دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تراریزش گیاه گندم با استفاده از ژن *fld* به روش تفنگ ژنی

سارا عبدالملکی[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، رضا فتوت[۳] و غلامرضا صالحی جوزانی[۴]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشگاه زنجان
۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، (نویسنده مسوول: gtohidfar@yahoo.com)
۴- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۲

چکیده

تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و شوری اولین عامل کاهش محصول در دنیا بوده و در اغلب محصولات مهم زراعی باعث کاهش شدید تولید محصول می شود. استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک یکی از گزینه‌های موجود جهت افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی می باشد. در این تحقیق به منظور تولید گیاه گندم تراریخته متحمل به تنش های غیرزیستی، از روش تفنگ ژنی و وکتور *p6U-Ubi-FVT1* استفاده شد. این وکتور حاوی ژن نشانگر باکتریایی استرپتومایسین و نشانگر گیاهی هیگرومایسین و ژن *fld* (فلاودوکسین) با منشاء سیانو باکتری می‌باشد. فلاودوکسین نقشی مشابه فردوکسین ایفا کرده و قادر است با جلوگیری از وقوع اغتشاشات در چرخه انتقال الکترون و ممانعت از تشکیل گونه های فعال اکسیژن، آسایش گیاه را فراهم کند. بدین منظور از کالوس‌های جنین زای ارقام بهار، لاین A، پیشتاز، N- 83 و ارقام پاییزه زرین و S-87 به عنوان بافت هدف برای تراریزش استفاده شد. نتایج نشان داد ریز نمونه کالوس جنین زا رقم بهار با ۶/۵۱٪ شاخه زایی و ۳/۳۵٪ ریشه زایی بیشترین باززایی را در مقایسه با سایر ارقام دارند. بیشترین درصد شاخه زایی، ریشه زایی مربوط به رقم بهار و کمترین آن مربوط به رقم زرین و S-87 بود. در این تحقیق ۳۶ بار بمباران با استفاده از تفنگ ژنی انجام شد و تعداد شش گیاه رقم بهار و یک گیاه رقم لاین A تولید شد. آنالیز PCR روی یک گیاه رقم لاین A و شش گیاه رقم بهار انجام شد. نتایج آزمایش وجود حداقل یک نسخه از ژن هدف را در ژنوم گندم یک گیاه رقم لاین A تائید کرد. بیشترین درصد تراریزش مربوط به رقم لاین A بود که این مقدار برابر با ۰/۰۰۷ بود در نهایت آزمون لکه گذاری تائید بیشتر تلفیق ژن را در گندم های تراریخته تائید کرد.

واژه های کلیدی: گندم تراریخته، مهندسی ژنتیک، تفنگ ژنی، *fld*، تحمل به تنش‌های غیرزیستی

مقدمه

بر اساس گزارشات سازمان ملل، جمعیت جهان در سال ۲۰۲۰ به ۷/۵ میلیارد نفر می رسد که ۱/۲ میلیارد نفر در فقر کامل زندگی کرده (۱۲) و ۸۰۰ میلیون نفر فاقد امنیت غذایی می‌باشند (۱۳). در میان گیاهان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

زراعی، گندم به علت داشتن مواد غذایی با ارزش مانند انواع پروتئین ها، ویتامین ها، مواد معدنی و تنوع محصولات، ۲۰ درصد از کالری غذایی مردم جهان (۵) و به همراه برنج و ذرت ۶۰ درصد کالری‌ها و پروتئین‌های غذای انسان را تامین می کند (۹). اما همواره یکی از عواملی که باعث کاهش عملکرد گندم می شود، تنش‌های غیر زیستی نظیر خشکی و شوری می باشد. تنش های غیر زیستی بسیاری از جنبه‌های رشد، تغییرات محصول، آناتومی، مورفولوژی، فیزیولوژی و در آخر محصول دهی گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷). تنش‌های محیطی باعث کاهش انتقال الکترون در مسیر فتوسیستم می‌شود، فردوکسین ها در گیاهان که در انتقال الکترون دخالت دارد، در پاسخ به محرکهای مختلف محیطی کاهش می‌یابد (۱۰).

میکروارگانیسم های فتوسنتزی در هنگام کاهش نا مطلوب فردوکسین، بیان ناقل های الکترونی همانند فلاودوکسین *fld*[1] که عملکرد مشابه فردوکسین را دارند را القا می کنند (۳). در حالی‌که فرودوکسین ها در همه موجودات اعم از پروکاریوت‌ها تا جانوران موجودند، فلاودوکسین‌ها تنها در بعضی از باکتریها و جلبک‌های اقیانوسی یافت می‌شود. فلاودوکسین در این موجودات می‌تواند القا کننده عملکرد فردوکسین تحت شرایط فقر آهن و تنش‌های محیطی که منجر به کاهش فردوکسین می‌شود باشند. بنابراین آنها نقش کلیدی انطباقی در میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده که اجازه نجات و تولید مثل در شرایط نامطلوب را می‌دهند بازی می‌کنند (۱۴). شواهد نتایج در سیانوباکتری‌ها و انتروباکتری‌ها نشان داد سطوح *fld* در اثر تماس سلول با علفکش‌های چرخه احیائی متیل ویولوزن، (MV) و دیگر اجزای حاوی ترکیبات سوپر اکسیدی تا چندین برابر افزایش می‌یابد (۱۱، ۱۴) و بیان بیش از حد این فلاووپروتئین در باکتری *E.coli* منجر به تحمل زیاد نسبت به منابع مختلف تنش اکسیداتیو می‌شود (۱۱). طبق گزارشات تاگنتی و همکاران (۱۱) بیان *fld* درکلروپلاست گیاه توتون، کاهش سطوح فردوکسین ناشی از شرایط نامطلوب محیطی را جبران می‌کند و موجب افزایش تحمل لاین‌های تراریخت نسبت به تنش اکسیداتیو و دامنه وسیعی از چالش های محیطی می شود. طبق گزارشات تاگنتی و همکاران (۱۱) بیان ژن *fld* در توتون باعث شد تا لاین های توتون تراریخت نسبت به کمبود آهن نیز تحمل نشان دهند. هم‌چنین انتقال *fld* به گوجه فرنگی و سیب زمینی نیز موجب افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو وتنش خشکی شد (۱۴). نظر به اینکه چنین سیستمی در گیاهان زراعی، در طول مسیر تکاملی پدید آمدن گیاهان آوندی از ژنوم گیاه، ناپدید شده و مزایای بیان و عملکرد آن نیز از بین رفته است، با توجه به مشاهده نتایج موفقیت آمیز در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان زراعی نام برده با انتقال ژن *fld* باکتریایی با ابزار مفید بیوتکنولوژی، می توان در جهت افزایش عملکرد محصول، در دیگر گیاهان زراعی به ویژه گندم نیز، گام برداشت. هدف از این تحقیق این است که با توجه به این امر که به علت چند ژنی بودن و پیچیدگی ژنتیکی و

1- flavodoxin

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

فیزیولوژیکی تحمل به تنش‌های غیرزیستی، تلاش برای بهبود این صفات با برنامه‌های متداول اصلاحی، ضمن همراه بودن با محدودیت های زیاد (۴)، مستلزم صرف وقت زیاد نیز می باشد. لذا اهمیت این تحقیق مبنی بر افزایش عملکرد در واحد سطح با افزایش تحمل نسبت به تنش‌های غیرزیستی با بکارگیری روش های نوین مهندسی ژنتیک به شیوه ای سریع و کاربردی روشن خواهد بود.

مواد و روش ها

در این تحقیق از وکتور *p6U-Ubi-FVT1* با طول ۱۲۹۵۱ جفت باز حاوی ژن فلاودوکسین و نیز نشانگر انتخابی هیگرومایسین در ناحیه T-*DNA* و نشانگر باکتریایی استرپتومایسین جهت تراریزش گیاه گندم استفاده شد. ژن فلاودوکسین تحت پیشبر یوبیکوئتون و ترمیناتور NOS می باشد. ارقام مورد استفاده در این تحقیق شامل ارقام بهاره بهار، لاین A، پیشتاز و N-83 و ارقام پاییزه زرین و S-87 بود. این بذور از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج از بخش غلات تهیه شد. در ابتدا، بذور مورد آزمایش در گلدان کشت و پس از طی کلیه مراحل داشت در گلخانه، بذور نارس آنها در فاصله زمانی ۱۲ الی ۱۸ روز پس از گرده افشانی برداشت شد. ریز نمونه‌های جنین نارس گندم پس از ضدعفونی بذور در الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و نیز هیپوکلریت سدیم تجاری به مدت ۲۰ دقیقه، در زیر میکروسکوپ جدا شده و به مدت ۴۵ روز روی محیط کالوس دهی شامل نمکها و ویتامینهای MS، ۲ میلی گرم بر لیتر توفوردی، ۴۰ میلی گرم بر لیتر تیامین، ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کازئین، ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر گلوتامین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار و pH= ۵/۷، تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی گراد در فیتوترون، به منظور تولید کالوس نگهداری شدند. سپس کالوس های جنین زا توسط ذرات طلای اندود شده با پلازمید نوترکیب بمباران شدند. در این آزمایش از تفنگ ژنی مدل BioRad, PDS-1000/He، ذرات طلا دارای قطر ۱ میکرون و دیسک پاره شونده نوع PSI ۹۰۰ و PSI ۱۱۰۰ استفاده شد. پس از بمباران کالوس ها به مدت یک روز در همین محیط تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتیگراد در فیتوترون نگهداری شده و سپس به محیط کالوس دهی انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین منتقل شدند. در ادامه کالوس های فوق، پس از طی مدت یک هفته به محیط باززایی انتخابی شامل نمکها و ویتامینهای MS، ۲ میلی گرم بر لیتر BAP، ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH= ۵/۷، همراه با ۵۰ میلی گرم بر لیتر هیگرومایسین تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در فیتوترون با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد منتقل شدند. گیاهچه های باززا شده پس از تولید شاخه به محیط باززایی حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین حاوی ۰/۵ گرم بر لیتر ذغال فعال منتقل شدند. واکشت نمونه ها هر دو هفته یکبار انجام و فاکتورهایی نظیر درصد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

شاخه زایی (نسبت کالوس های جنین‌زای شاخه دار شده به کالوس های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) و درصد ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه ها و کالوس‌های جنین‌زای ریشه دار شده به کالوس‌های جنین‌زای بمباران شده × ۱۰۰) اندازه‌گیری شد.

گیاهچه های باززاشده در درون شیشه، ابتدا به گلدان‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدان های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند. برای استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های گندم از روش دلاپورتا (۲) استفاده شد. به منظور اثبات تلفیق ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۲۵ نانوگرم DNA، ۴۰ نانوگرم از آغازگرهای اختصاصی، ۲/۵ میکرولیتر از۲dNTP میلی مولار که حجم آن در واکنش ۲۵ تایی می شود ۰/۲ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی مولار که حجم نهایی آن در واکنش ۲۵ تایی می شود ۲/۵ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X انجام گرفت. واکنش در ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت) و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۷ دقیقه انجام گرفت. محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس برداری گردید. همچنین برای تایید بیشتر تلفیق ژن، آزمون لکه گذاری DNA با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی برای ژن فلاودوکسین، براساس روش سمبروک و راسل (۸) انجام شد. عمل نشاندار کردن کاوشگر ها نیز به روش کیت DIGLabeling (شرکت Roche) انجام شد. توالی آغازگر ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب فلاودوکسین

آغازگر فلاودوکسین	توالی آغازگر
آغازگر رو به جلو	CTACGGTACTCAAACTGG
آغازگر رو به عقب	GCGATCGTCTGTTAAGTC

نتایج و بحث

در این پژوهش ۳۶ بار عمل بمباران با استفاده از تفنگ ژنی انجام شد. نتایج بدست آمده از مشاهدات نشان داد که ارقام پائیزه زرین و S-87 و ارقام بهاره پیشتاز، بهار، N-83 و لاین A به لحاظ ویژگی هایی نظیر درصد شاخه زایی، درصد ریشه زایی و درصد تراریزش با هم تفاوت دارند. در مقایسه، ارقام بهاره نسبت به ارقام پائیزه عملکرد بهتری در باززایی از خود نشان دادند (جدول ۲) و رقم بهار نسبت به بقیه ارقام دارای شاخه زایی و ریشه دهی بیشتری بود. درصد شاخه زایی در رقم بهار با ۶/۵۱ درصد بیشترین مقدار و رقم لاین A در رتبه دوم همچنین در رقم پیشتاز با ۲/۵ درصد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

کمترین میزان را نشان داد. لازم به یادآوری است که این نتایج بر اساس ریز نمونه های اولیه بدست آمده که تعداد آنها در لاین های مختلف متفاوت بوده است. درصد ریشه زایی نیز در رقم بهار بیشترین میزان و سپس در رقم لاین A با ۲/۱ درصد دومین مقدار و در رقم‌های زرین N-83 بدون ریشه زایی کمترین میزان را نشان داد. تعداد گیاهچه های کاملی که از این آزمایش به دست آمد در کل ۷ گیاه بوده که ۶ گیاه مربوط به رقم بهار و یک گیاه از رقم لاین A بود. به منظور تایید وجود حداقل یک نسخه از ژن آزمایش PCR روی کلیه گیاهچه ها انجام شد و تنها یک گیاه رقم لاین A وجود حداقل یک نسخه ژن *fld* را در ژنوم خود نشان داد. آزمون لکه گذاری جهت تایید بیشتر وجود ژن در ژنوم گیاهچه لاین A انجام شد.

جدول ۲- خلاصه ای از صفات اندازه گیری شده بعد از شلیک روی ارقام مختلف گندم

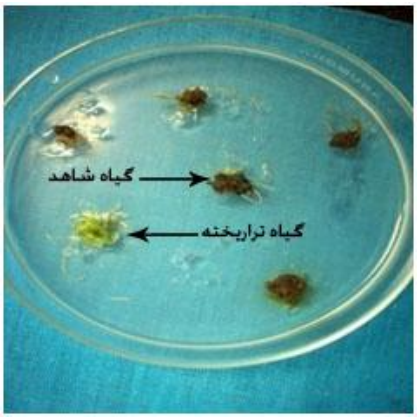
نوع بذر	نوع رقم	تعداد ریز نمونه شلیک شده	درصد شاخه زایی	درصد ریشه زایی	تعداد گیاهچه آنالیز شده	درصد تراریختی*
بهاره	لاین A	۱۴۰	۵/۷	۰/۵	۱	۰/۷
بهاره	پیشتاز	۲۰۰	۲/۵	۱	۰	۰
پاییزه	زرین	۴۳	۴/۶	۰	۰	۰
پاییزه	S-87	۱۵۰	۴/۰	۰/۶	۰	۰
بهاره	N-83	۴۹	۴/۰۸	۰	۰	۰
بهاره	بهار	۵۳۷	۶/۵۱	۳/۳۵	۶	۰

*: فراوانی تراریزش از نسبت گیاهچه های تراریخت به تعداد کالوس های بمباران شده، بدست آمد.

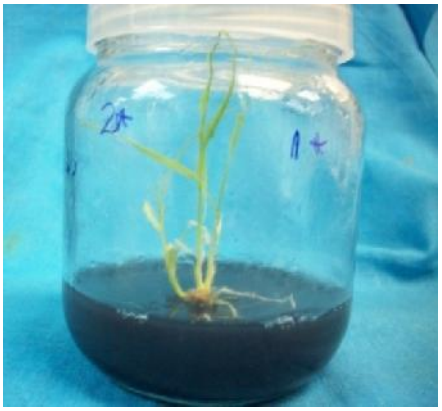
در کلیه آزمایشات نمونه‌های شاهد در زمان انتقال به محیط کشت انتخابی کاملا از بین رفتند (شکل ۱). در زمان انتقال به محیط باززایی گیاهانی که در ابتدا تولید شاخه کردند و علائم سبزینگی از خود نشان دادند پس از مدت کوتاهی شروع به ریشه زایی کردند. در حالی که ریزنمونه‌هایی که ابتدا به ریشه‌زایی رفتند هرگز علائم سبزینگی از خود نشان ندادند و کاملا سیاه شده و از بین رفتند. عمل ریشه دهی ریزنمونه‌ها در محیط عاری از زغال فعال به کندی صورت می‌گرفت که با اضافه شدن زغال فعال سرعت ریشه دهی افزایش یافت (شکل ۲).

تعداد گیاهان باززا شده در محیط حاوی آنتی بیوتیک شامل ۷ گیاه بود که ۶ گیاه از رقم بهار و یک گیاه از رقم لاین A بود (اشکال ۳، ۴ و ۵).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]



شکل ۱- از بین رفتن گیاه شاهد در مقابل گیاه تراریخت.



شکل ۲- باززایی کالوس های جنین زا رقم لاین A در محیط انتخابی در محیط دغال فعال.

شکل ۳- باززایی کالوس های جنین زا رقم لاین A در محیط انتخابی.

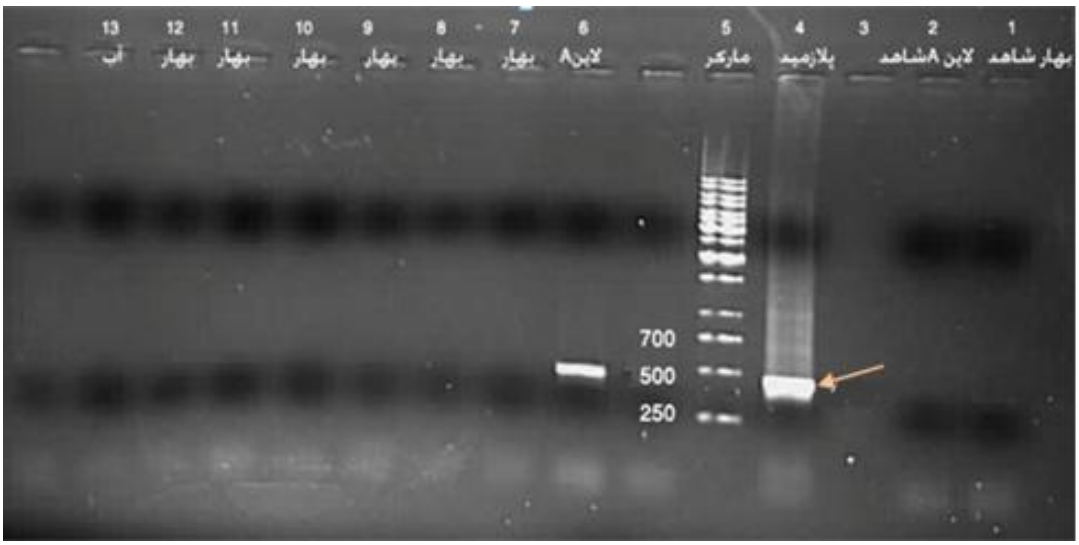
شکل ۴- باززایی گیاهان تراریخته در محیط انتخابی.

شکل ۵- انتقال گیاهان تراریخته احتمالی به خاک و گلخانه.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

این در حالی است که ریز نمونه اولیه بهار هم بیشتر از همه بود. ژن مقاومت به هیگرومایسین سبب مقاومت گیاه در برابر آنتی بیوتیک هیگرومایسین در محیط کشت می شود. در این تحقیق گیاهچه های مقاوم به هیگرومایسین با پرایمرهای اختصاصی ژن *fld* و هیگرومایسین بررسی شدند. وجود باند ۴۴۵ جفت بازی نشان دهنده وجود حداقل یک نسخه ژن *fld* می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *fld* را در ژنوم خود دارا هستند (شکل ۶). از ۶ گیاه باززا شده رقم بهار هیچ یک وجود ژن *fld* را نشان ندادند در حالی که گیاه باززاشده لاین A وجود حداقل یک نسخه از ژن فلاودوکسین را اثبات کرد.

طبق شکل ۶ عدم وجود باند در آب، نشان دهنده این است که واکنش PCR عاری از آلودگی بوده است. وجود باند در نمونه شماره ۴ حاوی پلاسمید به عنوان شاهد مثبت موید صحت مواد و آزمایش PCR می‌باشد. عدم وجود باند در نمونه شاهد موید عدم وجود ژن مذکور در این گیاه می‌باشد. وجود باند برابر با پلاسمید در گیاهان تراریخته، نشان دهنده وجود حداقل یک نسخه از ژن هدف در ژنوم گیاه می‌باشد. آزمون لکه گذاری آزمون PCR را تایید کرد و نشان داد که تنها گیاه لاین A که وجود ژن *fld* را در آزمایش PCR تایید کرده بود در آزمون لکه گذاری نیز موید وجود ژن مذکور بود (شکل ۷).



شکل ۶- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی رو به جلوو رو به عقب ژن *fld* در گندم
چاهک ۱ گیاه شاهد رقم بهار، چاهک ۲ گیاه شاهد رقم لاین A. چاهک ۴ پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۵ نشان‌گر با وزن ملکولی DNA (1 Kb) از شرکت سینا ژن. چاهک ۶ گیاه تراریخته احتمالی رقم لاین A چاهک ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ گیاه تراریخته احتمالی رقم بهار. چاهک ۱۳ نمونه آب (واکنش PCR بدون الگوی DNA).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

شکل ۷- آزمون لکه‌گذاری رقم لاین A برای اثبات تراریختی گندم با استفاده از کاوشگر تهیه شده برای ژن *fld*، نمونه ۱ پلاسمید (کنترل مثبت)، نمونه ۲ گیاه شاهد (کنترل منفی) و نمونه ۳ گیاهچه تراریخت لاین A.

در کلیه آزمایش‌ها عدم مشاهده باند در گیاه شاهد صحت نتایج را تایید کرد. در روش انتقال ژن با تفنگ ژنی، گیاهی تراریخته است که ژن در کروموزوم آن تلفیق شود. در این حالت می‌توان کالوس‌های تراریخته را به واسطه وجود نشانگر انتخابی در محیط شناسایی کرد. ژن (*hpt*)، سبب مقاومت گیاه در برابر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در محیط کشت می‌شود. با این روش گیاهانی انتخاب می‌شوند که دارای ژن مذکور هستند و به دلیل این‌که این ژن همراه با ژنهای هدف فلاودوکسین روی یک پلاسمید قرار دارد، به طور غیرمستقیم گیاهانی که حاوی ژن‌های هدف می‌باشند انتخاب می‌گردند. نمونه تراریخت که شامل ژن مقاومت بود در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین شاخه‌زایی و ریشه‌زایی طبیعی از خود نشان داد درحالی‌که گیاه شاهد در این محیط از بین رفت. استفاده از ذغال فعال در محیط باززایی، علاوه بر جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی که موجب عدم ریشه‌زایی می‌شوند، محیطی کم نور، مناسب با رشد ریشه را نیز فراهم می آورد. ارزیابی صفات (شاخه‌زایی و ریشه‌زایی) در ارقام بهار، زرین، پیشتاز، S-87، N-83 و لاین A، این نکته را بیان داشت که ارقام پائیزه نسبت به ارقام بهاره عملکرد بسیار کمتری از خود نشان دادند. از دلایلی که می‌توان به آن اشاره کرد، نوع ژنوتیپ است. کشت بافت غلات، انواع مختلفی از کالوس را تولید می‌کند که ممکن است از نظر پتانسیل باززایی با هم متفاوت باشند، از این رو پاسخ کالوس و باززایی گیاه بستگی به نوع ژنوتیپ دارد (۱). به همین علت در ژنوتیپ‌های پائیزه نسبت به بهاره کالوس‌دهی و باززایی کمتری مشاهده می‌شود. همچنین تعداد کم کالوس‌های باززا شده سرسختی گندم برای باززایی در کشت بافت گندم را نشان می‌دهد که طبق گزارشات هو (۶) از عوامل محدودکننده اصلی در روش های تراریختی می‌باشد. تاکنون ژن های زیادی به منظور افزایش تحمل به تنش های غیرزیستی به گیاهان منتقل شد که به علت پیچیده بودن مقاومت به تنش موفقیت چندانی حاصل نشده است. در این تحقیق برای اولین بار ژن *fld* به یک گیاه زراعی منتقل می‌شود. از این‌رو آنالیزهای بیشتری برای اثبات حضور و بیان ژن وارد شده و نیز آزمایشات زیست‌سنجی جهت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

اثبات تحمل به تنش‌های غیرزیستی و در نهایت آنالیز نسل‌های تراریخته برای اثبات پایداری ژن در آینده مورد نیاز خواهد بود.

منابع:

1. Baskaran, P., B.R. Rajeswariand and N. Jayabalan. 2005. A simple approach to improve planter generation from callus culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench for crop improvement. Journal of Agricultural Technology, 1(1): 179-192.
2. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks.1983. A plant DNA mini preparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
3. Falk, S., G. Samson, D. Bruce, N.P.A. Huner and D.E. Laudenbach. 1995. Functional analysis of the iron-stress induced CP 43 polypeptide of PS II in the cyanobacterium Synechococcussp PCC 7942. Photosynthesis Research, 45: 51-60.
4. Flowers, T.J. 2003. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55(396): 307-319.
5. Gill, B.S., R. Appels, A.M.B. Oberholster, C.R. Buell, J.L. Bennetzen, B. Chalhoub, F. Chumley, K.J. Dvora, M. Iwanaga, B. Keller, W. Li, R.M. Combie, Y. Ogihara, F. Quetier and T. Sasaki. 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. Genetics, 168: 1087-1096.
6. Huw, D.J. 2005. Wheat transformation current technology and applications to grain development and composition. Journal of Cereal Science.41: 137-147.
7. Mirbahar, A.A., G.S. Markhandi, A.R. Mahar, S.A. Abro and N.A. Kanhar. 2009. Effect of water stress on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum*) varieties. Pakistan Journal of Botany, 41(3): 1303-1310.
8. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001.Molecular cloning. A Laboratory manual.3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1234 pp.
9. Salunkhe, D.K., S.S. Kadam and A. Ausin. 1985. Quality of wheat and wheat products.Metropolition Book Co., New Delhi. 366 pp.
10. Singh, A.K., H. Li and L.A. Sherman. 2004. Microarray analysis and redox control of gene expression in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Physiologia. Plantarum. 120: 3-27.
11. Tognetti V.B., J.F. Palatnik, M.F. Fillat, M. Melzer, M.R. Hajirezaei, E.M. Valle and N. Carrillo. 2006. Functional replacement of ferredoxin by a Cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers Broad-Range stress Tolerance. The Plant Cell, 18: 2035-2050.
12. Winicov, I. 1998. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. Annals of Botany, 82: 703-71.
13. Winicov, I. 2000. Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. Planta 210: 416-422.
14. Zubriggen, M.D., V.B. Tognetti and N.J. Carrillo. 2007. Stress induced flavodoxin for photosyntethicmicro organisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 59(4): 355-360.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]

Genetic Engineering of Wheat, Using *fld* Gene by Gene Gun Method

Sara Abdolmaleki[1], Masood Tohidfar[2], Reza Fotovat[3] and Gholamreza Salehi Jozani[4]

1 and 3- MSc Student and Assistant Professor, University of Zanjan
2- Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute
(Corresponding author: gtohidfar@yahoo.com)
4- Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute
Received: March 9, 2012 Accepted: November 12, 2012

Abstract

Abiotic stresses such as drought and salinity are the most important causes of sever reduction of the crop yields in the world that genetic engineering could improve the tolerance of crops to these stresses as one of the suitable and available solution. In this study to produce transgenic wheat which has the tolerant to abiotic stresses gene gun method and *p6U-Ubi-FVT1* as vector was used. This vector has streptomycin and hygromycin marker and *fld* cyanobacteria offspring gene. Flavodoxin plays the same role of fredoxin which prevents the problems of electron transport system and active oxygene species formations. Embryogenic callus of Bahar, Line A, Pishtaz, N-83, Zarin and S-87 variety of Wheat were used for this study. Results showed embryogenic callus of Bahar variety by 6.51 percent of shooting and 3.35 percent of rooting has the most regenerating rate and Zarin and S-87 had the less regeneration ability in comparison of other variety. Gene bombardment was done 36 times and PCR analysis was done on 6 Bahar and 1 line A plantlets which proved the gene transferring in Line A plantlet. The highest amount of transgenes was by Line A variety which owned 0.007 percent. Also Dot blot analysis validates the gene transfer in the plantlet.

Keywords: Transgenic Wheat, Genetic engineering, Gene gun, *fld*, Tolerant to abiotic stresses

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-21]