مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۹۶-۸۵

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6

DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1
2022

http://gebsj.ir/

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

بررسی انتقال و بیان ژن *rT1* چای ترش در گندم

Investigation on transformation and expression of roseltide *rT1* gene in wheat

شکوفه عبدالمجیدی و فاطمه دهقان نیری*

Shokoufeh Abdolmajidi and Fatemeh Dehghan Nayeri[2*]

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران

Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

*Corresponding Author, Email: :نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی *
nayeri@eng.ikiu.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۶)

چکیده

پپتیدهای ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های گیاهی فعالیت‌های ضد میکروبی قوی نشان می‌دهند و جایگزین‌های خوبی برای سموم متداول هستند. در این مطالعه برای انتقال ژن پپتید ضد میکروبی *rT1* گیاه چای ترش به گندم از سویه LBA4404 اگروباکتریوم حامل پلاسمید نوترکیب pBI121-rT1 استفاده شد. ریزنمونه‌های جنین بالغ چهار رقم گندم (سایسون، بهار، چمران و آرتا) پس از هم‌کشتی با سوسپانسیون باکتری به محیط گزینشی کالوس‌دهی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و دو میلی‌گرم در لیتر Picloram به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا پس از رشد در محیط گزینشی، انتخاب و بعد به محیط باززایی حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم انتقال یافتند. حضور و بیان ژن *rT1* در سطح رونویسی در گیاهان تراریخت به کمک آغازگرهای اختصاصی به‌ترتیب با استفاده از روش‌های PCR و RT-PCR تایید شد. براساس نتایج از بین ۱۵ گیاه تراریخت احتمالی فقط ۱۱ گیاه تراریخت بودند. از بین ۱۱ گیاه تراریخت، پنج گیاه مربوط به رقم سایسون با درصد تراریختی ۱/۶، چهار گیاه مربوط به رقم بهار با درصد تراریختی ۱/۳ و دو گیاه مربوط به رقم چمران با درصد تراریختی ۰/۶ بودند. از رقم آرتا هیچ گیاه تراریختی بدست نیامد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
پپتید ضد میکروبی،
ژن *rT1*،
گندم تراریخت،
RT-PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Antimicrobial peptides display powerful antimicrobial activities against a large set of plant pathogens and are a good alternative to conventional toxins. To transfer *rT1* gene of *Hibiscus sabdariffa* to wheat, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring the pBI121-rT1 plasmid was used. Mature embryo explants of four wheat cultivars including the Saison, Bahar, Chamran and Arta after co-cultivated with *A. tumefaciens* suspension were transferred to a selective callus medium containing 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l Picloram, 50 mg/l Kanamycin and 500 mg/l Cefotaxime. Embryogenic calli were selected after growth in a selective medium and then transferred to a regenerative medium containing 25 mg/l Kanamycin and 250 mg/l Cefotaxime. The presence and expression of *rT1* gene at the transcriptional level in transgenic plants were confirmed by PCR and RT-PCR methods respectively using specific primers. Based on the RT-PCR results, the *rT1* gene was expressed in transgenic wheat plants. In this study, out of 15 possible transgenic plants, only 11 were transgenic. Among transgenic plants, five plants belonged to Saison cultivar with 1.6 transgenic percentage, four plants represented to the Bahar cultivar with 1.3 transgenic percentage and two plants belonged to the Chamran cultivar with 0.6 transgenic percentage. No transgenic plant was obtained for the Arta cultivar.

Keywords: *Agrobacterium*, Antimicrobial peptides, *rT1* gene, RT-PCR, Transgenic wheat.

مقدمه

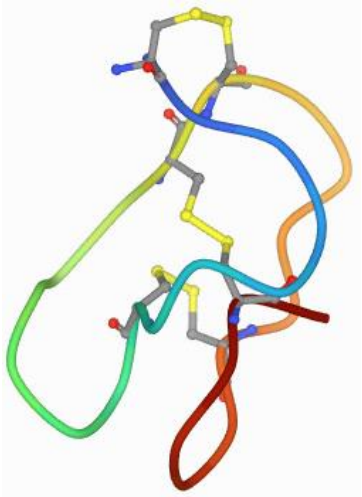
گندم (*Triticum aestivum* L) گیاهی یک ساله، علفی، تک لپه‌ای، روز بلند و خودگرده‌افشان از خانواده گندمیان و از جنس تریتیکوم است. این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که توسط میلیون‌ها نفر به عنوان اصلی‌ترین محصول غذایی جهان استفاده می‌شود (Ogihara et al. 2016) توانایی سازگاری گندم با اقلیم‌های مختلف به حدی است که در بیشتر زمین‌های قابل کشت جهان رشد می‌کند. این محصول ۲۱ درصد کالری کل و ۲۰ درصد پروتئین مورد نیاز ٤/٥ میلیارد نفر را در کشورهای در حال توسعه تأمین می‌کند (Borisjuk et al. 2019). در طول سال‌های اخیر با توجه به افزایش تقاضا و شرایط محیطی، پرورش‌دهندگان در جهت افزایش پتانسیل عملکرد، ویژگی‌های کیفی، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی در جهت اصلاح آن اقدام نموده‌اند. اگر چه اصلاح سنتی گندم در بهبود آن تأثیرگذار است اما استفاده از فناوری‌های زیستی مدرن مانند تفنگ‌ژنی (بمباران ذره‌ای) و اگروباکتریوم به توسعه سریع‌تر ارقام بهبود یافته کمک می‌کند (Supartana et al. 2006). کنترل زیستی آفات و بیماری-های گیاهی شاخص مهمی در تولید محصولات کشاورزی سالم می‌باشد. با توجه به اینکه بهداشت محیط و سلامت انسان از اهمیت بسیاری برخوردار است، پژوهش‌های بسیاری برای کاهش آثار مخرب عوامل آلوده‌کننده و افزایش مقاومت گونه‌های گیاهی در برابر آن‌ها صورت گرفته است. یکی از این راهکارها استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptide) است. این پپتیدها ترکیبات زیست فعالی به طول ۱۵ تا ۱۰۰ اسیدآمینه و بخشی از سیستم دفاع ذاتی موجودات زنده هستند که براساس بار و شکل به دو گروه آنیونی و کاتیونی تقسیم می‌شوند (Badr Hadad et al. 2017). پپتیدهای ضد میکروبی به مقدار کم در گیاهان بیان می‌شوند و باعث ایجاد مقاومت در گیاهان در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و آفات می‌شوند و انتخاب مناسبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. بنابراین به کمک تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌توان این پپتیدها را بطور گسترده به عنوان عوامل درمانگر و جایگزین سموم و داروهای خطرناک علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی و انسانی معرفی کرد (Marinaccio et al. 2022). پپتیدهای ضد میکروبی به چند گروه عمده شامل دیفنسین، سیکلوتید، نوتین، هوئین، اسکنین، تیونین و غیره تقسیم می‌شوند (Li et al. 2021). پپتیدهای گروه نوتین در دیواره سلولی، واکوئل‌ها و اجسام پروتئینی گیاه وجود دارند. همچنین از آن‌ها به دلیل پایداری و فعالیت مهارکنندگی علیه پروتئاز، استفاده-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

های درمانی بسیاری می‌شود. ژن *rT1* (Roseltid) کوچکترین عضو خانواده‌ی پروتئینی نوتین است که از گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) که به نام‌های Roselle و red sorrel نیز شناخته می‌شود جداسازی شده است. این ژن پپتید کوچکی با بار مثبت و ۲۷ اسیدآمینه تولید می‌کند که دارای شش اسیدآمینه سیستئین است (Loo et al. 2016). اسیدهای‌آمینه سیستئین با تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی ساختار فشرده‌ای در پپتیدهای ضد میکروبی ایجاد می‌کنند که در مقابل آفات و عوامل بیماری‌زای مختلف بعنوان سپر دفاعی عمل می‌کنند (Wang et al. 2016). این ساختار در پپتید rT1 چای ترش نیز وجود دارد (شکل ۱). بیان ژن نوتین در انسان به عنوان یک مهارکننده در برابر تجمع نوتروفیل‌الاستاز عمل می‌کند که باعث جلوگیری از بیماری‌هایی همچون آسم و انواع مختلفی از بیماری‌های التهابی می‌شود (Kam et al. 2019). اولین گیاه گندم تراریخت بارور توسط واسیل و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از روش بمباران ذره‌ای تولید شد (Aadel et al. 2018). انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به دلیل پایداری پلاسمیدها در تمام طول دوره هم‌کشتی و وجود تعداد نسخه پایین T-DNA در آن، نسبت به روش تفنگ ژنی موثرتر است (Jasdeep and Avijit 2015). دستیابی به گیاهان تراریخت نیازمند روش‌های دقیق باززایی و استفاده از ریزنمونه مناسب است. کشت بافت یا تکثیر غیرجنسی روشی است که بوسیله آن می‌توان به باززایی گیاهان تراریخت پرداخت (Ahmadpour et al. 2018). در این روش در مدت زمان کوتاه و فضایی محدود می‌توان تعداد زیادی گیاه در محیط درون شیشه‌ای با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت تولید کرد (Benderradji et al. 2012). منظور از بهینه‌سازی کشت بافت در گندم، ایجاد بستری مناسب برای انتقال ژن به گیاه و بررسی تمام مراحل تکوین گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است (Lantos et al. 2019). در گندم از ریزنمونه‌های مختلف از جمله گل‌آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است. کشت جنین نارس به عنوان ریزنمونه برتر برای انتقال ژن و مطالعات کشت کالوس در گندم معرفی شده است (Parmar et al. 2012). دسترسی به جنین نارس گندم در تمام فصول سال امکان‌پذیر نیست، بنابراین استفاده از جنین‌های بالغ با توجه به اینکه در تمام طول سال قابل دسترسی است، می‌تواند جایگزین مناسبی برای انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم باشد (Aydin et al. 2016). تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای دشوارتر از گیاهان دولپه‌ای است به همین علت برای القاء و تشکیل کالوس نیاز به بررسی عوامل مختلفی، مانند ژنوتیپ، ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد، استوسیرینگون، مواد موجود در محیط‌کشت، مدت زمان پیش-کشت، هم‌کشتی، سویه باکتری، آنتی‌بیوتیک گزینشگر در تولید و باززایی گندم تراریخت می‌باشد (Bouiamrine and El-Halimi 2012).

هدف از انجام این پژوهش ارائه دستورالعملی کارآمد برای کشت بافت و ریزازدیادی ٤ رقم گندم با استفاده از کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ و نیز ارائه روشی مفید برای انتقال ژن و تراریزش ژنتیکی گندم با استفاده از اگروباکتریوم سویه LBA4404 حامل وکتور pBI121 دارای ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک کانامایسین و پپتید ضد میکروبی rT1 می‌باشد.

CIPRGGI**C**LVALSG**CC**NSPG**C**IFGI**C**A



شکل ۱- توالی پپتیدی و ساختار سه بعدی پپتید rT1 چای ترش (PDB:5GSF) (https://www.rcsb.org). این پپتید دارای شش اسیدآمینه سیستئین برای تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی است.

Fig 1. Peptide sequence and 3-dimensional structure of rosell rT1 peptide (PDB: 5GSF) (https://www.rcsb.org). This peptide contains six cysteine amino acids to form disulfide bridges.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل چهار رقم گندم به نام‌های سایسون، بهار، آرتا و چمران از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (کرج) تهیه شد. دانه‌های با ظاهر سالم برای ضدعفونی انتخاب شدند. ابتدا دانه‌ها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد همراه با یک قطره توین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند. پس از چهار بار شستشو با آب مقطر استریل، دانه‌های ضدعفونی شده در یک ارلن استریل حاوی آب مقطر استریل به مدت ٤٨ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از آن، جنین از دانه تورم یافته با کمک تیغ اسکالپل از ناحیه محور جنینی در راستای طولی دانه و با برداشتن آندوسپرم خارج شد. محیط کشت MS استفاده شده حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اینوزیتول بود. pH محیط کشت با استفاده از NaOH/HCl یک مولار روی ۵/۸ تنظیم شد. پس از تنظیم pH، شش گرم در لیتر آگار به عنوان ژل‌کننده اضافه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. در هر محیط کشت ۲۵ عدد جنین قرار گرفت. جنین‌های بالغ به نحوی که ناحیه اسکوتلوم آن‌ها رو به بالا باشد در محیط پیش‌کشت (MSE1) به مدت دو شب در تاریکی در اتاقک رشد تحت تیمار ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Hensel et al. 2017).

انتقال سازه ژنی *rT1* : هیچ توالی نوکلئوتیدی برای پپتید rT1 در هیچ پایگاه داده‌ای ثبت نشده است. بهینه‌سازی کدونی پپتید ۲۷ آمینواسیدی rT1 چای ترش و همسانه‌سازی آن برای اولین بار توسط سهندی خلیفه کندی و دهقان نیری (١٤٠٠) انجام شد. برای طراحی سازه ژنی *rT1* به ابتدای توالی ۸۱ جفت بازی طراحی شده بوسیله نرم‌افزار EMBOSS Backtranseq (https://www.ebi.ac.uk) ۱۸ نوکلئوتید مربوط به نشانه هیس (His tag) و ۱۲ نوکلئوتید مربوط به توالی کزاک و به انتهای توالی طراحی شده، ۱۲ نوکلئوتید مربوط به توالی KDEL و ۳ نوکلئوتید مربوط به توالی خاتمه اضافه گردید. به منظور سهولت کار هنگام همسانه‌سازی در ابتدای توالی جایگاه برش آنزیم *Bam*HI و در انتهای توالی جایگاه برش آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I اضافه شدند. ناقل بیانی pBI121 حاوی سازه ژنی با روش شوک الکتریکی به باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد. باکتری-های ترانسفورم شده روی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شدند و پلاسمید از کلونی-های رشد کرده روی محیط کشت گزینشی استخراج شد. پلاسمیدهای نوترکیب pBI121 حامل ژن *rT1* بوسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی تایید و درستی همسانه‌سازی ژن طراحی شده بوسیله توالی‌یابی تایید شد (Sahandi Khalifeh-Kandy and Dehghan Nayeri 2021). در این پژوهش از ناقل بیانی pBI121 حامل ژن گزینشگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین جهت انتقال سازه ژنی *rT1* چای ترش به گیاه گندم استفاده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی تلقیح: از اگروباکتریوم تومفاسینس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه LBA4404 حامل پلاسمید pBI121 نوترکیب برای انتقال ژن*rT1* و نشانگر انتخابی کانامایسین استفاده شد. دو روز قبل از تلقیح ریزنمونه‌ها، تک کلنی‌های اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب (حامل ژن *rT1*) در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۵۰rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو شب کشت داده شدند. طی مدت زمان ٤٨ ساعت، به منظور افزایش کارایی تراریزش، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری رشد یافته همراه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB تازه منتقل و برای رشد باکتری‌های تازه، به مدت پنج ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. در این پژوهش برای اندازه‌گیری تراکم سلول‌های باکتری از اسپکتوفتومتر (OD 600nm= 0/6) استفاده شد. پس از رشد باکتری سوسپانسیون حاوی اگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ٦٠٠٠rpm سانتریفیوژ و رسوب باکتری در محیط کشت ۱/۲MS مایع به عنوان محیط کشت پایه برای تلقیح رقیق شد. در محیط کشت تلقیح از ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون برای تحریک، آزادسازی و ورود T-DNA به ریزنمونه‌ها استفاده گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

تلقیح ریزنمونه‌ها: به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها، جنین‌های بالغ به ظرف حاوی محلول باکتری منتقل شدند و به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از آن، جنین‌های بالغ آلوده شده به محیط هم‌کشتی (MSE2) (جدول ۱) انتقال یافتند و به مدت سه روز در تاریکی قرار داده شدند تا حمله اگروباکتریوم بصورت کامل صورت پذیرد.

جدول ۱- ترکیبات محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده در تراریختی گیاهان گندم

Table 1. Compositions of different culture media used in wheat transformation

Composition of culture medium	Name of culture medium
MS (Macro+ Micro+ Vitamin+ Sucrose+ Agar) +200 mg/l Casein hydrolysate	پیش‌کشت pre-culture (MSE1)
MSE1 + 2 mg/l 2,4-D +2 mg/l Picloram	هم‌کشتی co-culture (MSE2)
MSE2 + 500 mg/l Cefotaxime + 50 mg/l Kanamycin	محیط استراحت rest medium (MSE2cef)
MSE2 + 500 mg/l Cefotaxime + 50 mg/l Kanamycin	محیط انتخابی selective medium (MSE2kana)
MSE2 + 25 mg/l Kanamycin+ 250 mg/l Cefotaxime	محیط باززایی regenerative medium (MSER)
MS half	محیط ریشه‌زایی rooting medium (۱/۲MS)

انتخاب و باززایی گیاهان گندم تراریخت: پس از سه روز هم-کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS مایع همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم برای حذف اگروباکتریوم انتقال یافتند و پس از چندین بار شستشو، روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا رطوبت اضافی آن‌ها گرفته شود. جنین‌های تلقیح شده به محیط استراحت (MSE2cef) (جدول ۱) انتقال یافتند و تحت شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون به مدت هفت روز نگهداری شدند. بعد از گذشت هفت روز، ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌دهی (MSE2kana) تحت شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ در فیتوترون به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. هر هفت روز واکشت انجام شد و طی این مدت، فاکتورهایی شامل درصد کالوس‌دهی (نسبت کالوس‌های تولید شده به کل جنین‌های بالغ ×۱۰۰) و درصد جنین‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زا به کل کالوس‌ها ×۱۰۰) اندازه‌گیری شد. پس از طی مدت زمان کالوس‌دهی، کالوس‌های جنین‌زا به محیط باززایی انتخابی (MSER) جهت کنترل رشد باکتری و تحریک شاخه‌زایی و ریشه‌زایی، به اتاقک رشد تحت شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انتقال یافتند. کالوس‌های جنین‌زا، به رنگ کرم روشن بوده و ظاهری ترد و شکننده داشتند. با مشاهده شاخه‌زایی، گیاهچه‌های باززا شده جهت تولید ریشه به محیط ۱/۲MS همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها منتقل شدند. واکشت نمونه‌ها هر هفت روز انجام شد و تا محکم شدن ریشه، نمونه‌ها به مدت دو هفته در این محیط قرار گرفتند. در این مدت فاکتورهایی شامل درصد ساقه‌زایی (نسبت کالوس‌های جنین‌زای شاخه‌دار شده به کل کالوس‌های جنین‌زا ×۱۰۰)، ریشه‌زایی (نسبت گیاهچه‌ها و کالوس-های جنین‌زای ریشه‌دار شده به کل کالوس‌های جنین‌زا ×۱۰۰) و درصد تراریزش (نسبت گیاهچه‌های تراریخت به کل جنین‌های بالغ تلقیح شده با اگروباکتریوم ×۱۰۰) اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان حاوی مخلوط پرلیت و خاک باغچه به نسبت یک به یک منتقل شدند و در اتاقک رشد تحت شرایط دمایی ۲۱-۱۸ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی تا زمان رسیدن به سازگاری قرار گرفتند. گیاهان با محیط کشت MS مایع که برای رشد گیاهچه‌های گندم لازم بود تغذیه شدند.

استخراج DNA و تأیید انتقال ژن با روش PCR: برای بررسی مولکولی گیاهان تراریخت احتمالی، DNA ژنومی گیاهان سبز روی محیط کشت انتخابی با روش CTAB استخراج شد (Aboul-Maaty and Oraby 2019). برای تایید تراریختی گیاهان حاصل و اثبات حضور ژن *rT1*، از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی این ژن (جدول ۲) و DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت و شاهد استفاده شد. واکنش PCR در چرخه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

درجه، ۳۰ ثانیه در ٥٤ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. در واکنش از DNA گیاه شاهد غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی و پلاسمید حاوی ژن موردنظر به عنوان کنترل مثبت برای تأیید تراریزش گیاه استفاده شد. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و بررسی رونویسی ژن *rT1* با روش RT-PCR: استخراج RNA کل از بافت برگ گیاه گندم با استفاده از کیت RNX^{TM} Plus شرکت سیناکلون به شرح زیر انجام شد. در ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ در ازت مایع پودر شد و یک میلی‌لیتر از بافر استخراج RNX^{TM} Plus به آن اضافه شد و بعد پنج ثانیه ورتکس و پنج دقیقه روی یخ نگهداری شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و برای ۱۵ ثانیه میکروتیوب با دست به آرامی سر و ته شد و برای ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی که حاوی RNA است به میکروتیوب جدید منتقل شد و هم حجم آن، ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی با احتیاط خارج شد و به رسوب باقی مانده یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و برای هشت دقیقه با سرعت ۷۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و میکروتیوب در شرایط محیط خشک شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر تیمار شده با DEPC به آن اضافه شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز بارگذاری شد. قبل از ساخت cDNA، برای حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم *DNase* I محصول شرکت فرمنتاز استفاده شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت cDNA Synthesis شرکت سیناکلون انجام شد.

برای تایید بیان ژن *rT1* در سطح رونویسی، از cDNA سنتز شده و آغازگرهای اختصاصی این ژن (جدول ۲) در واکنش RT-PCR استفاده شد. این واکنش در ۳۵ سیکل و دمای واسرشت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، دمای اتصال ٥٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد (شکل ٤).

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تایید حضور و بیان ژن *rT1* در گیاهان تراریخت

Table 2. Primers used in PCR analysis for confirmation of presence and expression of *rT1* gene in transgenic plants.

Amplified fragment (bp)	Primer sequence	Gene name
138	**Forward**: TGTATTCCAAGAGGAGGTAT **Reverse**: AGCGCAAATACCAAAAATACA	*rT1*

نتایج و بحث

پپتیدهای ضد میکروبی جزء سیستم ایمنی گیاهان هستند و در صورت حمله عوامل بیماری‌زا در اندام‌های مختلف گیاه تولید می‌شوند. این پپتیدها با سرعت بالا و با صرف انرژی سوخت و ساز بسیار کم، به‌راحتی و در مقادیر زیاد در مدت زمان کوتاهی سنتز شده و طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا و آفات را مورد هدف قرار می‌دهند (Campos et al. 2018). بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی، از طریق افزایش نفوذپذیری غشاء در میکروارگانیسم‌های هدف، آن‌ها را از بین می‌برند. این پپتیدها به دلیل پیدایش پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در حوزه پزشکی موردتوجه زیادی قرار گرفته‌اند (Spohn et al. 2019). بعنوان مثال، پپتید Thi2.1 یک تیونین فراوان در آرابیدوپسیس است که توسط پاتوژن‌ها (مانند فوزاریوم)، زخم و اسیدجاسمونیک تولید می‌شود (Báez-Magaña et al. 2018). از پپتیدهای ضد میکروبی علاوه بر ایجاد مقاومت علیه عوامل بیماریزای گیاهی و انسانی به عنوان نگهدارنده‌های بالقوه مواد غذایی و راه حلی ممکن برای مبارزه مستمر با فساد مواد غذایی و ضایعات آنها استفاده می‌شود (Shwaiki et al. 2021). پژوهشگران تاثیر پپتید ضد میکروبی AsDef1 یولاف روی باکتری-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

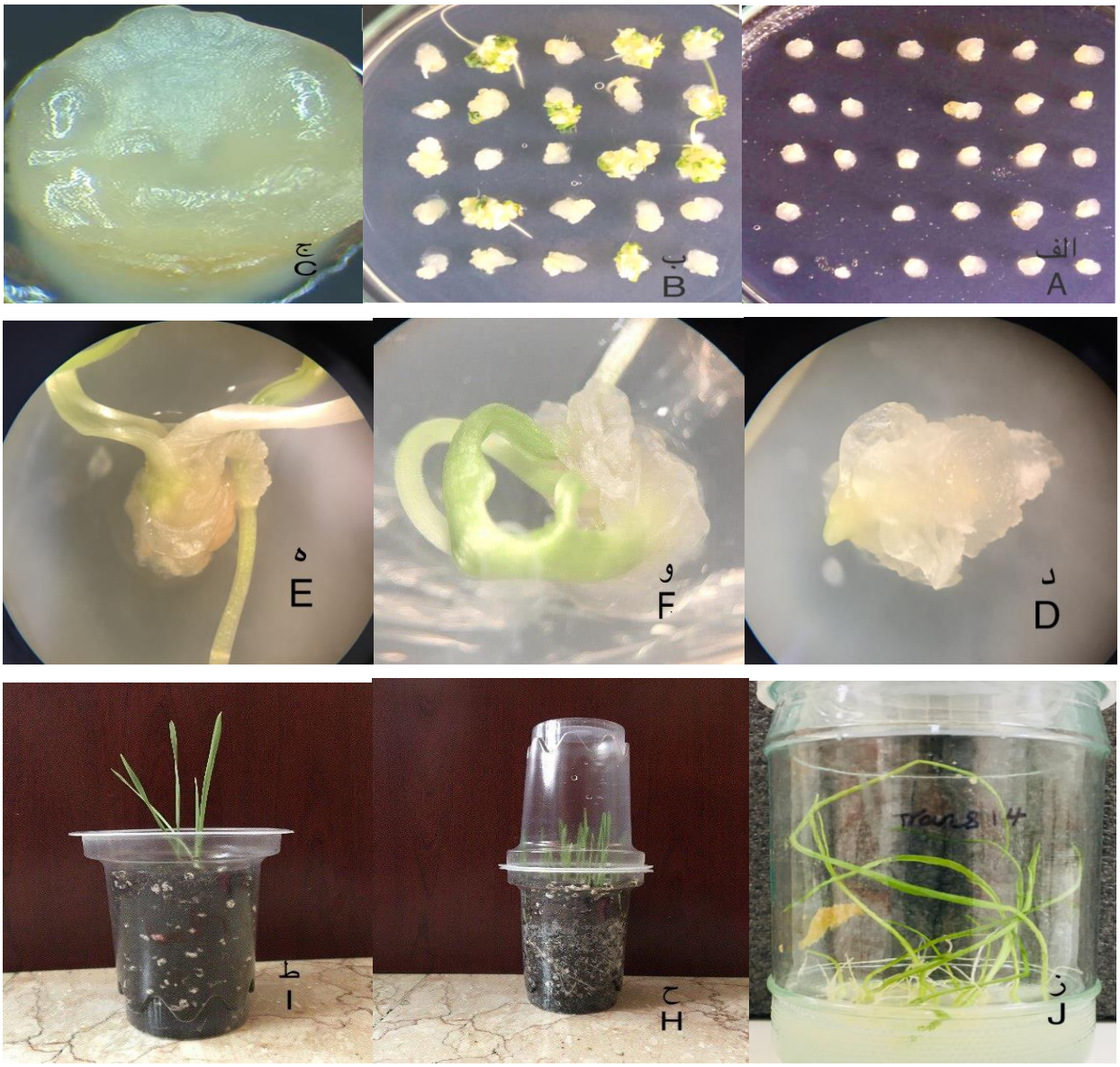
های گرم مثبت و گرم منفی تایید و استفاده از این پپتید برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل بیماریزا پیشنهاد شده است (Emamifar et al. 2021). پپتید ضد میکروبی DrsB1 اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی قوی علیه پاتوژن‌ها در گیاه تراریخت توتون نشان داد. از این پپتیدها میتوان برای تولید ارقام مقاوم گیاهان زراعی تراریخت علیه بیمارگرها استفاده نمود (Khademi and Nazarian-Firouzabadi 2019). در پژوهشی ژن پپتید ضد میکروبی امیگانان توسط اگروباکتریوم به دو گیاه توتون و سیب-زمینی انتقال داده شد. عصاره پروتئینی گیاهان بیان کننده این پپتید از رشد میکروب‌های بیماریزای انسانی جلوگیری کرد. از اینرو تولید پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان برای استفاده در صنایع داروسازی توصیه شده است (Badr Hadad et al. 2019).

پتید ضد میکروبی مورد مطالعه در پژوهش حاضر، پپتید ۲۷ اسیدآمینه‌ای Roseltide یا rT1 (شکل ۱)، یک پروتئین نوتین با خاصیت مهارکنندگی نوتروفیل‌الاستاز انسانی است که از گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) جداسازی شده و پتانسیل دارویی بالایی برای درمان بیماری‌های مرتبط با نوتروفیل‌الاستاز دارد (Robinson et al. 2016). در این پژوهش از ۱۲۵۰ جنین بالغ گندم ارقام سایسون، بهار، چمران و آرتا به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن *rT1* چای ترش به گندم استفاده شد. ریزنمونه‌های چهار رقم گندم چند روز پس از قرار گرفتن در محیط کشت کالوس‌دهی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و دو میلی‌گرم در لیتر Picloram به همراه آنتی‌بیوتیک کانامایسین و سفوتاکسیم، شروع به کالوس-زایی کردند (Parmar et al. 2012)، (شکل ۲). در هفته اول رشد کالوس‌ها کم بود اما از هفته دوم کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. بیشترین رشد کالوس‌ها بین هفته‌های سوم و چهارم رخ داد.کالوس‌های بدست آمده از نظر ساختار متراکم، ترد، شکننده و دارای سطحی ناهموار و از نظر رنگ کرم روشن مایل به زرد (به علت قرارگیری در تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند. تنظیم-کننده‌های رشد تاثیر معنی‌داری بر القای کالوس و باززایی جنین‌های بالغ دارند. استفاده از هورمون‌های Picloram و 2,4,D با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر باعث القای کالوس و باززایی جنین‌های بالغ در گیاهان تک‌لپه‌ای می‌شود (Parmar et al. 2012). براساس نتایج حاصل، ارقام سایسون، بهار، آرتا و چمران از نظر ویژگی‌هایی نظیر درصد شاخه‌زایی، درصد ریشه‌زایی و درصد تراریزش با یکدیگر تفاوت دارند (جدول ۵-۳). نتایج تجزیه و تحلیل آماری (جدول ٤ و ۵) نشان داد که بهترین ارقام از نظر کالوس‌زایی، جنین‌زایی، شاخه‌زایی و تولید ریشه به‌ترتیب سایسون، بهار، چمران و آرتا هستند. رقم سایسون بیشترین باززایی و رقم آرتا کمترین باززایی را نشان دادند. رقم سایسون نسبت به سایر ارقام دارای درصد شاخه-زایی و ریشه‌دهی بیشتری بود. درصد شاخه‌زایی در رقم سایسون ٥٤/٥ درصد، در رقم بهار ٤٤/٤ درصد، در رقم آرتا ٤٠ درصد و در رقم چمران ۳۷/۵ درصد بود. بیشترین میزان درصد ریشه‌زایی در رقم سایسون با ۲۷/۲ درصد و سپس در رقم بهار با ۲۱/۱۱ درصد و رقم چمران با ۱۵ درصد بود و رقم آرتا بدون ریشه‌زایی کمترین میزان را نشان داد. هنگامیکه گیاهان به محیط باززایی منتقل شدند شروع به شاخه‌دهی و پس از مدت کوتاهی شروع به ریشه‌دهی کردند. در حالیکه گیاهچه‌هایی که ابتدا شروع به ریشه‌دهی کردند هرگز علائم شاخه‌دهی از خود نشان ندادند و کاملا از بین رفتند. در همه آزمایش‌ها نمونه‌های شاهد در زمان انتقال به محیط کشت انتخابی کاملا از بین رفتند. تعداد گیاهان باززا شده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی ۳۰ گیاه بود که از بین آنها ۱۵ گیاه دارای بیشترین درصد شاخه‌زایی و ریشه‌دهی بودند که هفت گیاه مربوط به رقم بهار، شش گیاه از رقم سایسون و دو گیاه مربوط به رقم چمران بود. وجود آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط‌های کشت کالوس‌دهی و باززایی منجر به عدم تولید شاخه‌زایی و ریشه‌زایی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که آنتی‌بیوتیک کانامایسین حتی در مقادیر کم موجب از بین رفتن شاخه‌ها و جلوگیری از ریشه‌زایی شد. حذف آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط کشت باززایی باعث شد که کالوس‌های جنین‌زا شاخه و ریشه تولید کنند.

به منظور تایید تراریختی گیاهان گندم، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA گیاهان احتمالا تراریخت انجام شد. از بین ۱۵ لاین انتخاب شده، ژن *rT1* در ۱۱ لاین حضور داشت ولی وجود ژن *rT1* در رقم آرتا تایید نشد. وجود باند در نمونه +C که حاوی پلاسمید موردنظر است بعنوان کنترل مثبت بیانگر صحت آزمایش PCR می‌باشد. عدم وجود باند در نمونه آب، نشان‌دهنده این است

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

که واکنش PCR عاری از هرگونه آلودگی اسیدنوکلئیکی است. همچنین عدم وجود باند در چاهک w.t (بعنوان گیاه شاهد غیر تراریخت) نشانه عدم وجود ژن *rT1* در گیاه شاهد است (شکل ۳ و ٤).



شکل ۲- مراحل کشت و القاء کالوس و باززایی گیاه گندم از ریزنمونه جنین بالغ. الف) جنین‌های بالغ روی محیط کشت MS. ب) القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین-زای بدست آمده از جنین بالغ. ج) نمای نزدیک از جنین بالغ متورم شده. د) نمای نزدیک از یک کالوس‌های جنین‌زا. ه، و) القا ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. ز) گیاهچه‌های باززا شده انتقال یافته به محیط کشت ریشه‌زایی. ح) گیاهچه‌های ریشه‌دار انتقال یافته به خاک. ط) سازگار کردن گیاهان با شرایط طبیعی.

Fig 2. Stages of culture, callus induction and regeneration of wheat plant from mature embryo explants. A) Mature embryos on MS medium. B) Aerial shoot induction from embryogenic callus obtained from mature embryos. C) A close-up of a swollen mature embryonic. D) Close-up of an embryogenic callus. E, F) Aerial shoot induction from embryogenic callus. J) Regenerated seedlings transferred to root culture medium. H) Rooted seedlings transferred to soil. I) Adapting plants to natural conditions.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

جدول ۳- فراوانی گیاهچه‌های باززا شده از جنین بالغ گندم در تراریزش توسط اگروباکتریوم

Table 3. Abundance of seedlings regenerated from mature embryo using *Agrobacterium*-mediated transformation

Transformation percentage	Number of transgenic seedlings	Percentage of rooting	Percentage of branching	Percentage of embryogenesis	Percentage of callus	Number of mature embryo explants	Agrobacterium strain	Cultivars
1.6	5	27.2	54.5	55	66.6	300	LBA4404	Saison
1.3	4	21.11	44.4	60	50	300	LBA4404	Bahar
0.6	2	15	37.5	50	26.6	300	LBA4404	Chamran
0	0	0	40	16	20	300	LBA4404	Arta

*درصد تراریزش از نسبت گیاهان تراریخت به تعداد جنین‌های بالغ تلقیح شده با اگروباکتریوم×۱۰۰ بدست آمد.

جدول ٤- مقایسه میانگین ارقام مورد مطالعه

Table 4. Comparison of the mean of the studied cultivars

Percentage of rooting	Embryogenic, branching and rooted callus	Percentage of branching	Embryogenic and branched callus	Percentage of embryogenesis	Embryogenic callus	Callus-forming percentage	Callus formation	Cultivars
0.35 A	5 A	0.59 A	10 A	0.60 A	18.33 A	0.66 A	33.33 A	Saison
0.25 AB	3.16 A	0.49 A	6.66 AB	0.52 A	15 AB	0.50 A	25 A	Bahar
0.66 AB	0.33 B	0.47 A	2.5 BC	0.47 A	6.66 BC	0.26 B	33.13 B	Chamran
0 B	0 B	0.33 A	0.8 C	0.17 B	1.66 C	0.20 B	10 B	Arta

جدول ٥- تجزیه واریانس ارقام مورد مطالعه

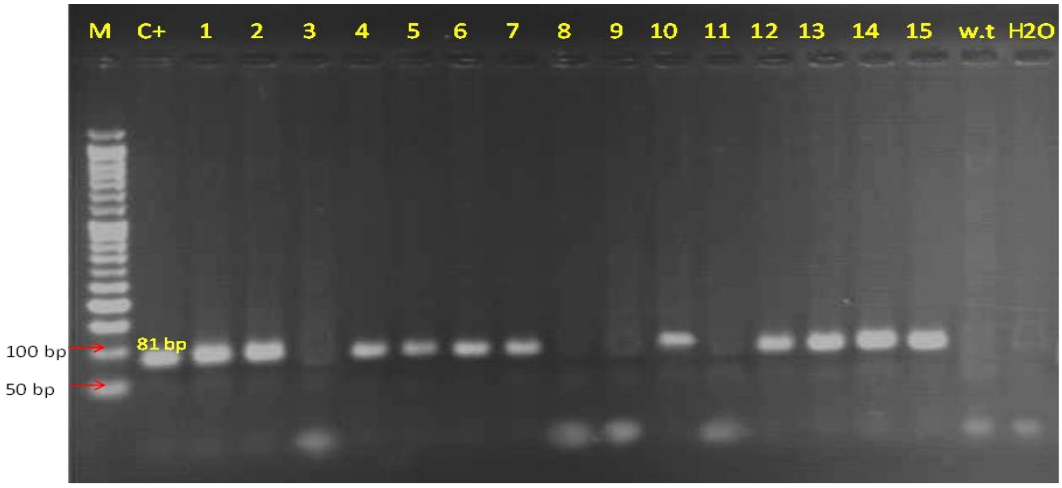
Table 5. Variance analysis of studied cultivars

Mean squares of ANOVA									Sources of changes
Percentage of embryogenic, branched and rooted callus	Embryogenic, branching and rooted callus	Percentage of branched embryos	Embryogenic and branching callus	Percentage of embryogenic callus	Embryogenic callus	Percentage of callus formation	Callus formation	Degrees of freedom	
*0.159	***34.153	0.071	***102.778	***0.214	***348.611	***0.277	***693.058	3	Cultivar

[1]، *** و * به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشد.

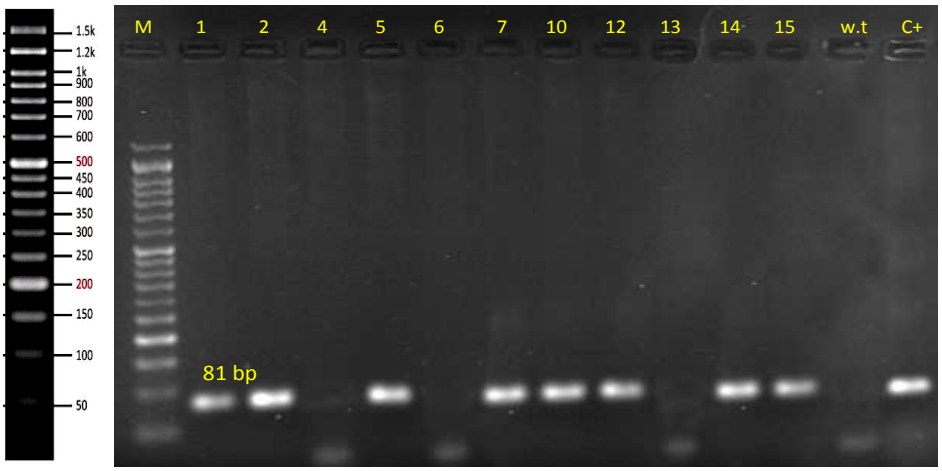
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]



شکل ۳- محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rT1* برای تایید حضور این ژن در ارقام سایسون، بهار و چمران. چاهک‌های شماره ۱ تا ٦ متعلق به گیاهان رقم سایسون، چاهک‌های شماره ۷ تا ۱۳ مربوط به گیاهان رقم بهار. چاهک‌های ١٤ و ١٥ متعلق به گیاهان رقم چمران هستند. حضور ژن *rT1* در گیاهان تراریخت رقم سایسون (چاهک‌های ۱، ۲، ٤، ٥ و ٦)، گیاهان تراریخت رقم بهار (چاهک‌های ۷، ۱۰، ۱۲ و ۱۳) و گیاهان تراریخت رقم چمران (چاهک-های ١٤ و ١٥) تایید شد. M: نشانگر مولکولی DNA، C^+: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن موردنظر)، w.t: گیاه شاهد غیر تراریخت، H_2O: کنترل منفی.

Fig 3. Electrophoresis of PCR product on 2% agarose gel using the *rT1* gene specific primers for confirmation of gene presence in the Saison, Bahar and Chamran cultivars. Wells 1 to 6 are related to the Saison, wells 7 to 13 represented the Bahar and wells 14 and 15 corresponded to the Chamran cultivars. The presence of *rT1* gene confirmed in the transgenic Saison (wells 1, 2, 4, 5 and 6), in the transgenic Bahar (wells 7, 10, 12 and 13) and in the transgenic Chamran cultivars (wells 14 and 15). M: DNA marker, C^+: positive control (vector containing the gene), w.t: non- transgenic control plant and H_2O: negative control.



شکل ٤- محصول واکنش RT-PCR روی ژل آگارز ۲٪. بیان ژن *rT1* با اندازه ۸۱ جفت باز در سطح رونویسی در۸ لاین گندم تراریخت تایید شد. بیان ژن در سطح رونویسی در چاهک‌های ۱، ۲ و ٥ گیاهان تراریخت رقم سایسون، چاهک‌های ۷، ۱۰ و۱۲ گیاهان تراریخت رقم بهار و چاهک‌های ١٤ و ١٥ گیاهان تراریخت رقم چمران تایید شد. M: نشانگر مولکولی DNA، C^+ کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن موردنظر)، w.t: گیاه شاهد غیر تراریخت.

Fig 4. Electrophoresis of PCR product on 2% agarose gel. The expression of the *rT1* gene with a size of 81 bp was confirmed at the transcription level in 8 transgenic wheat lines. Wells 1, 2 and 5 are related to the transgenic Saison cultivar, wells 7, 10 and 12 represented the transgenic Bahar cultivar and wells 14 and 15 corresponded to the transgenic Chamran cultivar. M: DNA marker, C^+: positive control (vector containing the gene), w.t: non- transgenic control plant.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

براساس مطالعات انجام شده، راندمان انتقال ژن در گیاهان به ویژه در گیاهان تک‌لپه‌ای پایین است. علیرغم مزایای بسیاری که استفاده از جنین نابالغ در مطالعات انتقال ژن به گندم دارد، زمان‌بر بودن تولید آن و عدم دسترسی به آن در تمام طول سال باعث استفاده از ریزنمونه‌های دیگر مانند جنین بالغ شده است (Turhan and Baser 2004). راندمان تراریختی با استفاده ار جنین بالغ چهار رقم مورد استفاده در این پژوهش (سایسون، بهار، چمران و آرتا) متفاوت و از ۰/۶ درصد در رقم چمران تا ۱/۶ درصد در رقم سایسون متغییر بود (جدول ۳). در پژوهشی با استفاده از جنین بالغ گندم به عنوان ریزنمونه، راندمان تراریختی ۱/۹ درصد گزارش شده است (Patnaik et al. 2006). تراریزش به کمک اگروباکتریوم، دارای عملکرد بهتری در تراریختی گیاهان دارد و به ژنوتیپ و رقم بستگی دارد. ممکن است تنها تعداد محدودی از نمونه‌ها تراریخت شوند، که این امر به میزان تولید کالوس و باززایی آن‌ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم بستگی دارد (Kumar et al. 2013). ژنوتیپ یکی از عوامل تاثیرگذار در باززایی گندم در کشت بافت است (Knežević et al. 2008) و براساس نتایج این پژوهش رقم سایسون دارای باززایی بهتری بود. انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم مزایای متعددی از جمله توانایی انتقال و الحاق قطعه DNA به درون ژنوم میزبان، ورود تعداد نسخه محدود و پایدار ژن خارجی و هزینه کمتر در آزمایش‌ها دارد. زمانی که DNA خارجی توسط اگروباکتریوم به ناحیه فعال رونویسی سلول میزبان وارد می‌شود رونویسی و بیان ژن خارجی را تحت کنترل خود قرار می‌دهد (Aadel et al. 2018). سویه اگروباکتریوم، غلظت اگروباکتریوم، نوع حامل، ریزنمونه انتخاب شده، مدت زمان پیش کشت، مدت زمان و شرایط تلقیح و هم‌کشتی، وجود استوسیرینگون در فرآیند تلقیح از جمله عواملی هستند که در موفقیت انتقال ژن به گیاه توسط اگروباکتریوم موثر هستند (Qayyum et al. 2011). به طور کلی پپتیدهای ضد میکروبی از بهترین نامزدهای مورد استفاده در برابر عوامل ضد میکروبی در کشاورزی و پزشکی هستند. این پپتیدها ساختاری متفاوت از سایر پپتیدها دارند و دارای فعالیت انتخابی دقیق و اثرات سمی محدود روی سلول‌های پستانداران هستند. پپتیدهای ضد میکروبی باعث ایجاد مقاومت در گیاهان به طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و آفات می‌شوند و جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی هستند. براساس نتایج این مطالعه پپتید rT1 چای ترش برای اولین بار در گندم بیان شد. انتظار می‌رود این پپتید باعث کنترل عوامل بیماری‌زای گندم تراریخت شود و بعنوان یک سم مناسب و بی‌خطر برای کنترل پاتوژن‌های گندم و سایر گیاهان معرفی گردد.

منابع

Aadel H. Abdelwahd R. Udupa SM. Diria G. El-Mouhtadi A. Ahansal K. Gaboun F. Douira A. Iraqi D. 2018. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Cereal Research Communications. 46: 10-20.

Aboul-Maaty NAF. Oraby HAS. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Centre. 43: 1-10.

Ahmadpour R. Zare N. Asghari-Zakarta R. Sheikhzadeh P. 2018. Efficient *in vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from mature and immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology. 59: 1-12.

Murat A. Hossien Pour A. Haliloğlu K. Tosun M. 2016. Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat. Turkish Journal of Biology. 40: 1178-84.

Nazarian-Firouzabadi F. Badr Haddad A. Sheikhian A. 2019. Cloning and in planta expression of an omiganan antimicrobial peptide in tobacco and potato plants to control the growth of human bacterial pathogens. Yafteh. 20: 14-29.

Badr Haddad A. Nazarian Firouzabadi F. Ismaili A. Bagheri H. 2017. Cloning and expression of an omiganan pentahydrochloride (MBI226) antimicrobial peptide in tobacco (*Nicotiana tabacum*) confers resist to bacterial pathogens. Crop Biotechnology. 7: 1-13.

Báez-Magaña M. Díaz-Murillo V. López-Meza JE. Ochoa-Zarzosa A. 2018. Immunomodulatory effects of thionin Thi2. 1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. International Immunopharmacology. 57: 47-54.

Benderradji L. Brini F. Kellou K. Ykhlef N. Djekoun A. Masmoudi K. Bouzerzour H. 2012. Callus induction. proliferation. and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]

heat stress conditions. International Scholarly Research Network. 2012: 1-8.

Borisjuk N. Kishchenko O. Eliby S. Schramm C. Anderson P. Jatayev S. Kurishbayev A. Shavrukov Y. 2019. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. BioMed Research International. 2019: 1-18.

Bouiamrine E. Diouri M. El-Halimi R. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos. International Journal of Biosciences. 2: 29-39.

Campos ML. de Souza CM. de Oliveira KBS. Dias SC. Franco OL. 2018. The role of antimicrobial peptides in plant immunity. Journal of Experimental Botany. 69: 4997-5011.

Emamifar S. Shamsozoha A. Sohrabi SM. Mohammadi M. Shahmohammadi M. 2021. Molecular characterization and evaluation of the antibacterial activity of a plant defensin peptide derived from a gene of oat (*Avena sativa* L.). Phytochemistry. 181: 112586.

Hensel G. Marthe C. Kumlehn J. 2017. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos. Methods Molecular Biology. 1679: 129-139.

Jasdeep CP. Avijit T. 2015. Genetic transformation and transgenic wheat development: an overview. Clon Transgen. 5: 1-2

Kam A. Loo S. Dutta B. Sze SK. Tam JP. 2019. Plant-derived mitochondria-targeting cysteine-rich peptide modulates cellular bioenergetics. Journal of Biological Chemistry. 294: 4000-4011.

Khademi M. Nazarian-Firouzabadi F. 2019. Expression and antimicrobial activity analysis of dermaseptin B1 recombinant peptides in tobacco transgenic plants. Plant Genetic Researches. 6: 139-50.

Knežević D. Zečević V. Đukić N. Dodig D. 2008. Genetic and phenotypic variability of grain mass per spike of winter wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). Kragujevac Journal of Science. 30: 131-136.

Kumar N. Gulati A. Bhattacharya A. 2013. L-glutamine and L-glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars. Applied Biochemistry and Biotechnology. 170: 1649-64.

Lantos C. Purgel S. Ács K. Langó B. Bóna L. Boda K. Békés F. Pauk J. 2019. Utilization of *in vitro* anther culture in spelt wheat breeding. Plants (Basel). 8: 436-445.

Li J. Hu S. Jian W. Xie C. Yang X. 2021. Plant antimicrobial peptides: structures. functions. and applications. Botanical Studies. 62: 1-15.

Loo S. Kam A. Xiao T. Nguyen GKT. Liu CF. Tam JP. 2016. Identification and characterization of roseltide. a knottin-type neutrophil elastase inhibitor derived from *Hibiscus sabdariffa*. Scientific Reports. 6: 1-16.

Marinaccio L. Stefanucci A. Scioli G. Della Valle A. Zengin G. Cichelli A. Mollica A. 2022. Peptide human neutrophil elastase inhibitors from natural sources: an overview. International Journal of Molecular Sciences. 23: 2924-2936.

Ogihara Ya. Shigeo T. Hirokazu H. 2016. Advances in wheat genetics: from genome to field. Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Springer Nature.10.1007.

Parmar SS. Sainger M. Chaudhary D. Jaiwal PK. 2012. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Physiology and Molecular Biology of Plants. 18: 177-183.

Patnaik D. Vishnudasan D. Khurana P. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. Current Science. 91: 307-317.

Qayyum A. Razzaq A. Ahmad M. Jenks MA. 2013. Water stress causes differential effects on germination indices. total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. African Journal of Biotechnology. 10: 14038-14045.

Robinson SD. Chhabra S. Belgi A. Chittoor B. Safavi-Hemami H. Robinson AJ. Papenfuss AT. Purcell AW. Norton RS. 2016. A naturally occurring peptide with an elementary single disulfide-directed β-hairpin fold. Structure. Structure. 24: 293-299.

Sahandi Khalifeh-Kandy A. Dehghan Nayeri F. 2021. Bioinformatics design and cloning of *Hibiscus sabdariffa rT1* gene for construction of pBI121-rT1 recombinant vector in order to expression in plants. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 10: 47-57.

Shwaiki LN. Lynch KM. Arendt EK. 2021. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application–A focus on synthetic peptides. Trends in Food Science and Technology. 112: 312-324.

Spohn R. Daruka L. Lázár V. Martins A. Vidovics F. Grézal G. Méhi O. Kintses B. Számel M. Jangir PK. Csörgő B. Györkei Á. Bódi Z. Faragó A. Bodai L. Földesi I. Kata D. Maróti G. Pap B. Wirth R. Papp B. Pál C. 2019. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. Nature Communications. 10: 4538-4552.

Supartana P. Shimizu T. Nogawa M. Shioiri H. Nakajima T. Haramoto N. Nozue M. Kojima M. 2006. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bioscience and Bioengineering.102: 162-170.

Turhan H. Baser I. 2004. Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Asian Journal of Plant Science. 3: 17-19.

Wang G. Li X. Wang Z. 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Research. 44: D1087-D1093.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.9.6]