مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۴۲-۱۳۱

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

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

ابراهیم دورانی علیایی[1*] – وحید مهری زاده[2]

Ebrahim Doranie Uliaie[*1] – Vahid Mehrizadeh[2]

[1] دانشیار و [2] 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 تاییدحضور 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 عنون موثرترین سویه‌های آگروباکتریوم و غلظت ۱=OD_{600} 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

مقدمه

جو (*Hordeum vulgar* 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 می‌باشد (Lu *et al*., 2015).

جو علاوه بر اینکه یک غله مهم می‌باشد، 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 (۲n=۲x=۱۴) برخوردار است که برای مطالعه صفات خاص و افزایش بیان و یا خاموش کردن ژن‌ها در غلات مناسب می‌باشد (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 محدودیت-هایی که دارد هنوز هم یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تولید گیاهان تراریخته به شمار می‌آید (Ji *et al*., 2013; Mrizova *et al*., 2014). در سال‌های اول توسعه انتقال ژن به گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم تصور می‌شد 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 موفقیت‌آمیز ژن به واسطه آگروباکتریوم در برخی از غلات مثل برنج (Aldemita and Hodges, 1996; Hiei and Komari, 2008; Ozawa, 2009; Soltesz *et al*., 2012)، ذرت (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 امکان‌پذیر 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 می‌توان 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 می‌توان به ژنوتیپ گیاه (Cheng *et al*., 2004)، نوع ریزنمونه (Holme *et al*., 2008; Lu *et al*.,

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

2015)، سویه باکتری (Ji *et al*., 2013)، غلظت باکتری (Kim *et al*., 2009)، مدت زمان هم‌کشتی (Sujatha *et al*., 2012)، سیستم گزینشی و سیستم باززایی (Yadav *et al*., 2013) 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 سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در آلوده سازی و انتقال ژن به گیاهان متفاوت می‌باشد. انتخاب سویه مناسب آگروباکتریوم می‌تواند 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 ریزنمونه‌ها کارایی تراریزش گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Shrawat and Lorz, 2006; Sujatha *et al*., 2012).

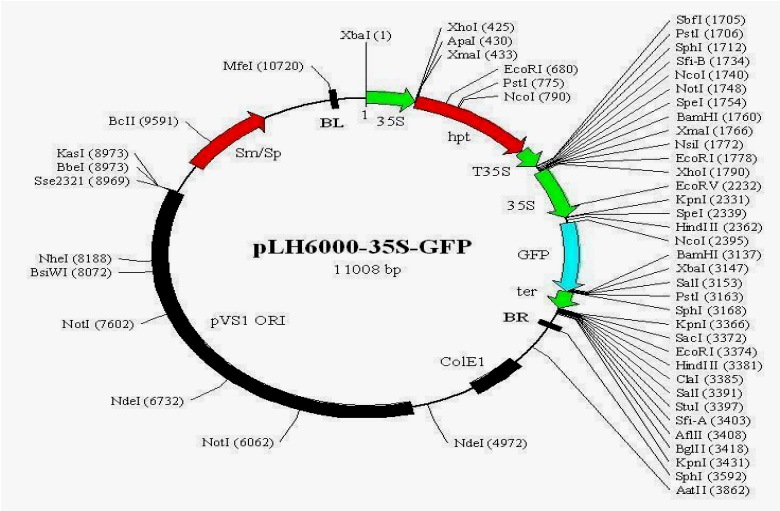
از دیگر عوامل موثر در مطالعه تراریزش گیاهان و همچنین بهینه سازی شرایط انتقال، استفاده از ژن‌های گزارشگر می‌باشد. ردیابی و آشکارسازی سیستم‌های تراریزش گیاه، به منظور اطلاع از انتقال موفق DNA مورد نظر به ژنوم سلول‌های میزبان به کمک مجموعه‌های از ژن‌ها، موسوم به ژن‌های گزارشگر صورت می‌گیرد (Kumlehn *et al*., 2006; Bettina *et al*., 2016). ژن‌های گزارشگر وسیله‌ای مناسبی برای مطالعه اجزای بیان ژن‌ها هستند. Green Fluorescent Protein (GFP) به عنوان یک گزارشگر پروتئینی است که در طول موج خاصی از نور به رنگ سبز روشن مشاهده می‌شود (Boulin *et al*., 2006). از مزایای این پروتئین به عنوان ژن گزارشگر می‌توان به غیر تهاجمی بودن آن، اندازه کوچک، مطالعه بافت‌های 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 هم‌کشتی با آگروباکتریوم گزارش می‌گردد و یک روش کارآمد برای انتقال ژن به جو از طریق آگروباکتریوم ارائه می‌شود.

مواد و روش‌ها

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.

سازه‌های ژنی و سویه‌های باکتری: در این پژوهش از ۳ سویه (GV3101، LBA4404 و AGL1) *آگروباکتریوم تومفسینس* که حاوی پلاسمید pLH6000 بودند، جهت تراریزش جنین‌های نارس جو استفاده شد. پلاسمید مذکور حاوی ژن‌های 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]



شکل ۱- نمای شماتیک پلاسمید pLH6000.

Figure 1- Schematic map of pLH6000 plasmid.

آگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب را ابتدا در محیط کشت YEP (عصاره مخمر gr/l ۱۰، پپتون gr/l ۱۰ و کلرید سدیم gr/l ۵) به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین و ۳۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین به مدت یک شب در دمای ۲۸°C با ۱۵۰ دور در دقیقه کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت وقتی که OD باکتری بین ۱-۰/۸ رسید، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (۴۰۰۰-۳۵۰۰ دور در دقیقه) رسوب داده شد و در محیط MS مایع در غلظت‌های ۱/۵ و ۱، OD_{600nm}=۰/۵ رقیق شدند.

تلقیح جنین‌های نارس با آگروباکتریوم: برای تلقیح با *آگروباکتریوم تومفسینس* 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 ۲۵°C نگهداری شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی: پس از هم‌کشتی، جنین‌های تلقیح شده به محیط انتخابی القای کالوس تکمیل شده با ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر تیکارسیلین منتقل شدند. بعد از ۶-۴ هفته کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده به محیط باززایی شامل محیط MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP منتقل و در دمای ۲۴±۲° 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 برای انتقال به خاک به اندازه کافی قوی شوند. گیاهان T0 برای بذرگیری 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 ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه با ۳۰ چرخه تکرار استفاده گردید. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *GFP*

Table 1- specific primers sequence of GFP gene.

آغازگر GFP Primers of GFP	توالی آغازگر Primer sequences
آغازگر روبه جلو Forward primer	5′-GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3′
آغازگر رو به عقب Reverse primer	5′-TAGTGGTTGTCGGGCAGCAGC-3′

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 فلورسنس مشاهده شده و تعداد کالوس‌های با رنگ سبز برای هر کدام از آنها یادداشت گردید. علاوه برآن درصد ریزنمونه‌ها یا کالوس سبز بدست آمد. همچنین برگ‌های تازه نسل T0 و نسل T1 گیاهان تراریخته نیز زیر میکروسکوپ فلورسنس 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 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}=۱ 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}=۱ و سویهLBA4404 طی یک آزمایش فاکتوریل دو عامل شامل دوره هم‌کشتی (یک، دو و سه روز) و محیط تلقیح (MS و LB) بر پایه طرح کاملا 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.

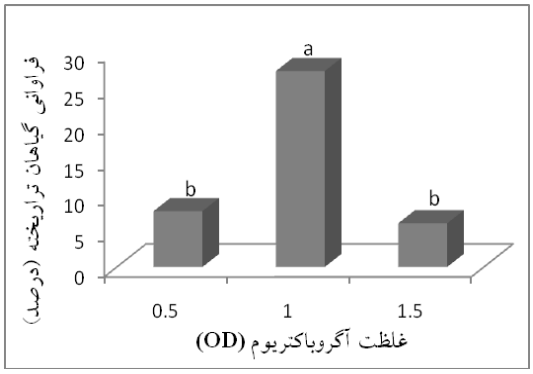
نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم روی تراریختی

به منظور تعیین OD مناسب برای تراریزش رقم والفجر گیاه جو، غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (۱/۵ و ۱ OD_{600nm}=۰/۵،) 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}=۱ کارایی انتقال افزایش یافته ولی در غلظت بالاتر (OD_{600}=۱/۵) کارایی انتقال کاهش یافته است (شکل ۲). استفاده از غلظت OD_{600}=۱/۵ باعث رشد زیاد باکتری بر روی ریزنمونه‌ها شد و کنترل آنرا مشکل کرد. در حالی که غلظت پایین‌تر (OD_{600}=۰/۵) از میزان تراریزش کمتری برخوردار بود که به خاطر غلظت پایین باکتری زنده در واحد حجم بود. OD_{600}=۱ با ۲۷ درصد بیان GFP در کالوس‌ها، بیشترین میزان تراریزش را در پی داشت.

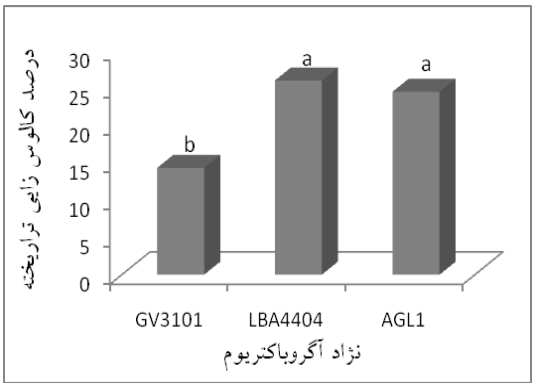
[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]



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 کارآیی 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 کارآیی 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).

هرچند در غلظت OD_{600}=۱/۵ میزان تراریزش جو بسیار پایین آمد اما Wu و همکاران (1998) بیشترین میزان تولید گیاهان تراریخته جو را در غلظت‌های ۲-OD_{600}=۱ و کمترین میزان تراریزش را در OD_{600}=۵ گزارش کرده‌اند. همچنین Ke و همکاران (2002) بیشترین میزان تراریزش جو را در OD_{600}=۱/۵ بدست آورده‌اند. Yadav و همکاران (2013) نیز از OD_{600}=۱ 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). جنین‌های 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 به سزایی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

بررسی قرار می‌گیرند (Bartlett *et al*., 2008; Ji *et al*., 2013).

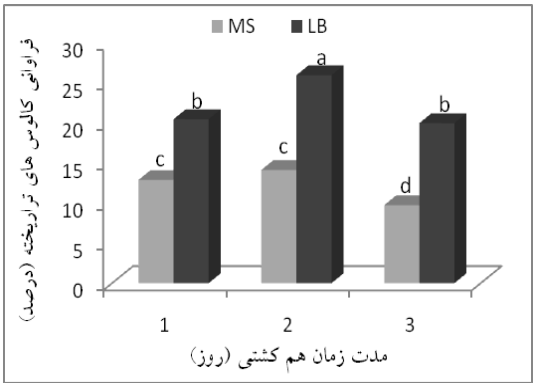
معمولا برای تراریزش غلاتی نظیر گندم، جو، برنج و ذرت از سویه‌های AGL0 و AGL1 استفاده می‌شود ولی استفاده از سویه LBA4404 نیز با موفقیت گزارش شده است (Kumlehn *et al*., 2006; Hensel *et al*., 2009). در مطالعه‌ای بیشترین میزان تراریزش جو از سویه LBA4404 در مقایسه با سویه EHA101 گزارش شده است (Wu *et al*., 1998). همچنین Holme و همکاران (2008) نیز برای تراریزش گیاه جو از سویه AGL1 آگروباکتریوم استفاده کرده‌اند.

سویه LBA4404 یکی از رایج‌ترین سویه‌هایی است که برای تراریزش گیاهان در اکثر آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود به طوریکه به عنوان یکی از کارامدترین 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 سویه‌هایی موثر معرفی شده است (Wu *et al*., 2008). سویه GV3101، از گونه C58 مشتق شده است. یکی از مشکلات این سویه رشد بیش از حد آن در طول مرحله هم‌کشتی است که روی ریزنمونه‌ها دیده می‌شوند. رشد بیش از حد باکتری با رشد کالوس در محیط انتخابی تداخل ایجاد کرده و باعث کاهش قدرت بازایی می‌شود (Kim *et al*., 2009).

اثر محیط تلقیح و مدت زمان هم‌کشتی آگروباکتریوم روی تراریختی

تجزیه واریانس اثر دوره هم‌کشتی و نوع محیط تلقیح بر روی تراریزش نشان داد که بین مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲ و ۳ روز) و محیط تلقیح باکتری (MS و LB) اثرات متقابل معنی‌داری 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 هم‌کشتی 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 هم‌کشتی با باکتری استفاده شده بود حاصل شده است (شکل ۴).



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

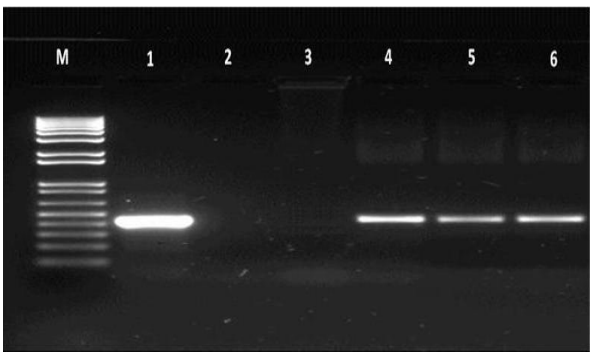
Figure 4. Comparison the mean of co-cultivation time and agrobacterium infection medium on barley transformation

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

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.

در انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم طول مدت هم-کشتی از ۱ تا ۷ روز متفاوت می‌باشد. بیشترین کارآیی 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، کارآیی 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 ۳-۲ روز برای تراریزش و باززایی از جنین‌های نارس جو مناسب بود.



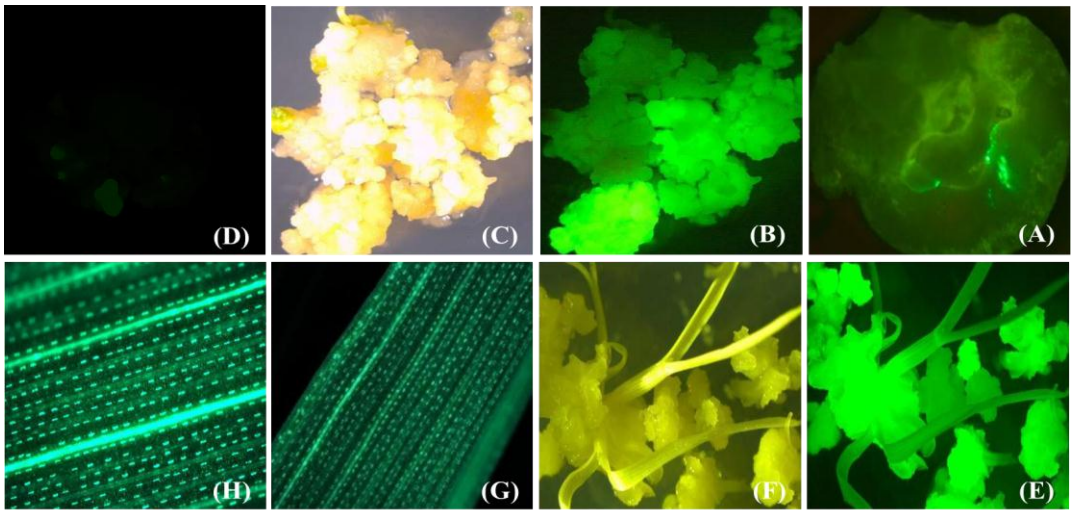
شکل ۵- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR، M: نشانگر مولکولی، ۱: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن GFP)، ۲: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)، ۳: گیاه شاهد (گیاه غیرتراریخت) و ۴ تا ۶: گیاهان تراریخته.

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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

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 A۶). در برخی 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 ۶ D). در این صورت کالوس‌ها نیز به خاطر عدم بیان ژن *htp* نکروزه 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 مریستمی 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 E۶). بیان ژن GFP در گیاهان T0 وT1 در برگ-های گیاهان در حال پنجه زنی نیز به خوبی بیان می‌شود و بیان آن در سلول‌های محافظ روزنه‌ای واضح‌تر بود (شکل ۶ G,H).



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 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

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 Agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) Transformation of Maize Embryogenic Callus. Russian Journal of Plant Physiology 4: 535-541.

Dita MA, Rispail 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 italic* L.). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology 23: 531.

Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

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.

Soltesz 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.

Soltesz 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]

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. Australain 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.7.4]