

بهینه سازی انتقال ژن به جو و تولید گیاهان تراریخته بارور با استفاده از آگروباکتریوم

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۴۲-۱۳۱

Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Barley and Production of Fertile Transgenic Plants

ابراهیم دورانی علیایی^{*۱} - وحید مهری زاده^۲

Ebrahim Doranie Uliiae^{*1} - Vahid Mehrizadeh²

^۱ دانشیار و ^۲ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی،

گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

1. Associate Professor, 2. Ph.D. Student

Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: uliaie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۵)

چکیده

در سال‌های اخیر انتقال ژن به غلات به ابزار مهمی برای بهبود صفات زراعی گیاهان تبدیل شده است. جو یکی از با اهمیت‌ترین غلات دانه‌ای است که اصلاح آن برای افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق انتقال ژن همانند سایر گیاهان زراعی از اهمیت زیادی برخوردار است. بهینه سازی عوامل مختلف موثر در تراریزش و باززایی گیاهان تراریخته اولین قدم در برنامه‌های انتقال ژن به گیاهان محسوب می‌شود. در این پژوهش برخی عوامل موثر در تراریزش جو به وسیله آگروباکتریوم مانند سویه باکتری، غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان هم‌کشتی و محیط تلقیح باکتری مورد بررسی قرار گرفت. برای تایید حضور ژن‌های انتقالی در گیاهان تراریخته احتمالی از آزمون PCR و برای بررسی بیان ژن‌های انتقالی از آزمون بیان ژن GFP استفاده شد. باززایی ریزنمونه‌های تراریخته با موفقیت انجام و گیاهان تراریخته بارور حاصل گردید. نتایج نشان داد که سویه LBA4404 و AGL1 به عنوان موثرترین سویه‌های آگروباکتریوم و غلظت $OD_{600}=1$ به عنوان مناسب‌ترین غلظت در تراریزش ریزنمونه‌های جنین نارس جو عمل کرده‌اند. همچنین استفاده از محیط تلقیح LB و مدت زمان هم‌کشتی دو روزه ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، بیشترین میزان تراریزش در جو را بدنبال داشت.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم،
تراریزش،
جو،
هیگرومایسین،
GFP

مقدمه

تولید گیاهان تراریخته به شمار می آید (Ji et al., 2013; Mrizova et al., 2014). در سال‌های اول توسعه انتقال ژن به گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم تصور می شد که گیاهان تک لپه‌ای از جمله غلات در برابر انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم مقاوم هستند، ولی بعدها تلاش‌های صورت گرفته در این زمینه انتقال موفقیت آمیز ژن به واسطه آگروباکتریوم در برخی از غلات مثل برنج (Aldemita and Hodges, 1996; Hiei and Komari, 2008; Ozawa, 2009; Soltesz et al., 2012; Shou et al., 2004; Yu et al., 2013), گندم (Morran et al., 2011; Kovalchuk et al., 2013; Risk et al., 2013; Soltesz et al., 2013), سورگوم (Zhao et al., 2000), ارزن (Liu et al., 2007; Jha et al., 2011) و یولاف (Gasparis, 2008) را امکان پذیر ساخت.

اولین گیاه تراریخت جو در سال ۱۹۹۰ با استفاده از روش بیولیستیک توسط Wan و Lemaux (1994) و اولین تراریزش جو با آگروباکتریوم توسط Tingay و همکاران (1997) از ریزنمونه‌های جنین نارس گزارش شده‌اند. پس از آن چندین گزارش انتقال ژن به جو با آگروباکتریوم منتشر شده است (Hensel et al., 2009; Seiler et al., 2014; Zhou et al., 2014; Bettina et al., 2016).

انتقال توسط آگروباکتریوم به گیاهان از جمله جو در مقایسه با روش بیولیستیک از مزایای متعددی برخوردار است از مهمترین آنها می توان به انتقال قطعات بزرگ DNA با حداقل بازآرایی، درج دقیق تراژن و تعداد نسخه پایین تراژن در ژنوم گیاه، سادگی و کم هزینه بودن آن و پایداری بیشتر تراژن اشاره کرد (Shim et al., 2009; Yadav et al., 2013; Manoharan and Dahleen, 2002; Tang et al., 2007).

عوامل متعددی در انتقال ژن به گیاهان تک لپه‌ای موثرند که از آن جمله می توان به ژنوتیپ گیاه (Cheng et al., 2004), نوع ریزنمونه (Lu et al., 2008; Holme et al., 2008)

جو (*Hordeum vulgare* L.) از خانواده گرامینه (Poaceae) و از اولین گیاهان اهلی شده توسط انسان است (Nevo, 2013). جو از لحاظ تولید ماده خشک در جهان رتبه پنجم را بعد از ذرت، گندم، برنج و سویا دارد و از لحاظ اهمیت چهارمین محصول مهم در بین غلات بعد از گندم، ذرت و برنج می باشد (Lu et al., 2015).

جو علاوه بر اینکه یک غله مهم می باشد، به عنوان یک گیاه مدل بسیار عالی برای مطالعه غلات توسط بیوشیمیست‌ها و زیست‌شناسان مولکولی مورد توجه قرار گرفته است (Mrizova et al., 2014; Bettina et al., 2016). ژنوم جو در مقایسه با ژنوم اکثر گیاهان خانواده Triticeae، از اندازه کوچک و ماهیت دیپلوئیدی واقعی ($2n=2x=14$) برخوردار است که برای مطالعه صفات خاص و افزایش بیان و یا خاموش کردن ژن‌ها در غلات مناسب می باشد (Karakas et al., 2011; Iehisa et al., 2014; Nussbaumer et al., 2014).

رشد فزاینده جمعیت جهان و افزایش تقاضا برای غذا در دهه‌های اخیر موجب شده تا تلاش گسترده‌ای در جهت افزایش کمی و کیفی محصولات استراتژیک و کاهش هزینه‌ها انجام گیرد. با توجه به نقش ویژه غلات در رژیم غذایی انسان، امنیت غذایی آینده بدون افزایش قابل توجه در تولید جهانی غلات قابل حصول نیست (Kim et al., 2009). برای نیل به این هدف مهندسی ژنتیک و روش‌های مبتنی بر آن به عنوان یک راهکار قوی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Dahleen et al., 2007). تراریزش جو با هدف افزایش کارایی زراعی آن، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، افزایش عملکرد و کیفیت آن انجام می‌گیرد (Vyroubalova et al., 2011; Bettina et al., 2016).

برای انتقال ژن به گیاهان روش‌های مختلفی وجود دارد ولی تراریزش به کمک آگروباکتریوم علی‌رغم محدودیت‌هایی که دارد هنوز هم یکی از کارآمدترین روش‌ها برای

پروتئینی است که در طول موج خاصی از نور به رنگ سبز روشن مشاهده می شود (Boulin *et al.*, 2006). از مزایای این پروتئین به عنوان ژن گزارشگر می توان به غیر تهاجمی بودن آن، اندازه کوچک، مطالعه بافت های زنده بدون تخریب، عدم نیاز به سوبسترای خاص برای مطالعه و غیره اشاره کرد (El Shemy *et al.*, 2008). در این مقاله شرایط بهینه عوامل انتقال ژن به جو از طریق آگروباکتریوم، از قبیل سویه و غلظت باکتری، محیط تلقیح باکتری و مدت زمان هم کشتی با آگروباکتریوم گزارش می گردد و یک روش کارآمد برای انتقال ژن به جو از طریق آگروباکتریوم ارائه می شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: بذرهای رسیده رقم والفجر جو به عنوان مواد گیاهی از جهاد کشاورزی آذربایجان شرقی تهیه و جهت اخذ جنین نارس در شرایط گلخانه کشت گردید. بذور نارس آنها در فاصله زمانی ۱۴ روز پس از گرده افشانی برداشت شد. بذور نارس ابتدا به مدت ۵ دقیقه در الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس آبشویی شده، پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۲/۵ درصد به طور کامل ضدعفونی شدند و پس از آبشویی و خشک شدن بذور، جنین نارس آنها در زیر میکروسکوپ با استفاده از یک لوپ با بزرگنمایی 10X جدا شدند.

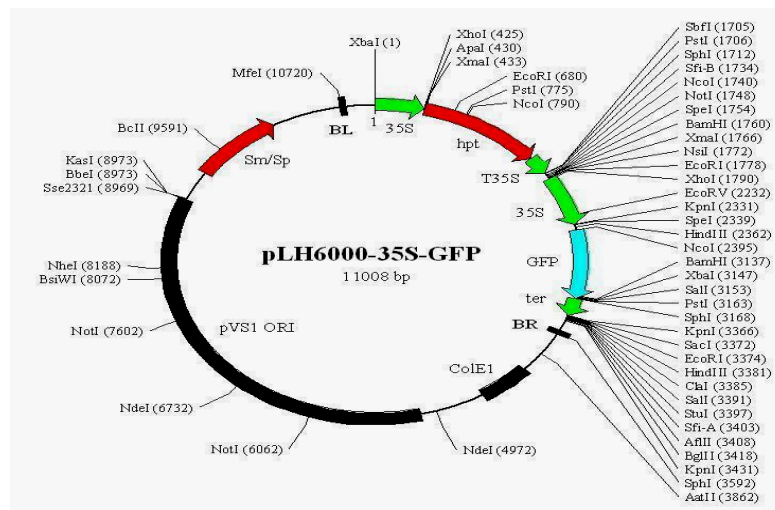
سازه های ژنی و سویه های باکتری: در این پژوهش از ۳ سویه (AGL1 و LBA4404، GV3101) آگروباکتریوم *تومفسینس* که حاوی پلاسمید pLH6000 بودند، جهت تراریزش جنین های نارس جو استفاده شد. پلاسمید مذکور حاوی ژن های گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین (*hpt*) بود که هر دو تحت کنترل راه انداز CaMV 35S بودند (شکل ۱). به منظور تراریختی، گزینش و باززایی از دستورالعمل ارائه شده توسط Tingay و همکاران (1997) با برخی تغییرات استفاده شد.

(2015)، سویه باکتری (Ji *et al.*, 2013)، غلظت باکتری (Sujatha *et al.*, 2009)، مدت زمان هم کشتی (Kim *et al.*, 2009)، سیستم گزینشی و سیستم باززایی (Yadav *et al.*, 2012) اشاره کرد. انتقال ژن در جو به شدت وابسته به ژنوتیپ است، به طوریکه بیشترین کارایی تراریزش در ارقام بهاره و کمترین کارایی در ارقام زمستانه گزارش شده است. حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه در موفقیت تراریزش به واسطه آگروباکتریوم موثر است و ریزنمونه جنین نارس بیشترین کارایی را در انتقال ژن به جو داشته است (Wang *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2015).

قابلیت و توانایی سویه های مختلف آگروباکتریوم در آلوده سازی و انتقال ژن به گیاهان متفاوت می باشد. انتخاب سویه مناسب آگروباکتریوم می تواند نقش مهمی در افزایش کارایی انتقال ژن به گیاهان داشته باشد (Oliveira *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2012). غلظت مناسب آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است به طوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه نقش بسزایی در کارایی تراریزش گیاهان دارد (Wroblewski *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009).

مدت زمان هم کشتی و محیط تلقیح باکتری از دیگر عوامل موثر در تراریزش گیاهان هستند که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه ها کارایی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهند (Shrawat and Lorz, 2006; Sujatha *et al.*, 2012).

از دیگر عوامل موثر در مطالعه تراریزش گیاهان و همچنین بهینه سازی شرایط انتقال، استفاده از ژن های گزارشگر می باشد. ردیابی و آشکارسازی سیستم های تراریزش گیاه، به منظور اطلاع از انتقال موفق DNA مورد نظر به ژنوم سلول های میزبان به کمک مجموعه های از ژن ها، موسوم به ژن های گزارشگر صورت می گیرد (Kumlehn *et al.*, 2006; Bettina *et al.*, 2016). ژن های گزارشگر وسیله ای مناسبی برای مطالعه اجزای بیان ژن ها هستند. Green Fluorescent Protein (GFP) به عنوان یک گزارشگر



شکل ۱- نمای شماتیک پلاسمید pLH6000

Figure 1- Schematic map of pLH6000 plasmid.

کالوس تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر تیکارسیلین منتقل شدند. بعد از ۴-۶ هفته کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده به محیط باززایی شامل محیط MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP منتقل و در دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ با روشنایی ۱۰۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شاخه‌های تشکیل شده به لوله‌های شیشه‌ای حاوی همان محیط منتقل شده تا گیاهان T0 برای انتقال به خاک به اندازه کافی قوی شوند. گیاهان T0 برای بذری به گلخانه منتقل شدند. بذر گیاهان T0 برای بدست آوردن گیاهان T1 در شیشه‌ها کشت شدند.

تایید مولکولی گیاهچه‌های تراریخته: DNA ژنومی تعدادی از گیاهان تراریخته احتمالی و گیاهان شاهد از برگ گیاه جو به روش CTAB (Pallota *et al.*, 2000) استخراج گردید. به منظور اثبات انتقال و تلفیق ژن GFP به ژنوم گیاه از آغازگرهای اختصاصی GFP استفاده شد (جدول ۱). برای تکثیر ژن GFP، از برنامه دمایی 94°C به مدت ۴۵ ثانیه، 54°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت یک دقیقه با ۳۰ چرخه تکرار استفاده گردید. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد.

آگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب را ابتدا در محیط کشت YEP (عصاره مخمر ۱۰ gr/l، پپتون ۱۰ gr/l و کلرید سدیم ۵ gr/l) به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین و ۳۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین به مدت یک شب در دمای 28°C با ۱۵۰ دور در دقیقه کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت وقتی که OD باکتری بین ۰/۸-۱ رسید، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (۳۵۰۰-۴۰۰۰ دور در دقیقه) رسوب داده شد و در محیط MS مایع در غلظت‌های ۱/۵، ۱ و ۰/۵ OD_{600nm} رقیق شدند.

تلقیح جنین‌های نارس با آگروباکتریوم: برای تلقیح با آگروباکتریوم توئومفسینس ریزنمونه‌ها جدا شده بر روی محیط کشت کالوس‌زایی شامل نمک‌های محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ویتامین‌های محیط B5 و ۲ میلی گرم در لیتر هورمون دیکامبا قرار گرفتند. پس از آن محلول باکتری با غلظت‌های رقیق شده به وسیله سمپلر بر روی ریزنمونه‌ها قطره گذاری شده و به مدت ۱ تا ۳ روز تحت شرایط تاریکی و دمای 25°C نگهداری شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی: پس از هم-کشتی، جنین‌های تلقیح شده به محیط انتخابی القای

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن GFP

Table 1- specific primers sequence of GFP gene.

توالی آغازگر Primer sequences	آغازگر GFP Primers of GFP
5'-GCGACGTAACGGCCACAAGTTCA-3'	آغازگر روبه جلو Forward primer
5'-TAGTGGTTGTCTGGGCAGCAGC-3'	آغازگر رو به عقب Reverse primer

به عنوان یک تکرار حاوی تعداد متفاوت ریزنمونه اعمال گردید و با استفاده از آزمون دانکن مقایسات میانگین انجام گردید. آزمایش دوم برای مطالعه اثر سویه باکتری با استفاده از بهترین OD بدست آمده از آزمایش اول یعنی $OD_{600}=1$ در یک آزمایش مجزا با محیط تلقیح MS و مدت هم‌کشتی دو روز در سه پتری دیش به عنوان تکرار انجام گردید. آزمایش سوم نیز با استفاده از غلظت $OD_{600}=1$ و سویه LBA4404 طی یک آزمایش فاکتوریل دو عامل شامل دوره هم‌کشتی (یک، دو و سه روز) و محیط تلقیح (MS و LB) بر پایه طرح کاملاً تصادفی به سه تکرار اعمال گردید و آنالیز آماری بر اساس نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بیان ژن GFP: به منظور بررسی صحت انتقال ژن GFP و بیان آن در بافت‌های گیاهی تراریخته، آزمون سنجش بیان GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۹۵ نانومتر انجام شد. کالوس‌های حاصل از جنین‌های نارس یک ماه پس از هم‌کشتی با آگروباکتریوم برای هر کدام از تیمارها با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شده و تعداد کالوس‌های با رنگ سبز برای هر کدام از آنها یادداشت گردید. علاوه بر آن درصد ریزنمونه‌ها یا کالوس سبز بدست آمد. همچنین برگ‌های تازه نسل T0 و نسل T1 گیاهان تراریخته نیز زیر میکروسکوپ فلورسنت مطالعه شدند.

طرح‌های آماری و آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش تاثیر غلظت آگروباکتریوم با استفاده از سویه LBA4404 و مدت زمان هم‌کشتی دو روز در سه تکرار هر پتری دیش

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم روی تراریختی

به منظور تعیین OD مناسب برای تراریزش رقم والفجر گیاه جو، غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم ($1/5$ و 1 و $5/1$) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که بین غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر میزان تراریختی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش غلظت آگروباکتریوم تا $OD_{600}=1$

کارایی انتقال افزایش یافته ولی در غلظت بالاتر ($OD_{600}=1/5$) کارایی انتقال کاهش یافته است (شکل ۲). استفاده از غلظت $OD_{600}=1/5$ باعث رشد زیاد باکتری بر روی ریزنمونه‌ها شد و کنترل آنرا مشکل کرد. در حالی که غلظت پایین‌تر ($OD_{600}=0/5$) از میزان تراریزش کمتری برخوردار بود که به خاطر غلظت پایین باکتری زنده در واحد حجم بود. $OD_{600}=1$ با ۲۷ درصد بیان GFP در کالوس‌ها، بیشترین میزان تراریزش را در پی داشت.

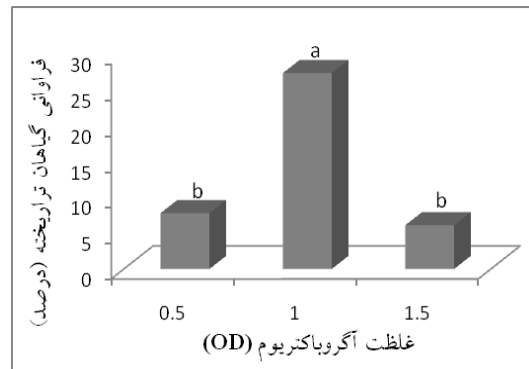
هرچند در غلظت $OD_{600}=1/5$ میزان تراریزش جو بسیار پایین آمد اما Wu و همکاران (1998) بیشترین میزان تولید گیاهان تراریخته جو را در غلظت‌های ۲- $OD_{600}=1$ و کمترین میزان تراریزش را در $OD_{600}=5$ گزارش کرده‌اند. همچنین Ke و همکاران (2002) بیشترین میزان تراریزش جو را در $OD_{600}=1/5$ بدست آورده‌اند. Yadav و همکاران (2013) نیز از $OD_{600}=1$ برای تراریزش رقم هندی جو استفاده کرده‌اند.

اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر تراریختی

جو

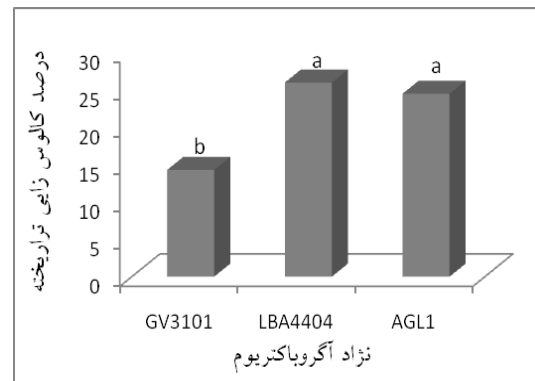
این آزمایش به منظور مقایسه توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در انتقال ژن به جو انجام شد. بدین منظور اثر سه سویه پر کاربرد آگروباکتریوم بر تراریزش جو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم از نظر میزان آلوده‌سازی و قدرت انتقال ژن به جو اختلاف معنی‌داری وجود داشت. فراوانی گیاهان جو تراریخت بدست آمده از دو سویه LBA4404 و AGL1 به مراتب بیشتر از سویه GV3101 بود (شکل ۳). چنین‌های نارس آلوده شده با سویه LBA4404 پس از یک ماه تولید کالوس‌های ریزتراریخته کردند.

انتخاب سویه آگروباکتریوم یکی از عوامل موثر در انتقال ژن به جو با استفاده از آگروباکتریوم هست. تعیین سویه برتر آگروباکتریوم نقش به‌سزایی در کارایی انتقال ژن به گیاهان دارند (Kumlehn et al., 2006; Bartlett et al., 2008; Ji et al., 2013). توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در آلوده‌سازی و انتقال ژن به گونه‌های مختلف گیاهی و حتی ژنوتیپ‌های مختلف درون یک گونه تفاوت معنی‌داری با هم دارند (Wroblewski et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Guo et al., 2012). با این حال تنها تعداد اندکی از سویه‌ها روی گیاهان آزمایش شده‌اند. بدین منظور برای دستیابی به سویه‌های برتر در تراریزش گیاهان، سویه‌های مختلف آگروباکتریوم مورد



شکل ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر میزان تراریزش گیاه جو.

Figure 2. Comparison the effect of different concentrations of Agrobacterium on barley transformation.



شکل ۳- مقایسه میانگین کارایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در تراریزش گیاه جو.

Figure 3. Comparison the efficiency means of different strains of Agrobacterium on barley transformation.

غلظت باکتری یکی از اصلی‌ترین عواملی است که کارایی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تعیین غلظت مناسب باکتری در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم، به عوامل متعددی بستگی دارد (Dita et al., 2006; Sujatha et al., 2012). در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت باکتری میزان تراریزش تا حدودی افزایش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر میزان تراریزش کاهش پیدا کرد. افزایش یا کاهش تراکم سلول‌های باکتری از حد مطلوب، در گیاهان دیگر نیز باعث کاهش فراوانی گیاهان تراریخته شده است (Wroblewski et al., 2005; Kim et al., 2009).

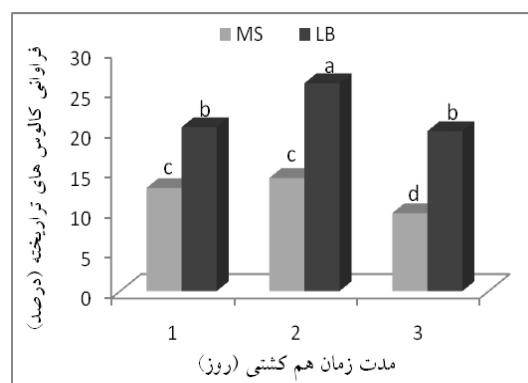
Bartlett *et al.*, 2008; Ji *et al.*,) بررسی قرار می گیرند (2013). معمولاً برای تراریزش غلاتی نظیر گندم، جو، برنج و ذرت از سویه های AGL0 و AGL1 استفاده می شود ولی استفاده از سویه LBA4404 نیز با موفقیت گزارش شده است (Kumlehn *et al.*, 2006; Hensel *et al.*, 2009). در مطالعه ای بیشترین میزان تراریزش جو از سویه LBA4404 در مقایسه با سویه EHA101 گزارش شده است (Wu *et al.*, 1998). همچنین Holme و همکاران (2008) نیز برای تراریزش گیاه جو از سویه AGL1 آگروباکتریوم استفاده کرده اند.

سویه LBA4404 یکی از رایج ترین سویه هایی است که برای تراریزش گیاهان در اکثر آزمایشگاه ها استفاده می شود به طوریکه به عنوان یکی از کارآمدترین سویه های آگروباکتریوم در تراریزش غلاتی مثل برنج (soltesz *et al.*, 2012)، گندم (Hensel *et al.*, 2009)، ذرت (Ombori *et al.*, 2013)، سورگوم (Ji *et al.*, 2013) و جو (Holme *et al.*, 2006; Shrawat *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2013) گزارش شده است.

سویه AGL1 در تراریزش برخی غلات از جمله گندم به عنوان یکی از سویه هایی موثر معرفی شده است (Wu

تجزیه واریانس اثر دوره هم کشتی و نوع محیط تلقیح بر روی تراریزش نشان داد که بین مدت زمان هم کشتی (۱، ۲ و ۳ روز) و محیط تلقیح باکتری (MS و LB) اثرات متقابل معنی داری در میزان تراریختی وجود داشت. مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد بیشترین میزان تراریزش جو در تیمارهایی که از محیط LB به عنوان محیط تلقیح باکتری و مدت زمان ۲ روز هم کشتی با باکتری استفاده شده بود بدست آمده است. همچنین کمترین میزان تراریزش در تیمارهایی که از محیط MS به عنوان محیط تلقیح باکتری و ۳ روز هم کشتی با باکتری استفاده شده بود حاصل شده است (شکل ۴).

شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر مدت زمان هم کشتی و محیط تلقیح باکتری بر میزان تراریزش.



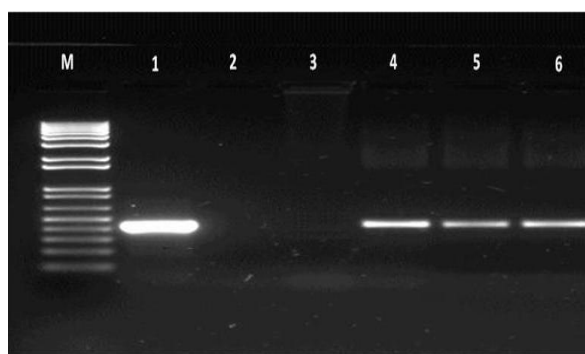
شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر مدت زمان هم کشتی و محیط تلقیح باکتری بر میزان تراریزش.

Figure 4. Comparison the mean of co-cultivation time and agrobacterium infection medium on barley transformation

در انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم طول مدت هم-کشتی از ۱ تا ۷ روز متفاوت می‌باشد. بیشترین کارایی تراریخت گیاهان در تیمارهایی با ۲ تا ۵ روز هم‌کشتی گزارش شده است (Han *et al.*, 2000; Mondal *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2002). در هم‌کشتی بیش از ۵ روز، بسته به سویه آگروباکتریوم، به دلیل رشد بیش از حد باکتری در اطراف ریزنمونه و به دنبال آن از بین رفتن ریزنمونه‌ها و اختلال در رشد و نمو بافت‌های تراریخته، کارایی تراریزش کاهش می‌یابد (Shrawat *et al.*, 2007) و مدت زمان هم‌کشتی ۲ تا ۳ روز منجر به افزایش کارایی تراریزش می‌شوند (Le *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2004). اما در این آزمایش مدت زمان هم‌کشتی ۳ روزه به دلیل افزایش آلودگی جنین‌ها مناسب نبود.

مطالعات Hensel و همکارانش (۲۰۰۹) نشان داد که هم-کشتی بیش از ۵ روز باعث افزایش آلودگی‌ها شده در نتیجه مانع از تشکیل کالوس و باززایی می‌شود بطوریکه مدت زمان هم‌کشتی ۲-۳ روز برای تراریزش و باززایی از جنین‌های نارس جو مناسب بود.

مدت زمان هم‌کشتی و محیط تلقیح باکتری از دیگر عواملی هستند که کارایی انتقال ژن به گیاهان را تحت تاثیر قرار دارند. هرچند با افزایش دوره هم‌کشتی از یک روز تا سه روز، تعداد جنین‌های با لکه‌های سبز افزایش پیدا می‌کرد، ولی آلودگی ریزنمونه‌ها در دوره هم‌کشتی سه روزه به مراتب افزایش یافته و کالوس‌ها حتی در صورت تراریخته بودن از بین می‌رفتند. محیط تلقیح باکتری از عوامل دیگری است که در باززایی ریزنمونه‌ها موثر می‌باشد (Danilova and Dolgikh, 2005). قدرت آلوده سازی و انتقال ژن به گیاهان در محیط تلقیح مناسب، به مراتب بیشتر از سایر محیط‌های تلقیح می‌باشد (Holme *et al.*, 2008). هرچند در اکثر آزمایشات تراریزش گیاهان استفاده از محلول تلقیح باکتری در MS مرسوم است و نتایج بهتری را می‌دهد. اما در این آزمایش میزان تراریزش با استفاده از محلول تلقیح در خود LB افزایش قابل توجهی داشت. همچنین مدت زمان هم‌کشتی دو روزه با استفاده از محیط تلقیح LB با ۲۷ درصد تراریزش بهترین ترکیب تراریزش جو بودند.

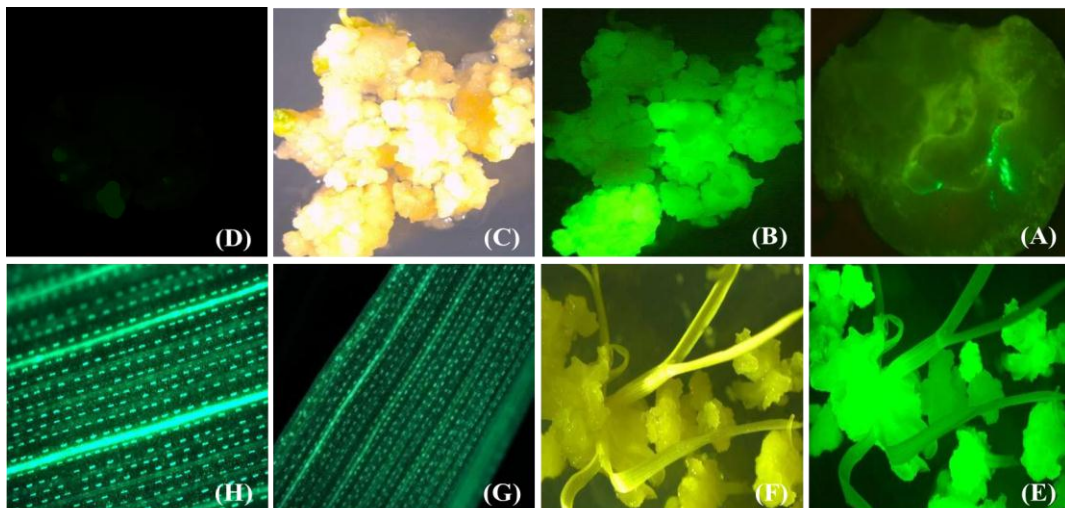


شکل ۵- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR. M: نشانگر مولکولی، ۱: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن GFP)، ۲: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)، ۳: گیاه شاهد (گیاه غیرتراریخت) و ۴ تا ۶: گیاهان تراریخته.

Figure 5. Analysis of transgenic plants by PCR. M: Molecular marker, 1: Positive control (the plasmid harboring GFP gene), 2: Negative control (distilled water without DNA). 3: Control plant (non-transgenic plant), 4-6: transgenic plants.

شده از بین می‌رفتند. در اغلب موارد با رشد و کالوس-زایی از بافت‌های تراریخته در حضور ماده گزینش‌گر هیگرومایسین، بیان ژن GFP در تمام بخش‌ها و حتی گیاهان باززایی شده از کالوس‌ها به خوبی بیان می‌شد (شکل ۶). بیان ژن GFP در بافت‌ها و بخش‌های مرستمی کالوس‌ها خیلی بهتر و بیشتر از بافت‌های مسن بود به طوریکه در برگ گیاهان بالغ بیان آن به مراتب کمتر از بیان آن در کالوس‌ها و بخش‌های جوان‌تر بود (شکل ۶E). بیان ژن GFP در گیاهان T0 و T1 در برگ-های گیاهان در حال پنجه زنی نیز به خوبی بیان می‌شود و بیان آن در سلول‌های محافظ روزنه‌ای واضح‌تر بود (شکل ۶G,H).

ژن پروتئین سبز (GFP) به دلیل امکان ردیابی در بافت-های زنده بدون آسیب رساندن به گیاهان تراریخته در تمام مراحل انتقال از ارجحیت بالاتری برخوردار است (Kumlehn *et al.*, 2006; Shrawat *et al.*, 2007). در این مطالعه از این ژن تحت کنترل راه انداز CaMV 35S استفاده گردید. ۷۲ ساعت پس از تلقیح جنین‌های نارس با آگروباکتریوم، امکان ردیابی فرآیند تراریزش ریزنمونه‌ها در زیر نور فلورسنس وجود داشت (شکل ۶A). در موارد علی‌رغم موفقیت اولیه در درج و بیان ژن در بافت جنین‌های نارس، بعد از گذشت چند روز ژن به دلایل نامعلومی خاموش می‌گردید (شکل ۶D). در این صورت کالوس‌ها نیز به خاطر عدم بیان ژن *hpt* نکرده



شکل ۶- بیان موقت و دائم ژن GFP در جو. (A) بیان ژن GFP در جنین نارس جو ۳ روز پس از تلقیح تحت تابش نور UV. (B) بیان ژن GFP در کالوس جو یک ماه پس از تلقیح تحت تابش نور UV. (C) کالوس جو یک ماه پس از تلقیح بدون حضور نور UV. (D) خاموشی تدریجی ژن در برخی کالوس‌ها. (E) بیان ژن GFP در شاخه‌های باززایی شده از کالوس تراریخته جو پس از یک ماه تحت تابش نور UV. (F) شاخه‌های باززایی شده از کالوس تراریخته جو پس از یک ماه بدون حضور نور UV. (G) بیان پایدار ژن GFP در برگ‌های جوان گیاهان تراریخته نسل T0 تحت تابش نور UV. (H) بیان پایدار ژن GFP در برگ‌های جوان گیاهان تراریخته نسل T1 تحت تابش نور UV.

Figure 6. Transient and stable expression of GFP gene in barley. (A) Expression of GFP gene in barley immature embryos after 3 days inoculation under UV light. (B) Expression of GFP gene in barley callus after 1 month inoculation under UV light. (C) Barley callus after 1 month inoculation without UV light. (D) Gradually gene silencing in some callus. (E) Expression of GFP gene in shoot regenerated from transgenic callus after 1 month inoculation under UV light. (F) Shoot regeneration from transgenic callus after 1 month inoculation without UV light. (G) Stable expression of GFP gene in young leaves of transgenic plants of T0 generation under UV light. (H) Stable expression of GFP gene in young leaves of transgenic plants of T1 generation under UV light.

منابع

- Aldemita RA, Hodges TK. 1996.** *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617.
- Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA. 2008.** High throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4: 21-22.
- Bettina N, Petra M, Robert M, Janos P, Gabor VH. 2016.** Stress tolerance of transgenic barley accumulating the alfalfa aldose reductase in the cytoplasm and the chloroplast. *Phytochemistry* 129: 14-23.
- Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. 2006.** Reporter gene fusions. *WormBook*. New York, USA, 1-23.
- Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL. 2002.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt transgenic cauliflower. *Bio Science* 27: 495-502.
- Cheng M, Lowe BA, Spencer TM, Ye X, Armstrong CL. 2004.** Factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation of monocotyledonous species. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40: 31-45.
- Dahleen LS, Manoharan M. 2007.** Recent advances in barley transformation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 43: 493-506.
- Danilova SA, Dolgikh YI. 2005.** Optimization of *Agrobacterium (Agrobacterium tumefaciens)* Transformation of Maize Embryogenic Callus. *Russian Journal of Plant Physiology* 4: 535-541.
- Dita MA, Rispaill N, Prats E, Rubiales D, Singh KB. 2006.** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1-24.
- El Shemy HA, Khalafalla MM, Ishimoto M. 2008.** The Role of Green Fluorescent Protein (GFP) in Transgenic Plants to Reduce Gene Silencing Phenomena. *Current Issues in Molecular Biology* 11: 21-28.
- Gasparis S, Bregier C, Orczyk W, Nadolska A. 2008.** *Agrobacterium*-mediated transformation of oat (*Avena sativa* L.) cultivars via immature embryo and leaf explants. *Plant Cell Reports* 27: 1721-1729.
- Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J. 2012.** Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transient expression of Micro-Tom tomatoes. *Genetics and Molecular Research* 11:661-671.
- Han KH, Meilan R, Ma C, Strauss SH. 2000.** An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports* 19: 315- 320.
- Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J. 2009.** *Agrobacterium* mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics* 51: 1-9.
- Hiei Y, Komari T. 2008.** *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols* 3: 824-834.
- Holme I, Brinch Pedersen H, Lange M, Holm PB. 2006.** Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Reports* 25: 1325-1335.
- Holme IB, Brinch Pedersen H, Lange M, Holm PB. 2008.** Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Reports* 27:1833-1840.
- Iehisa JCM, Ohno R, Kimura T, Enoki H, Nishimura S, Okamoto Y, Nasuda S, Takumi S. 2014.** A high-density genetic map with array-based markers facilitates structural and quantitative trait locus analyses of the common wheat genome. *DNA Research* 21: 555-567.
- Jha P, Shash I, Rustagi A, Agnihotri PK, Kulkarni VM, Bhat V. 2011.** Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. using shoot apices as explant source. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 107: 501-512.
- Ji Q, Xu X, Wang K. 2013.** Genetic transformation of major cereal crops. *The International Journal of Developmental Biology* 57: 495-508.
- Karakas O, Ucarli C, Gozukirmizi N, Gurel F. 2011.** Assessment of barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Journal of Applied Biological Sciences* 5: 55-58.
- Ke XY, Cormac ACM, Harvey A, Lonsdale D, Chen DF, Elliott, MC. 2002.** Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by *Agrobacterium* into cells of immature embryos of barley and wheat. *Euphytica* 126: 333-343.
- Kim MJ, Baek K, Park CM. 2009.** Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 28:1159-1167.
- Kovalchuk N, Jia W, Eini O, Morran S, Pyvovarenko T, Fletcher S, Bazanova N, Harris J, Beck-Oldach K, Shavrukov Y, Langridge P, Lopato S. 2013.** Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. *Plant Biotechnology Journal* 11: 659-670.
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hansel G, Becker D, Lorz H. 2006.** Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* 4: 251-261.
- Liu Y, Yu J, Ao G, Zhao Q. 2007.** Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 23: 531.
- Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N.**

2004. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation in tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 201-201.
- Lu B, Wu J, Fu D. 2015. Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. *Journal of Integrative Agriculture* 14: 453-468.
- Manoharan M, Dahleen L. 2002. Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Reports* 21: 76-80.
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK. 2001. Transgenic tea (*Camellia sinensis* L.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 20: 712-720.
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S. 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of *DREB/CBF* factors. *Plant Biotechnology Journal* 9: 230-249.
- Mrizova K, Holaskova E, Tufan OM, Jiskrova E, Frebort I, Galuszka P. 2014. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances* 32: 137-157.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nevo E. 2013. Evolution of wild barley and barley improvement. In: Zhang G, Li C, Liu X (Ed.) *Advance in Barley Sciences*. Springer, Netherlands, 1-23.
- Nussbaumer T, Spannagl M, Bader K C, Pfeifer M, Mayer K. 2014. A tool to visualize synteny between plant genomes including recently published cereal genomes of *Aegilops tauschii* and *Hordeum vulgare*. In: *Proceedings of 22nd Plant and Animal Genome Conference*. USA, San Diego, CA, 554-573.
- Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. 2009. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28: 387-395.
- Ombori O, Muoma JVO, Machuka J. 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113:11-23.
- Ozawa K. 2009. Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 176: 522-527.
- Pallota MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker, SJ. 2000. RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1100-1108.
- Risk JM, Selter LL, Chauhan H, Krattinger SG, Kumlehn J, Hensel G, Viccars LA, Richardson TM, Buesing G, Troller A, Lagudah ES, Keller B. 2013. The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. *Plant Biotechnology Journal* 11: 847-854.
- Seiler C, Harshavardhan VT, Reddy PS, Hensel G, Kumlehn J, Eschen-Lippold L, Rajesh K, Korzun V, Wobus U, Lee J, Selvaraj G, Sreenivasulu N. 2014. Abscisic acid flux alterations result in differential abscisic acid signaling responses and impact assimilation efficiency in barley under terminal drought stress. *Plant Physiology* 164: 1677-1696.
- Shim Y S, Pauls K P, Kasha K J. 2009. Transformation of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores: I. The influence of pretreatments and osmotic treatment on the time of DNA synthesis. *Genome* 52: 166-174.
- Shou H, Frame BR, Whitman SA, Wang K. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 13: 201-208.
- Shrawat AK, Becker D, Lorz H. 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172: 281-290.
- Shrawat AK, Lorz H. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers, *Plant Biotechnology Journal* 4: 575-603.
- Soltész A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W, Vagujfalvi A. 2013. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany* 64: 1849-1862.
- Soltész A, Vagujfalvi A, Rizza F, Kerepesi I, Galiba G, Cattivelli L, Coraggio I, Crosatti C. 2012. The rice *Osmyb4* gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants. *Journal of Applied Genetics* 53: 133-143.
- Somleva MN, Tomaszewski Z, Conger BV. 2002. *Agrobacterium* mediated transformation of switchgrass. *Crop Science* 42: 2080-2087.
- Sujatha M, Vijay S, Vasavi S, Veera Reddy P, Chander Rao S. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 110: 275-287.
- Tang W, Newton RJ, Weidner DA. 2007. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *Journal of Experimental Botany* 58: 545-554.
- Tingay S, Mcelroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* mediated barley transformation. *Plant Journal* 11: 1369-1376.
- Vyroubalova S, Smehilova M, Galuszka P, Ohnoutkova L. 2011. Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biologia Plantarum* 55: 213-224.
- Wan Y, Lemaux PG. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37-48.

- Wang MB, Abbott DC, Upadhyaya NM, Jacobsen JV, Waterhouse PM. 2001.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 149-156.
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R. 2005.** Optimization of *Agrobacterium*- mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 3:259-273.
- Wu H, Cormac ACM, Elliott MC, Chen DF. 1998.** *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 161-171.
- Wu H, Doherty A, Jones HD. 2008.** Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) using additional virulence genes. *Transgenic Research* 17: 425-436.
- Yadav T, Kothari SL, Kachhwaha S. 2013.** Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation and Regeneration of Transgenic Plants in Indian Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. BL 2). *Biological Sciences* 83:255-264.
- Yu GR, Liu Y, Du WP, Song J, Lin M, Xu LY, Xiao FM and Liu YS. 2013.** Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Immature Embryo Transformation System and Transformation of Glyphosate-Resistant Gene 2mG2-EPSPS in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Integrative Agriculture* 12: 2134-2142.
- Zhao Z, Cai T, Tagliani L, Miller M, Wang N, Pang H, Rudert M, Schroeder S, Hondred D, Seltzer J, Pierce D. 2000.** *Agrobacterium* mediated sorghum transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* 44: 789-798.
- Zhou G, Pereira JF, Delhaize E, Zhou M, Magalhaes JV, Ryan PR. 2014.** Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. *Journal of Experimental Botany* 65: 2381-2390.