دهنده تعداد نسخه های T-DNA ادغام شده در ژنوم گیاهی است که از ۱تا۴ نسخه متغییربود.

درلاین تراریخته Rgsy27 ، حامل ژن *Sn* (شکل۴d)، قطعات (Bor)، هیبرید با پروب *npt*II مطابق با نسخه‌های چند گانه

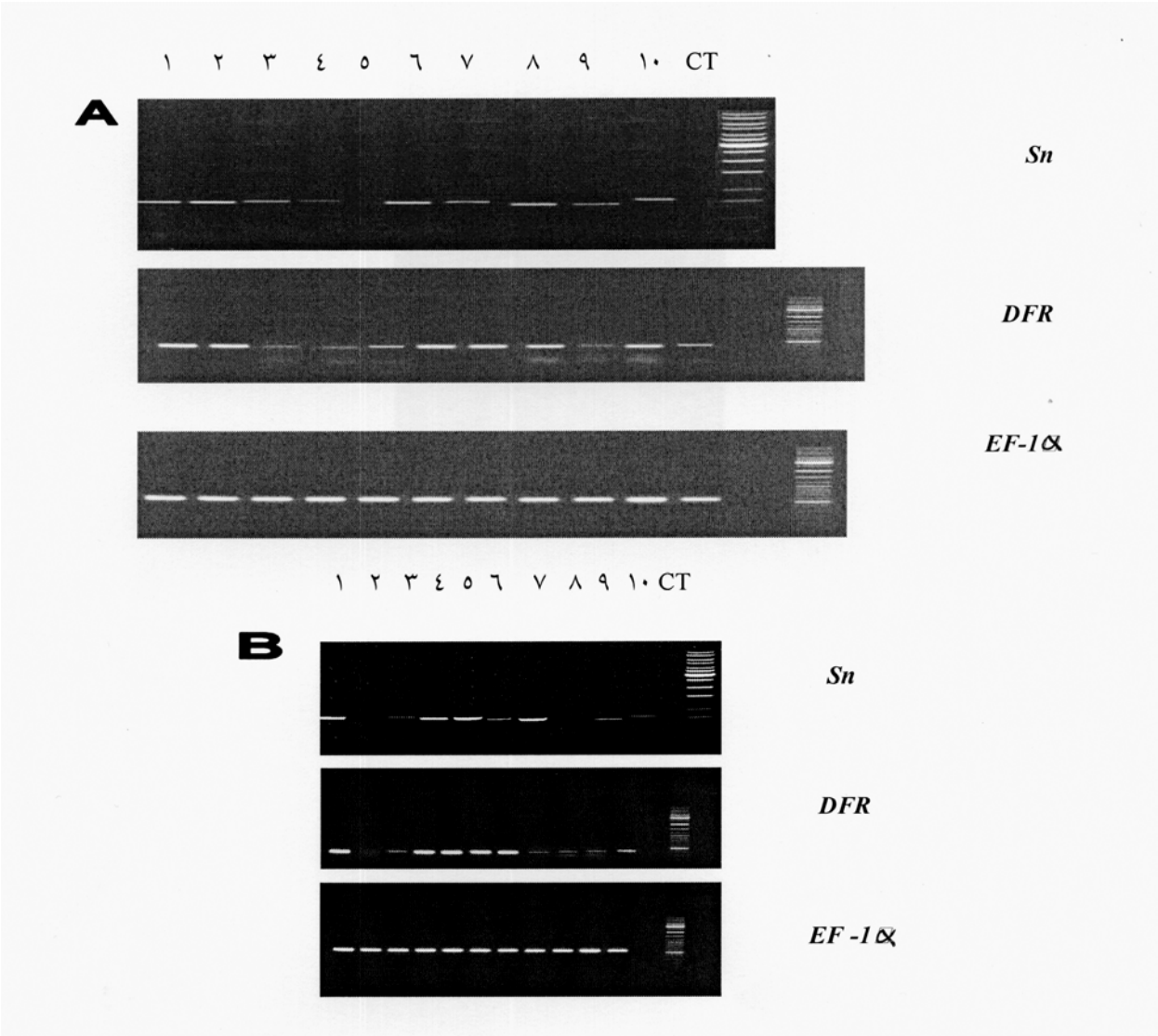
T-DNA الحاق شده به ژنوم گیاهی بود. در این گیاهان قطعات ۲/۳ کیلو جفت بازی(گیاهان شماره۱،۲،۳،۶،۷،۱۰) و ۲/۵ کیلو جفت بازی (گیاهان شماره ۴،۵،۸،۹) هیبرید با پروب *npt*II ، احتمالا" قطعات(Bor) را نشان می‌دهند. با توجه به اینکه بجای استفاده ازجنین های حاصل از ریزنمونه های مستقل، از گیاهان تراریخته تحت بررسی بطور تصادفی انتخاب ومورد آزمایش قرار گرفتند لذا گیاهان شماره(۱،۲،۳،۶،۷،۱۰) احتمالا" نشان دهنده کلون‌هایی از کالوس مشابه می‌باشند. در دیگر موارد، آنالیز ساترن بلات گیاهان تراریخته، مستقل برای هر ساختار،از نظر حضورترانس ژن‌های *Sn* و*gus* در (شکل ۴a-۴h) نشان داده شده است.بطور کلی افزایش نوار ها در هر مسیر نشانگر تعداد نسخه های ژن انتقال یافته در ژنوم گیاهان تراریخته بود.

نتایج آنالیز RT-PCR نشان دهنده این بود که تظاهر ژن *Sn* در گیاهان تراریخته مطابقت با سطوح افزایش یافته mRNA DFR، در مقایسه با لاین های کنترل و فرو نشانده شده (تعداد سلول های تانن دار کم شده) دارد(شکل۵A،۵B). گیاهان تراریخته دارای تظاهر بالای ژن *Sn* ،باعث افزایش تظاهر *DFR* نسبت به گیاه کنترل شدند و گیاهان تراریخته دارای تظاهر پائین ژن *Sn* ،باعث کاهش تظاهر*DFR* نسبت به گیاه کنترل شدند.گیاهان انتخابی از هر دولاین که در آنالیز ساترن بلات برای ژن *Sn* بیش از یک نوار تشکیل داده بودند، رونویسی ژن *Sn* در آنها کم بود و گیاهانی که در آنالیز ساترن بلات فاقد نوار برای ژن *Sn* بودند ،فاقد هرگونه رونویسی از ژن *Sn* بودند. ژن خانه دار*EF-1α* که جهت نرمالیزه کردن و تائید نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR بکار رفت در تمام گیاهان تراریخته و گیاه کنترل بیان شد.

بافت برگ های جدا شده از گیا هان بالغ برای اثبات وجود CT با استفاده از DMACA رنگ آمیزی شدند و با استفاده از دوربین دو چشمی نوری مدل BH ساخت شرکت الیمپوس با بزرگنمایی ۱۰x مورد بررسی قرار گرفتند.



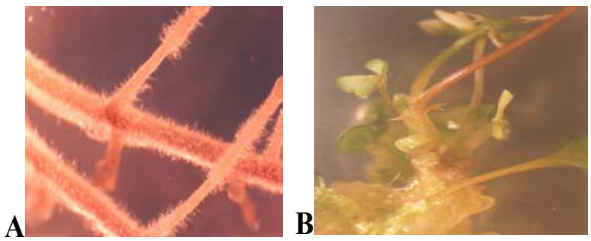
شکل ۴- آنالیز ساترن بلات : ۱۰ میکرو گرم DNA (از لاین های تراریخته و کنترل) با آنزیم *Hind*III برش داده شد و با پروب های نشاندار *Sn* ، *npt*II و *gus* هیبرید شدند.(E):*Eco*RI , (H):*Hind*III (Int):internal fragment, (Bor): border fragment .(a.)تعداد Bor از T-DNA حا مل ژن *gus*در لاین R108-1(c4)(b)تعداد Int از T-DNA حا مل ژن *gus* در لاین R108-1(c4) (c) تعداد Bor از T-DNA حا مل ژن *Sn* در لاین R108-1(c4) (d) تعداد Int از T-DNA حا مل ژن *Sn* در لاین R108-1(c4) (e) تعداد Bor از T-DNA حا مل ژن *gus*در لاین Rgsy27 (f) تعداد Int از T-DNA حا مل ژن *gus* در لاین Rgsy27 (g)) تعداد Bor از T-DNA حا مل ژن *Sn* در لاین Rgsy27 (h) تعداد Int از T-DNA حا مل ژن *Sn* در لاین Rgsy27 .



شکل ۵- آنالیز RT-PCR حاصل از لاین های تراریخته و کنترل انتخابی از سطوح رونویسی ژن *Sn* ، *DFR* و*EF-1α* . (A) RT-PCR گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته (B)R108-1(C4) RT-PCR گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته Rgsy27. (CT) نشان دهنده گیاه کنترل است.

در گیاهان تراریخته توسط ژن *Sn*، بدون رنگ آمیزی با معرفDMACA تغییرات فنوتیپی ریشه ها از نظر وجود رنگ قرمز نسبت به گیاهان کنترل به وضوح قابل مشاهده می‌باشد (شکل۶B،۶A). مشاهده دقیق لاین های رشد یافته تحت شرایط کنترل شده، فنوتیپ شامل آنتوسیانین در لاین هایی که ژن *S n* تظاهر یافته بود را تایید می کرد. لاین هایی که سطوح افزایش یافته ای از CT را نشان می دادند، مشخصات و صفات رنگ آنتوسیانین بطور ویژه در برگ های جوان و بافت‌های ساقه نمود می کرد. سلول‌های شامل آنتوسیانین به دلیل قرمز بودن بعد از رنگ آمیزی با DMACA با چشم غیر مسلح قابل مشاهده بودند. اثرات ژن *Sn* بر تجمع آنتوسیانین محدود به رگبرگ میانی، پایین برگ، و دم برگ می باشد، هر چند تجمع پلی مر های پرو آنتوسیانیدین (CT) بطور قابل توجهی در پهنای برگ قابل مشاهده بود. آنالیز لاین های انتخاب شده نشان می دهد که این تغییر فعالیت فنوتیپی مربوط به حالت پایدار سطوح رونوشت ترانس ژن *Sn* وارد شده به گیاه و ورود تنها یک نسخه از ساختار CaMV 35S-*Sn* در این گیاهان است.

با اندازه گیری میزان تانن موجود در شاخ و برگ گیاهان تراریخته از طریق اسپکتروفتومتری، در طول موج های ۷۲۵ ، ۶۴۳ و۵۵۰ نانومتر گیا هان تراریخته حامل ژن *Sn* به دو گروه تقسیم شدند(جدول ۶،۷):



شکل ۶-ریشه ،ساقه و برگ لاین تراریخته یونجه.
(A) تظاهر آنتوسیانین در ریشه گیاه تراریخته توسط ژن *Sn*
(B)تظاهر آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین در شاخ و برگ گیاه تراریخته توسط ژن *Sn*

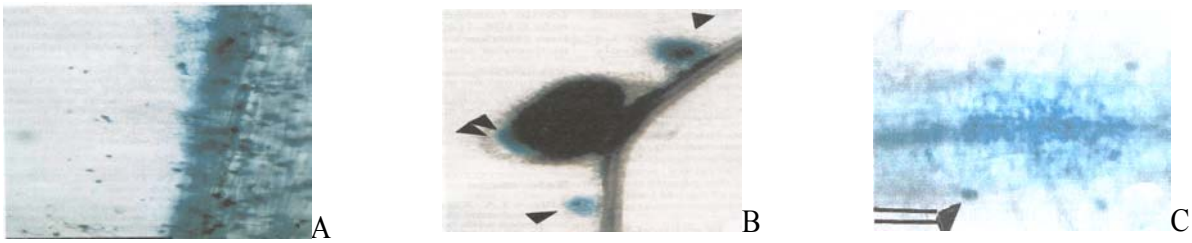
۱-گیاهان تراریخته که ژن *Sn* باعث کاهش مقدار تانن در مقایسه باگیاهان کنترل شده بود(S)[1] (کاهش، از۰/۲۶به۰/۲۲ ٪).

۲-گیاهان‌تراریخته‌که ژن *Sn* باعث افزایش مقدار تانن در مقایسه با گیاهان‌کنترل‌شده بود(A)[2](افزایش از۰/۲۶به۰/۴۷٪).

1. suppressed
2 . Addetived

برگ های گیاهان تراریخته کاهنده تانن و افزاینده تانن هر دو قادر به رونویسی ژن *Sn* بودند. همه گیا هان تراریخته تظاهر ژن *Sn* را در بافت های ریشه دارا بودند(شکل ۶A). درصد پروآنتوسیانیدین موجود در ماده خشک گیاهان تراریخته توسط ژن *Sn*در برگ ،ساقه و ریشه که از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۴۳ نانومتر (جدول۷) بدست آمده است ،نشان دهنده اثر ژن *Sn* در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می باشد.

نتایج آزمون χ^2 حاصل از بررسی۵۰ گیاه T_1 حاصل ازخودگشنی ۵ گیاه T_0 تراریخته باساختارهای $p^{BI121.1}$ و $p^{BI121.Sn}$ نسبت به سنجش فعالیت آنزیمی *gus* وسنجش تظاهر ژن *Sn* (RT-PCR و سنجش هیستوشیمیایی)، نشان داد که ترانس ژن ها غالبا" به عنوان صفت مندلی غالب، توارث یافته اند، هرچند برای تعدادی گیاه این امر صادق نبود که احتمالا"منعکس کننده محل های دخول چندگانه ساختار T-DNA در ژنوم گیاه است، همانگونه که نتایج بررسی مولکولی در مورد گیاهان تراریخته نیز این مطلب را تائید کرد (شکل۷A - ۷C / جدول۸،۹). مقدار χ^2 در سطح احتمال ۰/۰۵ (χ^2= ۳/۸۴) برای فرض توارث ساده مندلی معنی دار است . همانگونه که در (شکل ۸A) مشاهده می شود وجود CT در برگ گیاه یونجه القاء شده است.



شکل ۷- فعالیت ژن *gus* در قسمت های مختلف گیاه تراریخته یونجه.(A)فعالیت ژن *gus* در ریشه های موئی
(B) فعالیت ژن *gus* در اطراف ناحیه گره و گره(C) فعالیت ژن *gus* دررگبرگ اصلی.

جدول ۶- سنجش پروآنتوسیانیدین ها در گیاهان تراریخته و کنترل از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج های ۶۴۳،۵۵۰و۷۲۵ نانومتر

لاین	میزان جذب ۶۴۳ nm ۲۵ دقیقه	میزان جذب ۷۲۵ nm ۴۰دقیقه، فنل کل(X)	میزان جذب ۵۵۰ nm ۲۵ دقیقه	X(#TA) µg	میزان جذب ۷۲۵ nm ، ۴۰دقیقه، فنل یرتاننی(Y)	%X	%Y	%(X-Y)	Y(#TA) µg
Rg(200mg)	۰/۰۷۱۲	۱/۴۹۷۲	۰/۹۶۱۵	۲/۷۱۲۰۰	۰/۰۴۶۵	۰/۳۰۱۱	۰/۰۴۲	۰/۲۵۹۱	۰/۸۶۲۰
Rg + *Sn*	(S)۰/۰۶۴۳	۱/۲۸۳۴	۰/۳۹۷۸	۲/۳۰۸۳۰	۰/۰۱۷۸	۰/۲۵۶۰	۰/۰۳۵۳	۰/۲۲۰۷	۰/۳۱۷۸
Rg + *Sn*	(A)۱/۵۸۹۳	۲/۸۹۳۹	۰/۲۸۹۳	۵/۳۰۹۹۰	۰/۰۵۸۳	۰/۵۸۹۹	۰/۱۱۵۶	۰/۴۷۴۳	۱/۰۴۱۰

X% =درصد مقدار کل فنل در ماده خشک،Y%=درصد مقدار فنل های غیر تاننی ،(X-Y)%=درصد مقدار تانن در ماده خشک،TA=اسید تانیک،
S= فرونشاننده پروآنتوسیانیدین و A= افزاینده پروآنتوسیانیدین

جدول ۷- درصد پرو آنتوسیانیدین در ماده خشک در گیاهان تراریخته توسط ژن*Sn* وگیاه کنترل در طول موج ۶۴۳ نانومتر

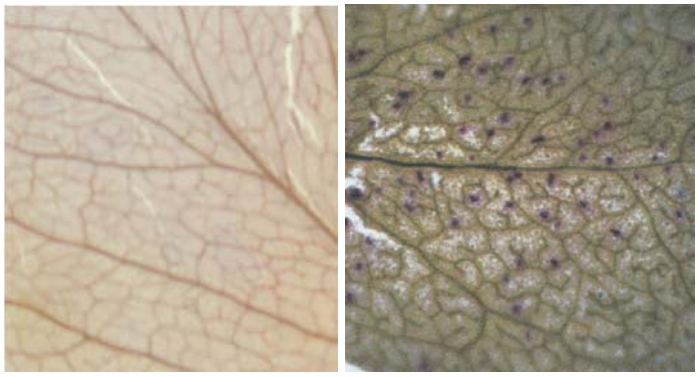
لاین	برگ	ساقه	ریشه
Rg	۰/۰۸	۰/۰۳	۰/۰۲
Rg + *Sn*	۰/۰۲ (S)	۰/۰۳(S)	۰/۰۱(S)
Rg + *Sn*	۰/٤۸ (A)	۰/۱٤(A)	۰/۷٤(A)

جدول ۸-آنالیز تفرق ژنی ترانس ژن ها در نتاج گیاهان تراریخته لاین Rgsy27.

گیاه	$p^{BI121.1}$			$p^{BI121.Sn}$		
	gus^+	gus^-	$\chi^2_{(3:1)}$	Sn^+	Sn^-	$\chi^2_{(3:1)}$
۱	۴۳	۷	۳/۲۳	۳۶	۱۴	۰/۲۴
۲	۳۷	۱۳	۰/۰۳	۲۸	۲۲	۹/۶
۳	۲۶	۲۴	۱۴/۱۱	۳۲	۱۸	۳/۲۲
۴	۳۴	۱۶	۱/۳۰	۲۳	۲۷	۲/۱۶
۵	۲۹	۲۱	۷/۷۱	۳۰	۲۰	۶

جدول ۹-آنالیز تفرق ژني ترانس ژن ها در نتاج گیاهان تراریخته لاین R108-1(C4)

گیاه	$p^{BI121.1}$			$p^{BI121.Sn}$		
	gus^+	gus^-	$\chi^2_{(3:1)}$	Sn^+	Sn^-	$\chi^2_{(3:1)}$
۱	٤۰	۱۰	۰/٦٦	۲۷	۲۳	۱۱/۷٦
۲	۲۵	۲۵	۱٦/٦۷	۳۲	۱۸	۳/۲۲
۳	۳٤	۱٦	۱/۳۰	۳۰	۲۰	٦
٤	۳۰	۲۰	٦	۳۵	۱۵	۰/٦٦
۵	۳۳	۱۷	۲/۱٦	۳۹	۱۱	۰/٦٦



B **A**

شکل۸-تظاهر پروآنتوسیانیدین در برگ گیاه تراریخته توسط ژن *Sn*
(A) تظاهر CT بصورت نقاط بنفش رنگ در برگ گیاه تراریخته(B)
برگ گیاه غیر تراریخته ، فاقد نقاط بنفش رنگ

بحث

با توجه به عدم باززایی مطلوب در بیشترگونه های تتراپلوئید یونجه، فرایند تراریزش از روش باکتری آگروباکتریوم عملا بی‌نتیجه می‌ماند .لذا یافتن گونه یا گونه هایی که از باززایی قابل قبولی بر خوردار هستند بسیار ضروری است . بطور کلی عوامل زیر برای اجرای بهتر فرایند تراریزش گیاه یونجه ضروری است:

۱- محیط کشت مناسب جهت باززایی و عدم تاثیر بر تغییر سطوح پلوئیدی.

۲ـ افزایش قابلیت باززایی لاین‌ها یا ژنوتیپ‌ها بوسیله واکشت‌های متوالی و در نهایت انتخاب ژنوتیپ مناسب جهت عمل تراریزش.

۳ـ استفاده از خلاء نسبی همراه با تکان آرام در زمان نفوذ آگروباکتریوم به ریز نمونه ها در مکان استریل.

۴ـ حضوراستوسیرینگون‌بامقدارمناسب طی دوره کشت توأم.

۵- انتخاب نوع نژاد آگروباکتریوم در اثر متقابل با ژنوتیپ و ترانس ژن مورد استفاده .

سطوح پلوئیدی گیاهان تراریخته نشان داد که تقریبا همه گیاهان در سطوح پلوئیدی قبل ازعمل تراریزش باقی ماندند، علت این امر احتمالا"در نتیجه تیمار هورمونی(2,4-D) در زمان بسیار کوتاه می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از لاین هایRgsy27 و R108-1(C4) برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی بسیار مناسب می باشند. لاین های تراریخته ای که حامل دو یا چند نسخه ترانس ژن بودند، نشانه ای از آزمایشات Co-transformation در یونجه می باشند. گیاهان تراریخته‌ای که شامل چند نسخه از ژن CaMV35S-*Sn* هستند، تظاهر ژن *Sn* آنها کاهش یافته، و یا کلا" از بین رفته است. در گیاهان تراریخته ای که ژن *Sn*، تظاهر یافته(با یک نسخه) ،میزان تظاهر ژن *DFR* افزایش یافته است و تظاهر ضعیف ژن *Sn* (افزایش تعداد نسخه های ژن *Sn* در گیاهان تراریخته)، باعث کاهش در تظاهر ژن DFR نسبت به گیاه کنترل شده است. بنابراین بیان ژن *Sn* در گیاهان تراریخته باعث تاثیر بر دیگر آنزیم های مؤثر در مسیر فلاونوئید می شود همانگونه که سایر محققین در مورد گیاه تراریخته L. corniculatus حامل ترانس‌ژن Sn نشان دادند که فنوتیپ‌ها از نظر پروآنتوسیانیدین در مقایسه با گیاه کنترل تغییر یافتند و سطوح آنزیم‌های DFR و LAR به طور قابل توجهی تغییر یافته است (۴۳). در مسیرهایی که نواری برای ژن *Sn* و *gus* حضور ندارد ولی در border ها حضور دارد نشان دهنده این است که قسمتی ازT-DNA به ژنوم گیاه متصل شده است. همچنین نوار های نابجایی که در تعدادی از گیاهان تراریخته ایجاد شده احتمالا" بدلیل برش و کوتاه شدگی تعدادی از نسخه های T-DNA در آن گیاهان است. با توجه به اینکه ریشه های گیاهان حامل ژن *Sn* در لاین ها، نشانگر الگو هایی از وجودرنگ قرمز بودند و بررسی فنوتیپی لاین های حامل ژن *Sn* ، نشان گر تغییر رنگ در محدوده دم برگ، پایه برگ، رگبرگ میانی و... بودند، لذا ورود ژن *Sn* و تظاهر آن می تواند باعث تغییر در بیوسنتز CT باشد. برگ های حاصل از تراریزش های تک نسخه ای باعث ایجاد لاین هایی با افزایش CT و برگ های حاصل از تراریزش های چند نسخه ای باعث ایجاد لاین هایی با کاهش CT بودند. بنابر این استفاده از ژن *Sn* و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آنتوسیانین از گروه bHLH امکان دسترسی جهت تغییر سطوح CT را در گونه های گیاهی افزایش می دهد. گیاهان تراریخته، ممکن است همچنین منبع قابل ارزشی برای کلونینگ مراحل انتهایی مسیربیوسنتز CT و ژن‌های مسئول در تخصیص سلول هایی که بیوسنتز آنتوسیانین و CT را بعهده دارند،باشند. امکان وجود اثر متقابل منفی ژن *Sn* و یک endogene همولوگ نامشخص با آن، می تواند توصیف کننده رفتار گیاهان تراریخته کاهنده تانن (S) باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج ذکر شده نشان می دهد که محیط های کشت M1، M2، M3 و M4 جهت جنین زایی رویشی در دو گونه دیپلوئید وتترا پلوئید جنس *Medicago* بسیار مناسب است . در تراریزش گیاه یونجه چندین فاکتور از جمله نژاد آگروباکتریوم ، گونه مورد استفاده و روش تراریزش از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است . تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان تراریخته نشان داد که تقریبا همه گیاهان در سطوح پلوئیدی قبل ازعمل تراریزش باقی ماندند، لذا استفاده از محیط های کشت مورد استفاده برای باززایی، نسبت به تغییرسطوح پلوئیدی مؤثرنمی باشند و علت این امر احتمالا" نتیجه تیمار هورمونی در زمان بسیار کوتاه می باشد. همچنین به نظر می‌رسد لاین هایRgsy27 و R108-1(C4) ژنوتیپ های بسیار مناسب جهت برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی باشند. در آنالیز ساترن بلات مسیر هایی وجود دارند که در آن نواری برای ژن *Sn* و *gus* در گیاهان تراریخته حضور ندارد ولی درقسمت (Bor) یک یا چند نوار دیده می شود. علت این امر این است که قسمتی از T-DNA به ژنوم گیاه متصل شده است و گیاه تراریخته ایجاد شده است ولی ژن *Sn*، یا ژن *gus* را بیان نمی‌نماید. همچنین نوار های نابجایی که در تعدادی از گیاهان تراریخته ایجاد شدند احتمالا" بدلیل برش و کوتاه شدگی تعدادی از نسخه های T-DNA در آن گیاهان است. اثر

ژن *Sn* بر گیاه یونجه به دو صورت، کاهنده تانن و افزاینده تانن پدیدار می شود. برگ های گیاهان تراریخته کاهنده تانن و افزاینده تانن، هر دو قادر به رونویسی ژن*Sn* بودند. همه گیاهان تراریخته، ژن *Sn* را در بافت های ریشه بیان می کنند. تظاهر ژن *Sn* وابسته به نور است و تنها در صورت بروز آلل *Sn:bol3*، در تاریکی نیز رونویسی *Sn* mRNA صورت خواهد گرفت و تولید رنگدانه در بافت ها میسر می شود. تظاهر ژن *Sn* باعث افزایش میزان آنزیم DFR می شود.

REFERENCES

1. Bingham,E.T., L.V.Hurley, D.M.Kaatz, & J.W.Saunders. 1975.Breeding alfalfa which regenerates from callus in culture.Crop Sci. 15:719-721.
2. Blondon, F., D. Marie, S. Brown, & A. Kondorosi. 1994. Genome Size and base Composition in *Medicago sativa* and *M.truncatula* species. Genome, 37: 264-270.
3. Bovy, A. R. de Vos, M. Kemper, E. Schijien, M. Almenar Pertejo, S. Muir,G.Collins, S. Robinson, M. Verhoeyen, S.Hughes, C.Santos-Buelga, & A. van Tunen. 2002. High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC*AndC1. The Plant Cell, 14: 2509-2526.
4. Brown, D. C. W. & A. Atanasov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago . Plant Cell Tissue Organ Culture, 4 : 111-122.
5. Brown, D. C. W. l988. Germplasm determination of in vitro somatic embryogenesis in alfalfa . Hortscience. 23: 526-531.
6. Brown.D.C.W., P. Nagarajan & P. D. Walton. l989. Embryogenic in vitro responses in creeping and non creeping rooted selections from *M.sativa*.J.Genet. & Breed. 43:73-76.
7. Buising , C.M., D. Tomes, & J. Schmidt.1998.Methods of regeneration of Medicago sativa and expressing foreign DNA in same.patent number US005731202A
8. Cameron S. J., B. Kolevski, & D.R. Smyth. 2002. Transparent Testa Glabra2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis ,* encodes a WRKY transcription factor. The Plant Cell, 14: 1359-1375.
9. Chang, S., J., puryear, & J. Cairney. 1993. Asimple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol.Biol.rep., 11:113-116.
10. Chu, C.C., Proc.Sym.Plant tissue culture. 1978. Science Press, Peking: pages 45-50.
11. Cone, K.C.1989.Molecular and genetic analysis of light requirement for anthocyanin synthesis in maize. In the geneticsof Flavonoids, D.E., styles, G.A.,Gavazzi,eds(Milan:Edizioni Unicopli), pp.143-146.
12. Devic M., J. Guilleminot, & I. Debeaujon. 1999.The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development.The Plant Journal 19: 387-398.
13. Dooner, H.K., & T. P. Robbins. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. Annu. Rev.Genet. 25 : 173-199.
14. Gamborg, O. L. , R. A.Miller, & K. Ojima. 1968. Nutrient requrements of suspension cultures of soybean root cells.Exp.Cell, Res. 50:151-158 .
15. Hellens, R., P. Mullineaux, H. Klee. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors.Trends in Plant Sci. 5 : 446-451.
16. Hoffmann, B., T.H., Trinh, J., Leung, A., Kondorosi, & E., Kondorosi. 1997. A new Medicago truncatula line with superor in vitro regeneration , transformation and symbiotic properties isolated through cell culture selection. Mol. Plant Microbe intract, 10: 307-315.

17. Holton, T.A. & C. C. Edwina. 1995.Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis.The Plant Cell, 7: 1071-1083.
18. Jefferson, R.A., T.A. ,Karanagh, & M.W. Bevan. 1987. GUS fusion as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6 : 3901-3907.
19. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. Plant Mol.Biol.Rep ., 5:387-405.
20. Jende-Strid, J. 1993. Genetic control of flavonoid biosyn-thesis in barley. Hereditas. 119: 187-204.
21. Johnson, L.B., S. E., Schlarbaum, & D.Z. Skinner. 1984.Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclones regenerated from nonmutagenized calli, Crop. Sci., 24: 948-952.
22. Kamate, K., I.D. Rodriguez- Llorente, M. Schotle, P. Durand, P. Ratet, E. Kondorosi, A. Kondorosi, & T.H. Trinh. 2000. Transformation of floral organs with GFP in *Medicago Truncatula* .Plant Cell Rep.19: 647-653.
23. Koornneef, M., L. W. M. Dellaert, & J. H. van der Veen. 1982a.EMS and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mutation Res. 93:109-123.
24. Koornneef, M., W. Luiten, P. de Vlaming, and A. W. Schram. 1982b. A gene controlling flavonoid-3'-hydroxylation in *Arabidopsis.* Arab. Inf. Serv. 19:113-115.
25. Li, Y. G., G. J. Tanner, & P. G. Larkin. 1996. The DMACA-HCL protocol and the threshold proantho cyanidin content for bloat safety in forage legumes. J. Sci. Food Agric. 70: 89-101.
26. Li, Y.G., G. J. Tanner, A. C. Delves, P. J. Larkin. 1993. Symetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. and *Onobrychis vicifolia* Scop.Theor.Appl.Genet. 87: 455-463.
27. Marescalchi, O. & V. Seali. 1998. Flow-Cytometric analysis of intraspecific genome size variations in acillus atticus (insecta, Phasmatodea). Genome, 41 : 629-635.
28. Meijer,E.G.M. & D.C.W.Brown. l985. Screening of diploid *Medicago sativa* germplasm for somatic embryogenesis. Plant Cell Reports ,4: 285-288.
29. Mitten,D.H., S.J. Sato, & T. A. Skokut. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm cources.Crop Sci. 24: 943-945.
30. Murashige , T. & F. Skoog. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures.Physiol. Plant., 15: 473-497 .
31. Nagarajan,P., J. S. Mc kerize & P. D.Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago*.Spp.In tissue culture, Plant Cell Reports, 5: 77-80.
32. Nakajima, J., T. Yoshikazu, M. Yamazaki, & K. Saito. 2001. Reaction Mechanism from leucoanthocyanidin 3-glucoside , a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis.The Journal of Bio.Chemistry, 276: 25797-25803.
33. Redenbaugh, K. & K.Wapker. 1990. Role of artificial seeds in alfalfa breeding. In: Bhojwani . S.S.Plant tissue culture: Applications and limitations. Elsevier.
34. Rob, J. A., T.N. Barry, & W.C. McNabb. 2000. Review paper for Polyphenols and agriculture :beneficial effects of proanthocyanidins in forage.Agri.Ecosystens and Environment, 75 : 1-12.
35. Robbins, M.P., F.Paolocci , J.Hughes, V. Turchetti , S. Arcioni, & F.Damiani. 2003.*Sn* , a maize bHLH gene , modulates anthocyanin and condensed tannin pathway in *lotus corniculatus.* J. of Experimental Botany, 54: 239-248.

36. Sambrook, J., E. F., Fritsch, & T., Maniatis. 1989. Molecular cloning: alaboratory manual- cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2nd.
37. Scalbert, A.1991.Antimicrobial properties of tannins.Phytochemistry 30: 3875-3883.
38. Schenk, R. U. & A. C. Hildebrant. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.Can. J. Bot. 50:199-204.
39. Somers, D. A., D. A. Samac, & P. M. Olhoft. 2003. Recent Advances in legume Transformation. Plant Physiology , 131: 892-899.
40. Susan Marles, M.A., H. Ray, & M. Y. Gruber. 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistryand molecular regulation. Phytochemistry 64 :367-383.
41. Szymanski, D.B., D.A. Klis , J.C. Larkin , & M.D. Marks. 1998. cot1: A regulator of Arabidopsis trichome initiation. Genetics. Jun;149: 565-77.
42. Tanner, G.J., R. G. Joseph, Y. G. Li, & P. J. Larkin. 1997.Towards bloat safe pastures, Feedmix, university of Cambridge. UK.
43. Tanner GJ, J. M. Watson S. Abrahams, A. R. Ashton, K. T. Francki, & P. J. Larkin. 2002. Novel gene and uses therefore to modify pasture qualities of crops. Australia PCT Application No. WO02066625.
44. Tonelli, C., G. Consonni, & S. F. Dolfini. 1991. Genetic and molecular analysis of *Sn*, a light–inducible, tissue specific regulatory gene in maize. Mol.Gen.Genet. 225: 401-410.
45. Trieu, A.T., & M.J. Harrison. 1996.Rapid transformation of Medicago truncatula: regeneration via shoot organogenesis. Plant Cell Rep. 16: 6-11.
46. Trieu, A.T., S.H., Burleigh, I., V., Kardailsky, & M.J., Hrrison. 2000. Technical advance: Transformation of *Medicago sp*. Via infiltration of seedling of flowering plants with agrobacterium. Plant J., 22: 531-541.
47. Walker Peach, CR, & J. Velten. 1994. Agrobactrium-mediated gene transfer to plant cell:cointegrate and binary vector systems in :Gelvin Sb, Schilperoot RA(eds) plants molecular biology manual.Kluwer , Dordrecht, pp.B1-B19.
48. Winkel-Shirley, B. 2001.Flavonoid biosynthesis.Acolorful model for genetic ,biochemistry,cell biology, and biotechnology. Plant Physiol., 126: 485-493.
49. Yu-Guang, Li, Greg Tanner & phil larkin. 1996. The DMACA- HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. J. Sci. Food Agric., 70: 89-101.