

بهینه سازی کشت کالوس و انتقال ژن به چند رقم برنج ایرانی با آگروباکتريوم

Optimization of callus induction and Agro-transformation on some Iranian Rice cultivar

افسانه ابراهیمی هروان^۱، ابراهیم دورانی^{۱*}، الهه بینا^۱، بهزاد قره‌یازی^۲

Afsaneh Ebrahimi Heravan¹, Ebrahim Dorani^{*1}, Elahe Bina¹, Behzad Ghareyazi²

۱- گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

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

2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural
Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: uliaie@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۱)

چکیده

از مهمترین اهداف اصلاح برنج (*Oryza sativa* L.)، به دست آوردن ارقام جدید با عملکرد بالا، کیفیت بهتر و مقاوم در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی به کمک مهندسی ژنتیک است. در این آزمایش، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (NAA، 2,4-D، Kin) و پرولین (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در کالوس‌زایی چند رقم زراعی (شامل موسی طارم، نعمت، دم‌سرخ، غریب، علی‌کاظمی و درفک) و همچنین اثر سویه‌های آگروباکتريوم تومه‌فاشینز (LBA4404، AGL-1، EHA105) و غلظت باکتری (۱ و ۰/۶، ۰/۲) (OD₆₀₀) در تراریزش رقم برگزیده مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که بین تنظیم‌کننده‌های رشد و ژنوتیپ در پاسخ به کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشتر ارقام در بیشتر ترکیبات هورمونی درصد کالوس‌زایی بالای ۸۰٪ را داشتند. در بین ارقام مورد مطالعه، رقم حسن‌سرایبی بیشترین میزان رشد کالوس (۰/۴۹ گرم) را در محیط کشت حاوی 2,4-D 2 mg/l داشت و ارقام غریب و دم‌سرخ نیز بیشترین وزن کالوس (بالای ۰/۴ گرم) را در محیط دارای 2,4-D 2 mg/l و NAA 2 mg/l تولید کردند. استفاده از اسید آمینه پرولین میزان رشد کالوس‌ها را در مقایسه با شاهد کاهش داد و با افزایش میزان پرولین، رشد کالوس کاهش بیشتری داشت. کمترین میزان وزن کالوس‌های برنج (۰/۱۳۸ گرم) در محیط کشت دارای ۶۰۰ mg/l پرولین مشاهده شد. در میان سه سویه بکار گرفته شده در تراریزش برنج، کالوس‌های تراریخته تنها با استفاده از سویه EHA105 بدست آمدند. هر چند اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف آگروباکتريوم در تراریزش برنج مشاهده نشد، ولی باکتری در غلظت ۱ OD₆₀₀= کالوس‌های تراریخته بیشتری را تولید کرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده رقم دم‌سرخ قابلیت کالوس‌زایی بیشتری را در محیط دارای 2,4-D داشته و می‌توان از آن در انتقال ژن با اهداف مختلف استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

پرولین،
تنظیم‌کننده رشد 2,4-D،
تراریزش،
دم‌سرخ،
سویه EHA105

(Mansfield, 2004). پاسخ به کشت بافت در برنج به عوامل متعددی از قبیل نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد (Jain et al. 1996)، منبع کربن (Alam et al. 1994)، مواد مکمل محیط غذایی مثل زغال فعال و اسیدآمینها و ... (Bajia and Rajam, 1995; Yang et al. 2005)، نوع و درصد ماده‌ی ژله‌کننده‌ی محیط کشت (Shaukat et al. 2001)، ژنوتیپ (khanna and Raina, 2002)، نوع و سن ریزنمونه (Kishor and Reddy, 1987)، نور، دما و pH (Yang and Jian, 1996) بستگی دارد که اغلب اثرهای متقابل با هم دارند. بهینه‌سازی عوامل مؤثر در القای کالوس و تراریزش گیاهان، از جمله برنج، اولین قدم در بهره‌برداری از کشت درون شیشه‌ای در اصلاح این گیاه می‌باشد. با توسعه سویه‌های آگروباکتریوم مستعدتر برای آلوده‌سازی گیاهان تک لپه، تراریزش برنج بواسطه آگروباکتریوم به یک روش متداول تبدیل شده است (Hiei et al. 2008). موفقیت این روش انتقال ژن به گیاه، به ژنوتیپ و گونه‌ی گیاهی، نوع و سن ریزنمونه، نوع ناقل استفاده‌شده برای انتقال ژن، سویه‌ی آگروباکتریوم و غلظت آن، مراحل و عمل آلودگی با باکتری شامل مدت زمان تلقیح، مناسب بودن محیط هم‌کشتی به خصوص از لحاظ دمایی و pH وابسته است (Dai et al. 2001). شناسایی و غربالگری ارقام مناسب برای توسعه کالوس‌های جنینی و باززایی از طریق کشت درون شیشه‌ای، و تراریزش آنها گامی حیاتی در مهندسی ژنتیک برنج است. در این پژوهش اثر چند عامل رقم، تنظیم‌کننده‌ی رشد، ماده‌ی آلی پرولین، سویه غلظت آگروباکتریوم در القای کالوس و تراریزش برنج ایرانی با استفاده از جنین بالغ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی و کشت: بذور رقم‌های موسی طارم، نعمت، دم‌سرخ، غریب، علی کاظمی و درفک، از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شدند و این بذور رسیده پس از جدا شدن پوسته آنها، تحت شرایط استریل و زیر هود لامینار، ابتدا به مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه در

برنج نیمی از کربوهیدرات رژیم غذایی مردم، بخصوص در کشورهای آسیایی را فراهم می‌کند و مناسب‌ترین رژیم غذایی برای بیش از ۳ میلیارد انسان و تأمین‌کننده‌ی ۵۰-۸۰ درصد از کالری جذب‌ی بدن انسان است (Khush, 2005). طبق پیش‌بینی‌ها جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۴ میلیارد می‌رسد و تخمین زده می‌شود که برای برآورد نیاز سالانه مردم به برنج، تولید آن باید ۸-۱۰ میلیون تن در سال (یا بیشتر از ۱/۵ درصد) افزایش یابد (Patra et al. 2016). برنج دارای ۲۳ گونه‌ی مختلف است که ۲۱ گونه‌ی وحشی و دو گونه‌ی زراعی را شامل می‌شود. از میان ۲۳ گونه *Oryza sativa* و *Oryza glaberrima* به طور زراعی کشت می‌شوند که *O. sativa* در آسیا و *O. glaberrima* در برخی مناطق غرب افریقا کشت می‌شود (Linares, 2002). برنج *O. sativa* در جهان به سه زیرگونه‌ی *Indica*, *Javanic*, *Japonic* تقسیم می‌شود (Garris et al. 2005). از این میان زیرگونه‌ی *Indica* به طور گسترده‌تری در کشورهای آسیایی و از جمله ایران کشت و مصرف می‌شود.

در کنار به‌نژادی کلاسیک، استفاده از مهندسی ژنتیک و روش‌های زیست‌فناوری تنها راه ممکن برای رسیدن به تولید کافی از این محصول است (Pawar et al. 2015). از کشت بافت گیاهی می‌توان به‌عنوان روشی مکمل برای برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. استفاده از کشت درون شیشه‌ای در ترکیب با سیستم‌های اصلاح متعارف مانند اصلاح از طریق جهش‌زایی می‌تواند به افزایش عملکرد برنج کمک کند (Krishnan et al. 2013; Khush, 2005). عمده‌ترین مشکل در کشت درون شیشه‌ای برنج، بویژه ارقام هندی، پایین بودن سرعت رشد کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی آن می‌باشد (Chu and Croughan, 1990). برخلاف گزارش‌های زیادی که در مورد کشت بافت برنج وجود دارد، پاسخ به کشت بافت این گیاه به شدت به ژنوتیپ وابسته است (Kumria et al. 2001). بنابراین شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب برای رشد کالوس و باززایی گیاه در شرایط آزمایشگاهی پیش شرطی لازم در بهبود ژنتیکی برنج است (Hoque and

آگروباکتریوم تومه فاشینز با ناقل بیان گیاهی pCAMBIA1304 حاوی ژن *GUS* با روش ذوب و انجام ترازیخت شد. تأیید مولکولی ترازیخت آگروباکتریوم با پلاسمید نو ترکیب با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن گاس به ترتیب با توالی 5'CCA GAT CTA ACA ATG CGC و 3'GGT GGT CAG TCCC3' برای آغازگر روبه جلو و 5'CCA GAT CTA TTC ATT GTT TGC CTC CCTGCT GC3' به عنوان آغازگر پس رو صورت گرفت. مخلوط واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر آماده گردید و در نهایت محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و با TBE با ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. آزمایش ترازیخت در ۲ مرحله صورت پذیرفت بدین ترتیب که در مرحله اول از سه سویه‌ی مدنظر سویه مناسب‌تر انتخاب گردید و در مرحله دوم سه غلظت مختلف آن سویه در ترازیخت رقم انتخابی مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تأیید مولکولی باکتری‌های ترازیخت، کالوس‌های جنین زای ۲۱ روزه رقم دم سرخ، تحت شرایط استریل به مدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها از سوسپانسیون باکتری خارج و روی کاغذ واتمن استریل بطور نسبی خشک شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت برای هم‌کشتی در محیط MS جامد بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و آنتی‌بیوتیک و دارای استوسرینگون ۱۰۰ میلی مولار قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان لازم برای هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط MS مایع حاوی ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین شستشو داده شدند و پس از خشک شدن روی کاغذ واتمن استریل، در محیط MS جامد دارای ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین واکشت شدند. نمونه‌ها در پایان هر ۱۵ روز واکشت شدند و در نهایت کالوس‌های رشد یافته به منظور بررسی هیستوشیمیایی کالوس‌های ترازیخته با محلول X-gluc رنگ‌آمیزی شدند. به این منظور ۱۰ میلی گرم از پودر X-gluc در متیل فورمامید حل گردید و محلول حاصل به ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات اضافه شد. کلیه کشت‌ها در اتاق رشد با دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط تاریکی قرار گرفتند.

هیپوکلریت سدیم با غلظت ۵ درصد شستشو شدند. بذور دارای جنین‌های رسیده برنج، در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد کشت شدند (جدول ۱).

جدول ۱- غلظت تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط MS

Table 1. concentration of growth regulator in MS media

| Kin (mg/l) | NAA(mg/l) | 2,4-D (mg/l) | تیمار |
|------------|-----------|--------------|-------|
| - | - | ۲ | ۱ |
| - | ۱ | ۱ | ۲ |
| - | ۰/۵ | ۲ | ۳ |
| - | ۱ | ۲ | ۴ |
| - | ۲ | ۲ | ۵ |
| ۰/۵ | - | ۲ | ۶ |

نگهداری و کشت: پس از کشت بذور در شرایط حفاظت شده، کشت‌ها در اتاق رشد با دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از کالوس‌زایی و رشد کافی (۲۱ روز)، بذر و کولتوئیدیل از کالوس‌های رشد یافته جدا شد و واکشت کالوس‌ها در محیط کشت جدید انجام گرفت.

یادداشت برداری و تجزیه آماری: پس از ۲ دوره واکشت و در پایان دو ماه، درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس‌ها به عنوان شاخصی از کالوس‌زایی اندازه‌گیری شدند. درصد کالوس‌زایی با شمارش تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس نسبت به کل ریزنمونه‌ها برآورد گردید و وزن تر کالوس‌ها با ترازوی حساس اندازه‌گیری شد. همچنین پس از بدست آمدن نتایج و تعیین مناسب‌ترین تنظیم کننده‌های رشد، آزمایش با حفظ تنظیم کننده‌های رشد مناسب، مجدداً برای غلظت‌های مختلف پرولین (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر) نیز تکرار شد. این طرح با ۳ تکرار و ۷ ریز نمونه در هر پتری دیش به عنوان تکرار انجام شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از تست شاپیرو-ویلکس، تجزیه واریانس انجام گرفت و رقم دم‌سرخ به عنوان رقمی با کالوس‌زایی بالا برای مرحله‌ی بعد انتخاب گردید.

در مرحله بعد، به منظور بدست آوردن مناسب‌ترین سویه و غلظت باکتری، سه سویه LBA4404، EHA105، AGL-1

نتایج و بحث

درصد کالوس‌زایی بر اساس القای کالوس در ریز نمونه های کالوس‌زا بدون در نظر گرفتن کالوس‌های نکروزه محاسبه شد و مشاهده شد که اثر ژنوتیپ، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل بین آنها در سطح احتمال ۱ درصد بر روی درصد کالوس‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشتر ژنوتیپ‌ها در بیشتر ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد درصد کالوس‌زایی بالایی (بیشتر از ۸۰ درصد) را نشان دادند (شکل ۲).

مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد در بیشتر رقم‌ها در تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف مورد آزمون، درصد کالوس‌زایی بین ۸۰-۱۰۰ درصد بود. این درحالی است که رقم‌های حسن‌سرایبی، کادوس و دم‌سیاه، در محیط حاوی ۲ میلی گرم برلیتر 2,4-D بین ۶۰-۷۰ درصد کالوس‌زایی داشتند و ارقام حسن‌سرایبی، کادوس، نعمت و دم‌سیاه در محیط کشت دارای ۱ میلی گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی گرم برلیتر Kin بین ۵۰-۷۰ درصد کالوس‌زایی را القا کردند.

در کشت کالوس از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مثل اکسین و سیتوکینین استفاده می‌شود، اما در تک‌لپه‌ها برای القای کالوس‌زایی، اکسین، ماده‌ای بسیار ضروری است. از میان اکسین‌های شناخته شده، 2,4-D بیشترین کاربرد را در القای کالوس‌زایی و ایجاد جنین‌های سوماتیکی دارد و در غلظت‌های ۰/۲ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود (Meneses *et al.* 2005). در پژوهش بر روی سه رقم برنج هندی به نام‌های Sita، Rupali Swarna، Masuri، در محیط کشت پایه MS، 2,4-D در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد و بیشترین میزان کالوس‌زایی در هر سه رقم در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، مشاهده شده بود. همچنین صالحیان و همکاران (۱۳۹۰) در پژوهشی بر روی چهار رقم برنج ایرانی طارم جلودار، طارم دانش، سنگ طارم و ندا، قابلیت کالوس‌زایی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که رقم طارم دانش در محیط کشت پایه MS همراه تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در غلظت ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشت. ژنوتیپ و محیط عواملی موثر در فراوانی القای کالوس، شکل و تشکیل کالوس‌های جنین‌زا هستند (Ramesh *et al.* 2009; Lee *et al.* 2002).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و اثر متقابل بین آنها، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری در وزن تر کالوس‌ها وجود داشت (جدول ۲). به دلیل اثر متقابل بین ژنوتیپ و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، ارقام مختلف مقدار متفاوتی از کالوس را در محیط‌های مختلف تولید کردند.

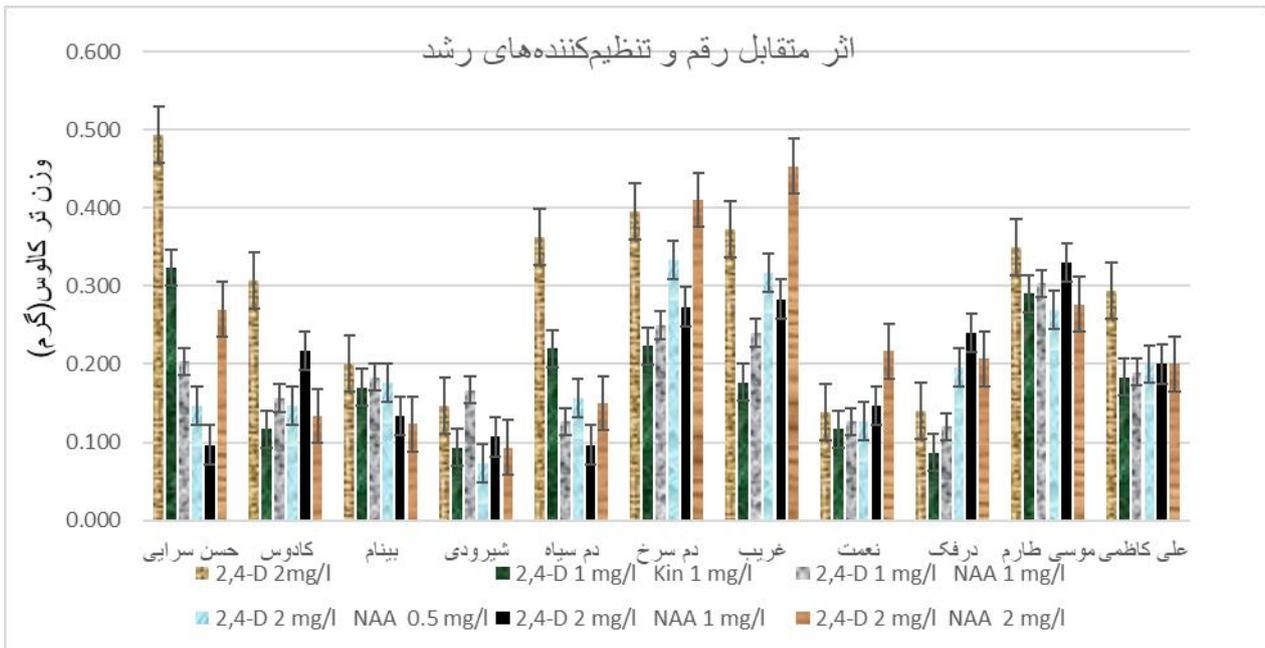
جدول ۲- تجزیه واریانس وزن کالوس‌ها و درصد کالوس‌زایی در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد

Table 2. Analysis of variance of callus weight and callus induction percentage on different growth regulator

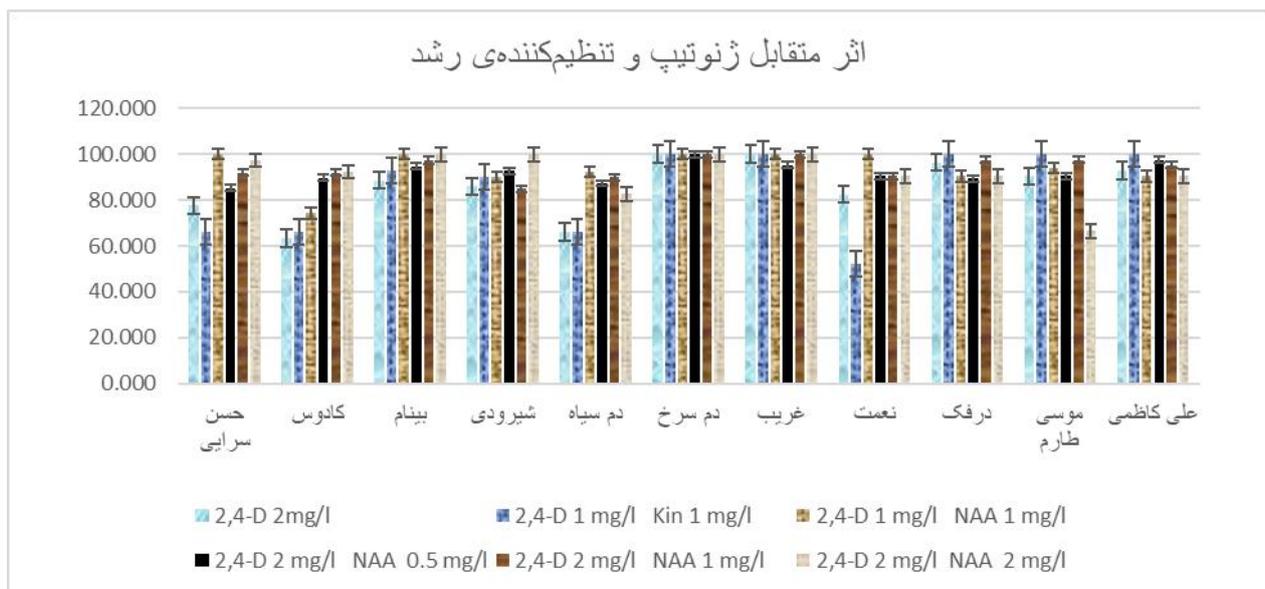
| میانگین مربعات (MS) | | | |
|---------------------|------------|--------------|-----------------|
| منابع تغییر | درجه آزادی | وزن تر کالوس | درصد کالوس‌زایی |
| ترکیب | ۵ | ۰/۲۸۷** | ۵۵۲/۴۷۸** |
| ژنوتیپ | ۱۰ | ۰/۹۰۳** | ۸۷۹/۱۹۶** |
| ترکیب × ژنوتیپ | ۵۰ | ۰/۶۰۹** | ۲۴۲/۹۳** |
| خطا | ۱۳۲ | ۰/۲۶۸ | ۶۶/۴۲۵ |

**، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

رقم حسن‌سرایبی در محیط کشت 2,4-D با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر، و رقم‌های غریب و دم سرخ، هر دو در محیط کشت 2,4-D و NAA در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر، بیشترین میزان وزن تر کالوس (بیشتر از ۴،۰ گرم) را تولید کردند (شکل ۱). این در حالی است که رقم‌های شیروودی و درفک در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی‌گرم برلیتر Kin، و رقم‌های حسن‌سرایبی و دم سیاه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، و رقم شیروودی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، کالوس‌هایی با وزن تر بسیار پایین (کمتر از ۰/۱ گرم) را تولید کردند (شکل ۱ و شکل ۵ الف-ب). سایر ارقام در ترکیبات مختلف محیط کشت، وزن تر مابین ۱-۴ گرم را تولید کردند.



شکل ۱- مقایسه میانگین تولید کالوس ارقام مختلف در محیط های کشت حاوی تنظیم کننده های رشدی مختلف
Figure 1. Comparison of the callus production average of different cultivars on different growth regulators



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ژنوتیپ و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد
Figure 2. Comparison of the callus induction average (percentage) of different genotypes on various growth regulator compounds

کالوس (0.91 ± 0.54) در رقم Sambha mahsuri با ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد و حداکثر فراوانی القای کالوس (0.45 ± 0.49) در رقم Pothana با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد (Sankepally et al. 2016).

همانطور که مشاهده شد، 2,4-D در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA دامنه‌ی وسیعی از پاسخ را در وزن تر کالوس‌ها نشان داد. ژنوتیپ‌های مورد آزمایش نیز واکنش متفاوتی نسبت به ترکیبات

در ارقام برنج Giza178 و Sakha104 بررسی بر روی محیط N6 برای القای کالوس در سه آزمایش مختلف با سه تیمار گلوتامین، تریپتوفان و کازئین هیدرولیزات مورد بررسی قرار گرفت و در هر سه آزمایش کالوس‌زایی رقم Sakha104 از Giza178 بهتر بود (Amer et al. 2017). فراوانی القای کالوس علاوه بر ژنوتیپ تحت تاثیر ترکیب محیط کشت غذایی قرار دارد. در مطالعه‌ای که بر روی دو رقم برنج هندی انجام شد حداکثر فراوانی القاء

منبع آلی کربن در کشت بافت استفاده شود. در تنش‌های محیطی در محیط کشت تجمع می‌کند و ممکن است در محافظت و فعال کردن آنزیم‌ها نقش داشته باشد (Ozturk and Demir, 2002). برخلاف نتایج بدست آمده، در تحقیقات انجام شده بر روی ۴ نوع برنج هندی Indrayani, Jaya, Pawana و Ambemohar مشخص شد که پرولین تاثیر بسزایی در شروع تقسیمات سلولی و رشد کالوس‌ها دارد و ریزنمونه‌های محیط دارای پرولین و گلوتامین ۵۰۰ میلی گرم در لیتر، نسبت به محیط بدون پرولین ساقه‌زایی بهتری دارند (Pawar et al. 2015). از جهت دیگر، در باززایی سه رقم برنج هندی از پرولین در غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۳۰۰، و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری دیده نشد و بیشترین درصد کالوس‌زایی با پرولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد (Wang et al. 2011). که با نتایج ما مطابقت داشت. پرولین در هنگام استفاده در محیط در غلظت کم (به عنوان مثال، ۳۰ میلی مولار)، تحمل اثرهای نامطلوب شوری را بر رشد نشاهای اولیه در برنج، بهبود می بخشد، این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر (۵۰-۴۰ میلی مولار) اثرهای سمی و رشد گیاهان ضعیف را نشان داده است (Roy et al. 1993). در مطالعه‌ی هار و همکاران (Hare et al. 2001)، نشان داده شده است که پرولین در غلظت کم، باعث ساقه‌زایی هیپوکوتیل‌های Arabidopsis می‌شود، در حالی که رشد را در غلظت‌های بالاتر مهار می‌کند. اثر سمی پرولین به این دلیل است که پرولین در غلظت‌های پایین‌تر، چرخه‌ی سنتز پرولین سیتوزولی را از گلوتامات فعال می‌کند و تخریب پرولین میتوکندری را شروع می‌کند، که به طور همزمان NADP + را برای بیوسنتز پورین سیتوزولی فراهم می‌کند و به همان اندازه فسفوریلاسیون ADP میتوکندری را کاهش می‌دهد (Hare, 1998).

در آزمایش دوم، اثر سویه و غلظت آگروباکتریوم در تراریزش کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت و بعد از تراریزش آگروباکتریوم، برای اطمینان از تراریزش، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی ژن *gus* و سپس الکتروفورز تک بعدی با ولتاژ ۸۰ و به مدت یک ساعت انجام شد (شکل ۴).

محیط کشت داشتند. سه رقم دم سرخ، غریب و موسی طارم ارقامی با وزن کالوسی بالا بودند که با وزن بالای ۰/۳۰ گرم، در مقایسه با سایر ارقام، توانستند بیومس بیشتری را تولید کنند. محیط کشت دارای 2,4-D با غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر و محیط کشت دارای 2,4-D و NAA به ترتیب با غلظت ۲ و ۲ میلی گرم بر لیتر در تولید بیومس سلولی، اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و بیشترین وزن تر کالوس‌ها در این دو ترکیب مشاهده شد.

بیشتر ژنوتیپ‌ها در بیشتر ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد، درصد کالوس‌زایی بالای ۸۰ درصد را نشان دادند. بنابراین به دلیل تنوع ژنتیکی بالا در برنج و همچنین تنوع در سطوح داخلی تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی در مسیر سنتز کالوس، غلظت استفاده از 2,4-D نیز باید متفاوت باشد و برای هر ژنوتیپ بهینه شود (Deo et al. 2009).

در مرحله‌ی بعد اثر سه غلظت مختلف پرولین نیز بر روی کالوس‌زایی برنج در دو رقم موسی طارم و دم‌سرخ انجام گرفت. مشاهده شد که اثر متقابل بین ژنوتیپ و پرولین در میزان تولید کالوس در سطح احتمال ۱ درصد، معنی‌دار بود (جدول ۳).

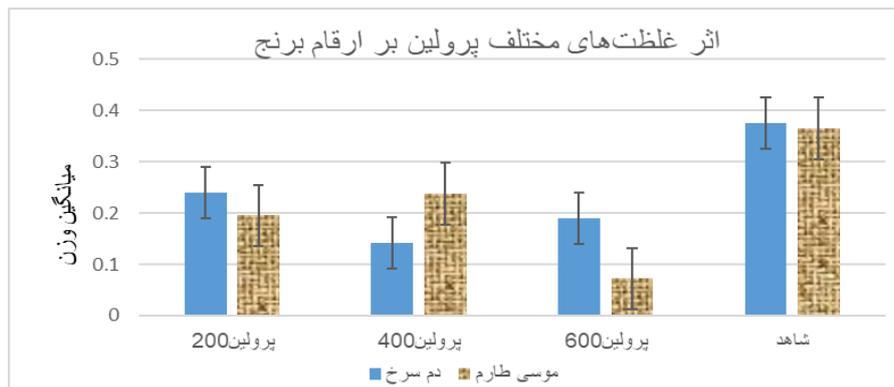
جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر پرولین و ژنوتیپ بر القای کالوس

Table 3. Analysis of variation of the effect of prolin and genotypes in callus induction

| منابع تغییر | درجه آزادی | وزن تر کالوس | میانگین مربعات (MS) |
|-----------------|------------|---------------------|---------------------|
| پرولین | ۲ | ۰/۰۳۱** | |
| ژنوتیپ | ۱ | ۰/۰۰۳ ^{ns} | |
| پرولین × ژنوتیپ | ۲ | ۰/۰۴۷** | |
| خطا | ۱۸ | ۰/۰۱۹ | |
| ضریب تغییرات | ۱/۱۳۱ | | |

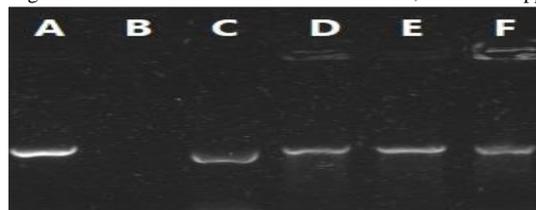
ns و ** به ترتیب غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

طبق نتایج به دست آمده، اضافه کردن پرولین به محیط کشت کالوس‌زایی، اثر منفی در رشد کالوس داشت و با افزایش غلظت آن میزان کاش در رشد نیز افزایش یافت (شکل ۳). این در حالی است که درمقایسه نمونه شاهد، به طور کلی پرولین وزن تر کالوس را کاهش داد و اثر منفی بر رشد کالوس‌های برنج داشت. (شکل ۳). پرولین اسیدآمینوای کوچک است که می‌توان به عنوان



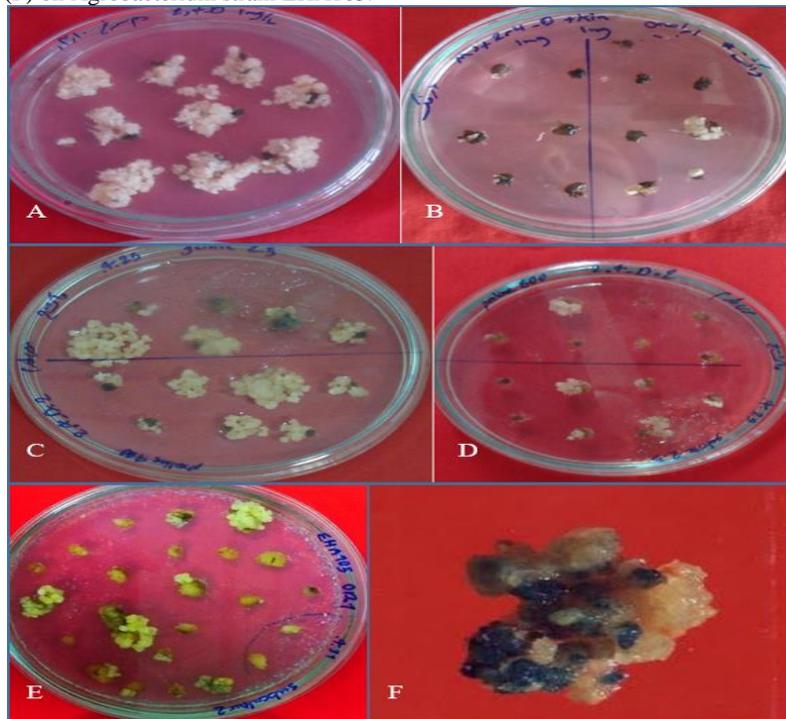
شکل ۳- مقایسه میانگین وزن کالوس تولید شده دو رقم دم سرخ و موسی طارم در محیط کشت حاوی سه غلظت پرولین

Figure 3. comparison of the average callus weight in DomSorkh and MoosaTarom cultivars, in media supplemented with three concentrations of proline



شکل ۴- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن gus با استفاده از آغازگرهای اختصاصی gus. (A) شاهد مثبت روی پلاسمید استخراج شده از *E. coli*, (B) شاهد منفی (آب)، (C) شاهد مثبت (قطعه تکثیر شده از پلاسمید BlueScript)، (D) روی آگروباکتریوم سویه LBA4404، (E) روی آگروباکتریوم سویه AGL1، (F) روی آگروباکتریوم سویه EHA105

Figure 4. The results of PCR on recombinant plasmids using specific primers of gus gene., (A) Positive control on a plasmid extracted from *E. coli*, (B) Negative control (water), (C) positive control on BlueScript plasmid, (D) on Agrobacterium strain LBA4404, (E) on Agrobacterium strain AGL1, (F) on Agrobacterium strain EHA105.



شکل ۵- (A) رقم دم سرخ در 2 mg/L 2,4-D، (B) رقم درفک در 1 mg/L 2,4-D و 1 mg/L Kin، (C) کالوس‌های رقم موسی طارم در محیط دارای 400 mg/L پرولین (D) کالوس‌های رقم موسی طارم در محیط دارای 600 mg/L پرولین (E) کالوس‌های سویه EHA105 در OD₆₀₀=1، (F) کالوس‌های رنگ آمیزی شده با X-gluc

Figure 5. (A) DomSorkh in 2 mg/L 2,4-D, (B) Derafk in 1 mg/L 2,4-D plus 1 mg/L Kin, (C) MoosaTarom calli in a medium containing 400 mg/L proline, (D) MoosaTarom calli in a medium containing 600 mg/L proline (E) Transgenic callus with EHA105 strain in OD₆₀₀=1, (F) Callus stained with X-gluc

برای تأیید تراریزش کالوس‌ها رنگ‌آمیزی با X-gluc انجام شد و در نقاط مختلف کالوس‌ها رنگ آبی مشاهده شد. سویه و ژنوتیپ از مهمترین عوامل موثر در انتقال ژن با آگروباکتریوم می‌باشند. تراریزش برنج RD41 با استفاده از آگروباکتریوم سویه EHA105 و AGL1 با $OD_{600} = 0.8 - 1$ و هم‌کشتی ۴۸ ساعته آن مشخص شد که سویه EHA105 برای انتقال ژن به این گیاه کارا تر است ولی اختلاف معنی داری بین این دو سویه وجود نداشت. در آزمایشی که برای تراریزش برنج Indica رقم IR58025B با چهار سویه از آگروباکتریوم EHA105، EHA101، LBA404 و AGL1 انجام دادند؛ بیشترین کارایی تراریزش با سویه EHA105 حاصل شده است (Gui *et al.* 2016). از طرفی در آزمایشی که سویه‌های آگروباکتریوم (pTOK233)، LBA4404، LBA4404 (pIG121Hm) و (EHA101 (pIG121Hm) برای بررسی میزان تراریزش جنین‌های نابالغ گونه‌های IR64 و IR72 مقایسه شدند، مشاهده شد که انتقال ژن با LBA4404 (pTOK233) بیشترین کارایی تراریزش را در برداشته است (Hiei and Komari, 2006). این امر به خاطر وجود اثر متقابل بین سویه و ژنوتیپ گیاهی می‌تواند باشد.

برخی از گونه‌های گیاهی و حتی ژنوتیپ‌های گیاهی در برابر باکتری و تعداد آن حساسیت‌های دفاعی متفاوتی دارند و در غلظت‌های خاص امکان اتصال و حمله باکتری به گیاه ممکن است اتفاق بیفتد، بنابراین بدست آوردن غلظت مناسب آگروباکتریوم برای انتقال ژن ضروری به نظر می‌رسد. طبق تحقیقات کارسکیان و همکاران (Karthikeyan *et al.* 2011) در تراریخت‌سازی برنج هندی با استفاده از سویه EHA 105 با $OD_{600} = 0.9$ میزان تراریختگی به $9/33$ درصد رسید. ولی یه و همکاران (Ye *et al.* 2000) نشان دادند که غلظت $OD_{600} = 0.2$ در باکتری‌های سویه LBA 4404 برای انتقال ژن به توتون بهتر بود.

بعد از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم برای گزینش کالوس‌های تراریخته احتمالی کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر دو روز یکبار بررسی می‌شدند تا در صورت مشاهده هرگونه آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌های غیرآلوده به محیط کشت جدید منتقل شوند. پس از ۱۴ روز واگشت صورت گرفت و فقط ریزنمونه‌هایی که نکروزه نشده بودند و کالوس‌های تازه در آنها رشد کرده بود به محیط جدید منتقل شد. پس از یک دوره واگشت در پایان ۳۰ روز داده‌برداری انجام شد. در بررسی اثر سویه بر تراریزش کالوس‌های برنج، مشاهده شد که از میان کالوس‌هایی که با سه سویه آگروباکتریوم AGL1، LBA4404، EHA105 تلقیح شده بودند، تنها کالوس‌های سویه EHA105 قادر به رشد در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک بود و در مجموع سه تکرار تعداد ۲۰ ریزنمونه رشد کالوسی داشتند.

اثر غلظت بر تراریزش، غلظت‌های مختلف سویه EHA105 مورد آزمایش قرار گرفت و مشاهده شد در غلظت باکتری $OD_{600} = 0.2$ از ۶۰ ریزنمونه از تراریزش کالوس برنج با آگروباکتریوم سویه EHA105 با فقط یک کالوس قادر به رشد در محیط گزینشی شد و بقیه‌ی کالوس‌ها به مرور زمان نکروزه شده و از بین رفتند. ولی در تراریزش کالوس برنج با آگروباکتریوم سویه EHA105 با $OD_{600} = 0.6$ تعداد ۷ کالوس از ۶۰ ریزنمونه به رشد خود در محیط گزینشی ادامه دادند (جدول ۴).

جدول ۴- درصد کالوس‌های رشد یافته در محیط انتخابی در کالوس‌های

تراریخت شده با سویه EHA105

Table 4. Percentage of calluses grown in the selection medium in transgenic callus with strain EHA105

| غلظت باکتری | تعداد | تعداد کالوس‌های | درصد تراریزش |
|-------------|----------|-----------------|--------------|
| OD_{600} | ریزنمونه | رشد یافته | احتمالی |
| ۰/۲ | ۶۰ | ۱ | ۱/۶۶ |
| ۰/۶ | ۶۰ | ۷ | ۱۱/۶۶ |
| ۱ | ۶۰ | ۲۰ | ۳۳/۳۳ |

منابع

- Aggarwal RK, Brar DS, Khush GS. 1997.** Two new genomes in *oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. *Molecular and General Genetic* 254: 1-12.
- Alam MF, Zapata FJ, Barrion AA, Datta SK. 1994.** Plant regeneration from protoplasts of three *indica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Genetics and Breeding* 48: 359-366.
- Bajaj S, Mohanty A. 2005.** Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 3: 275-307.
- Bajia SM, Rajam V. 1995.** Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. *Plant Cell Reports* 14: 717-720.
- Chu QR, Croughan TP. 1990.** Genetics of plant regeneration in immature panicle culture of rice. *Crop Science* 30: 1194-1197.
- Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy R, Fauquet C. 2001.** Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7: 25-33.
- Deo PC, Harding RM, Taylor M, Tyagi AP, Becker DK. 2009.** Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 99: 61-71.
- Dias IM, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR. 2016.** Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds. A review. *Industrial crops and products* 82: 9-22.
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch SR. 2005.** Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L.. *Genetics* 169: 1631-1638.
- Jain RK, Jain S, Wang B, Wu R. 1996.** Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic *indica* rice varieties. *Plant Cell Reports* 15: 449-454.
- Khanna HK, Raina SK. 2002.** Elite *indica* transgenic rice plants expressing modified *CryIAc* endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to Yellow Stem Borer. *Transgenic Research* 11: 411-423.
- Khush GS. 1997.** Origin dispersal cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* 35: 25-34.
- Khush GS. 2005.** What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59: 1-6.
- Kishor PB, Reddy GM. 1987.** Callus initiation and plantlet regeneration from different explants and genotypes of *Oryza sativa* L. *Indian Journal of Plant Physiology* 30: 66-70.
- Krishnan SR, Priya AM, Ramesh M. 2013.** Rapid regeneration and ploidy stability of 'cv IR36' indica rice (*Oryza sativa* L.) confers efficient protocol for *in vitro* callus, organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Botanical Studies* 54: 47-59.
- Kumria R, Waie B, Rajam MV. 2001.** Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 67: 63-71.
- Linares OF. 2002.** African rice (*oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceeding of National Academy of Science of the United states of America* 99: 16360-16365.
- Meneses A, Flores Munoz D, Arrietal G, Espinoza AM. 2005.** Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biologia Tropical* 53: 361-368.
- Patra BC, Ray S, Ngangkham U, Mohapatra T. 2016.** 1- Rice. *Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement* 1-80.
- Pawar B, Kale P, Bahurupe J, Jadhav A, Kale A, Pawar SH. 2015.** Proline and Glutamine Improve in vitro Callus Induction and Subsequent Shooting in Rice. *Rice Science* 22: 283-289.
- Shukat SS, Zaki MJ, Zareen A, Siddiqui IA. 2001.** Use of *Trichoderma* Species in the Control of *Meloidogyne javanica* Root Knot Nematode in Okra and Mungbean. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 40: 245- 252.
- Yang YS, Chen YL, Jian YY. 2005.** A highly responsive *indica* rice cultivar Qiuguiai 11 in *in vitro* cultures. *China Biotechnology* 25: 137-139.
- Yu CK, Chia CT, Jung TK, Wei CH, Sung CS, Chung AL, Li FH. 2013.** Improving Pharmaceutical Protein Production in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5): 8719-8739.
- Plasson C, Michel R, Lienard D, Saint-Jore-Dupas C, Sourrouille C, de March GG, Gomord V. 2009.** Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells. *Methods in Molecular Biology* 483: 145-61.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Optimization of callus induction and Agro-transformation on some Iranian
Rice cultivar

Afsaneh Ebrahimi Heravan¹, Ebrahim Dorani*¹, Elahe Bina¹, Behzad Ghareyazi²

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

*Corresponding Author: uliaie@tabrizu.ac.ir

Abstract

Improving new high performance cultivars, with better quality and resistance to biotic and abiotic stresses are important objectives of rice (*oryza sativa* L.) breeding through genetic engineering. This study, have been done to optimization of callus induction and, transformation protocol for some cultivar of Iranian Rice. In first experiment, effect of plant growth regulators (NAA, 2,4-D, Kin), proline (200, 400 and 600 mg/L) and Rice genotypes (including Moosa tarom, Nemat, Dom sorkh, Garib, Ali kazemi and Derafk) in callus induction, bacterial concentrations ($OD_{600} = 0.2, 0.6$ and 1) and strain types (LBA4404, EHA105, AGL1) on selected cultivar transformation were evaluated. The results were analyzed in a factorial experiment based on a completely randomized design. Analyses of variance were showed significant difference between plant growth regulator and genotype in response to callus induction. Almost all of the cultivars induced callus up to 80% in majority of PGRs combinations. HasanSarai, had the higher callus growth rate (over 0.49 g) in the medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, and DomSorkh and Garib had the highest callus fresh weight (above 0.4 g) in media containing 2 mg/l 2,4-D plus 2 mg/l NAA. Using prolin in callus induction medium decreased callus growth. Lowest callus biomass (0.138 g) produced in medium containing 600 mg/L prolin. Among the three evaluated strain of *Agrobacterium tumefaciens*, only the EHA105 produced transgenic calli. Analysis of variance showed there was no significant difference between bacterial OD_{600} on transformation efficiency, but $OD_{600}=1$ produced more transgenic calli. According to the results, the DomSorkh cultivar is more capable of callus formation in 2,4-D medium and can be used for gene transfer for different purposes.

Key words: Prolin, 2,4-D, Callus induction, Transformation, DomSorkh, EHA105