زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹٤

بهبود انتقال ژن در گیاه دارویی کالانکوئه
(*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.)

محسن ثانی خانی*[1]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۰

چکیده

یکی از کاربردهای انتقال ژن ، تولید محصولات تراریخته با کاربردهای مختلف از جمله تولید متابولیت های ثانویه ارزشمند می باشد. در این بررسی راهکارهای کسب موفقیت در انتقال ژن به گیاه کالانکوئه (*Kalanchoe blossfeldiana*) که دارای مصارف تزئینی و کاربرد در طب سنتی در برخی کشورها می باشد تشریح می گردد. باززایی درون شیشه ای می تواند برای تکثیر سریع ارقام بدیع و نوظهور گیاهان در کوتاه ترین زمان ممکن و نیز بعنوان یکی از شرایط موفقیت در دستورزی ژنتیکی جهت تولید متابولیت های ثانویه در بیورآکتورها و یا مزارع تولید داروهای نوترکیب خاص مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق جهت ارزیابی کارایی انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم تومفاشینس (*Argobacterium tumefaciens*) از پلازمیدpBI121 که واجد دو ژن *gus* و *nptII* بود استفاده گردید. از عوامل مهم در موفقیت انتقال ژن می توان به عواملی از قبیل مدت هم کشتی با آگروباکتریوم و نوع ریز نمونه اشاره نمود.گیاهان باززا شده در محیط کشت انتخابی که به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت دادند با تولید مقادیر بالای پروتئینNPTII قابل تشخیص با روش ELISA تا یک سال پس از هم کشتی با آگروباکتریوم بعنوان گیاهان تراریخته دارای ثبات بالای بیان ژن در نظر گرفته شدند.

واژگان کلیدی : بیان ژن، تراریخته، GUS، NPTII

[1] . عضو هیات علمی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان (sani@znu.ac.ir)

مقدمه

گیاه کالانکوئه با نام علمی *Kalanchoe blossfeldiana* متعلق به خانواده کراسولاسه (Crassulaceae) می باشد (Izumikawa et al., 2007). گیاهان این خانواده دارای بیش از ۱۴۰ گونه بوده و از خصوصیات بارز آنها چرخه متابولیسمی کراسولاسهای CAM: Crassulacean Acid (Metabolism) می باشد که باعث افزایش کارایی فتوسنتزی در این گیاهان می شود(Gehrig et al., 1995; Gehrig et al., 1997).

در خانواده کراسولاسه تطابق بین جنس ها از نظر امکان گرده افشانی و تلاقی بین گونه ای میسر بوده که این مساله در اصلاح و به نژادی این گیاهان بعنوان شاخصی مثبت در افزایش تنوع بین گونه ای موثر می باشد(van Voorst and Arends 1982; Izumikawa et al., 2007). مزیت دیگر گیاهان این خانواده امکان تلاقی بین گونه ای در بین آنهاست. بنابراین در صورت انتقال ژن و معرفی ژنها و صفات نوظهوری که در بین گیاهان این خانواده وجود ندارند صفات انتقال یافته می توانند در بین گونه ها و حتی جنس ها از طریق تلاقی بین گونه ای انتقال یابند. گیاه کالانکوئه دارای قابلیت رشد و تولید پیکر رویشی مناسب خصوصا در شرایط کنترل شده گلخانه ای بوده و همچنین از امکان انطباق با تکثیر درون شیشه ای بطور قابل ملاحظه ای برخوردار می باشد (Sanikhani et al., 2006; Shagufta et al., 2009).

از سالهای پایانی قرن بیستم اهداف مختلفی برای بهبود محصولات کشاورزی با استفاده از زیست فناوری مورد توجه بوده است. هدف تولید محصولات تراریخته نسل اول افزایش مقاومت نسبت به علف کش ها، حشرات و عوامل بیماری زا بوده است. هدف عمده در تولید محصولات تراریخته نسل دوم ایجاد تغییرات در گیاهان زراعی به منظور افزایش ارزش غذایی و محتوای درونی محصولات مختلف از قبیل اسید های آمینه، اسید های چرب، ویتامین ها و کاهش برخی ترکیبات ناخواسته ازقبیل لیگنین بوده است. همچنین تولید مواد غذایی فتوسنتزی بستگی به بالا بودن میزان تثبیت دی اکسید کربن اتمسفر توسط گیاه و تبدیل آن به ترکیبات آلی قندی و سایر ترکیبات فتوسنتزی دارد که در این خصوص افزایش کارایی فتوسنتزی گیاهان از طریق تغییر در آنزیم های چرخه های متابولیسمی مرتبط با فتوسنتز مورد توجه می باشد (Christou and Capell, 2009).

در حال حاضر گرایش زیادی به استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان بیورآکتور های تولید کننده دارو های با ارزش از قبیل آنتی بادی ها، واکسن ها و نیز تولید ترکیبات غذایی با ارزش تغذیه ای بالا، هورمون ها و آنزیم های صنعتی بوجود آمده است. در نتیجه استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان موجودات تولید کننده ترکیباتی با ارزش در صنایع شیمیایی و دارویی از قبیل واکسن های حیوانی و انسانی و انواع داروهای کمیاب معطوف شده است(محصولات تراریخته نسل سوم)(Gupta et al., 2013; Christou and Capell 2009).

انتقال ژن هایی خاص جهت تولید متابولیت های ثانویه ارزشمند در موجودات مختلف از جمله باکتری ها و گیاهان در شرایط بیورآکتور امکان پذیر می باشد. در مورد گیاهان امکان تولید در سطوح مزرعه ای به گونه ای که بتوان مقیاس تولید را فراتر از سطوح بیورآکتور ها ارتقاء داد میسر می باشد. با استفاده از انتقال ژن می توان محصولات زراعی را تبدیل به کارخانه های تولید داروهای با ارزش نمود (Molecular Farming) و علاوه بر درآمد زایی بهتر برای کشاورزان، تولید داروهای شیمیایی صنعتی را با این سیاست کاهش داد. همچنین تولید برخی ترکیبات شیمیایی که تولید آنها در صنعت چندان مقرون به

صرفه نیست ممکن است با این روش بتوان بطور

این گیاهان تراریخته، معمولا روش فوق الذکر در شرایط محیط های کنترل شده از قبیل گلخانه ها یا اراضی کوچک که بطور مطلوب قابل مدیریت باشند استفاده می شود. به نظر می رسد الگوی استفاده از این روش برای تولید متابولیت های ثانویه در سال های آتی سهم پر رنگ تری در صنایع داروسازی به خود اختصاص دهد (Gupta et al., 2013; Christou and Capell 2009).

گیاه کالانکوئه در طب سنتی برخی کشورها در درمان زخم های پوستی، درد مفاصل، عفونت گوش، آبسه، تب، عفونت های دستگاه گوارش و دستگاه تنفسی و موارد دیگر کاربرد دارد (Milad et al., 2014). با توجه به موارد ذکر شده در خصوص مزیت های کالانکوئه می توان پتانسیل های دارویی آنرا جهت تولید داروهای جدید ارتقاء داده و یا با انتقال ژنهایی خاص در تولید داروهای مورد نظر از آن بهره جست. جهت اصلاح مولکولی این گیاه و انتقال ژن های مسوول تولید متابولیت های ثانویه خاص، بهینه سازی مراحل کشت بافت و انتقال ژن در این گیاه از شرایط اساسی نیل به هدف تولید متابولیت های ثانویه می باشد. لذا در این تحقیق دستورالعمل انتقال ژن مبتنی بر استفاده از آگروباکتریوم بعنوان واسطه انتقال ژن مورد بحث قرار می گیرد.

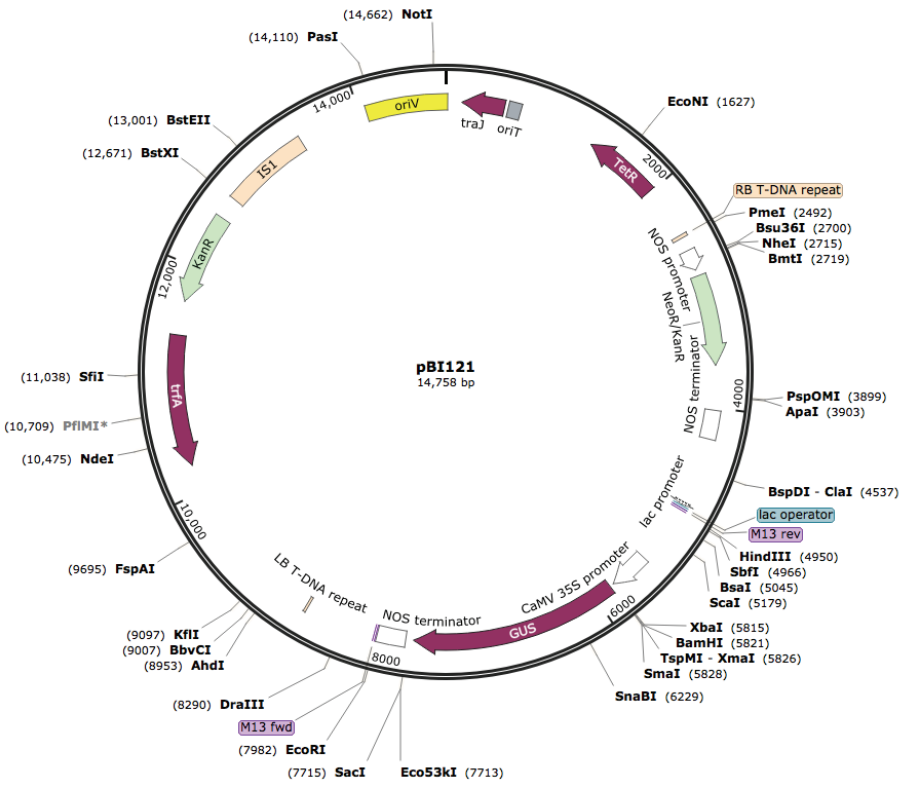
مواد و روش ها

باززایی درون شیشه ای

نظر به بررسی های انجام گرفته در خصوص باززایی درون شیشه ای ارقام مختلف کالانکوئه (Sanikhani et al., 2006)، رقم دِبی (Debbie) که با مقادیر کم سیتوکینین قادر به باززایی درون شیشه ای می باشد و احتمال تنوع سوماکلونال از این طریق ناچیز و قابل صرفنظر کردن می باشد بعنوان رقم مناسب مورد اقتصادی تولید کرد. با توجه به موارد استفاده خاص استفاده قرار گرفت. ریز نمونه های مورد استفاده در این بررسی شامل دو ریز نمونه برگ و میانگره بودند. بدین ترتیب که از گیاهان مادری رشد یافته در گلخانه مواد گیاهی تهیه شد و سپس ناحیه پائینی برگها به اندازه ۲ سانتی متر مربع و میانگره ها به طول ۶ تا ۸ میلی متر بعنوان ریز نمونه تهیه شدند. نسبت هورمونی مناسب جهت باززایی شاخه شامل ۴/۵ میکرومول TDZ به همراه ۰/۵۷ میکرومول IAA در نظر گرفته شده و به محیط کشت MS اضافه گردید. سایر روشها از قبیل ضد عفونی بافتهای گیاهی، شرایط محیطی اتاق رشد طبق گزارش قبلی در نظر گرفته شدند (Sanikhni et al., 2006).

انتقال ژن

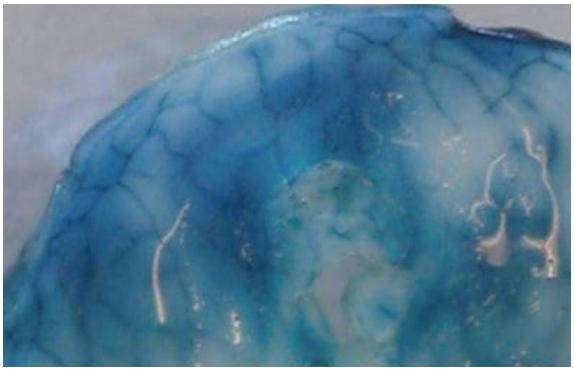
سویه آگروباکتریوم تومفاشینس LBA4404 (*Argobacterium tumefaciens*) واجد پلازمید pBI121 (شکل ۱) جهت انتقال دو ژن *npt*II و *uid*A که بیان هر دو ژن تحت کنترل آغازگر CaMV35S بود مورد استفاده قرار گرفت (Sriskandarajah et al., 2004; Chen et al., 2003). آگروباکتریوم از طریق کشت در محیط کشت تعلیقی LB به انضمام ترکیبات آنتی بیوتیک (kanamycin: 100 mgl^{-1}, rifampicin: 20 mgl^{-1}) در انکوباتور دوار تا رسیدن به تراکم سلولی لازم (OD_{600nm}=1-1.2) قابل تشخیص با اسپکتروفوتومتر، رشد داده شد. ریز نمونه های تهیه شده برگ و میانگره در محلول حاوی آگروباکتریوم به همراه حرکت ملایم ارلن حاوی ریز نمونه ها در انکوباتور دوار به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند.



شکل ۱: پلازمید pBI121 واجد دو ژن gus و nptII (در تصویر: Kan R) به همراه سایر جزئیات (Chen et al., 2003).

در مرحله بعد، هم کشتی باکتری و ریز نمونه ها در محیط کشت MS و تنظیم کننده های رشد ذکر شده طی دو مدت ۰ و ۲ روز انجام گرفت. در تیمار ۰ روز هم کشتی (بدون هم کشتی) در واقع ریز نمونه ها پس از ۱۵ دقیقه مجاورت ریز نمونه ها با آگروباکتریوم مستقیما درمحیط کشت انتخابی کشت شدند. در تیمار هم کشتی ۲ روز، ریز نمونه ها در طی این مدت به محیط کشت MS و تنظیم کننده های رشد انتقال یافتند و پس از این مدت ریز نمونه ها در محیط کشت جدید حاوی مقادیر مختلف کانامایسین (kanamycin: 0, 50, 100, 200 mgl^{-1}) جهت غربالگری بافت های گیاهی تراریخته واکشت شدند. جهت ممانعت از رشد مجدد باکتری در محیط کشت از تیمنتین (timentin) به میزان ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر در همه تیمارها استفاده گردید و عمل واکشت هر 3 هفته یک بار صورت گرفت. درصد ریز نمونه هایی که باززایی یافتند نهایتا پس از ۱۲ هفته کشت در این محیط کشت ارزیابی شدند.

ارزیابی مقدماتی وضعیت انتقال ژن از طریق آزمون هیستوشیمیایی GUS انجام شد. جهت ارزیابی مقدماتی گیاهان مورد بررسی در معرف X-Gluc (شامل X-Gluc به غلظت ۲ میلی مولار و بافر فسفات سدیم به غلظت ۱۰۰ میلی مولار) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ روز تیمار و نگهداری شده و سپس رنگبری بافتها با محلول ۹۵٪ اتانول طی مدت ۱ روز صورت پذیرفت (شکل ۲). این گیاهان برای تایید تراریختگی، با روش ELISA مورد ارزیابی دقیق تر قرار گرفتند و لاین های متعدد تراریخته مورد بررسی دقیق تر قرار گرفتند. آزمون تعیین میزان پروتئین NPTII با روش ELISA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Agdia) در طول موج ۴۵۰ نانومتر جهت ترسیم منحنی استاندارد صورت پذیرفت. همچنین میزان پروتئین کل گیاهان تراریخته با استفاده از معرف برادفورد (Bradford) در طول موج ۵۹۵ نانومتر صورت پذیرفت.



شکل ۲: آزمون هیستوشیمیایی GUS در ارزیابی مقدماتی برگ یک گیاه تراریخته.

نتایج

در این بررسی استفاده از ریز نمونه های برگ موفقیت قابل قبولی برای انتقال ژن به این گیاه نشان داد. با این حال استفاده از ریز نمونه های میانگره برای هم کشتی با آگروباکتریوم موفقیت چندانی به همراه نداشت که دلیل آن حساسیت بسیار زیاد ریز نمونه های میانگره به آگروباکتریوم و رشد بیش از حد باکتری حتی با حضور ترکیبات آنتی بیوتیک خصوصا در قسمت هایی از ریز نمونه که مستقیما با محیط کشت تماس نداشتند گردید. این مساله باعث باززایی بطئی و ناچیز ریز نمونه های میانگره گردید. لذا ادامه مراحل فقط با استفاده از ریز نمونه های برگ انجام پذیرفت.

با توجه به اینکه گیاهان تراریخته دارای ژن مقاومت به کانامایسین می باشند لذا بافت های تراریخته بایستی قادر به تحمل کانامایسین در محیط کشت باشند. غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین می تواند باززایی کالوس و رشد شاخه های غیر تراریخته را کنترل نماید. با این حال بررسی‌های بعدی جهت تایید گیاهان تراریخته با آزمون GUS و ELISA-NPTII نشان داد که بسیاری از آنها تراریخته نبودند و احتمالا به دلیل عدم تماس مستقیم با محیط کشت تا حدودی قادر به بقا در محیط کشت انتخابی بوده اند. طبق آزمون هیستوشیمیایی GUS و NPTII بهترین نتیجه در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۲ روز هم کشتی بدست آمد (جدول ۱). مقدار ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین باعث نکروزه شدن ریز نمونه ها و تا حد زیادی کند نمودن باززایی، رشد بعدی و بقای گیاهان بازایی یافته گردید (شکل۳).

جدول ۱: اثر مدت هم کشتی ریز نمونه برگ و آگروباکتریوم(۰ و ۲ روز) بر باززایی و درصد گیاهان تراریخته ۳ ماه پس از هم کشتی.

روش انتقال ژن/غربالگری	تعداد ریز نمونه ها	درصد باززایی (٪)	تعداد گیاهان +GUS*	تعداد گیاهان +NPTII**	درصد گیاهان تراریخته (٪)	
					GUS+	NPTII+
0	۶۰	۵۶/۷	۰	۰	۰	۰
A1	۶۰	۳۱/۷	۵	۳	۸/۳	۵/۰
A2	۶۰	۲۶/۷	۱۰	۷	۱۶/۳	۱۱/۷
A3	۶۰	۱۶/۷	۶	۳	۱۰/۰	۵/۰
B1	۶۰	۴۸/۳	۷	۴	۱۱/۷	۶/۷
B2	۶۰	۴۰/۰	۱۶	۱۱	۲۶/۷	۱۸/۳
B3	۶۰	۲۵/۰	۹	۸	۱۵/۰	۱۳/۳

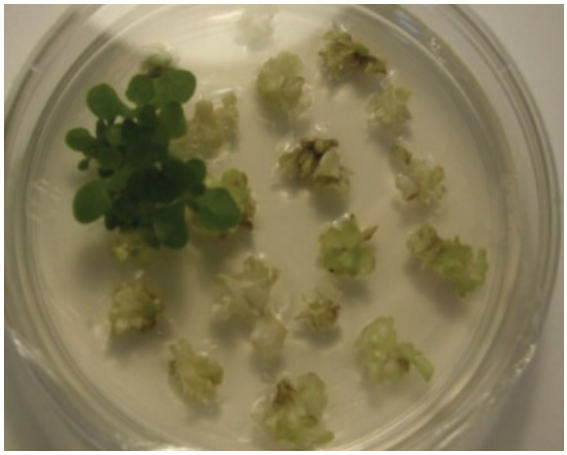
0: بدون هم کشتی و بدون استفاده از کانامایسین

A: بدون هم کشتی (مقادیر کانامایسین: 1: ۵۰ میلی گرم بر لیتر، 2: ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ، 3: ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)

B: هم کشتی به مدت ۲ روز(مقادیر کانامایسین: 1: ۵۰ میلی گرم بر لیتر، 2: ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ، 3: ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)

*: گیاهانی که به آزمون هیستوشیمیایی پاسخ مثبت نشان داده و بعنوان تراریخته در نظر گرفته شدند.

**: گیاهانی که به آزمون ELISA-NPTII پاسخ مثبت نشان داده و بعنوان تراریخته در نظر گرفته شدند.



شکل۳: غربالگری در غلظت بالای کانامایسین (۲۰۰ میلی گرم برلیتر) درصد بقای ریز نمونه ها را در واکشتهای بعدی بطور چشمگیر کاهش می دهد.

جهت تعیین کارایی انتقال ژن ارزیابی بر اساس آزمون هیستوشیمیایی GUS و NPTII در گیاهان باززایی یافته صورت پذیرفت. نتایج نشان داد گیاهانی که طبق آزمون هیستوشیمیایی GUS تراریخته بودند در بیشتر موارد سطوح بالای پروتئین NPTII را نیز نشان دادند. جهت ارزیابی ثبات بیان ژنها ۳ ماه پس از هم کشتی با آگروباکتریوم و ۱ سال پس از هم کشتی مقایسه‌ای بین مقادیر نسبی پروتئین NPTIIدر بین لاین های تراریخته صورت پذیرفت. نتایج نشان داد تنوع قابل ملاحظه ای بین مقادیر پروتئین NPTII بین دو بررسی (۳ ماه و ۱۲ ماه) ملاحظه می شود (نمودار ۱). مقادیر پروتئین NPTII در گیاهان تراریخته از حدود ۴ برابر تا بیش از ۳۰ برابر گیاهان غیر تراریخته ثبت گردید. در مجموع مقادیر پروتئین NPTII سه ماه پس از هم کشتی به وضوح بیش از میزان آن پس از ۱۲ ماه مشاهده گردید. گیاهان تراریخته همچنان پس از یک سال، سطوح بالای NPTII را نشان می‌دادند که حاکی از ثبات قابل قبول بیان ژن در این بررسی انتقال ژن می باشد (نمودار ۱).

بحث

در یک تحقیق انتقال ژن به کالانکوئه جهت ایجاد تغییر در تولید فلاونوئید های این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است (Nielsen et al., 2005). همچنین کاربرد انتقال ژن در کالانکوئه جهت تغییر فرم ظاهری گیاه بعنوان گیاه گلدانی پاکوتاه و ایجاد مقاومت به اتیلن جهت بهبود ماندگاری گیاه گلدانی مورد بررسی قرار گرفته است (Christensen et al., 2008; Sanikhani et al., 2008).

در انتقال ژن استفاده از آنتی بیوتیک ها (از قبیل کانامایسین) برای غربالگری منجر به کندی روند باززایی گیاهان در محیط کشت می گردد (Zhang et al., 2001). لذالازم است غلظت آنتی بیوتیک مورد استفاده جهت غربالگری گیاهان تراریخته در هر آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. در تحقیق حاضر از میان نسبت های مختلف کانامایسین میزان ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از لحاظ درصد قابل قبول باززایی و درصد گیاهان تراریخته بهترین نتایج را حاصل نمود. در یک بررسی دیگر جهت انتقال ژن به گل استکانی میزان ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین جهت انتقال ژن در محیط کشت انتخابی مورد استفاده قرار گرفت اما مقایسه ای درباره اثر سایر غلظت ها انجام نگردید (Srisk and Arajahet al., 2004).

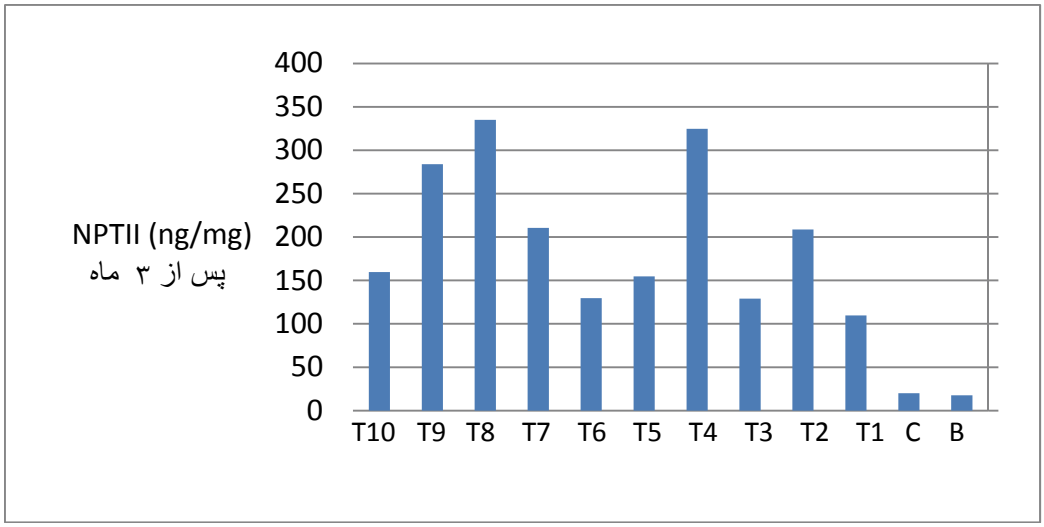
مشخص شده است برخی گونه های کالانکوئه از قبیل (*K. tubiflora*) حساسیت بالایی نسبت به آگروباکتریوم دارند. بدین ترتیب که در زمان ایجاد زخم در گیاه مقادیر قابل ملاحظه ای ترکیبات فنلی که در تسهیل روند آلوده شدن گیاه میزبان موثر است آزاد می کنند که باعث تسریع فرآیند انتقال ژنمی گردد (Xu et al., 2001; Romeiro et al., 1999). اگرچه در فرآیند انتقال ژن و در مرحله هم کشتی ریز نمونه ها باآگروباکتریوم افزودن ترکیبات فنلی از قبیل استوسیرینجون (acetosyringone) معمولا توصیه می شود، با این حال مشخص شده است که انتقال ژن در گیاه کالانکوئه به دلایل فوق الذکر بدون این تیمار نیز می تواند صورت پذیرد (Sanikhani et al., 2008).

طی هم کشتی فرآیند انتقال ژن احتمالا در مدت زمان کوتاهی صورت می پذیرد. طبق بررسی انجام گرفته بر روی انتقال ژن به گیاه *K.*

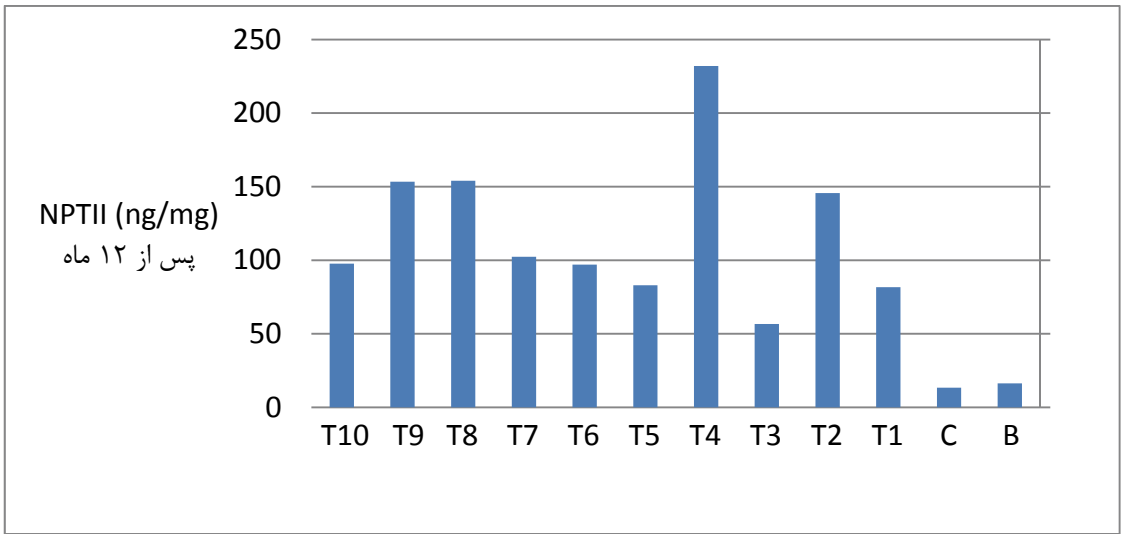
diagremontiana مشخص شده است که روند انتقال ژن از باکتری به ژنوم گیاهی فقط طی ۳ ساعت صورت می پذیرد. بطوری کهT-DNA انتقال یافته فقط پس از ۴ تا ۸ ساعت از شروع هم کشتی قابل تشخیص بوده است (Sykes and Matthysse 1986). با این حال پیشنهاد شده است طولانی تر نمودن مدت هم کشتی موفقیت انتقال ژن را افزایش می دهد (Zuker et al., 1998; Thirukkumaran et al., 2009). در تحقیق حاضر مدت زمان ۲ روز هم کشتی با آگروباکتریوم بهترین نتایج را به دنبال داشت (جدول ۱). در تحقیقی بر روی گونه *K. laciniata* نشان داده شده است در صورت افزایش مدت زمان هم کشتی تا ۷ روز بهبود راندمان انتقال ژن و درصد گیاهان تراریخته صورت می گیرد (Jia et al., 1989). یکی از عوامل محدود کننده در افزایش مدت زمان هم کشتی رشد بیش از حد آگروباکتریوم در محیط کشت می باشد که ممکن است کنترل رشد آن پس از هم کشتی به سختی میسر شود و این مساله باززایی بعدی گیاه را با مشکل مواجه سازد (Sykes and Matthysse 1986). در بررسی های دیگر که در *K. blossfeldiana* صورت پذیرفته است بدون انجام مقایسه تعداد روزهای مناسب هم کشتی، مدت ۳ روز (Thirukkumaran et al., 2009) و ۲ روز هم کشتی با آگروباکتریوم (Sanikhani et al., 2008) جهت انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفته است.

انتخاب ریز نمونه مناسب نیز می تواند در میزان موفقیت انتقال ژن حائز اهمیت باشد. در این بررسی مشخص شد که ریز نمونه های میانگره حساسیت بیش از حد نسبت به آلودگی با آگروباکتریوم نشان داده و قادر به باززایی چندانی نبودند. در گزارش قبلی (Sanikhani et al., 2006) در خصوص بهبود باززایی درون شیشه ای در کالانکوئه اشاره گردید که باززایی این گیاه با استفاده از هر دو ریز نمونه برگ و میانگره بخوبی قابل دستیابی است. حتی بهترین نتیجه با استفاده از ریز نمونه میانگره از نظر درصد باززایی حاصل گردید. با این حال بررسی حاضر نشان می دهد انتقال ژن در گیاه کالانکوئه در صورت استفاده از ریز نمونه برگ در مقایسه با ریز نمونه میانگره موفقیت بالاتری رابه همراه خواهد داشت.

بررسی بیان ژن در گیاهان تراریخته حاکی از ثبات بالا و قابل توجه بیان ژن انتقال یافته بود بطوری که میزان پروتئین در طی زمان های ۳ و ۱۲ ماه پس از هم کشتی چندین برابر شاهد به ثبت رسید (نمودار ۱ و ۲). با این حال در لاین های تراریخته تنوع در سطوح بیان ژن قابل ملاحظه می باشد. سطح بیان ژنهای انتقال یافته تحت تاثیر شرایط مختلف محیطی و ژنتیکی می تواند تنوع نشان دهد. عواملی از قبیل تعداد کپی ژن انتقال یافته، ناحیه ای که ژن به ژنوم ملحق شده و عوامل متعدد دیگر می‌توانند در میزان بیان ژنها تاثیر گذار باشند (Bryant et al., 2014; Doran 2006). لازم است در بررسی های آتی ناحیه ژنهای انتقالی بر روی ژنوم و اثر تعداد کپی ژنهای انتقال یافته بر روی سطح بیان ژنها مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد.



نمودار ۱: مقدار نسبی پروتئین NPTII در نمونه های مختلف ۳ ماه پس از هم کشتی با آگروباکتریوم. B (محلول بافر به تنهایی بعنوان شاهد)، C(گیاه غیر تراریخته)، T1 تا T10 لاین های تراریخته.



نمودار ۲: مقدار نسبی پروتئین NPTII در نمونه های مختلف ۱۲ ماه پس از هم کشتی با آگروباکتریوم. B (محلول بافر به تنهایی بعنوان شاهد)، C(گیاه غیر تراریخته)، T1 تا T10 لاین های تراریخته.

این بررسی امکان انتقال ژنهای *gus* و *nptII* و میزان موفقیت آنها را در گیاه کالانکوئه مورد بررسی قرار می دهد. نوع ریز نمونه، محیط کشت مناسب از نظر میزان تنظیم کننده های رشد و شیوه غربالگری گیاهان تراریخته و مدت هم کشتی با آگروباکتریوم از عوامل مهم در میزان موفقیت و کارایی انتقال ژن می باشند. در راستای این تحقیق، دستورالعمل های مشابه این بررسی می تواند در تحقیقات آتی جهت انتقال انواع دیگری از ژنها به منظور ایجاد گیاهان تراریخته کالانکوئه که قابلیت تولید ترکیبات ثانویه حائز اهمیت و یا اهداف دیگر اصلاحی را دارند مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Bryant, J. A., Sellars, L. E., Busby, S. J. W., Lee, D. J.(2014). Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Research, 42(18), 11383-11392.

Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong, S.C., To, K.Y. (2003). Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding, 11, 287-293.

Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M., Müller, R. (2008). Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with *rol*-genes is useful in molecular breeding towards compact growth. Plant Cell Reports, 27, 1485-1495.

Christou, P., Capell, T. (2009). Transgenic crops and their application for sustainable agriculture and food security. In: Ferry N, Gatehouse AMR (eds.) Environmental impact of genetically modified crops. CABI, Oxfordshire, UK, pp. 3-22.

Doran, P. M. (2006). Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. Trends in Biotechnology, 24(9), 426-432.

Gehrig, H., Taybi, T., Kluge, M., Brulfert, J. (1995). Identification of multiple PEPC isogenes inleaves of the facultative Crassulacean acid metabolism (CAM) plant *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cv. Tom Thumb. FEBS Letters, 377, 399-402.

Gehrig, H., Rosicke, H., Kluge, M. (1997). Detection of DNA polymorphism in the genus *Kalanchoe* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic positionand ecophysiological photosynthetic behaviour of the species. Plant Science, 125:41-51.

Gupta, S.M, Grover, A., Nasim, M. (2013). Transgenic technologies in agriculture: from lab to field to market. CIBTech Journal of Biotechnology, 3(3), 20-47.

Izumikawa, Y., Nakamura, I., Mii, M. (2007). Interspecific hybridization between *Kalanchoe blossfeldiana* and several wild *Kalanchoe* species with ornamental value. Acta Horticulturae, 743, 59-65.

Jia, S. H., Yang, M. Z., Ott, R., Chua, N. H. (1989). High frequency transformation of *Kalanchoe lacianata*. Plant Cell Reports, 8, 336-340.

Milad, R., El-Ahmady, S., Singab, A. N. (2014). Genus Kalanchoe (Crassulaceae): A review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. European Journal of Medicinal Plants, 4(1), 86-104.

Nielsen, A. H., Olsen, C. E., Møller, B. L. (2005). Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. Phytochemistry, 66, 2829-2835.

Romeiro, R. S., Silva, H. A. S., Beriam, L. O. S., Rodrigues, N. J., Carvalho, M. G. (1999). A bioassay for detection of *Agrobacterium tumefaciens* in soil and plant material. Summa Phytopathologica, 25:(4), 359-362.

Sanikhani, M., Frello, S., Serek, M. (2006). TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 53, 79-84.

Sanikhani, M., Mibus, H., Stummann, B. M., Serek, M. (2008). *Kalanchoe blossfeldiana* plantsexpressing the *Arabidopsis etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. Plant Cell Reports, 27, 729-737.

Shagufta, N., Sumera, J., Saiqa, I., Aamir, A. (2009). An efficient protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum diagre montianum*. Pakistani Journal of Botany, 41(5), 2347-2355.

Sriskandarajah, S., Frello, S., Jørgensen, K., Serek, M. (2004). *Agrobacterium tume faciens* mediated transformation of *Campanula carpatica*: Factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. Plant Cell Reports, 23, 59-63.

Sykes, L. C., Matthysse, A. G. (1986). Time required for tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. Appliedand Environmental Microbiology, 52(3), 597-598.

Thirukkumaran, G., Ntui, V. O., Khan, R. S., Mii, M. (2009). Thidiazuron: an efficient plant growthregulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia hybrida*. PlantCell, Tissue and Organ Culture, 99, 109-115.

Van Voorst, A., Arends, J. C. (1982). The origin and chromosome numbers of cultivars of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.: Their history and evolution. Euphytica, 31, 573-584.

Xu, X. Q., Li, L. P., Pan, S. Q. (2001). Feedback regulation of an *Agrobacterium* catalase gene katAinvolved in *Agrobacterium*-plant interaction. Molecular Microbiology, 42(3), 645–657.

Zuker, A., Tzfira, T., Vainstein, A. (1998). Genetic engineering for cut-flower improvement. Biotechnology Advances, 16(1), 33-79.