مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۱۱۰-۱۰۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

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

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

افسانه ابراهیمی هروان[۱]، ابراهیم دورانی*[۱]، الهه بینا[۱]، بهزاد قره‌یاضی[۲]

Afsaneh Ebrahimi Heravan[1], Ebrahim Dorani*[1], Elahe Bina[1], Behzad Ghareyazi[2]

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 دست‌آوردن 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 (Kin، 2,4-D، NAA) و پرولین (۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در کالوس‌زایی چند رقم زراعی (شامل موسی‌طارم، نعمت، دم‌سرخ، غریب، علی‌کاظمی و درفک) و همچنین اثر سویه‌های آگروباکتریوم تومه‌فاشینز (LBA4404، AGL-1،EHA105) و غلظت باکتری (۱ و ۰/٦، ۰/۲= OD_{600}) در تراریزش رقم برگزیده مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا 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. دربین ارقام مورد مطالعه، رقم حسن‌سرایی بیشترین میزان رشد کالوس (۰/٤۹ گرم) را در محیط کشت حاوی 2,4-D 2 mg/l داشت و ارقام غریب و دم سرخ نیز بیشترین وزن کالوس (بالای۰/٤ گرم) را در محیط دارای 2,4-D 2 mg/l و NAA 2 mg/l تولید کردند. استفاده از اسیدآمینه 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 ٦۰۰ 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 آگروباکتریوم در تراریزش برنج مشاهده نشد، ولی باکتری در غلظت ۱ =OD_{600} کالوس‌های تراریخته بیشتری را تولید کرد. باتوجه 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،
تنظیم کننده رشد 2,4-D،
تراریزش،
دم‌سرخ،
سویه EHA105

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]

مقدمه

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 ۹/٤ میلیارد می‌رسد و تخمین زده می‌شود که برای برآورد نیاز سالانه مردم به برنج، تولید آن باید ۱۰-۸ میلیون تن در سال (یا بیشتر از ۱/۵درصد) 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. glaberim* 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 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 اسیدآمینه‌ها 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 وسن 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، ازجمله برنج، اولین قدم در بهره‌برداری از کشت درون شیشه‌ای در اصلاح این گیاه می‌باشد. با توسعه سویه های 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 اگروباکتریوم در القای کالوس و تراریزش برنج ایرانی با استفاده از جنین بالغ مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی و کشت: بذور رقم‌های موسی‌طارم، نعمت، دم‌سرخ، غریب، علی‌کاظمی 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 به‌مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و در مرحله بعد به‌مدت ۲۰ دقیقه در

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]

هیپوکلریت سدیم با غلظت ۵ درصد شستشو شدند. بذور دارای جنین‌های رسیده‌ی برنج، در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند (جدول۱).

جدول۱- غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط MS
Table 1. concentration of growth regulator in MS media

تیمار	2,4-D (mg/l)	NAA(mg/l)	Kin (mg/l)
۱	۲	–	–
۲	۱	۱	–
۳	۲	۰/۵	–
٤	۲	۱	–
۵	۲	۲	–
٦	۲	–	۰/۵

نگهداری و کشت: پس از کشت بذور در شرایط حفاظت‌شده، کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از کالوس‌زایی و رشد کافی(۲۱ روز)، بذر و کولئوپتیدیل 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 تنظیم‌کننده‌های رشد، آزمایش با حفظ تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب، مجددا برای غلظت‌های مختلف پرولین (۲۰۰، ٤۰۰ و٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نیز تکرارشد. 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 اوردن مناسب‌ترین سویه و غلظت باکتری، سه سویه LBA4404، EHA105، AGL-1 آگروباکتریوم تومه‌فاشینز با ناقل بیان گیاهی pCAMBIA1304 حاوی ژن *GUS* با روش ذوب و انجماد تراریخت شد. **تأیید** مولکولی تراریزش اگروباکتریوم با پلاسمید نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن گاس به ترتیب با توالی 5’CCA GAT CTA ACA ATG CGC GGT GGT CAG TCCC3’ برای آغازگر روبه جلو و 5’CCA GAT CTA TTC ATT GTT TGC CTC CCTGCT GC3’به عنوان آغازگر پس‌رو 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. ازمایش تراریزش 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 تراریزش رقم انتخابی مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تایید مولکولی باکتری‌های تراریخت، 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 ٤۸ 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین واکشت شدند. نمونه‌ها در پایان هر ۱۵ روز واکشت شدند و در نهایت کالوس‌های رشد یافته به منظور بررسی هیستوشیمیایی کالوس‌های تراریخته با محلول X-gluc رنگ‌آمیزی شدند. به این منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر X-gluc در متیل فورمامید حل گردید و محلول حاصل به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات اضافه شد. کلیه کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط تاریکی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

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 (جدول۲). به دلیل اثر متقابل بین ژنوتیپ و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، ارقام مختلف مقدار متفاوتی از کالوس را در محیط های مختلف تولید کردند.

جدول۲- 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/ ٤٧٨**
ژنوتیپ	۱۰	۰/۹۰۳**	۸۷۹/۱۹٦**
ترکیب× ژنوتیپ	۵۰	۰/٦۰۹**	۲٤۲/۹۳**
خطا	۱۳۲	۰/۲٦۸	٦٦/٤۲۵

**، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

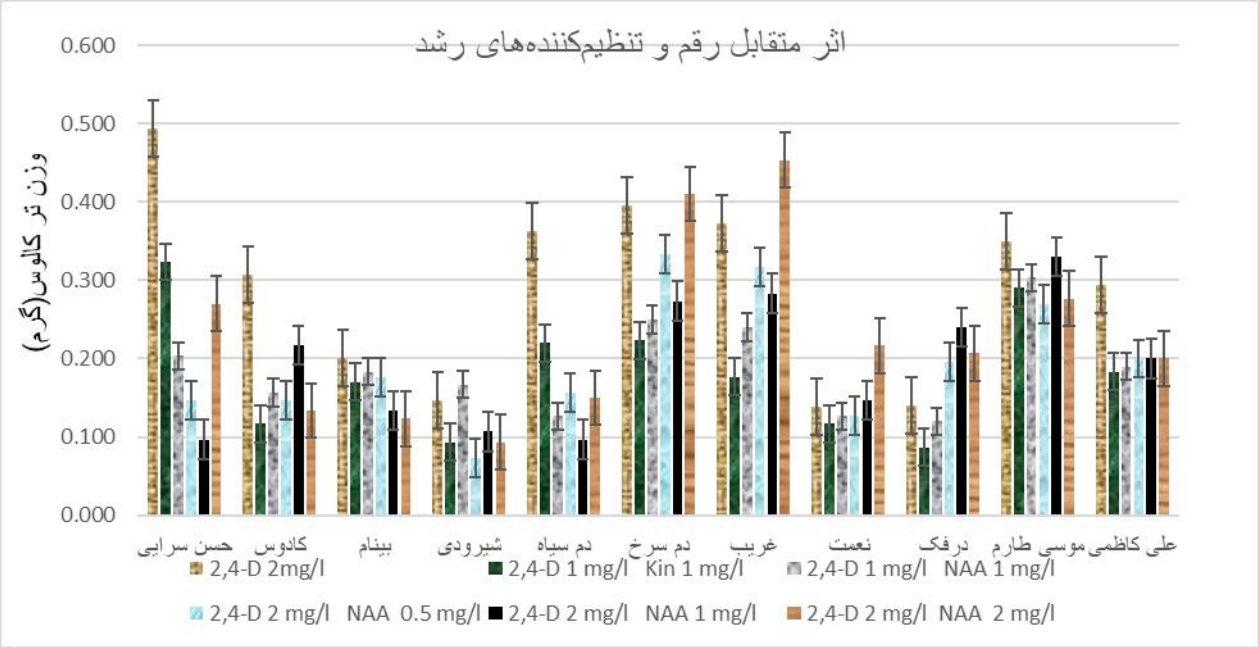
رقم حسن‌سرایی در محیط کشت 2,4-D با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر، و رقم‌های غریب و دم سرخ، هر دو در محیط کشت 2,4-D و NAA در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر ، بیشترین میزان وزن تر کالوس (بیشتر از ٤,۰گرم) را تولید کردند (شکل۱). این در حالی است که رقم‌های شیرودی و درفک در محیط کشت دارای ۱ میلی گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی گرم برلیتر Kin ، و رقم‌های حسن سرایی و دم سیاه در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی گرم در لیتر NAA ، و رقم شیرودی در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم برلیتر 2,4-D به اضافه ۱ میلی گرم در لیتر NAA، کالوس‌هایی با وزن تر بسیار پایین (کمتر از ۰/۱ گرم) را تولید کردند (شکل ۱ و شکل ۵ الف- ب). سایرارقام در ترکیبات مختلف محیط کشت، وزن تر مابین ۱-٤ گرم را تولید کردند.

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 (جدول۲). بیشتر ژنوتیپ‌ها در بیشتر ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد درصد کالوس‌زایی بالایی (بیشتر از ۸۰ درصد) را نشان دادند (شکل۲).

مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد در بیشتر رقم‌ها در تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف مورد آزمون، درصدکالوس‌زایی بین ۸۰-۱۰۰درصد بود. این درحالی است که رقم‌های حسن‌سرایی، کادوس و دم‌سیاه، درمحیط حاوی ۲ میلی گرم برلیتر 2,4-D بین ٦۰-۷۰ درصد کالوس‌زایی داشتند و ارقام حسن‌سرایی، 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.

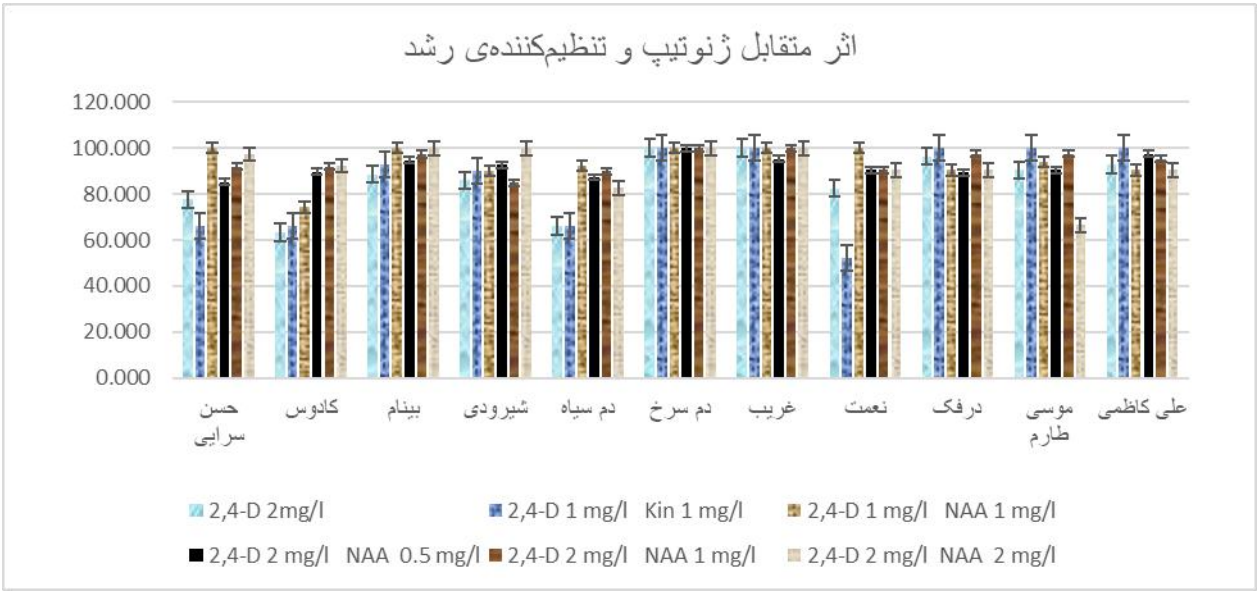
در کشت کالوس از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مثل اکسین و سیتوکینین استفاده می‌شود، اما در تک‌لپه‌ها برای القای کالوس‌زایی، اکسین، ماده‌ای بسیار ضروری است. از میان اکسین‌های شناخته شده، 2,4-D بیشترین کاربرد را در القای کالوس‌زایی و ایجاد جنین‌های سوماتیکی دارد و در غلظت‌های ۰/۲ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود (Meneses *et al*. 2005). در پژوهش بر روی سه رقم برنج هندی به نام‌های Sita، Masuri, Rupali Swarna، 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 لیتر2,4-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 تنظیم کننده رشد 2,4-D در غلظت ۲ و ۲/۵ میلی گرم 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).

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]



شکل۱- 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



شکل۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ژنوتیپ و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد

Figure 2. Comparison of the callus induction average (percentage) of different genotypes on various growth regulator compounds

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 کالوس (۰/۹۱ ± ۷۵/۵٤) در رقم Sambha mahsuri با ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد وحداکثر فراوانی القای کالوس (۰/٤٥± ۷۰/٤۹) 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

محیط کشت داشتند. سه رقم دم سرخ، غریب وموسی‌طارم 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 میلی‌گرم بر لیتر و محیط کشت دارای 2,4-D و NAA به ترتیب با غلظت ۲ و ۲ میلی‌گرم برلیتر 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 موسی‌طارم و دم‌سرخ انجام گرفت. مشاهده شد که اثر متقابل بین ژنوتیپ و پرولین در میزان تولید کالوس در سطح احتمال ۱ درصد، معنی‌دار بود (جدول۳).

جدول۳- تجزیه واریانس تاثیر پرولین و ژنوتیپ بر القای کالوس

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

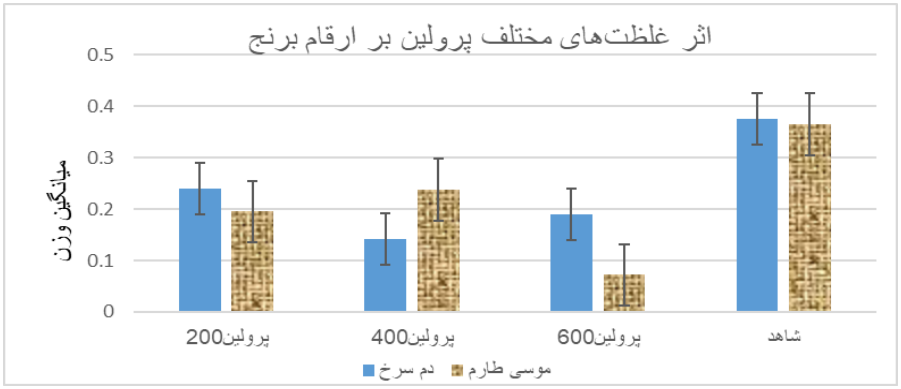
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین‌مربعات(MS) وزن تر کالوس
پرولین	۲	۰/۰۳۱**
ژنوتیپ	۱	۰/۰۰۳ns
پرولین× ژنوتیپ	۲	۰/۰۴۷**
خطا	۱۸	۰/۰۱۹
ضریب تغییرات	۱/۱۳۱	

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 (شکل۳). 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 اسیدآمینه‌ای کوچک است که می‌توان به عنوان 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 برروی ٤ نوع برنج هندی Pawana، Jaya، Indrayani و Ambemohar مشخص شد که پرولین تاثیر بسزایی درشروع 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 میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری دیده نشد و بیشترین درصد کالوس‌زایی با پرولین ۱۰۰ میلی‌گرم 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 غلظت های بالاتر (۵۰-٤۰ 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).

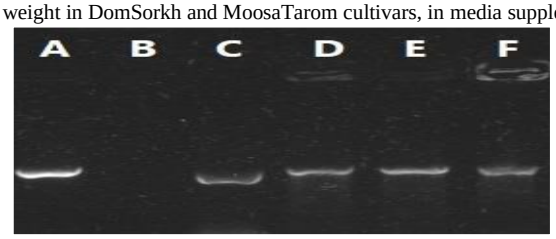
در آزمایش دوم، اثر سویه و غلظت اگروباکتریوم در تراریزش کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت و بعد از تراریزش اگروباکتریوم، برای اطمینان از تراریزش، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی ژن *gus* و سپس الکتروفورز تک بعدی با ولتاژ ۸۰ و به مدت یک ساعت انجام شد (شکل٤).

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]



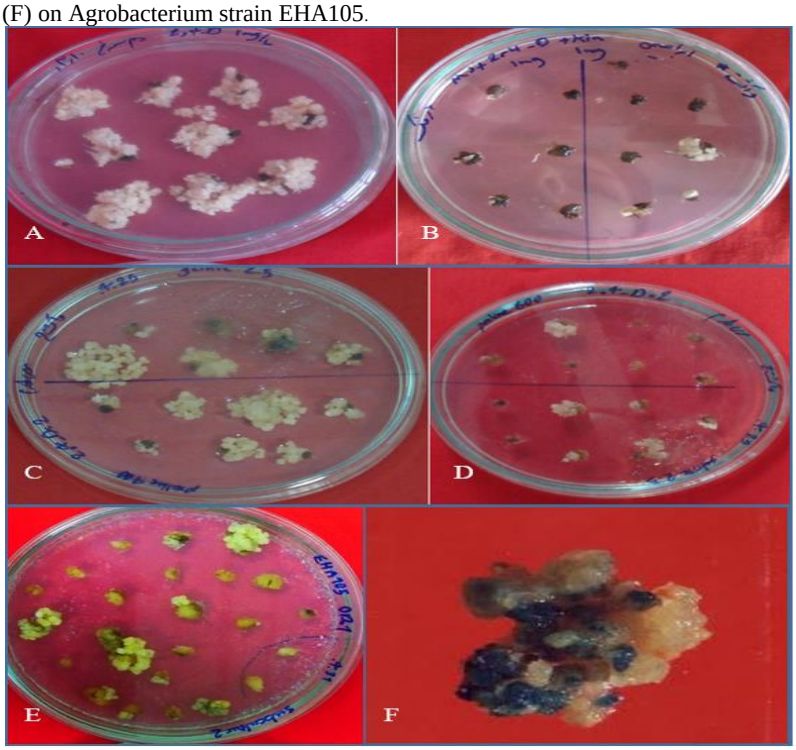
شکل۳- مقایسه میانگین وزن کالوس تولید شده دو رقم دم سرخ و موسی‌طارم در محیط کشت حاوی سه غلظت پرولین

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



شکل٤- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پلاسمیدهای نوترکیب 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 اگروباکتریوم سویه LBA4404، (E) روی اگروباکتریوم سویه AGL1، (F) روی اگروباکتریوم 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.



شکل٥- (A) رقم دم‌سرخ 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 موسی‌طارم در محیط دارای ٤٠٠ mg/l پرولین (D) کالوس‌های رقم موسی‌طارم در محیط دارای ٦٠٠ mg/l پرولین (E) کالوس‌های سویه EHA105 در OD_{600}=۱، (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 OD_{600} =1, (F) Callus stained with X-gluc

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]

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 ١٤ روز واکشت 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 واکشت در پایان ٣٠ روز داده‌برداری انجام شد. در بررسی اثر سویه بر تراریزش کالوس‌های برنج، مشاهده شد که از میان کالوس‌هایی که با سه سویه اگروباکتریوم 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 ٢٠ ریزنمونه رشد کالوسی داشتند.

اثر غلظت بر تراریزش، غلظت‌های مختلف سویه EHA105 مورد آزمایش قرار گرفت و مشاهده شد در غلظت باکتری OD_{600}=٠/٢ از ٦٠ ریزنمونه از تراریزش کالوس برنج با اگروباکتریوم 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 اگروباکتریوم سویه EHA105 با OD_{600}=٠/٦ تعداد ٧ کالوس از ٦٠ ریزنمونه به رشد خود در محیط گزینشی ادامه دادند (جدول٤).

جدول٤- درصد کالوس‌های رشد یافته در محیط انتخابی در کالوس های تراریخت شده با سویهEHA105

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

غلظت باکتری OD_{600}	تعداد ریزنمونه	تعداد کالوس‌های رشدیافته	درصد تراریزش احتمالی
٠/٢	٦٠	١	١/٦٦
٠/٦	٦٠	٧	١١/٦٦
١	٦٠	٢٠	٣٣/٣٣

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 موثردر انتقال ژن با اگروباکتریوم می‌باشند. تراریزش برنج RD41 با استفاده از اگروباکتریوم سویه EHA105 و AGL1 با ١- ٠/٨ =OD_{600} و هم‌کشتی ٤٨ ساعته آن مشخص شد که سویه EHA105 برای انتقال ژن به این گیاه کاراتر 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، LBA4404 و AGL1 انجام دادند؛ بیشترین کارایی تراریزش با سویه EHA105 حاصل شده است (Gui *et al*. 2016). از طرفی در آزمایشی که سویه‌های آگروباکتریوم (LBA4404 (pTOK233)، 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 اگروباکتریوم برای انتقال ژن ضروری به نظر می‌رسد. طبق تحقیقات کارسکیان و همکاران (Karthikeyan *et al*. 2011) در تراریخت‌سازی برنج هندی با استفاده از سویهEHA 105 با ٠/٩= OD_{600} میزان تراریختگی به ٩/٣٣ درصد رسید. ولی یه و همکاران (Ye *et al*. 2000) نشان دادند که غلظت OD_{600}=٠/٢ در باکتری‌های سویه LBA 4404 برای انتقال ژن به توتون بهتر بود.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]

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 biotechnonlogy 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 *Cry1Ac* 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 Munozl 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.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

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

Afsaneh Ebrahimi Heravan[1], Ebrahim Dorani*[1], Elahe Bina[1], Behzad Ghareyazi[2]

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. HasanSaraei, 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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.10.6]