روش سریع با کارایی بالا برای تراریخته نمودن گیاه یونجه به منظور تظاهر ژن *BANYULS* (BAN)

سید محسن حسام‌زاده حجازی[1]، سیروس عبد میشانی[2] و Sergio Arcioni [3]

چکیده

پروآنتوسیانیدین‌ها (Condensed Tannins:CTs)، الیگومرهای فلاونوئیدی می باشند که تعدادی از آنها اثرات مفیدی روی سلامت حیوان و انسان دارند. توانایی پروآنتوسیانیدین‌ها در تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها سبب شده که تأثیر زیادی بر ارگانیسم های تجزیه کننده پروتئین و در نهایت کاهش خطر نفخ در حیوانات داشته باشند. آنتوسیانین‌ها نیزفلاونوئیدهایی هستند که در ایجاد رنگ قرمز، بنفش یا آبی در بذرها و گل‌ها شرکت دارند. ژن *BAN* حاصل از گیاه *Arabidopsis thaliana* رمزگردان آنتوسیانیدین‌ردوکتاز (ANR) می باشد . این آنزیم آنتوسیانیدین‌ها را به 2,3-cis-flavan-3-ols ((+)-catechin) که به عنوان واحد شروع کننده در تشکیل CT شناخته می‌شوند تبدیل می‌کند. انتقال این ژن به گیاه یونجه ، به منظور القاء تولید CT در شاخ و برگ آن جهت استفادهٔ بهینه از پروتئین‌های گیاه و کاهش خطر نفخ درحیوانات انجام شد. عمل تراریزش ریز نمونه‌های برگی حاصل از دو لاین یونجه چند ساله با نام‌های Rgsy27 و P1 که در حالت عادی دارای مقادیر ناچیز CT در شاخ و برگ می باشند توسط دو نژاد مختلف باکتری (LBA 4404 , EHA 105) *Agrobacterium tumefaciens*، حامل پلاسمید pBI121. *BAN* (ناقل دوتایی شامل ژن *BAN*) صورت گرفت. از ریز نمونه‌های برگی حاصل از لاین Rgsy27 بیش از ۹۰ درصد تولید کالوس‌های پیش جنین‌زا و از ریز نمونه‌های برگی حاصل از لاین P1 حدود ۳۰ درصد تولیدکالوس‌های پیش جنین‌زا تولید شد. در هردو لاین بیش از ۶۵ درصد جنین های باززایی شده در مدت ۲ ماه به گیاه کامل تبدیل شدند. کارایی تراریزش لاین‌های Rgsy 27 و P1 بستگی به نوع نژادهای *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده داشت ، به‌نحوی‌که لاین‌های تراریخت‌توسط ژن *BAN* با نژاد آگروباکتریوم LBA 4404 بهترین واکنش را نسبت به تولید گیاهان تراریخته نسبت به نژاد EHA 105 نشان دادند . تظاهر

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع smhessamzadeh@rifr-ac.ir

۲- دانشگاه تهران

۳- مؤسسه تحقیقات ژنتیک وبیوتکنولوژی گیاهان علوفه ای- ایتالیا

اکتوپیک ژن *BAN* در شاخ و برگ گیاه یونجه تراریخته باعث القاء تجمع CT شد که به راحتی از طریق بررسی شیمی بافتی قابل تشخیص بود. عدم فعالیت ژن *BAN* باعث افزایش مقدار رنگدانه قرمز شد. بنابراین این ژن به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی در تولید رنگدانه‌ها می‌باشد. درصد CT در ماده خشک گیاهان تراریخته لاین های Rgsy27 و P1 به ترتیب ۰/۴۷۴ و ۰/۶۰۰ در مقایسه با ۰/۲۵۹ و ۰/۴۰۸ در گیاهان کنترل بود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم تومفسینس، آرابیدوپسیس تالیانا، باززایی، تراریزش، پروآنتوسیانیدین، ژن *BAN* و یونجه

مقدمه

اهمیت گیاهان علوفه‌ای همزمان به دوران اهلی‌کردن حیوانات وحشی بر می گردد. بشر هر چه بیشتر به فراورده‌های دامی احتیاج پیدا می کرد اهمیت نباتات علو فه ای بارزتر می‌شد، تا آنجاکه امروز ه زراعت گیاهان علو فه ای از جمله یونجه یکی از اساسی‌ترین زراعت‌ها را تشکیل می دهد. در میان نباتات علوفه‌ای، یونجه بدلیل کیفیت خوب وخوشخوراکی و دارا بودن ذخائر غذایی از جمله مواد معدنی مختلف مانند کلسیم، مواد پروتئینی و حتی انواع ویتامین های گوناگون به ویژه ویتامین های A وC و تأثیر مهم آن در اصلاح زمین‌های زراعی اهمیت خاصی پیدا کرده است. یونجه را می‌توان به‌عنوان علوفه سبز برای تغذیه حیوانات بکار برد اما گاوهای شیری و گوشتی را نباید تنها با علوفه سبز یونجه تغذیه نمود زیرا سیری، با مصرف بیش از حد پروتئین همراه بوده و باعث نفخ و در نهایت موجب مرگ ناگهانی حیوان می شود. میانگین کاهش و ضرر ناشی از نفخ، سالیانه در استرالیا بیش از ۱۸۰ میلیون دلار و در آمریکا بیش از ۳۱۰ میلیون دلار تخمین زده شده است (Tanner، ۱۹۹۷ و Rumbaugh، ۱۹۸۵). عوامل ایجاد نفخ، می‌تواند گیاه، حیوان، عامل‌های محیطی و میکروبی باشد. عامل‌های گیاهی مرتبط با ایجاد نفخ می‌تواند پکتین‌ها، ساپونین‌ها، پروتئین‌های قابل حل در آب، لیپیدها، لیپوپروتئین ها، پلی‌ساکاریدها، آنزیم‌ها، فنولها و ساختمان دیواره سلولی

باشد. اما تا کنون فقط حضور پروآنتوسیانیدین‌ها یا CTها (گروهی از فلاونوئید ها)، استحکام دیواره سلولی و میزان تجزیه پروتئین را در ارتباط با عوامل ایجاد نفخ مؤثردانسته‌اند (Bovy و همکاران، ۲۰۰۲). فلاونوئیدها نقشی کلیدی در سیگنال دهی میان گیاهان و میکروبها، تولید و رشد دانه‌های گرده فعال تعدادی از گونه ها، خواص ضد میکروبی، بازدارنده تغذیه‌ای و حفاظت از نور ماوراء بنفش را به عهده دارند (Winkel-Shirley، ۲۰۰۱). 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 نفخ‌زایی بهبود یابد. از آنجایی‌که نخست تلاش درجهت انتقال ژن کنترل کننده بیوسنتز پروآنتوسیانیدین با روش ایجاد دورگ غیر جنسی میان 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 میان مقدار تانن و سن (Koornneef و همکاران ، ۱۹۸۲a؛ Tanner، ۱۹۹۷ و Li، ۱۹۸۵) فاقد نتیجه مطلوب بوده است، دوم اینکه دورگ غیر جنسی میان برگ یونجه و کشت سوسپانسیون *Lotus pedunculatus* نیز به‌دلیل کم بودن تعداد گیاهان باززایی شده ومقادیر ناچیز و ناپایدار تانن، نیز از نتیجه مطلوبی برخوردار نبوده است.سوم اینکه گرچه جهش های طبیعی و یا القاء شده، جهت تظاهر CTها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان مختلف و گونه های علفی شامل سورگوم، جو، نخود، آرابیدوپسیس، برنج و *L. japonicus* اثرات قابل توجهی داشته اند (Koornneef و همکاران ، ۱۹۸۲b؛ Jende-Strid، ۱۹۹۳ و Szymanski و همکاران، ۱۹۹۸)، ولی تا به‌حال هیچ جهشی که مؤثر بر القاء تظاهر CTها در برگ گیاه یونجه یا گونه‌های وابسته‌باشد، یافت نشده است و با وجود تنوع سوماکلونی از نظر میزان فلاوان –۳–ال در جوانه‌های برگی یونجه، جداسازی تانن از آنها صورت نگرفته است و این خصیصه نیزدر گیاه یونجه پایدار نبوده است (Scalbert، ۱۹۹۱). بنابراین استفاده

از روش بسیار دقیق، در بکارگیری تکنولوژی DNA نوترکیب، جهت تولید گیاهان حاوی پروآنتوسیانیدین نیاز می‌باشد.

پروآنتوسیانیدین ها ترکیبهای فنلی با وزن مولکولی بالا هستند که با نام "Condensed Tannins" نیز شناخته می‌شوند، در واقع آنها تولیدات ثانویه پلی فنولیک گیاهی بوده که با پروتئین‌ها پیوند یافته و قابلیت هضم پروتئین را کاهش می دهند. بنابراین به‌عنوان ترکیبهای ضد تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شوند. غلظتهای نسبتا کم از پروآنتوسیانیدین‌ها کافی است تا ایمنی از نفخ[1] را در گیاهان علوفه ای القاء نماید. در تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته، آستانه بحرانی غلظت پروآنتوسیانیدین ها برای پیشگیری از نفخ حدود نیم درصد وزن خشک علوفه تخمین زده شده است (Li و همکاران، ۱۹۹۶). به‌دلیل توانایی پروآنتوسیانیدین‌ها برای تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، آنها می‌توانند تأثیر چشم‌گیری بر ارگانیسم‌ها داشته باشند. ایجاد نفخ در حیوانات پس از مصرف علوفه تازه بعضی ازگیاهان مانند یونجه که هم اکنون به‌وسیله مواد شیمیایی کنترل می‌شود دارای اثرات سوء بر تولیدات حیوانی‌می‌باشد. تحقیقات انجام شده و در حال انجام بر پروآنتوسیانیدین‌ها یا (CTs) در اصل از نظرنحوه تولید و القا، در گیاه و نقش آنها در بهبود کیفیت علوفه می باشد (Rob و همکاران ، ۲۰۰۰). تقریبا تمام آنزیم‌های شرکت‌کننده کلیدی در مسیر بیوسنتز طبقات مختلف فلاونوئید، تعیین شده و تعداد زیادی از ژنهای مربوطه در گیاه ذرت و گل میمون و گل اطلسی و گیاه آرابیدوپسیس شناخته وکلون شده‌اند (Holton و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین ژنهای تنظیم کننده ای که تظاهر ژنهای ساختمانی را در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها در تعدادی از گیاهان کنترل می‌کنند، شناسایی شده‌اند. این ژنها در شدت و خصوصیات بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پرو آنتوسیانیدین‌ها و به‌طور کلی تظاهر تعدادی از ژنهای ساختمانی

1- Bloat safety

تأثیر می‌گذارند. این تأثیر از طریق فعالیت ژنهای ساختمانی با سنجش آنزیمی یا سنجش mRNA، قابل بررسی و تأیید می‌باشد. بسیاری از ژنهای تنظیم کننده موجود در گیاهان ذرت، گل میمون و گل اطلسی و آرابیدوپسیس شناسایی شده اند (Winkel-Shirley، ۲۰۰۱؛ Dellaporta و همکاران ، ۱۹۸۸؛ Tonelli و همکاران ۱۹۹۱؛ Ludwig و همکاران ، ۱۹۸۹؛Goodrich , »شقحثدفتق ، ۱۹۹۲ و Quattrocchio و همکاران ، ۱۹۹۳). بنابراین بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها نیازمند عمل تعدادزیادی ژن بوده و با عوامل محیطی از قبیل نور، دما، مواد غذایی و استرس‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند . ژن کلون شده *BAN* رمزگردان آنزیمی (پروتئینی) شبیه به DFR[1] است که این آنزیم باعث تولید لئوکوآنتوسیانیدین[2] می‌شود که برای تولید آنتوسیانین‌ها و CTها پیش نیاز می‌باشد . بنابراین فرض می‌شود که ژن *BAN* یک لئوکوآنتوسیانیدین ردوکتاز[3] (LAR) است که به‌عنوان عامل شروع کننده در سنتز CT در گیاهان شناخته می شود . در واقع ژن *BAN* نقطه انشعاب آنزیمی است که مقادیر نسبی دو خانواده فلاونوئید (آنتوسیانین‌ها و CTها) را تنظیم می‌کند . این ژن در نقطه‌میان تولید آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین دارای عمل مؤثر بوده و به احتمال زیاد رمزگردانی آنزیم LAR یا تنظیم‌کنندگی فعالیت LAR را به‌عهده دارد (شکل شماره ۱). در غیاب فعالیت آنزیم LAR، مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها، بیشتر از سنتز کتکین ها و پروآنتوسیانیدین‌ها (CTs) فعال می‌باشد (Gruber و Ray، ۲۰۰۲).

ژن *BAN* به‌عنوان نشانگری از توسعه و نمو اولیه پوشش بذری محسوب شده و جهش در ژن *BAN* باعث تجمع زودرس آنتوسیانین ها در پوشش بذری نابالغ درگیاه آرابیدوپسیس شده است (Gruber و Ray، ۲۰۰۲). در گیاه آرابیدوپسیس، انجام جهش در ژن *BAN* باعث شفاف شدن پوسته خارجی بذر[4] شده که به موجب آن تجمع زو درس

1- Dihydroflavonol 4-reductase
2- Leucoanthocyanidin(flavan –3,4- diols)
3- Leucoanthocyanidin reductase (LAR)
4- Transparent testa (tt)

آنتوسیانین قرمز و کاهش CT در پوشش بذری آن صورت می‌گیرد. بر پایه این موضوع و تشابه توالی اسیدآمینه‌های ژن *BAN* با *DFR*، می توان نتیجه گرفت که ژن *BAN* رمزگردان آنزیم LAR می باشد . آنزیم LAR یک مونومر ۴۳ کیلودالتونی با ۳۸۲ اسیدآمینه می‌باشد که سنتز کتکین را از لئوکوسیانیدین کاتالیز می کند وشامل اولین مرحله‌ای است که تنها در مسیر بیوسنتز فلاونوئید ها باعث ایجاد CT می شود . آنزیم LAR بطور طبیعی فقط در بافتهای شامل تانن تظاهر می یابد . ژن *LAR* در برگهای یونجه دیده نشده و فقط در طی نمو اولیه بذر قابل شناسایی می‌باشد. تحقیقات بیشتر نشان داده که ژن *BAN* رمزگردان آنتوسیانیدین‌ردکتاز (ANR) است که باعث تبدیل آنتوسیانیدین‌هایی مانند دلفینیدین، پلارگونیدین و سیانیدین به ترتیب به (-)-epicatechin، (-)-epiafzelechin، (-)-epigallocatechin که از گروه 2,3-cis-2R,3R-flavan-3-ols می‌باشند (Joseph و همکاران ، ۱۹۹۸ و Sylvie و همکاران ، ۱۹۹۷). بنابراین عدم فعالیت ژن *LAR* می‌تواند یکی از موانع اصلی برای تجمع CTها در برگهای یونجه بشمار آید.

مواد وروشها

الف–کلیات: بذرهای گیاهان *M.sativa* var. Rgsy 27 و *M. sativa* var. adriana (P1) در گلدانهای محتوی ماسه– خاک برگ به نسبت (۱:۲) در گلخانه‌ای با ۶۰ درصد رطوبت نسبی ودوره نوری ۱۶ ساعته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در روز و ۱۵ درجه سانتیگراد در شب و دو ره آبیاری متناوب کشت شدند. برای انجام آزمایشهای کشت بافت و عمل تراریزش از برگهای نسبتا جوان وسالم متعلق به گیاهان ۴ تا ۶ هفته ای استفاده شد. پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۷ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه و در نهایت ۳ بار شستشو با آب مقطر

استریل، برگها به قطعات مربع شکل کوچک (۵×۵ میلیمتر مربع) تقسیم شده ودر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع M_1 حاوی نژادهای آگروباکتریوم ، قرار گرفتند . قطعات برگی موجود در محیط کشت آلوده به آگروباکتریوم به مدت ۲۰ دقیقه در محیط خلا ء با فشار ۶۵۰Psi و بعد جهت نفوذ آگروباکتریوم‌ها، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱تا۳ ساعت قرار گرفتند. بعد از خشک کردن قطعات برگی در شرایط سترون و خارج نمودن محلول باکتریایی، نسبت به انتقال قطعات برگ به محیط کشت جامد M_2 بدون آنتی بیوتیک و محتوی استوسیرینگون (۹/۸ میلی‌گرم بر لیتر)اقدام شد و به مدت ۳ روز در تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند . جهت ایجاد و القاء کالوس پیش جنین‌زا، بعد از شستشوی قطعات برگی با آب مقطر سترون 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 سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند و هر دو هفته یک بار محیط کشت تعویض شد. جهت جنین‌زایی، کالوسهای ایجاد شده به محیط کشت جامد M_4 که فقط شامل ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و فاقد هر گونه هورمون بود انتقال داده شدند و در شرایط ۱۲ ساعت نور با میزان روشنایی ۱۳۰ $\mu E/m^2/s$ نگهداری شدند. بعد از ایجاد گیاهچه، جهت ریشه‌زایی به محیط کشت بدون هورمون ½ M_4 انتقال یافتند. پس از ۲ تا ۴ هفته،گیاهان تراریخته بدست آمده به گلخانه ای با شرایط ویژه انتقال داده شدند به نحوی که گیاهان در روزهای اول در شرایط کاملا مرطوب قرار گرفتند و بعد شرایط رشدی تغییر یافته و به صورت طبیعی در آمد.

ب- محیطهای کشت مورد استفاده: برای استقرار قطعات برگی تراریخته شده، ایجاد کالوس، القاء جنین‌زایی و تولید گیاهچه و گیاه کامل از محیط های کشت M_1، M_2،

M_3، M_4 که ترکیبی از ۴ محلول متفاوت و مناسب جهت گیاه یونجه بود استفاده شد (Hesamzadeh و همکاران ، ۲۰۰۴).

ج- نژادهای *Agrobacterium tumefaciens* و پلاسمید ها: در این تحقیق جهت تولید گیاهان تراریخته از دو نژاد *A. tumefaciens* استفاده شد. هرچند نژاد LBA 4404 برای تراریزش گیاه توتون بسیار مؤثر بوده است ولی این نژاد برای تراریزش تمام گونه‌های یونجه مؤثر نبوده است (Kamate و همکاران ، ۲۰۰۰؛ Hellens و همکاران ، ۲۰۰۰ و Trieu و همکاران، ۲۰۰۰). در این مقاله علاوه بر نژاد LBA 4404، از نژاد EHA105 نیز استفاده شد. پلاسمید pBI121.1 با اندازه ۱۴/۷۵۸ کیلو جفت باز که به‌عنوان ناقل دوتایی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت از ترکیب ناقل دوتایی pBIN19 با اندازه ۱۱/۷۷۷کیلو جفت باز و کاست GUS حاصل شد. T-DNA این ناقل دوتایی حامل ژن *npt*II [1] (نشانگر انتخابی که باعث ایجاد مقاومت سلول های گیاهی تراریزش شده به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود) و ژن *uidA* از *E. coli*،که رمزگردان ژن *gus* است بود. ژن‌های *npt*II و *uidA* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S بودند.

پلاسمید pRK2013 با اندازه ۴/۸ کیلو جفت باز به‌عنوان پلاسمید کمکی (Helper) مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید pBI121.*BAN* با اندازه ۱۴/۰۸۱ کیلو جفت باز که با جایگزینی ژن *BAN* (موجود در بانک ژن مؤسسه تحقیقات ژنتیک گیاهان علوفه ای- ایتالیا) به جای ژن *gus* با برش پلاسمید pBI121.1 بوسیله آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I و حذف ژن *gus* ایجاد شد. ژن *BAN* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS[2] قرار گرفت. این پلاسمیدها بوسیله تکنیک آمیزش سه والدینی [3] (Walker Peach و Velten، ۱۹۹۴) به نژادهای آگروباکتریومی EHA 105 و LBA 4404 انتقال

1- Neomycin phosphotransferase II (npt II)

2- Nopalin synthase 3’ terminator

3- Three Parental Mating

داده شد و جهت تشکیل کلونی روی محیط کشت YEP شامل آنتی بیوتیک های ریفامپیسین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر)قرار گرفته و جهت رشد به مدت ۲ روز در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند . جهت صحت کلونی‌های تشکیل شده از نظر وجود ژن *BAN*، با استفاده از جفت پرایمرهای:

5’-GGCGACCTGAAGATCTTCAAG-3’ : جلو رونده

و 5’-GTCACATGCATTTCTTTCCCG-3’ : معکوس، برای تشخیص ژن *BAN* از روش PCR استفاده شد.

د- جدا سازی DNA ژنومی و تجزیه و تحلیل ساترن بلات: استخراج DNA ژنومی گیاه مطابق روش Chang (Chang و همکاران، ۱۹۹۳) و تجزیه و تحلیل ساترن بلات بر طبق روش Sambrook انجام شد (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹). ۱۰ میکروگرم DNA بعد از هضم توسط آنزیم *Bam*HI روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز و سپس به غشاء نایلونی +Hybond N (Amersham) منتقل شد. غشاء متوالیا با پروب‌های نشاندار *BAN* و *npt*II هیبرید شد. برای تهیه پروب، با استفاده از روش (کلنی- PCR) (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹) و استفاده از پرایمرهای مخصوص جهت ژن‌های *BAN* و *npt*II نسبت به تکثیر قسمتی از ژن‌ها اقدام شد و پس از جدلسازی در ژل آگارز ۱٪ نوارهای ایجاد شده به ترتیب در محل تقریبی ۵۰۰ و ۷۰۰ جفت باز بریده شد و توسط کیت مخصوص (QIAEX II) ساخت شرکت QIAGEN ایتالیا، DNA مربوط به پروب ها استخراج و خالص شدند. تهیه پروب *npt*II با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای:

5’-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3’ :جلو رونده و

5’-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3’ :معکوس، مطابق با ۷۰۰ جفت باز قطعه PCR حاصل از نوکلئوتید های پایین دست محل شروع ترجمه *npt*II انجام شد.

تهیه پروب *BAN* با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای -5’ :

GGCGACCTGAAGATCTTCAAG -3’ : جلو رونده

و 5’- GTCACATGCATTTCTTTCCCG -3’ : معکوس، مطابق با ۵۰۴ جفت بازقطعه PCR قرار گرفته میان نوکلئوتیدهای ۲۲۲–۷۲۶ از توالی کامل ۱۲۱۳ جفت باز ژن *BAN* انجام شد.

جهت نشان دار نمودن پروب‌ها از کیت Ready-To-Go [DNA labeling Beads(-dCTP)] ساخت شرکت Amershame و $[\alpha - ^{32}P]$ dCTP استفاده شد.

ه–تجزیه و تحلیل RNA گیاهان تراریخته : تجزیه و تحلیل RT-PCR از سطوح رونویسی ژن *BAN*، ژن *LAR* (یکی از ژن های عمومی در مسیر بیوسنتز پروآنتوسیانیدین‌ها) و ژن خانه‌دار[1] *EF-1α* از لاین‌های انتخابی حامل CaMV-*BAN*، کل RNA عاری از DNA از بافت برگی گیاهان تراریخته و غیر تراریخته (کنترل)، با استفاده ازکیت مخصوص (Nucleo Spin RNA plant) محصول شرکت (Macherey-NAGEL) استخراج شد، و با استفاده از آنزیم Strata Script نسبت به سنتز اولین رشته cDNA اقدام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای:

5’- GGCGACCTGAAGATCTTCAAG -3’ : جلو رونده و

5’- GTCACATGCATTTCTTTCCCG -3’ : معکوس، برای ژن *BAN* و پرایمرهای

5'-AATCAGAAAAAGACCTCTCACC-3': جلو رونده و

5'-AGGGACATTGTACTCTGGATAT-3':معکوس، برای ژن *LAR* و پرایمرهای

5’-ATTGTGGTCATTGGCCACGT-3’: جلو رونده و

---

[1] House keeping gene(Elongation Factor-1α)

5’-CCAATCTTGTACACATCCTG-3’: معکوس، برای ژن خانه دار *EF-1α*، سطوح رونویسی *BAN* و *LAR* 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 سانتی‌گراد، ۳۵ دور سه مرحله PCR به ترتیب در دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۱۰ثانیه)، ۵۰ درجه سانتیگراد (۲۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۴۵ ثانیه) و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۷ دقیقه) عمل PCR صورت گرفت. جهت نرمال کردن و تأیید نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RT-PCR از ژن خانه دار *EF-1α*استفاده شد.

و–تعیین سطوح پلوئیدی در گیاهان تراریخته : برگهای ۴ تا ۶ هفته ای حاصل از گیاهان تراریخته رشد یافته در گلخانه ، جهت تعیین مقدار DNA هسته به روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACScan تحت بررسی قرار گرفتند (Johnson و همکاران، ۱۹۸۴ و Blondon و همکاران، ۱۹۹۴) و سطوح پلوئیدی آنها استنباط شد، در این راستا از گل اطلسی (*Petunia hybrida* L.) به عنوان استاندارد استفاده شده است (Marescalchi و همکاران، ۱۹۹۸). همچنین شمارش کروموزومی در گیاهان تراریخته و کنترل برای تعیین سطوح پلوئیدی جهت تأئید نهایی انجام شد.

ز– تجزیه و تحلیل HPLC[1]: جهت اثبات تغییر مواد فنلی موجود در گیاهان تراریخته ازروش HPLC استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل HPLC از دستگاهی با مشخصات (Varian polaris HPLC System) که شامل دو پمپ Prostar 210، یک

---

[1] High performance(pressure) liquid chromatography

آشکارگر UV مدل Prostar 320 و یک Prostar integrator جهت ثبت و تجزیه و تحلیل کروماتوگراف‌ها بود استفاده شد. سنجش‌ها با استفاده از دو ستون: ODS (4.6 * 250 nm , 10 µm) و ODS (4.6 * 100 nm , 5 µm) انجام شد. فاز متحرک متانول – آب به نسبت (۳۵ : ۶۵) و شدت جریان ۱/۵-۱ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد . میزان تزریق برای استاندارد و نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر بود. طول موج مورد استفاده در HPLC جهت یافتن میزان جذب UV در ترکیبهای‌ی مانند catechin-(+) و کوچکتر از آن، پلیمرهای پروآنتوسیانیدین قابل استخراج (به‌عنوان مثال دایمرها) برابر ۲۳۰، ۲۵۰، ۲۸۰ نانومتر استفاده شد و برای تشخیص پروآنتوسیانیدین موجود در رسوب های باقی مانده از طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد.

ح- سنجش شیمی بافتی پروآنتوسیانیدین ها در گیاهان تراریخته : سلول‌های شامل CT، بعد از حذف کلروفیلهای برگ و رنگ‌آمیزی با DMACA[۱] قابل مشاهده خواهند شد. با استفاده ازروش DMACA-HCl، پروآنتوسیانیدین‌های قابل حل حتی با مقادیر ناچیز، بطور کمی از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۴۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (Li، ۱۹۹۶). این معرف در واکنش با پروآنتوسیانیدین‌ها تحت شرایط اسیدی باعث ایجاد رنگ آبی می‌شود.

ط- سنجش مقدار فنل و تانن کل و میزان CT در گیاهان تراریخته و کنترل

جهت تعیین مقدار فنول‌ها و تانن‌ها معمولا از روش Butanol-HCl استفاده می‌شود. هر چند این روش ساده و مناسب برای حضور CT می‌باشد، اما خصوصیات شیمیایی تانن‌ها از جمله موقعیت پیوند Interflavan و بروز اکسیداسیون بطور معنی داری روی میزان رنگ مؤثر است به‌عنوان مثال در مواردی که پیوند Interflavan محکم باشد میزان رنگ شدیدتر است. روشهای اندازه‌گیری تانن‌ها ممکن است بر پایه مشخصات

---

[۲] 4-Dimethylamino cinnamaldehyde-HCL

شیمیایی تانن‌ها یا قابلیت پیوند با سوبستراها باشد . بر این اساس یکی از روشهای اندازه‌گیری شیمیایی تعیین مواد فنلی کل، تعیین تانن کل، تعیین CT می باشد . در این روش نمونه‌های برگی از گیاهان تراریخته و غیر تراریخته، پس از برداشت بلافاصله در نیتروژن مایع جهت انجماد بافتها قرار گرفت .سرپس عمل انجماد- خشک بر روی نمونه‌ها انجام شد. جهت استخراج فنل و تانن از حلال استن ۷۰٪ استفاده شد و عمل عصاره گیری طبق روش *هاگرمن* انجام گرفت (Hagerman و Butler، ۱۹۹۴). اندازه‌گیری فنل و تانن کل گیاه و مقدار CT در طول موجهای ۷۲۵ و ۵۵۰ نانومترانجام شد. مقدار درصد CT در ماده خشک، با قرائت میزان جذب در طول موج ۵۵۰ نان‌ومتر واستفاده از رابطه : (درصد ماده خشک)/(A_{550}×78.26×Dilution factor) =CT% محاسبه شد.

نتایج

میزان درصد کالوسهای پیش جنین‌زا و جنین‌زایی رویشی لاین های Rgsy27 و P1 از ریز نمونه‌های برگی روی محیط کشت M_2 با مقادیر، ۴ میلی گرم 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم BAP برای هر آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت (حسا م زاده و همکاران ، ۱۳۸۴). با استفاده از محیط کشت M_2، حداکثر بعد از ۱۶ روز تشکیل کالوسهای پیش جنین‌زا آغاز شد. با قرار گرفتن ریز نمونه ها بر محیط کشت M_2، ۹۰ درصد ریز نمونه‌های حاصل از لاین Rgsy27 و ۳۰ درصد ریز نمونه‌های حاصل از لاین P1 پس از چهار هفته کالوسهای جنینی تشکیل دادند. زمانی که کالوسهای پیش جنین‌زا حاصل از محیط کشت M_2 به محیط کشت M_4 منتقل شدند ، همگی کالوس های حاصل از لاین‌های Rgsy27 و P1 ایجاد جنین نمودند به استثنای لاین P1 تراریخته شده با آگروباکتریوم EHA 105 که جنینی ایجاد نشد (۵-۲ جنین بسته به نوع آگرو باکتریوم

استفاده شده در هر ریزنمونه برای لاین Rgsy27 و ۲-۰ جنین در هر ریزنمونه برای لاینP1) و۶۵ درصد این جنین‌ها به گیاهچه تبدیل شدند. گیاهان تراریخته حاصل از ریزنمونه برگی در مدت ۱/۵ تا ۲ ماه بدست آمد و از نظر سطوح پلوئیدی نیز هیچگونه تغییری در آنها مشاهده نشد. تعداد گیاهان تراریخته پایدار حاصل از لاین Rgsy27 توسط آگروباکتریوم نژاد LBA 4404 حامل ژن *BAN*، برابر۱۱۰ عدد و تعداد گیاهان تراریخته توسط آگروباکتریوم نژاد EHA 105 حامل ژن *BAN* برابر۱۰ عدد بود . تعداد گیاهان تراریخته پایدارحاصل از لاین P1 توسط آگروباکتریوم نژاد LBA 4404 حامل *BAN*، برابر ۷۵ عدد و تعداد گیاهان تراریخته پایدار توسط آگروباکتریوم نژاد EHA 105 حامل ژن *BAN* برابر صفر عدد بود . تعداد جنین در هر ریز نمونه در لاین Rgsy27 زمانی که نژاد LBA 4404 استفاده شد برابرپنج عدد وبرای نژاد EHA 105، دوعدد بود. تعداد جنین در هر ریز نمونه در لاین P1 زمانی که نژاد LBA 4404 استفاده شد، دو عدد و برای نژاد EHA 105 صفر بود . بنابراین کارایی تراریزش لاین‌های Rgsy27 و P1، به نژادهای مورد استفاده از*Agrobacterium tumefaciens* بستگی دارد. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگر انتخابی کانامایسین می‌تواند در هر دو لاین به نحو مؤثری مفید بوده و کارایی تراریزش لاین‌های مختلف یونجه به نژادهای آگروباکتریوم مورد استفاده بستگی دارد، بطوری‌که لاین‌های تراریخته Rgsy27 و P1 توسط ژن *BAN* با نژادآگروباکتریوم LBA 4404 بهترین واکنش را نسبت به تولید گیاهان تراریخته نشان داد(شکل شماره ۲).

حضور ژن *BAN* در۱۰ گیاه تراریخته همراه با گیاه غیر تراریخته به‌عنوان کنترل با استفاده از تکنیک ساترن بلات ، در لاین های Rgsy27 و P1 (شکل‌های شماره ۶-۳) مورد بررسی قرار گرفت. در هر حالت، یک قطعه داخلی (Internal fragment) از T-DNA و یک قطعه از کناره های T-DNA (Border fragment) به عنوان شناساگر استفاده شدند. اندازه‌های مورد انتظار از قطعات مخصوص هر ساختار در گیاهان تحت

بررسی به درستی تشخیص داده شد، به استثنای مواردی در لاین‌های تراریخته، که فاقد قطعه *BAN* و در مواردی هم که تعداد قطعات *BAN* بیش از یک نسخه مشاهده شد . تعداد Borderهای T-DNA تشخیص داده شده در این گیاهان ، نشان دهنده تعداد نسخه‌های T-DNA منتقل شده به ژنوم گیاهی است که از ۱تا ۵ نسخه متغ یربود . درگیاه‌ان تراریخته لاین‌ه‌ای Rgsy27 وP1 که حامل ژن *BAN* بودند، قطعات Border، هیبرید با پروب *npt*II مطابق با نسخه‌های چندگانه T-DNA الحاق شده به ژنوم گیاهی بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RT-PCR از سطوح رونویسی ژن *BAN*، ژن *LAR* (ژن عمومی برای مسیرهای بیوسنتز پروآنتوسیانیدین‌ها) وژن *EF-1α* (ژن خانه دار) از لاین‌های انتخابی حامل CaMV-*BAN*، نشان داد که تظاهرژن خانه دار *EF-1α* در تمام گیاهان تراریخته و گیاه کنترل بیان می‌شود. نحوه تظاهر ژن *BAN* با مقادیر افزایش یافته و کاهش یافته، *LAR* mRNA در مقایسه با لاین‌های کنترل مطابقت داشت . به بیان دیگو گیاهان تراریخته دارای تظاهر بالای ژن *BAN*، باعث افزایش تظاهر *LAR* نسبت به گیاه کنترل شدند و گیاهان تراریخته دارای تظاهر پایین ژن *BAN*، باعث کاهش تظاهر *LAR* نسبت به گیاه کنترل شدند. مقایسه نتایج ساترن بلات و RT-PCR نشان می دهد که در مواردی که هیچ و یا بیش از یک باند برای یک گیاه در ساترن بلات بدست آمده رونویسی ترانس ژن صورت نگرفته است (شکلهای شماره ۷ و ۸). در گیاهان تراریخته توسط ژن *BAN*، بدون رنگ‌آمیزی با معرفDMACA، تغییرات فنوتیپی واضحی قابل مشاهده نبود. تظاهر اکتوپیک ژن *BAN* در شاخ و برگ گیاه تراریخته یونجه باعث القاء تجمع CT شد که از طریق بررسی شیمی بافتی قابل تشخیص بود . عدم فعالیت ژن *BAN*، باعث افزایش مقدار رنگدانه قرمزآنتوسیانین شد. بنابراین این ژن به‌عنوان تنظیم کننده منفی در تولید رنگدانه‌ها شناخته شد(شکل شماره ۹).

گیاهان یونجه تتراپلوئید تراریخته توسط ژن *BAN* از نظر میزان پروآنتوسیانیدین محلول و نامحلول و فنل کل و فنل‌های غیر تاننی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند

ودر نهایت درصد تانن در ماده خشک گیاهان تراریخته و غیر تراریخته محاسبه گردید (جدول شماره ۱).درصد تانن در گیاه تراریخته P1 برابر ۰/۶ و درصد تانن در گیاه تراریخته Rgsy27 برابر۰/۵ محاسبه شد. در حالی‌که درصد تانن در گیاه غیر تراریخته P1 برابر ۰/۴ و در گیاه غیر تراریخته Rgsy27 برابر ۰/۲۶ می‌باشد.

سطح پلوئیدی ۲۰ گیاه تراریخته حاصل از لاین‌های Rgsy27 و P1 مورد بررسی قرار گرفت. تمام گیاهان تحت بررسی بدون تغییر در سطوح پلوئیدی در حالت تتراپلوئید باقی ماندند و اندازه ژنوم آنها با استفاده از دستگاه FACstar از ۳/۵۷ تا ۳/۶۲ پیکوگرم برای لاین‌های Rgsy27 وP1 متغیر بود. همچنین بررسی سیتوژنتیکی گیاهان تراریخته نشان داد که تعداد کروموزوم‌ها نسبت به گیاهان کنترل تغییری نداشتند . بنابراین باززایی با روش شرح داده شده هیچ نوع تغییری درسطوح پلوئیدی وتعداد کروموزوم‌های گیاهان باززایی شده بوجود نیاورده است (شکل‌های شماره ۱۰ و ۱۱).

نتایج تجزیه و تحلیل HPLC جهت بررسی و مقایسه زمان بازداری پیک (+)-catechin و (-)-epicatechin نمونه‌های گیاهان تراریخته با پیک استاندارد در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان داد که زمان بازداری (RT) به‌ترتیب در زمان ۲۰ دقیقه و ۳۲ دقیقه می‌باشد. پروفیل حاصل از عصاره برگ لاین‌های گیاهان تراریخته و غیر تراریخته از نظر وجود ماده کتکین و اپی‌کتکین در طول موج ۲۸۰ نانومتر ، نشان دهنده تفاوت در میزان این مواد در گیاهان می‌باشد (نمودار شماره ۲).

نمودار HPLC حاصل از عصاره برگ لاین‌های تراریخته، حضور سیانیدین آزاد شده از پروآنتوسیانیدین استخراج شده توسط هیدرولیز بوتانول- هیدروکلراید را نشان داد. این نمودار با نمودار حاصل از سیانیدین استاندارد و گیاه کنترل در طول موج ۵۲۰ نانومتر مقایسه شد و تغییرات سیانیدین در گیاهان کنترل و تراریخته در زمان ۳۷ دقیقه با پیک ایجاد شده مشخص شد (نمودار شماره ۱).

بحث

نتایج ذکر شده نشان می‌دهد که محیط های کشت M1، M2، M3 و M4 جهت جنین‌زایی در گونه تتراپلوئید جنس *Medicago* بسیار مناسب است. در تراریزش گیاه یونجه چندین عامل از جمله نژاد آگروباکتریوم، گونه و واریته 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 پلوئید ی قبل ازعمل تراریزش باقی ماندند، بنابراین استفاده از محیط‌های کشت مورد استفاده برای باززایی ، نسبت به تغییرسطوح پلوئیدی مؤثر نمی‌باشند و علت این امر احتمالا نتیجه تیمار هورمونی در زمان بسیار کوتاه می‌باشد.

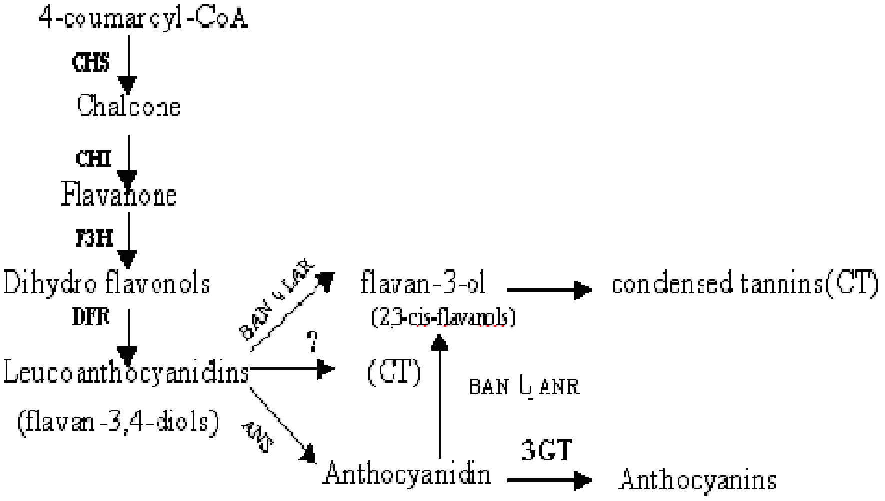
نژاد باکتری LBA 4404 برای هر دو لاین مورد استفاده، عمل انتقا ل ژن را بهتر از نژاد دیگر انجام می‌دهد. با این وجود لاین P1 نسبت به لاین Rgsy27 از نظر تراریخت شدن و ایجاد گیاهان تراریخته، زمانی که از نژاد باکتری LBA 4404 استفاده شد برتر بود. تجزیه و تحلیل ساترن بلات نشان داد که لاین‌هایی که حامل دو نسخه یا بیشتر ترانس ژن هستند، نشانه ای از آزمایشهای Co-transformation در یونجه می باشند . گیاهان تراریخته‌ای که حامل چند ین نسخه از ژن *BAN* بودند تظاهر ژن *BAN* آنها کاهش یافته و یا کلا خاموش شدند. تجزیه و تحلیل RT-PCR نشان داد که در گیاهان تراریختی که ژن *BAN*، تظاهر یافته (با یک نسخه) میزان تظاهر ژن *LAR* افزایش یافته است و تظاهر ضعیف ژن *BAN* (افزایش تعداد نسخه های ژن *BAN* در گیاهان تراریخت) باعث کاهش در تظاهر ژن *LAR* شده است. در مسیرهایی که باندی برای ژن *BAN* حضور ندارد ولی در Borderها وجود دارد نشان‌دهنده این است که قسمتی از T-DNA به ژنوم گیاه منتقل شده است. همچنین باندهای نابجایی که در تعدادی از گیاهان

تراریخته ایجاد شده احتمالا به‌دلیل برش و کوتاه شدگی یکی از محل‌های *Bam*HI در T-DNA می‌باشد که در اثر برش، تعدادی از نسخه های T-DNA در این لاین‌ها رخ داده است. بعضی از گیاهان تراریخته به‌طور کلی فاقد باندی در ساترن بلات بودند ولی قطعه متصل به سمت راست (RB) در این لاین‌ها تشخیص داده شد که نشان دهنده انتقال حداقل، قسمتی از T-DNA در لاین‌های تراریخته می‌باشند. در صورتی که ژن *BAN* در گیاه تراریخته تظاهر نماید بر اساس تجزیه و تحلیل HPLC، می توان چنین گفت ک ه در طول موج ۲۸۰ نانومتر، آنزیم های مؤثر در مسیر انتهایی بیوسنتز پروآنتوسیانیدین مانند کتکین و اپی‌کتکین نسبت به گیاهان کنترل افزایش می یابند. بنابراین نتایج ما برای اولین‌بار در دنیا نشان داد که نقش ژن *BAN* از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا در گیاه یونجه تراریخته می تواند به نحو مؤثری بر تظاهر آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدین‌ها مؤثر باشد. به بیان دیگر نقش ژن *BAN* در تولید گیاه یونجه ضد نفخ مؤثر است.

جدول شماره ۱- سنجش کمی پروآنتوسیانیدین‌ها در گیاهان تراریخته

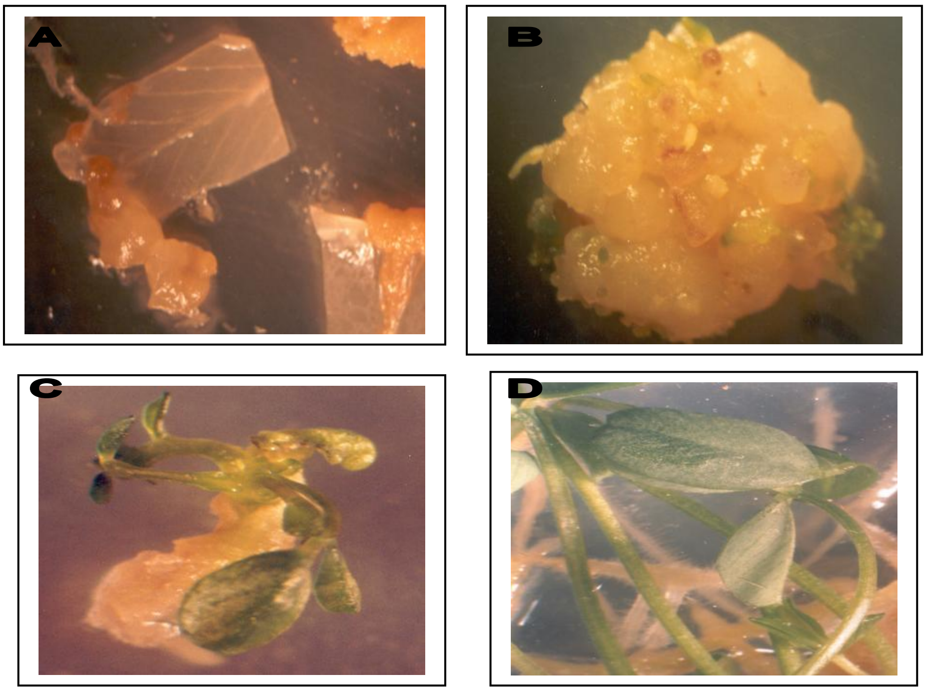
Y(#TA) µg	%(X-Y)	%Y	%X	فنل غیر تاننی(Y) میزان جذب در nm ۷۲۵ به مدت ۴۰دقیقه،	X(#TA) µg	میزان جذب درnm ۵۵۰ به مدت ۲۵ دقیقه	فنل کل(X) میزان جذب در nm ۷۲۵ به مدت ۴۰دقیقه	میزان جذب در nm ۶۴۳ به مدت ۲۵ دقیقه	لاین
۰/۴۶۶۰	۰/۴۰۸	۰/۰۵۲	۰/۴۷۰	۰/۰۲۵۴	۴/۲۴۸۰۰	۰/۵۱۷۰	۲/۳۱۴۹	۰/۰۷۲۵	P1(200mg)
۰/۸۶۲۰	۰/۲۵۹	۰/۰۴۲	۰/۳۰۱	۰/۰۴۶۵	۲/۷۱۲۰۰	۰/۹۶۱۵	۱/۴۹۷۲	۰/۰۷۱۲	Rg(200mg)
۱/۰۹۱	۰/۶۰۰	۰/۱۲۱	۰/۷۲۲	۰/۰۶۱۱	۶/۴۹۵۲	۰/۲۴۶	۳/۵۳	۱/۴۶	P1+ BAN
۱/۷۵۲	۰/۴۷۴	۰/۱۹۵	۰/۶۶۹	۰/۰۹۸	۶/۰۱۹	۰/۲۲۸	۳/۲۸	۱/۵۷	Rg + BAN

X% : درصد مقدار کل فنل در ماده خشک ، Y% : درصد مقدارفنل‌های غیر تاننی، (X-Y)% : درصد مقدار تانن در ماده خشک، TA : اسید تانیک

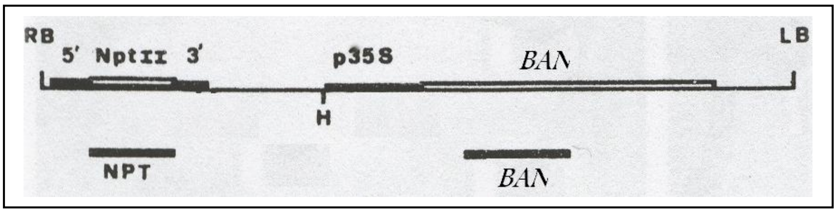

4-coumarcyl-CoA
CHS
Chalcone
CHI
Flavanone
F3H
Dihydro flavonols
DFR
Leucoanthocyanidins
(flavan-3,4-diols)
BAN L LAR
?
ANS
flavan-3-ol
(2,3-cis-flavanols)
(CT)
BAN Ŀ ANR
Anthocyanidin
3GT
Anthocyanins
condensed tannins(CT)

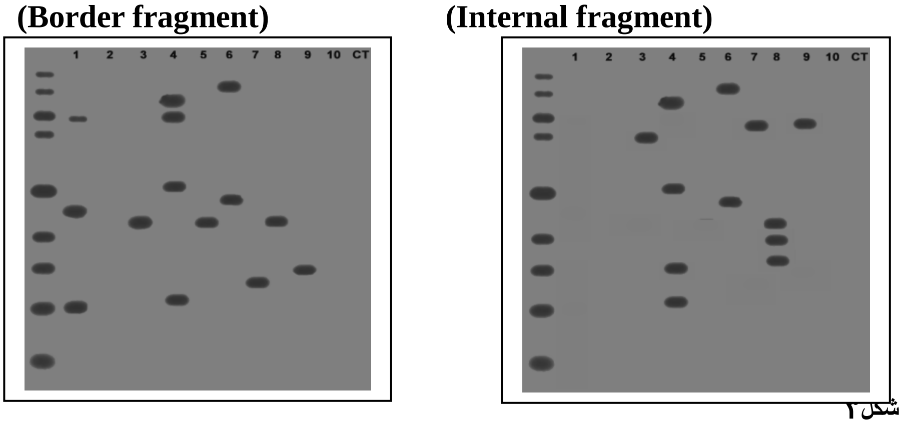
شکل شماره۱- جایگاه سنتز **CT** ها در مراحل انتهایی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و تأثیر ژن ***BAN*** بر تولیدپروآنتوسیانیدین(Bloor & *etal,1998)*

CHS: Chalcone synthase, CHI: Chalcone isomerase, F3H : Flavanone 3-hydroxylase , DFR: Dihydroflavonol 4-reductase, ANS: Anthocyanidin synthase, 3GT: 3 Glucosyl transferase

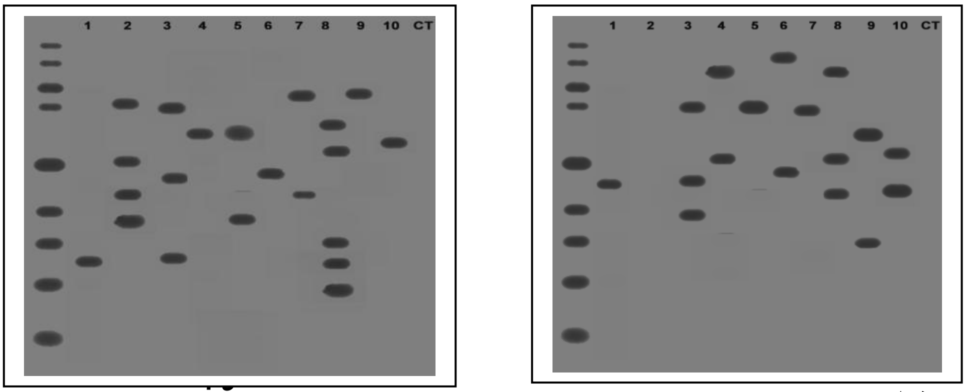


شکل شماره ۲- (A) مراحل اولیه تولید کالوس روی ریز نمونه‌ها (B) تشکیل کالوس پیش جنین‌زا (C) گیاهچه حاصل از ریزنمونه‌های تراریخته(D) گیاه کامل حاصل از ریزنمونه‌های تراریخته


RB
5' NptII 3'
p35S
BAN
LB
H
NPT
BAN


(Border fragment) (Internal fragment)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CT
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CT

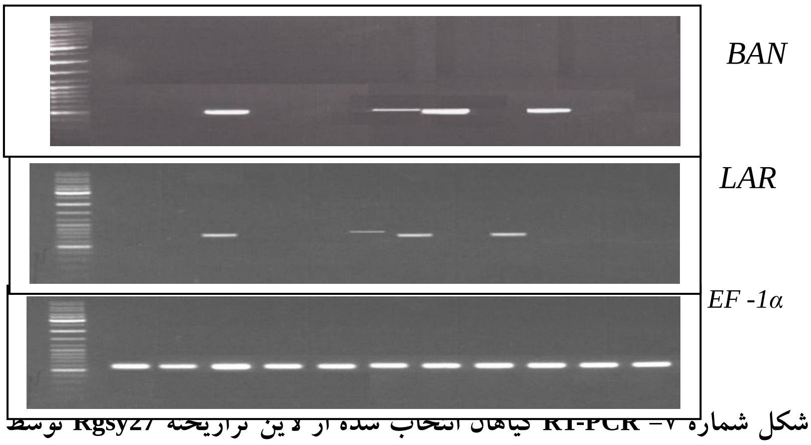
شکل۲


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CT
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CT

شکل۵

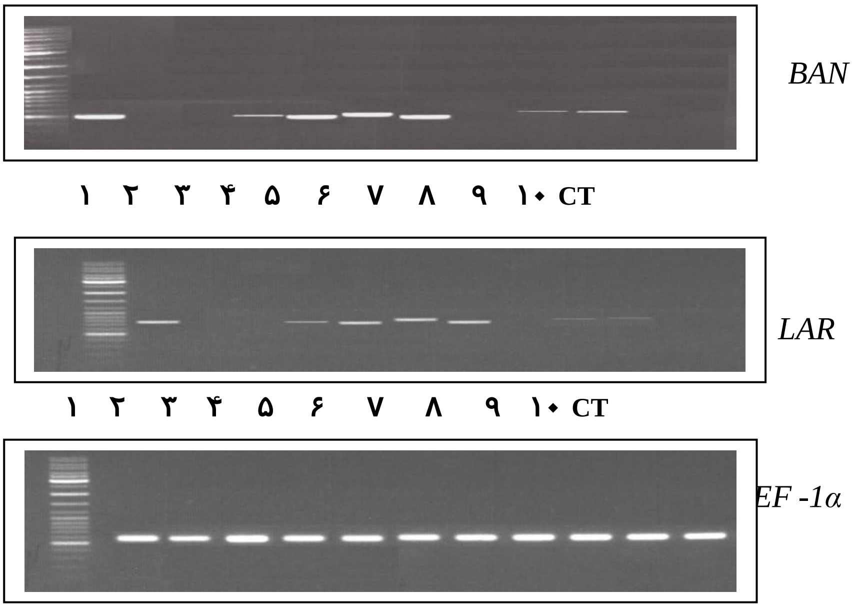
شکل‌های شماره (۶ – ۳) تجزیه و تحلیل ساترن بلات: (۳) تعداد Bor از T-DNA حامل ژن *BAN* در لاین Rgsy27(۴) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *BAN* در لاین Rgsy27 (۵) تعداد Bor از T-DNA حامل ژن *BAN* در لاینP1 (۶) تعداد Int از T-DNA حامل ژن *BAN* در لاین P1 . (CT) نشان دهنده گیاه کنترل است.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰CT

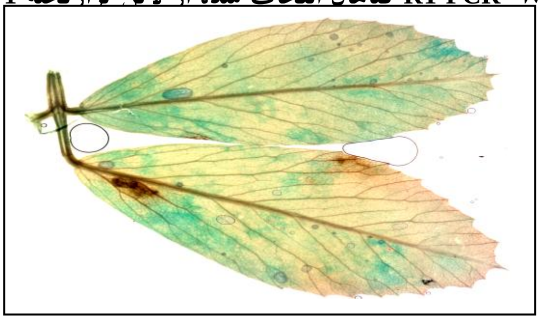

BAN
LAR
EF -1α

شکل شماره ۷– RT-PCR گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته Rgsy27 توسط ژن *BAN*

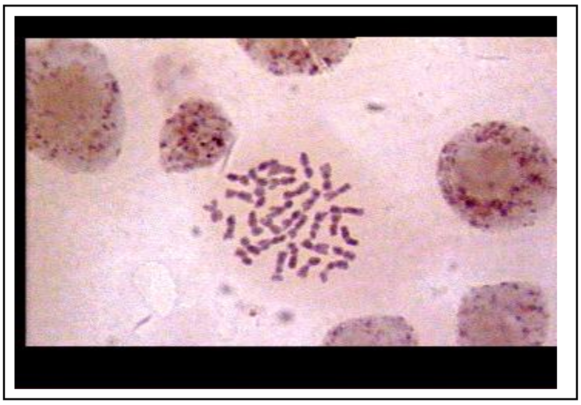
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ CT


BAN
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ CT
LAR
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ CT
EF -1α

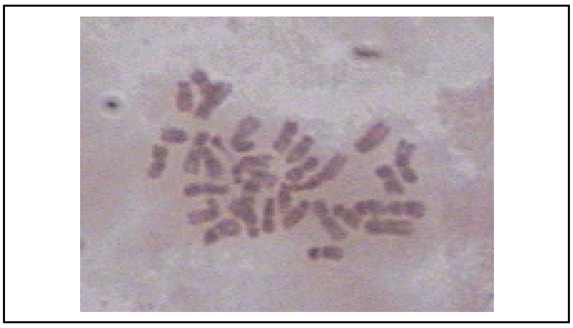
شکل شماره ۸– RT-PCR گیاهان انتخاب شده از لاین تراریخته P1 توسط ژن *BAN*



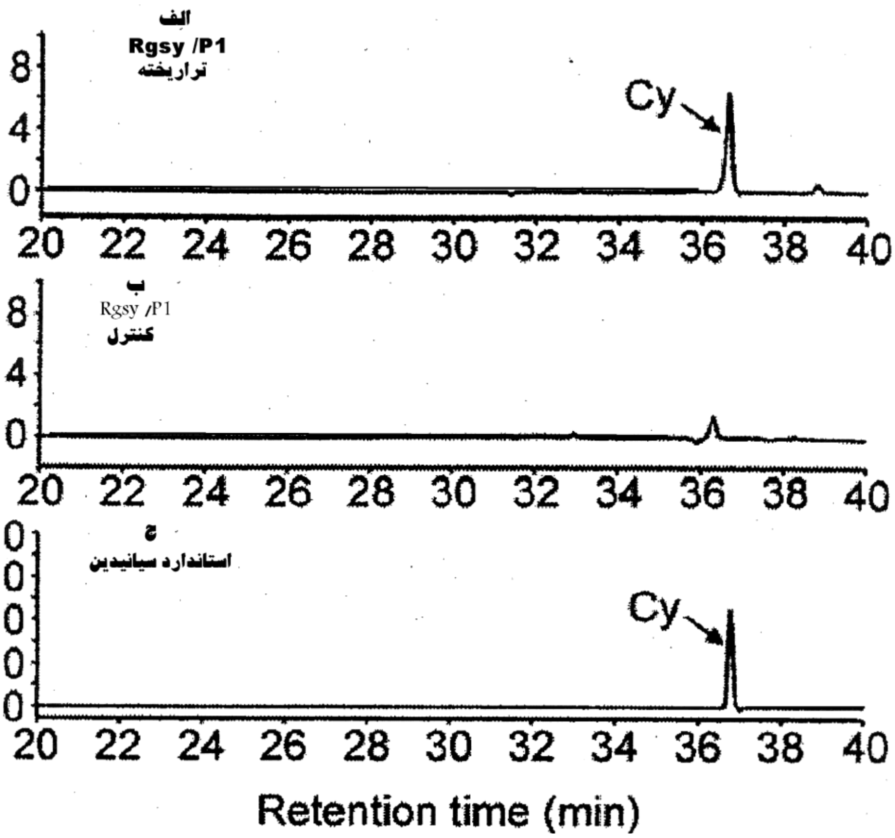
شکل شماره ۹- برگهای یونجه تراریخته و ظهور رنگ آبی پس از تیمار با DMACA



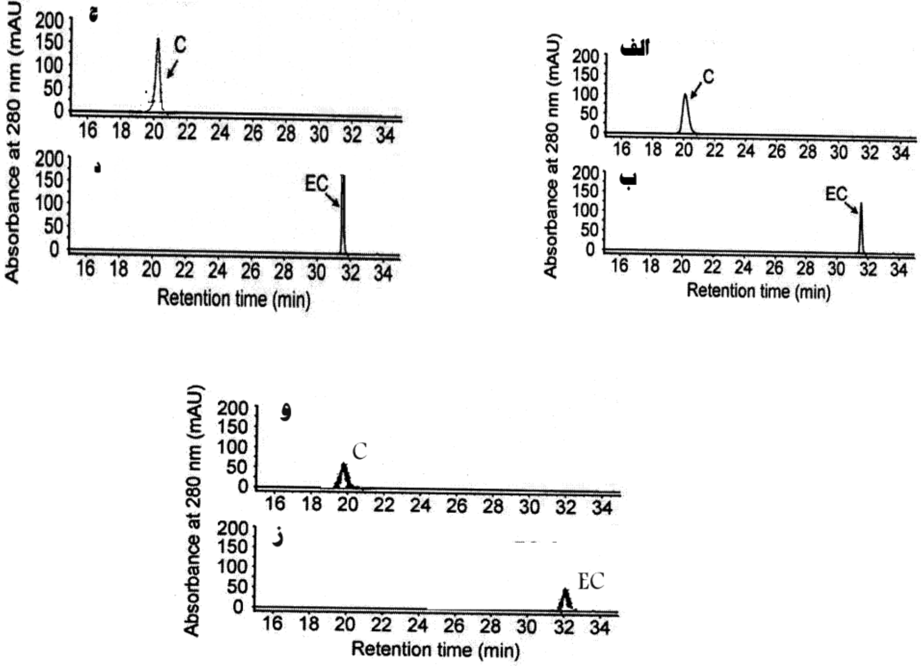
شکل شماره ۱۰- تعداد کروموزوم‌های لاین Rgsy27 تراریخته با ژن *BAN* (2n=2x=32)



شکل شماره ۱۱- تعداد کروموزومهای لاین P1 تراریخته با ژن *BAN* (2n=2x=32)



نمودار شماره ۱- الف) نمودار HPLC حاصل از عصاره بوگ لاین‌هاي تراریخته، حضور سیانیدین آزاد شده از پروآنتوسیانیدین استخراج شده توسط هیدرولیز بوتانول- هیدروکلراید. ب) گیاه کنترل ج) استاندارد سیانیدین



نمودار شماره ۲ - پیک ایجاد شده در ۲۸۰ نانومتر برای الف) کتکین استاندارد ب) اپی‌کتکین استاندارد ج) افزایش میزان کتکین در یونجه تراریخته با ژن **BAN** د) افزایش میزان اپی‌کتکین در یونجه تراریخته با ژن **BAN** ز) میزان کتکین و اپی‌کتکین در گیاه کنترل

منابع

حسام زاده حجازی ،س.م. و همکاران ۱۳۸۴.روش تراریزش سریع با کارایی بالا در یونجه های دیپلوئید و تتراپلوئید برای تظاهر ژن *Sn* و بتا- گلوکورونیداز (*gus*). مجله علوم کشاورزی ایران، جلد۳۶، شماره۴.

Blondon, F., Marie , D., Brown, S., Kondorosi, A., 1994. Genome Size and base Composition in *Medicago sativa* and *M.truncatula* species. Genome, 37: 264-270.

Bloor, S.J, Bradley, J.M, Lewis, D.H, Davies, K.M, 1998. Identification of flavonol and anthocyanin metabolites in leaves of *Petunia* "Mitchell" and its *Lc* transgenic. Phytochemistry 49: 1427–1430.

Bovy, A. R. de Vos, Kemper, M, Schijien, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., van Tunen, A.,2002.High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC* and C1. The Plant Cell, 14: 2509-2526.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J., 1993.A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol.Biol.Rep., 11:113-116.

Chu, C.C., Proc.Sym.Plant tissue culture 1978. Science Press, Peking: pages 45-50.

Dellaporta, S.L., Greenblatt, I.M., Kermicle, J.L., 1988.Molecular cloning of the *R-nj* gene by transposon tagging with Ac. In Chromosome Structure and Function: impact of new concept, J.P.Gustafson and R.Appels, eds(New York: Plenum Press), pp.263-282.

Goodrich,J.,Carpenter, R.,1992.A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. Cell 68, 955-964.

Gruber, M. y., H. Ray, 2002. Novel regulatory genes involved in condensed tannins synthesis in plants. US. Patent No# 2000022156.

Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1994. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. Meth Enz , 234: 429-437.

Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. 2000 A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors.Trends in Plant Sci. 5 : 446-451.

Hesamzadeh Hejazi ,S.M., Abde-Mishani, S., Arcioni , S., Alizadeh, H., Tavakol Afshar, R. , Hosseinzadeh, A., 2004.Production of bloat safe alfalfa plants through genetic transformation.Ph.D thesis, University of Tehran, IR.

Holton, T.A., Edwina, C.C., 1995.Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis.The Plant Cell, 7: 1071-1083.

Jende-Strid, J. 1993. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. Hereditas. 119: 187-204.

Johnson, L.B., Schlarbaum, S.,E., Skinner, D.Z., 1984.Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclones regenerated from nonmutagenized calli, Crop. Sci., 24: 948-952.

Joseph, R., Tanner, G. and Larkbl, P.,1998. Proantbocyanidin synthesis in the forage legume *Onobrychis viciifolia* -a study of chalcone synthase. Dihydroflavonol 4-reductase and leucoantho cyanidin 4- reductase in developing leaves. Aust. J. Plant Physiol. 25: 271-278.

Kamate, K., Rodriguez- Llorente, I.D., Schotle, M., Durand, P., Ratet, P., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Trinh, T.H.,2000. Transformation of floral organs with GFP in *Medicago Truncatula* .Plant Cell Rep.19: 647-653.

Koornneef, M., Dellaert, L.W.M. and van der Veen, J.H. 1982a.EMS and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mutation Res. 93:109-123.

Koornneef, M., Luiten, W., de Vlaming, P. and Schram, A.W. 1982b. A gene controlling flavonoid-3'-hydroxylation in *Arabidopsis. Arab. Inf. Serv.* 19:113-115.

Li, Y.G., Tanner, G.J., Delves, A.C., Larkin, P.J., 1993.Symetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. and *Onobrychis vicifolia* Scop.Theor.Appl.Genet. 87: 455-463.

Li, Y.G. Tanner, G.J., Larkin, P.J., 1996. The DMACA-HCL protocol and the threshold proantho cyanidin content for bloat safety in forage legumes. J. Sci. Food Agric. 70: 89-101.

Ludwig, S.R., Habera, L.F., 1989. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region .Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86, 7092-7096.

Marescalchi, O., Seali, V., 1998. Flow-Cytometric analysis of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (insecta, Phasmatodea). Genome, 41 : 629-635.

Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M.,1993.regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. Plant Cell 5, 1497-1512.

Rob,J. A., Barry, T.N. , McNabb, W.c.,2000. Review paper for polyphenols and agriculture :beneficial effects of proanthocyanidins in forage.Agri.Ecosystems and Environment, 75 : 1-12.

Rumbaugh, M.D., 1985. Breeding bloat-safe cultivars of bloat-causing legumes, in:Barnes, R.F., Ball, P.R., Bringham, R.w.,(Eds.) Forage legumes for Energy-Efficient Animal Production.USDA, Washington.Proc.Bilaternal Workshop, Plamerston North, NZ, April 1984, pp.238-245.

Sambrook, J., Fritsch, E f., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning : A laboratory manual- Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2nd.

Scalbert, A.1991.Antimicrobial properties of tannins.Phytochemistry 30: 3875-3883.

Schenk, R. U. and Hildebrant, A. C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.Can. J. Bot. 50:199-204.

Susan Marles, M.A., Ray, H., Gruber, M. Y., 2003.New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation Phytochemistry 64 :367-383.

Sylvie, A., Delseny, M., Devic, M., 1997. *BANYULS*, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. The Plant J.11(2): 289-299.

Szymanski, D.B., Klis, D.A., Larkin, J.C., Marks, M.D., 1998. A regulator of Arabidopsis trichome initiation. Genetics. 149: 565-77.

Tanner, G.J., Joseph, R.G., Li, Y.G., Larkin, P.J., 1997.Towards bloat safe pastures, Feedmix, University of Cambridge. UK.

Tonelli, C., Consonni, G., Dolfini, S.F.,1991. Genetic and molecular analysis of *Sn*, a light–inducible, tissue specific regulatory gene in maize. Mol.Gen.Genet. 225: 401-410.

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.

Walker Peach, CR, Velten, J., 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.

Winkel-Shirley, B., 2001.Flavonoid biosynthesis.A colorful model for genetic ,biochemistry,cell biology, and biotechnology. Plant Physiol., 126: 485-493.