مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۲۳۶-۲۲۵

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی عوامل موثر در انتقال ژن به سویا از طریق آگروباکتریوم

Study on the factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of soybean

وحید مهری زاده[۱]، ابراهیم دورانی*[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۱]، بهزاد قره یاضی[۲]

Vahid Mehrizadeh[1], Ebrahim Dorani *[1], Seyed Abolghasem Mohammadi[1], Behzad Ghareyazie[2]

[۱] گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
[۲] استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
2. Agricultural Biotechnology of Research Institute of Iran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۱)

چکیده

تراریختی به واسطه آگروباکتریوم یکی از موثرترین روش‌ها برای تولید گیاهان تراریخته سویا به شمار می‌آید. کارایی تراریختی سویا با آگروباکتریوم به عوامل مختلفی بستگی دارد. این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید اینترفرون گامای انسانی در گیاه سویا انجام گرفت. بدین منظور برخی عوامل موثر در تراریختی سویا از قبیل غلظت آگروباکتریوم (۱ و ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، OD_{600nm}=۰/۲)، مدت زمان تلقیح (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه)، مدت زمان هم‌کشتی (۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ روز) و سطوح مختلف استوسیرینگون (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، بیشترین میزان تراریختی در غلظت ۰/۸ =OD_{600nm} و کمترین میزان تراریختی در غلظت ۰/۲ =OD_{600nm} حاصل شده است. همچنین بیشترین میزان تراریختی در مدت زمان تلقیح ۴۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی ٤ روز و کمترین میزان تراریختی در مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی ۱ روز مشاهده شد. حضور استوسیرینگون اثر افزایشی در کارایی تراریختی سویا داشت، به طوریکه بیشترین میزان تراریختی در غلظت‌های ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون حاصل شده است. در نهایت حضور ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاهان تراریخته احتمالی به وسیله تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی تایید شد. شرایط بهینه بدست آمده در این مطالعه می‌تواند برای انتقال ژن‌های هدف به این رقم سویا استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

استوسیرینگون،
آگروباکتریوم،
انتقال ژن،
سویا

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

مقدمه

امروزه سیستم‌های ساده و ارزانی که تولید پروتئین‌های نوترکیب را در مقیاس انبوه ممکن سازند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر گیاهان تراریخته به عنوان سیستم بیانی مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (Buyel *et al.*, 2015). از مزیت‌های عمده‌ی استفاده از گیاهان تراریخته جهت تولید داروهای بیولوژیک نسبت به سایر روش‌ها می‌توان به اقتصادی‌تر بودن سیستم گیاهی، انجام تغییرات پس ترجمه‌ای ضروری، تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و ایمن بودن و عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماری‌زای انسانی و سموم بالقوه خطرناک اشاره کرد (Sabalza *et al.*, 2014).

اینترفرون‌ها به ویژه اینترفرون گامای انسانی از جمله پروتئین‌هایی هستند که ارزش درمانی بالایی دارند و به عنوان یک داروی موثر برای درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Miller *et al.*, 2009; Armstrong-james *et al.*, 2010). کاربردهای فراوان این دارو و ارزش اقتصادی بالای آن، باعث شده تا محققین در صدد تولید اینترفرون‌ها از منابع دائمی، ایمن و ارزان مثل گیاهان برآیند (Memari *et al.*, 2010; Ahangarzadeh *et al.*, 2012). در حال حاضر از میان گیاهان، سویا به عنوان گیاهی ایده‌آل در تولید گیاهان تراریخت و زیست داروها مطرح هست (Powell *et al.*, 2011). گیاه سویا دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که آنرا برای تولید پروتئین نوترکیب از بقیه گیاهان متمایز کرده است (Lau and Sun, 2009).

از مزیت‌های عمده‌ی سویا (*Glycine max* L.) می‌توان به محتوای پروتئینی بالای دانه سویا اشاره کرد بطوریکه ٤٠ درصد وزن خشک دانه سویا را پروتئین تشکیل می‌دهد. بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب بطوریکه سطح بیان پروتئین نوترکیب در سویا حدود ٤-٢ درصد کل پروتئین محلول را شامل می‌شود و پایداری دراز مدت پروتئین تولید شده در بیوماس خشک این گیاه اشاره کرد (Powell *et al.*, 2011; Hudson *et al.*, 2014). همچنین این گیاه عملکرد بیوماس بالایی دارد. دوره رشد کوتاه و امکان کشت و نگهداری آن در گلخانه از مزیت‌های دیگر این گیاه است (Vianna *et al.*, 2011). قابل ذکر است که سویا اولین لگومی است که به طور کامل توالی یابی شده است (Schmutz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013).

برای انتقال ژن به گیاهان روش‌های مختلفی وجود دارد، انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم به عنوان روشی سودمند در انتقال پایدار ژن و مطالعه ثبت بیان ژن‌های منتقل شده شناخته شده است (Vianna *et al.*, 2011). استفاده از روش انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم مزایای متعددی از جمله، توانایی انتقال و الحاق قطعات بزرگ DNA با کمترین بازآرایی درون ژنوم میزبان، درج تعداد نسخه پایین تراژن در ژنوم گیاه، سادگی و کم هزینه بودن آن و پایداری ژن خارجی را در پی خواهد داشت (Xing *et al.*, 2010). تاکنون آگروباکتریوم با موفقیت برای تراریختی برخی ارقام سویا مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال روش تراریختی سویا هنوز یک روش معمول و قابل تکرار برای همه ارقام آن نیست (Zhang *et al.*, 2014). به طور کلی موفقیت انتقال ژن در این روش متاثر از چندین عامل متفاوت از جمله نوع ژنوتیپ گیاهی (Soto *et al.*, 2013)، نوع و سن ریزنمونه (Koetle *et al.*, 2017)، سویه باکتری (می‌باشد (Zhang *et al.*, 2015)، غلظت باکتری (Yamada *et al.*, 2013)، مدت زمان تلقیح (Paramesh *et al.*, 2010)، مدت زمان هم‌کشتی (Sujatha *et al.*, 2012)، ترکیب محیط کشت (Rai *et al.*, 2012)، سیستم گزینشی و سیستم باززایی (Yadav *et al.*, 2013) می‌باشد.

انتقال ژن به گیاهان از طریق آگروباکتریوم نیازمند یک سیستم پایدار باززایی و درج ژن می‌باشد که باید برای گیاهان مختلف از جمله سویا بهینه‌سازی گردد (Kumari *et al.*, 2016). گرچه یک گیاه دو لپه‌ای و یک میزبان طبیعی برای آگروباکتریوم به شمار می‌رود ولی به عنوان یک گیاه سرسخت در برابر تراریختی به وسیله آگروباکتریوم شناخته شده است و در میزان تراریختی ارقام مختلف سویا تنوع زیادی گزارش شده است (Mello-farias and Chaves, 2008). انتقال ژن در سویا به شدت وابسته به ژنوتیپ است، حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه در موفقیت تراریختی به واسطه آگروباکتریوم موثر است، به طوریکه در اکثر گزارشات

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

تراریزش سویا، ریزنمونه کوتیلدون بیشترین کارایی را در انتقال ژن به سویا داشته است (Phat *et al.*, 2015).

غلظت مناسب آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است، به طوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه می-تواند نقش بسزایی در افزایش کارایی انتقال ژن به گیاهان داشته باشد (Kim *et al.*, 2009). مدت زمان هم کشتی و مدت زمان تلقیح 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 (Sujatha *et al.*, 2012). استوسیرینگون یکی دیگر از عوامل موثر در تراریختی گیاهان هست که از طریق القاء بیان ژن‌های بیماریزای Vir در پلاسمید Ti و نفوذ چندگانه T-DNA، کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Yamada *et al.*, 2012). لذا تراریختی گیاهان را می‌توان با افزودن ترکیبات فنولی از قبیل استوسیرینگون در محیط هم‌کشتی یا محیط باکتریایی افزایش داد (Zhang *et al.*, 2015). این تحقیق با هدف مطالعه برخی از عوامل موثر در تراریختی سویا از قبیل غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح باکتری، مدت زمان هم‌کشتی و غلظت استوسیرینگون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی: در این پژوهش از رقم سامان سویا (*Glycine max* cv. Saman) به عنوان میزبان جهت تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی استفاده شد. بذور رقم مورد نظر از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید.

ضدعفونی بذور و تهیه ریزنمونه: بذور به مدت سی ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و بعد از یک بار شستشو با آب مقطر استریل از هیپوکلرید سدیم سه درصد به مدت ۱۵ دقیقه برای ضدعفونی استفاده شد. سپس با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شدند. بذور سویا بعد از ضد عفونی سطحی به شیشه‌های مربا حاوی محیط کشت جوانه‌زنی شامل محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز و ۰/٦ درصد آگار منتقل شدند و در اتاق رشد با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون از گیاهچه‌های شش روزه تهیه شدند.

سویه‌های باکتری: در این پژوهش از باکتری *Eshrichia coli* سویه DH5α به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر ساختارهای تهیه شده و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 جهت انتقال سازه ژنی به سویا استفاده شد.

ناقل پلاسمیدی: از ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 که حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی هست استفاده شد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین جهت بیان در باکتری و ژن مقاومت به هیگرومایسین جهت بیان در گیاه، سایت‌های برش برای آنزیم‌های *Nco*I و *Bst*EII، پروموتر CaMV35S (از ویروس موزائیک کلم) و توالی‌های خاتمه دهنده‌ی نسخه‌برداری NOS می‌باشد.

تراریختی باکتریایی: برای تکثیر پلاسمید pCAMBIA1304 حاوی ژن اینترفرون گاما از روش شوک حرارتی (Cohen *et al.*, 1972) با اعمال تغییراتی به باکتری *E. coli* نژاد DH5α منتقل شد. همچنین برای انتقال پلاسمید pCAMBIA1304 حاوی ژن اینترفرون گاما به آگروباکتریوم از روش استاندارد انجماد و ذوب (Sambrook and Russell, 2001) استفاده شد. در نهایت برای تایید تراریزش آگروباکتریوم از واکنش PCR کلونی استفاده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون آگروباکتریوم جهت انتقال ناقل به گیاه: بدین منظور، یک کلنی از سویه LBA4404 آگروباکتریوم-های حاوی پلاسمید نوترکیب به محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۵ میلی گرم در لیتر ریفامپسین منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد روی شیکر انکوباتور (۱۰۰ دور در دقیقه) نگهداری شدند. بعد از ٢٤ ساعت وقتی که غلظت باکتری بین ۱-OD600nm=۰/۸ رسید، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (٤٠٠٠ دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل با محیط MS مایع در غلظت‌های مختلف ۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، OD_{600nm}=۰/۲، رقیق شده و به صورت سوسپانسیون درآمدند و برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم: بدین منظور زخم‌هایی در سطوح ریزنمونه‌ها ایجاد شد و در سوسپانسیون آگروباکتریوم تهیه شده با غلظت‌های مختلف (۱ و ۰/۸، ۰/٦، ۰/٤، OD600nm=۰/۲)، غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل منتقل شدند. همچنین برای بررسی اثر مدت زمان‌های مختلف تلقیح از پنج مدت زمان متفاوت (۱۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ دقیقه) استفاده شد.

هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم: ریزنمونه‌های تلقیح شده روی کاغذ صافی استریل انتقال یافته و هنگامی که محلول باکتری اطراف ریزنمونه‌ها نسبتا خشک شد، ریزنمونه‌ها به محیط کشت هم‌کشتی (محیط MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ٦ گرم در لیتر آگار) که فاقد آنتی‌بیوتیک بود منتقل شدند. همچنین برای بررسی اثر مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی از پنج مدت زمان متفاوت (۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ روز) استفاده شد. در نهایت پس از انتخاب بهترین غلظت آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح و مدت زمان هم‌کشتی برای تراریختی، اثر سطوح مختلف استوسیرینگون بر تراریختی سویا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اثر غلظت‌های مختلف استوسیرینگون (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفت.

گزینش ریزنمونه‌های تراریخته احتمالی در محیط گزینشگر: ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی شامل محیط کشت باززایی (محیط MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ٦ گرم در لیتر آگار) تکمیل شده با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ٤۰۰ میلی‌گرم درلیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. پس از دو دور واکشت ۱۵ روز، ریزنمونه‌های باززا شده به محیط طویل شدن ساقه (محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ٤۰۰ میلی‌گرم درلیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. پس از چهار هفته شاخه‌های طویل شده به محیط کشت ریشه‌زایی (MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم در لیتر IBA، ۲ درصد ساکارز، ۰/٦ درصد آگار، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت و خاک استریل انتقال یافته و به گلخانه منتقل شدند.

تأیید حضور ژن اینترفرون گامای انسانی (*Hu-IFN-γ*) در گیاهان با انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) : جهت اطمینان و تایید انتقال و درج ژن اینترفرون گامای انسانی از واکنش PCR استفاده شد. بدین منظور از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و شاهد، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFN-γ (جدول ۱) انجام گرفت. حجم واکنش µl ۲۰ در نظر گرفته شد. بدین منظور ابتدا واسرشت‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ^{o}C ۹٤ انجام شد. سپس واکنش در ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در دمای ^{o}C ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ^{o}C ٦۰ به مدت ٦۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ و به مدت دو ساعت انجام گرفت. برای رویت باندهای حاصل از دستگاه Gel documentation استفاده شد.

طرح‌های آماری و آنالیز آماری داده‌ها:

همه آزمایش‌های این پژوهش با استفاده از طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار اجرا گردید. پس از شش هفته، صفات تعداد شاخه-های باززا شده در محیط انتخابی و درصد تراریختی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تجزیه آماری داده‌های، ابتدا نرمال بودن آنها بررسی شد سپس تجزیه واریانس‌های لازم صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای MSTATC (version 5.5) و Excel (version 2016) استفاده گردید.

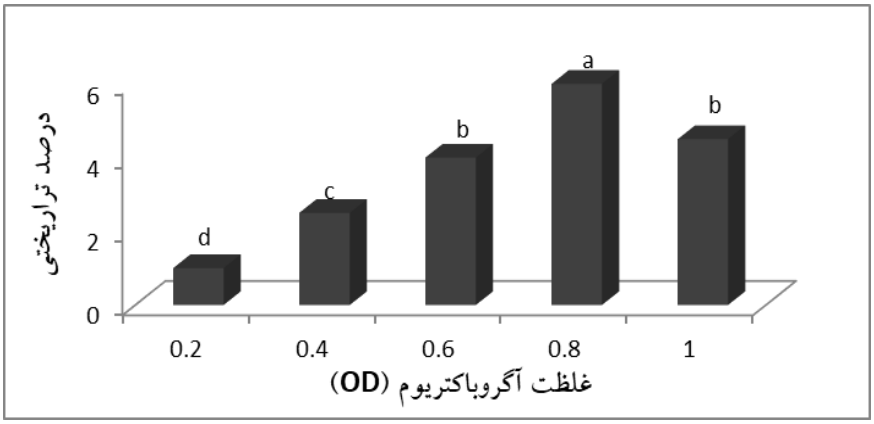
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *IFN-γ*

Table 1. Specific primers sequence of *IFN-γ* gene

آغازگر *IFN-γ* Primers of *IFN-γ*	توالی آغازگر Primer sequences
آغازگر روبه جلو Forward primer	5′-CAGGACCCATATGTAAAAGAAGC-3′
آغازگر رو به عقب Reverse primer	5′-CTGGGATGCTCTTCGACCTC-3′



شکل ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم بر میزان تراریختی گیاه سویا

Figure 1. Comparison the effect of different concentrations of *Agrobacterium* on soybean transformation

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم روی تراریختی سویا

به منظور تعیین OD مناسب سویه LBA4404 آگروباکتریوم برای تراریختی ریزنمونه کوتیلدون گیاه سویا، غلظت‌های مختلف - آگروباکتریوم (۱ و ۰/۸، ۰/۵، ۰/۳، ۰/۲=OD_{600nm}) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که بین غلظت‌های مختلف سویه LBA4404 آگروباکتریوم از نظر میزان تراریختی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج حاصل یک همبستگی مثبت بین کارایی انتقال ژن و غلظت آگروباکتریوم تا OD_{600}=۰/۸ نشان داد، به طوریکه با افزایش غلظت آگروباکتریوم تا ۰/۸ =OD_{600} کارایی انتقال نیز افزایش یافته ولی در غلظت بالاتر (۱=OD_{600}) کارایی انتقال کاهش یافته است (شکل ۱) که می‌تواند ناشی از رشد زیاد باکتری بر روی ریزنمونه‌ها باشد. همچنین کمترین میزان تراریختی در غلظت ۰/۲=OD_{600} مشاهده شد که به خاطر غلظت پایین باکتری زنده در واحد حجم بود.

به طور کلی چندین فاکتور می‌توانند اثر مهمی بر تراریختی گونه‌های مختلف گیاهی با استفاده از آگروباکتریوم داشته باشد. با بهینه سازی فاکتورهای موثر می‌توان کارایی انتقال ژن به سویا را افزایش داد. غلظت باکتری یکی از اصلی‌ترین عواملی است که کارآیی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تعیین غلظت مناسب باکتری در انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم، به عوامل متعددی از جمله نوع ژنوتیپ گیاهی و سویه آگروباکتریوم بستگی دارد (Paz *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 تراریختی 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). در مطالعه‌ای برای تراریختی سویا از بین چهار غلظت مختلف سویه LBA4404 آگروباکتریوم (۱ و ۰/۸، ۰/۵، ۰/۳ =OD_{600nm})،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

بیشترین میزان کارایی تراریختی در غلظت‌های ۰/۵- OD_{600nm}=۰/۳ و کمترین میزان تراریختی در غلظت‌های ۱- OD_{600nm}=۰/۸ حاصل شده است به طوریکه در غلظت‌های بالای باکتری، ریزنمونه‌های تلقیح شده از بین می‌رفتند (Liu *et al.*, 2013). از دلایل عدم مطابقت این مطالعه با نتایج ما می‌توان به متفاوت بودن رقم سویا اشاره کرد. در مطالعه‌ای دیگر برای تراریزش دو رقم سویا (Tianlong1 و Jac Purpke) از غلظت‌های مختلف سویه EHA101 آگروباکتریوم (۱ و ۰/۸، ۰/٦=OD_{600nm}) استفاده شده است. نتایج نشان داده که بیشترین میزان تولید گیاهان تراریخته سویا در غلظت OD_{600nm}=۰/٦ حاصل شده است (Li *et al.*, 2017). همچنین در مطالعه‌ای برای تراریختی چهار رقم سویا (Thorne، Williams، Williams 79، Williams 82) از غلظت OD_{600nm}=۰/۰-۷/۸ سویه EHA101 آگروباکتریوم استفاده شده است (Paz *et al.*, 2006).

اثر مدت زمان تلقیح آگروباکتریوم روی تراریختی سویا

این آزمایش به منظور مقایسه مدت زمان‌های متفاوت تلقیح در میزان تراریختی سویا انجام شد. بدین منظور اثر چهار زمان متفاوت تلقیح ۱۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ دقیقه ریزنمونه‌های سویا با غلظت OD_{600nm}=۰/۸ سویه LBA4404 آگروباکتریوم مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین زمان‌های مختلف تلقیح از نظر میزان آلوده‌سازی و انتقال ژن به سویا اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش مدت زمان تلقیح، میزان کارایی تراریختی نیز افزایش پیدا می‌کرد. بیشترین میزان کارایی تراریختی در مدت زمان تلقیح ٤۰ دقیقه و کمترین میزان کارایی تراریختی در مدت زمان تلقیح ۱۰ دقیقه حاصل شد (شکل ۲).

مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها یکی از فاکتورهای موثر بر کارایی تراریختی گیاهان محسوب می‌شود. در این مدت زمان تلقیح، باکتری‌ها ریزنمونه‌های مورد نظر را آلوده کرده و در ادامه در محیط هم‌کشتی موجب انتقال T-DNA به گیاه می‌شوند. از آنجایی که مدت زمان تلقیح هرچه طولانی‌تر باشد باعث نکروزه شدن ریزنمونه‌ها و در نهایت از بین رفتن کامل آن‌ها می‌گردد (Paramesh *et al.*, 2010). مطالعات Liu و همکاران (Liu *et al.*, 2013) نشان داد از میان مدت زمان‌های مختلف تلقیح سویا (۱۰، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه)، مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه برای تراریختی ریزنمونه‌های سویا مناسب می‌باشد. همچنین Paz و همکاران (Paz *et al.*, 2006) از مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه برای تراریختی سویا استفاده کرده‌اند. در حالی که Zhang و همکاران (Zhang *et al.*, 2015) از مدت زمان تلقیح ۱۵ دقیقه برای تراریختی سویا استفاده کرده‌اند.

اثر مدت زمان هم‌کشتی آگروباکتریوم روی تراریختی سویا

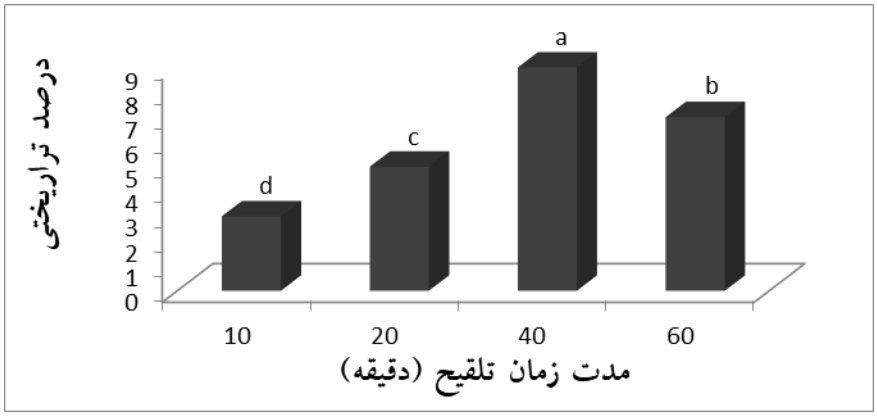
این آزمایش به منظور تعیین مدت زمان هم‌کشتی مناسب در انتقال ژن به سویا انجام شد. بدین منظور پنج مدت زمان مختلف هم‌کشتی ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ روز برای تراریختی ریزنمونه‌های سویا با استفاده از غلظت OD_{600nm}=۰/۸ سویه LBA4404 آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح ٤۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین زمان‌های مختلف هم-کشتی از نظر میزان آلوده‌سازی و انتقال ژن به سویا اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوریکه با افزایش مدت زمان هم-کشتی، میزان کارایی تراریختی نیز افزایش پیدا می‌کرد. بیشترین میزان کارایی تراریختی در مدت زمان هم‌کشتی ٤ روز و کمترین میزان کارایی تراریختی در مدت زمان هم‌کشتی یک روز حاصل شده است (شکل ۳).

مدت زمان هم کشتی باکتری از دیگر عوامل موثر در تراریختی گیاهان هست که از طریق اثر در نحوه آلودگی، رشد و باززایی ریزنمونه‌ها کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sujatha *et al.*, 2012). در انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم مدت زمان هم‌کشتی از ۱ تا ۷ روز متفاوت می‌باشد. معمولا بیشترین کارآیی تراریختی گیاهان در ۲ تا ۵ روز هم‌کشتی گزارش شده است (Somleva *et al.*, 2002). مطالعات مختلف نشان داده-اند هرچه مدت زمان هم‌کشتی کوتاهتر باشد باکتری فرصت کافی برای انتقال و درج ژن هدف را به گیاه پیدا نمی‌کند (Guo *et al.*, 2012). همچنین در هم‌کشتی‌های طولانی‌تر 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 تراریختی کاهش می‌یابد (Shrawat *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای از

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

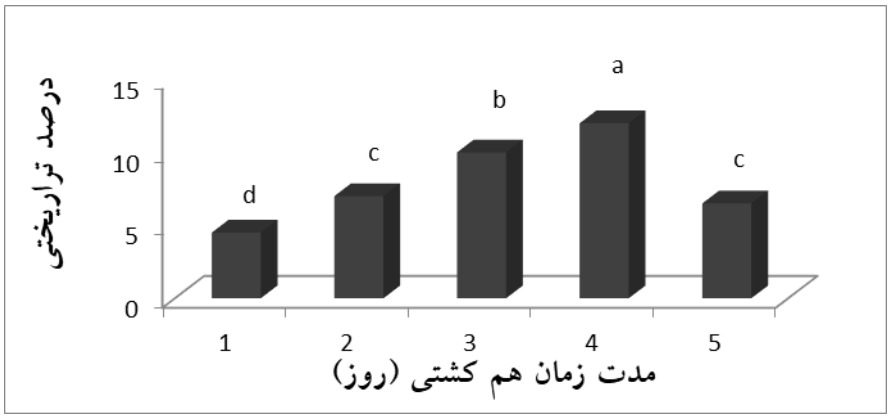
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

میان مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی (۲، ۳، ٤ و ۵ روز) ، بیشترین کارایی تراریختی سویا در مدت زمان هم‌کشتی ۳ روز مشاهده شده است (Liu *et al.*, 2013). همچنین Zhang وهمکاران (Zhang *et al.*, 2014) از مدت زمان هم‌کشتی ۳ روز برای تراریختی سویا استفاده کرده‌اند. اما Arun و همکاران (Arun *et al.*, 2016) و Li و همکاران (Li *et al.*, 2017) از مدت زمان هم‌کشتی ۵ روز برای تراریختی سویا استفاده کرده‌اند.



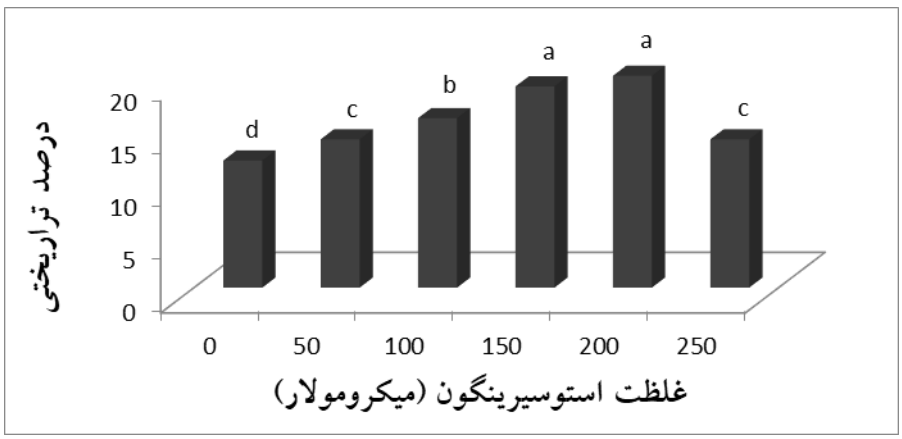
شکل ۲- مقایسه اثر مدت زمان‌های مختلف تلقیح بر میزان تراریختی گیاه سویا

Figure 2. Comparison the effect of different Period of Inoculation on soybean transformation



شکل ۳- مقایسه اثر مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی بر میزان تراریختی گیاه سویا

Figure 3. Comparison the effect of different Period of co-cultivation on soybean transformation



شکل ٤- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف استوسیرینگون بر میزان تراریختی گیاه سویا

Figure 4. Comparison the effect of different concentrations of acetosyringone on soybean transformation

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

اثر استوسیرینگون بر روی تراریختی سویا

به منظور بررسی اثر استوسیرینگون بر میزان کارایی انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی به سویا این آزمایش انجام شد. بدین منظور اثر سطوح مختلف استوسیرینگون (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار) با استفاده از غلظت OD_{600}=۰/۸ سویه LBA4404 آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح ٤٠ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی چهار روز مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل وجود یک همبستگی مثبت بین کارایی تراریختی و غلظت استوسیرینگون تا ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار را نشان داد، به طوریکه با افزایش غلظت استوسیرینگون تا غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار، کارایی تراریختی نیز افزایش یافته ولی در غلظت بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون کارایی تراریختی کاهش یافته است (شکل ٤).

استوسیرینگون از دیگر عوامل موثر در تراریختی گیاهان هست که از طریق القاء بیان ژن‌های بیماریزای Vir در پلاسمید Ti و نفوذ چندگانه T-DNA، کارایی تراریختی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Yamada *et al.*, 2012). لذا تراریختی گیاهان را می‌توان با افزودن ترکیبات فنولی از قبیل استوسیرینگون در محیط هم-کشتی یا محیط باکتریایی افزایش داد (Zhang *et al.*, 2015). غلظت مناسب استوسیرینگون برای انتقال ژن به گیاهان مختلف، متفاوت است بطوریکه تعیین مقدار بهینه آن برای هر گیاه نقش بسزایی در کارایی تراریختی گیاهان دارد. معمولا در غیاب استوسیرینگون، کارایی تراریختی کم است اما در مقادیر بالای استوسیرینگون کارایی تراریختی خیلی کاهش می‌یابد، چون غلظت‌های بالای استوسیرینگون ایجاد سمیت کرده و به نحوی از انتقال T-DNA یا تکثیر سلول‌های تراریخته جلوگیری می‌کند (Krenek *et al.*, 2015). در مطالعات مختلف از غلظت ٤٠ میلی-گرم در لیتر استوسیرینگون برای تراریختی سویا استفاده کرده‌اند (Kim *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2016).

ریشه‌زایی گیاهان تراریخته و سازگاری آنها در خاک

پس از هم‌کشتی، ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت انتخابی منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار بـه محـیط تازه واکشـت شدند. پس از چهار هفته جوانه‌های باززا شده در برخی از ریزنمونه‌ها مشاهده شدند، در حالی که ریزنمونه‌های شاهد روی محیط کشت انتخابی زرد شده و هیچگونه باززایی در آنها مشاهده نشد. معمولا در محیط گزینش، شاخه‌هایی که از باززایی و تکثیر سلول‌های تراریخت حاصل شده‌اند سبز باقی می‌مانند ولی شاخه‌هایی که از سلول‌های غیر تراریخت حاصل شده‌اند از بین می‌روند. البته در این آزمایش تعدادی از شاخه‌های باززا شده بر روی محـیط انتخابی، سبز و زنـده مانـدن و بقیـه بـه علـت عـدم دریافت ژن مقاومت به هیگرومایسین از بین رفتند. شاخه-های باززا شده در شرایط گزینش به محیط کشـت طویل‌سازی ساقه منتقل شدند. سپس شاخه‌ها با ارتفاع مناسب به محیط ریشه-زایی که حاوی دو میلی گرم IBA بود، منتقل شدند. بعد از چند روز از محل برش شاخه‌ها، اول کالوس و بعد جوانه‌های ریشه ظاهر شدند. رشد ریشه در برخی از گیاهچه‌ها کند و در برخی سریع بودند. کیفیت ریشه‌های تولید شده نازک و بلند بودند که سازگاری خوبی را با خاک نشان دادند (شکل ٥).

بررسی حضور ژن *Hu-IFN-γ* در گیاهان تراریخته با انجام واکنش PCR

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA و اطمینان از انتقال ژن هدف به گیاهان تراریخت، پس از استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخته نسل اول (T0) و شاهد، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Hu-IFN-γ* انجام شد که نتیجه آن نشان داد حداقل یک نسخه از ژن *Hu-IFN-γ* درژنوم گیاهان تراریخته وجود دارد. عدم مشاهده باند در گیاهان شاهد نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ٦).

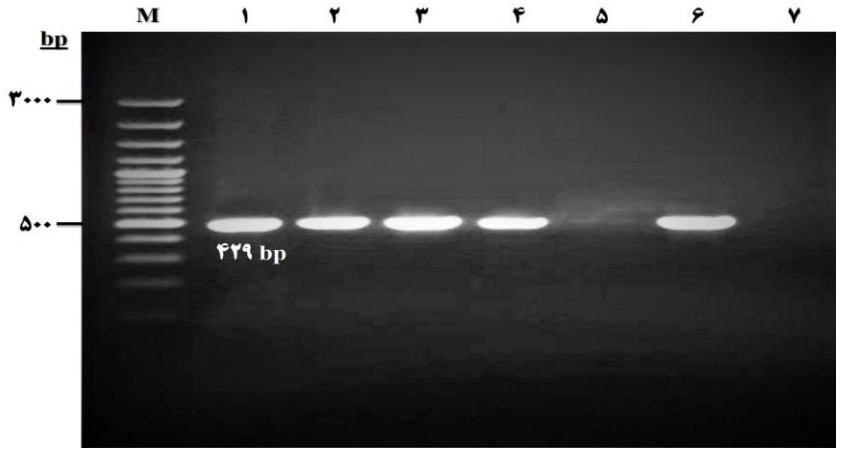
سویا یکی از مهمترین محصولات کشاورزی به شمار می رود. علی رغم تولید گیاهان تراریخته سویا، کارآیی انتقال به این گیاه هنوز هم پایین می‌باشد. البته تراریزش گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم به عنوان یک روش موثر و کارآمد مطرح است. کارایی تراریزش گیاهان با آگروباکتریوم تحت تاثیر مجموعه‌ای از عوامل قرار دارد که بهینه سازی این عوامل برای توسعه یک روش مناسب جهت انتقال ژن بسیار ضروری است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

شکل ۵- مراحل مختلف تراریختی سویا با آگروباکتریوم و باززایی ریزنمونه‌های تراریخته: **a)** کشت بذور سویا، **b)** جوانه زنی بذور، **c, d)** تهیه ریزنمونه کوتیلدون، **e)** تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون، **f)** هم‌کشتی ریزنمونه‌های تلقیح شده، **g, h)** باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های کوتیلدون پس از هم‌کشتی در محیط انتخابی، **i)** طویل‌شدن شاخه‌های باززا شده، **j)** ریشه‌زایی شاخه‌های طویل شده، **k, l, m)** سازگاری و انتقال گیاهچه‌های تراریخته به خاک، **n)** غلاف سویای تراریخته

Figure 5. Various stages of transformation of soybean by *Agrobacterium* and regeneration of transgenic explants. **a)** Cultivation of soybean seeds; **b)** Seed germination; **c, d)** Preparation of cotyledon explants; **e)** Inoculation of cotyledon explants; **f)** Co-cultivation; **g, h)** Regeneration of shoots from cotyledon explants after co-cultivation on selective medium; **i)** Shoot elongation; **j)** Rooting of elongated shoots; **k, l, m)** Acclimatization and transferred of transgenic plantlets to the soil; **n)** Pods of transgenic soybean



شکل ٦- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن hIFN-γ، **M**: نشانگر وزن مولکولی (3 Kb DNA Ladder)، **۱ تا ٤**: قطعات تکثیر شده از گیاهان تراریخته، **۵**: گیاه شاهد (گیاه غیرتراریخته)، **٦**: شاهد مثبت (قطعه تکثیر شده از پلاسمید حاوی ژن hIFN-γ)، **۷**: شاهد منفی (آب).

Figure 6. Analysis of transgenic plants by PCR technique. **M**: Molecular marker (3 Kb DNA Ladder), **1-4**: transgenic plants, **5**: Control plant (non-transgenic plant), **6**: Positive control (the plasmid that is harboring *Hu-IFN-γ* gene), **7**: Negative control (distilled water without DNA).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

در این پژوهش برای انتقال ناقل پلاسمیدی نوترکیب حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی به گیاه سویا، برخی از عوامل تعیین کننده بهینه شدند، به طوریکه بیشترین میزان کارآیی تراریختی ریزنمونه کوتیلدون شش روزه رقم سامان سویا در غلظت ۰/۸ =OD_{600nm} سویه LBA4404 آگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح ۴۰ دقیقه و مدت زمان هم‌کشتی ٤ روز به همراه ۱۵۰ الی ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون حاصل شد.

منابع

Ahangarzadeh S, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied K. 2012. Cloning, transformation and expression of *human interferon α2b* gene in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 7: 111-116.

Armstrong-James D, Teo IA, Shrivastava S, Petrou MA, Taube D, Dorling A, Shaunak S. 2010. Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. American Journal of Transplantation 10: 1796-1803.

Arun M, Chinnathambi A, Subramanyam K, Karthik S, Sivanandhan G, Theboral J, Alharbi SA, Kim CK, Ganapathi A. 2016. Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and *Agrobacterium-mediated* genetic transformation in half-seeds of soybean. Biotech Journal 6: 148- 150.

Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. 2015. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. Biotechnology Advances 1: 1- 31.

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 69: 2110–2114.

Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C. 2010. Plant-Specific Glycosylation Patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnology Journal 8: 564-587.

Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J. 2012. Optimization of factors affecting *Agrobacterium- mediated* transformation of Micro-Tom tomatoes. Genetics and Molecular Research 11:661- 671.

Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 32: 107-121.

Hudson LC, Garg R, Bost KL, Piller KJ. 2014. Soybean seeds: a practical host for the production of functional subunit vaccines. BioMed Research International 2014: 1-13.

Karg SR, Kallio PT. 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology Aadvances 27: 879-894.

Kim HJ, Kim MJ, Pak JH, Im HH, Lee DH, Kim KH, Lee JH, Kim DH, Choi HK, Jung HW, Chung YS. 2016. RNAi-mediated soybean mosaic virus (SMV) resistance of a Korean soybean cultivar. Plant Biotechnology Reports 10: 257–267.

Kim MJ, Baek K, Park CM. 2009. Optimization of conditions for transient *Agrobacterium-mediated* gene expression assays in Arabidopsis. Plant Cell Reports 28:1159-1167.

Koetle, M.J., Baskaran, P., Finnie, J.F., Soos, V., Balazs, E., and Van-Staden, J. 2017. Optimization of transient GUS expression of *Agrobacterium-mediated* transformation in Dierama erectum Hilliard using sonication and Agrobacterium. South African Journal of Botany, 111: 307-312.

Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Doskocilova A, Komis G, Samaj J. 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. Biotechnology Advances 33: 1-19.

Kumari S, Krishnan V, Dahuja A, Vinutha T, Jolly M, Sachdev A. 2016. A rapid method for optimization of *Agrobacterium-mediated* transformation of Indian soybean genotypes. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 53: 218-226.

Lau OS, Sun SSM. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. Biotechnology Advances 27: 1015-1022.

Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J, Li Y. 2017. Optimization of *Agrobacterium-Mediated* Transformation in Soybean. Plant science 8: 246-261.

Liu D, Liu S, Chang D, Wang L, Wang D, Wang NN. 2013. A simple and efficient method for obtaining transgenic soybean callus tissues. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2113–2125.

Mello-Farias PC, Chaves ALS. 2008. Advances in *Agrobacterium-mediated* plant transformation with enphasys on soybean. Scientia Agricola 65: 95-106.

Memari HR, Ramanan RN, Ariff AB. 2010. Comparison of expression systems for the production of *human interferon-α2b*. Central European Journal of Biology 5: 446-455.

Mikulecky P, Zahradnik J, Kolenko P, Cerny J, Charnavets T, Kolarova L, Necasova I, Pham PN, Schneider B. 2016. Crystal structure of *human interferon-γ* receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. Acta Crystallographica Section D Structural Biology 72: 1017-1025.

Miller CH, Maher SG, Young HA. 2009. Clinical use of *interferon-gamma*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1182: 69-79.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiology 15:473-497.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

Paramesh H, Fakrudin B, Kuruvinashetti MS. 2010. Genetic transformation of a local variety of tomato using gus gene: an efficient genetic transformation protocol for tomato. Journal of Agriultural Technology 6: 87-97.

Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. 2006. Improved cotyledonary-node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. Plant Cell Reports 25: 206–213.

Phat P, Rehman SU, Jung HI, Ju j. 2015. Optimization of soybean (*Glycine Max* L.) regeneration for korean cultivars. Pakistan Journal of Botany 47: 2379-2385.

Powell R, Hudson LC, Lambirth KC, Luth D, Wang K, Bost KL, Piller KJ. 2011. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: an alternative source of human thyroglobulin. Plant Cell Reports 30: 1327-38.

Rai, G. K., Rai, N. P., Kumar, S., Yadav, A., Rathaur, S., and Singh, M. 2012. Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on *Agrobacterium-mediated* transformation of tomato. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 48: 565-578.

Razaghi A, Owens L, Heimann K. 2016. Review of the recombinant *human interferon gamma* as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. Journal of Biotechnology 240: 48-60.

Sabalza M, Christou P, Capell T. 2014. Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. Biotechnology Letters 36: 2367-79.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81: 8014-8018.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molcular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New yourkYork, USA, 16.1-16.62.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463: 178–183.

Shrawat AK, Becker D, Lorz H. 2007. *Agrobacterium tumefaciens-mediated* genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 172: 281- 290.

Somleva MN, Tomaszewski Z, Conger BV. 2002. *Agrobacterium mediated* transformation of switchgrass. Crop Science 42: 2080-2087.

Soto N, Ferreira A, Abad CD, Enriquez GA. 2013. Regeneracion in vitro de plantas de soya de la variedad cubana Incasoy-36. Biotecnologia Aplicada 30: 29-33.

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.

Vianna GR, Cunha NB, Murad AM, Rech EL. 2011. Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins. Genetics and Molecular Research 10: 1733-1752.

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.

Xing A, Moon BP, Mills KM, Falco SC, Li Z. 2010. Revealing frequent alternative polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant transcription terminators. Plant Biotechnology 7: 772-782.

Yadav T, Kothari SL, Kachhwaha S. 2013. Optimization of *Agrobacterium-Mediated* Genetic Transformation and Regeneration of Transgenic Plants in Indian Cultivar of Barley. Biological Sciences 83:255-264.

Yamada T, Takagi K, Ishimoto M. 2012. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. Breeding Science 61: 480–494.

Zhang F, Chen C, Ge H, Liu J, Luo Y, Liu K, Chen L, Xu K, Zhang Y, Tan G, Li C. 2014. Efficient soybean regeneration and *Agrobacterium-mediated* transformation using a whole cotyledonary node as an explant. Biotechnology and Applied Biochemistry, 61: 620-625.

Zhang YM., Zhang HM, Liu ZH, Guo XL, Li HC, Li GL, Jiang CZ, Zhang MC. 2015. Inhibition of isoflavone biosynthesis enhanced T-DNA delivery in soybean by improving plant–Agrobacterium tumefaciens interaction. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 121: 183-193.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Study on the factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of soybean

Vahid Mehrizadeh[1], Ebrahim Dorani [*1], Seyed Abolghasem Mohammadi[1], Behzad Ghareyazie[2]

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
2. Agricultural Biotechnology of Research Institute of Iran, Karaj, Iran
* Corresponding Author, Email: dorani@tabrizu.ac.ir

Abstract

Agrobacterium-mediated transformation is one of the most effective methods for producing the transgenic soybean plants. The efficiency of soybean transformation with Agrobacterium depends on the various factors. The aim of this study was investigating the possibility of human interferon gamma production in soybean. For this purpose, some effective factors in soybean transformation such as Agrobacterium concentration (OD_{600nm} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1), inoculation time (10, 20, 40 and 60 minutes), co-cultivation time (1, 2, 3, 4 and 5 days) and different levels of acetosyringone (0, 50, 100, 150, 200 and 250 µM) were evaluated. The results showed that the highest percentage of transformation was observed in the OD_{600nm}= 0.8 and the lowest percentage of transformation was obtained at the OD_{600nm}= 0.2. Also, the highest percentage of transformation was obtained in the 40 minutes of inoculation and 4 days of co-cultivation and the lowest percentage of transformation was observed in the 10 minutes of inoculation and 1 day of co-cultivation. The presence of acetosyringone had the increasing effect on the soybean transformation efficiency, and the highest percentage of transformation was obtained at the 150 until 200 µM of acetosyringone. Finally, the presence of human interferon gamma gene in the probable transgenic plants was confirmed by the PCR technique and specific primers. The optimal conditions that obtained in this study can be used to transfer target genes to this soybean cultivar.

Key words: Acetosyringone, Agrobacterium, Transformation, Soybean

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8]