مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره دوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۸۰-۷۱

بهبود کارایی انتقال ژن به روش غیرکشت‌بافت در گیاهان گندم و برنج با استفاده از اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*)

Optimization of *Agrobacterium* -mediated transformation efficiency in wheat and rice using a non-tissue culture approach

صدیقه نصررمزی، محمدمهدی سوهانی*، محسن ایمان‌زاده
Sedighe Nasr-Ramzi, Mohammad Mahdi Sohani, Mohsen Imanzade

دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

Biotechnology Department, College of Agriculture, University of Guilan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/٤/٦ – تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/٤)

چکیده

گیاهان تراریخته بیشتر به‌وسیله روش‌های مبتنی بر کشت‌بافت تولید می‌شوند که به آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و گزینش دقیق ریزنمونه، غربالگری بافت‌های تراریخته و به باززایی گیاهان فوق تحت شرایط درون شیشه‌ای *in vitro* نیاز است که مشکل و زمان‌بر است. در این پژوهش تراریزش دو گیاه تک‌لپه و مهم زراعی برنج و گندم با روش به نسبت آسان *in planta* انجام و کارایی انتقال ژن آن‌ها بررسی شد. آزمایش با دو سویه‌ی اگروباکتریوم (EHA105 و LBA4404)، سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام)، سه رقم گندم (آذر۲، الوند و سرداری)، سه غلظت استوسیرینگون (µM صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰) و نیز استفاده از شرایط خلأ با استفاده از دستگاه خلأ به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. کارایی انتقال ژن با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS و واکنش پی.سی.آر با سه ژن مختلف بررسی شد. بالاترین کارایی در رقم حسن سرایی در گیاه برنج با استفاده از سویه‌ی EHA105 با حضور ۱۰۰µM استوسیرینگون همراه با استفاده از خلأ به میزان ۱/۱ درصد بود. هم‌چنین کارایی انتقال ژن رقم آذر۲ و سرداری در بین ارقام گندم در سویه‌ی EHA105 با حضور ۲۰۰µM استوسیرینگون همراه با استفاده از خلأ به میزان ۰/۵۵ درصد بود.

واژه‌های کلیدی

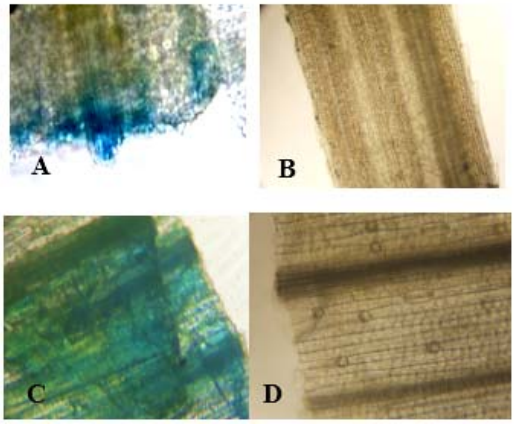
ستوسیرینگون
آزمون هیستوشیمیایی گاس
in planta
انتقال ژن
اگروباکترویوم

مقدمه

برای اولین بار انتقال ژن پایدار برنج تیپ ژاپونیکا به واسطه اگروباکتریوم به سلول کالوس در سال ۱۹۹۰ گزارش داده شد (Raineri *et al.* 1990). سویه‌ی استفاده شده در این پژوهش A281، حاوی پلاسمید با بیماری‌زایی قوی به‌نام pTi B0542 بود. گندم نیز همانند برنج یکی از محصولات مهم زراعی است که از جنبه‌های مختلفی به‌هم شبیه هستند اما انتقال ژن گندم دیرتر از برنج شروع شده است (Wu *et al.* 2003). اولین انتقال ژن گندم به‌واسطه اگروباکتریوم از طریق سیستم کشت بافت و کشت جنین نابالغ را چنگ و همکارانش (۱۹۹۷) گزارش کردند.

انتقال ژن به واسطه‌ی اگروباکتریوم در مقایسه با روش‌های مکانیکی بمباران ذرات دارای مزیت‌های بسیاری است که از جمله آن‌ها انتقال یک قطعه دی.ان.ای با توالی‌های مشخص در دو انتها، تعداد نسخه کم از تراژن و نیز امکان انتقال قطعات بزرگ دی.ان.ای است. موفقیت این روش به نوع و سن بافت گیاهی برای آلودگی، نوع ناقل استفاده شده برای انتقال ژن، سویه‌ی اگروباکتریوم، مراحل و جزئیات عمل آلودگی به‌خصوص استفاده از ترکیب فنولی استوسیرینگون وابسته است (Dai *et al.* 2001).

در حال حاضر یکی از روش‌های رایج انتقال ژن غلات استفاده از اگروباکتریوم بر پایه روش‌های کشت بافت است (Hiei *et al.* 2008) باید توجه داشت که روش‌های کشت بافت به دلیل اثرهای اپی‌ژنتیکی و نوترکیبی کروموزومی بر سلول‌های میزبان سبب وقوع بالای تنوع سوماکلونال می‌شوند (Zhao *et al.* 2006). علاوه‌بر این، در طی مراحل مختلف به‌طور معمول گیاه به شرایط *in vitro* منتقل، ریزنمونه از گیاه تهیه و کالوس تولید می‌شود. در نهایت باززایی گیاه کامل لازم و ضروری است که البته باززایی برخی از گیاهان مانند غلات به سختی انجام می‌شود (Mohan. 2001). روش دیگر استفاده از اگروباکتریوم در انتقال ژن گیاهان، روش *in planta* است که بدین منظور از اگروباکتریوم در شرایط *in vivo* برای تلقیح بذور در حال جوانه‌زنی استفاده می‌شود و نیازی به کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی وجود ندارد. با استفاده از روش *in planta* تنوع سوماکلونال به حداقل رسیده و به‌طور قابل توجهی در زمان، هزینه‌ها و مراحل طولانی کشت بافت صرفه‌جویی می‌شود (Supartana *et al.* 2006). این روش برای گیاهان تک لپه مانند برنج و گندم که از دیدگاه کشت بافت و باززایی سرسخت هستند بسیار مفید بوده و می‌تواند جایگزین



شکل ۱- بیان ژن بتاگلوکورونیداز به‌صورت ظهور رنگ آبی در بافت برگ گیاهان برنج و گندم. ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم برنج رقم حسن سرایی با سویه EHA105 در غلظت ۱۰۰μM استوسیرینگون با استفاده از خلأ (A) و نمونه شاهد از همین رقم (B). ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم گندم رقم آذر ۲ و سویه EHA105 در غلظت ۲۰۰μM استوسیرینگون با استفاده از خلأ (C) و نمونه شاهد از همین رقم (D).

Figure 1 – Transgenic (left) and nontransgenic (right) leaf of rice (top) and wheat (below) expressing GUS. Formation of blue color in Hasan saraie rice cultivar, which transformation was performed by means of vacuum infiltration of EHA105 strain plus 100 μM Acetosyringone (A) and control sample from the same cultivar (B). The blue color was formed in Azar 2 wheat cultivar, which transformation was performed by vacuum infiltration plus 200 μM Acetosyringone (C) and control sample from the same cultivar (D).

روش کشت بافت شود. این روش در غلاتی مانند برنج (Supartana *et al*. 2005; Lin *et al*. 2009)، گندم (Supartana *et al*. 2006; Janice *et al*. 2009; He *et al*. 2010; Razzaq *et al*. 2011) و ذرت (Chumakov *et al*. 2006) گزارش شده است.

هدف از این پژوهش بهینه‌سازی انتقال ژن دو گیاه تک‌لپه برنج و گندم با واسطه‌ی باکتری *A. tumefaciens* به‌روش غیرکشت‌بافت و عوامل دخیل است. گیاهان ترانسفورم شده با استفاده از دو آزمون رنگ‌آمیزی GUS برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش پی.سی.آر با استفاده از ۳ جفت آغازگر در داخل ناحیه T-DNA از پلاسمید گیاهی pCAMBIA1105.IR تایید شدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه‌های باکتری، پلاسمید و مواد مورد استفاده: در این پژوهش سه رقم محلی برنج حسن سرایی، گرده و بینام از موسسهٔ تحقیقات برنج کشور در رشت و سه رقم گندم دیم آذر۲، الوند و سرداری از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کردستان، سنندج، تهیه شدند. دو سویه اگروباکتریوم EHA105 و LBA4404 حامل پلاسمید گیاهی pCAMBIA1105.IR (کامبیا[1]، کانبرا، استرالیا، AF354045) جهت انتقال ژن استفاده شد. این ناقل حاوی ژن مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*)، ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS-Plus*) با اینترون چالکون سینتاز[2] در نزدیک پایانه ′۵ است و حاوی پروموتر قوی CaMV35S در ناحیه T-DNA است. آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین[3] (Rif) و مواد شیمیایی (X- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide Gluc) و 4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone (استوسیرینگون، AS) از شرکت سیگما[4]، اسپکتینومایسین[5] (Spec) و سفوتاکسیم[6] (Cef) از شرکت داروپخش خریداری شدند.

انتقال ژن به بذور با اگروباکتریوم: بدین منظور، ابتدا بذور برنج و گندم جداگانه با استفاده از اتانل ۹۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی شدند. بذور به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد درون ظروف پتری قرار گرفتند تا جوانه بزنند و سفیدی حاصل از رشد ریشه‌چه در آن‌ها ظاهر شود. سویه‌های باکتری بر اساس روش گلوین طی سه مرحله و در سه محیط به صورت جداگانه کشت داده شدند (Gelvin. 2006).

جهت تلقیح بذور با اگروباکتریوم، ناحیه جنینی بذر جوانه زده با سوزن (به قطر ۰/۵ میلی‌متر) آغشته به هر یک از سویه‌های اگروباکتریوم تا عمق حدود یک میلی‌متری سوراخ شد (Imanzadeh, 1391). سپس نیمی از بذور تلقیح شده، به‌طور جداگانه تحت شرایط خلأ، با استفاده از دستگاه خلأ (Eppendorf, Concentrator plus) در دمای محیط و تا زمان جوش آمدن محلول درون محیط کشت القایی قرار گرفتند. بذور تلقیح شده برنج در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، در شرایط تاریکی، به مدت ۹ روز نگهداری شدند تا جوانه بزنند که این زمان برای بذور تلقیح شده گندم ۳ روز بود. سپس به منظور حذف باکتری، بذور تلقیح شده با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (mg/L ۱۰۰۰) به مدت یک ساعت تیمار شدند (Bechtold *et al*. 1993). گیاهچه‌های حاصل وارد گلدان حاوی خاک مناسب شده و به اتاقک کشت با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

واکنش پی.سی.آر: استخراج دی.ان.ای از گیاهچه‌ها با روش CTAB انجام شد (Murray. 1980). توالی‌های آغازگرها بر اساس بخش T-DNA ناقل شامل آغازگر رفتی 5′-GAA TCC TGT TGC CGG TCT T-3′ و برگشتی 5′-TTG CGC GCT ATA TTT TGT T-3′ مربوط به پایانبر nos، آغازگر رفتی 5′-CCG TCC CAA GCA GTT ACA A-3′ و برگشتی 5’-GGT CAC AAC CGA GAT GTC C-3′ مربوط به ژن *GUS-Plus*، آغازگر رفتی 5′-GAT GTT GGC GAC CTC GTA T-3′ و برگشتی 5′-GTG CTT GAC ATT GGG GAG T-3′ مربوط به ژن مقاومت به Hyg و آغازگر رفتی 5′-ATT TGC CGA CTA CCT TGG T-3′ و برگشتی 5′-GAA CAT AGC GTT GCC TTG G-3′ مربوط به ژن مقاومت به اسپکتینومایسین جهت بررسی گیاهان ترانسفورم استفاده شد. آغازگرهای توالی مذکور با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu)

1- Cambia
2- Chalcone synthases
3- Rifampicin
4- Sigma
5- Spectinomycin
6- Cefotaxime

طراحی شدند. واکنش‌های پی.سی.آر شامل ۱ میکرولیتر دی.ان.ای الگو، آغازگرهای رفتی و برگشتی (۱۰ pmoles) هر کدام ۱ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، 10X buffer و ۰/۳ میکرولیتر *Taq* polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده و محصول پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

رنگ‌آمیزی برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز: آزمایش هیستوشیمیایی گاس برای نمونه‌های ترانسفورم شده انجام شد. اثر آنزیم گاس روی سوبسترای مربوط (X-gluc) سبب تبدیل فرآوردهٔ واکنش به رنگ آبی در نمونه‌های تراریخته می‌شود. بر این اساس ابتدا قطعات برگی به طول ۱ سانتی‌متر از گیاهچه‌ها جدا شد و سپس درون تیوب‌های حاوی ۱ mL از محلول گاس (۸/۹ml آب استریل، ۱mL بافر فسفات $NaPO_4$ ۰/۵mM، tween 20 ۱۰ میکرولیتر و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر x-gluc 2mM) وارد شدند. تیوب‌ها را سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه تحت شرایط خلأ با استفاده از دستگاه خلأ قرار داده تا سطح برگ، محلول را به‌طور کامل جذب کرده و تیره رنگ شود. این کار هر بار تا جوش آمدن محلول داخل تیوپ ادامه می‌یابد. تیوب‌ها را به مدت ۲٤ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از گذشت این مدت محلول گاس حذف و شست و شوی نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۱۰۰ درصد انجام شد. در نهایت نمونه‌ها برای تولید رنگ آبی بررسی شدند (Bartels, 2011).

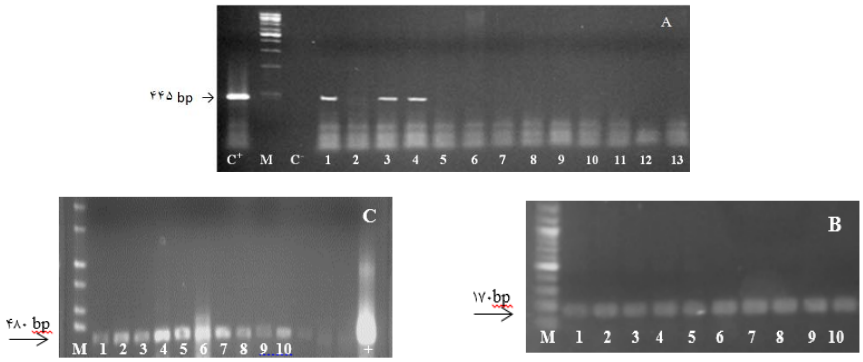
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش با دو سویه‌ی اگروباکتریوم (EHA105 و LBA4404) حاوی پلاسمید pCAMBIA1105.1R، سه غلظت AS (۰μM، ۱۰۰، ۲۰۰)، سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام)، سه رقم گندم (آذر۲، الوند و سرداری) و نیز استفاده از شرایط خلأ استفاده از دستگاه خلأ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام و داده‌های آزمایش با استفاده از نسخه ۹ نرم‌افزار SAS تجزیه و تحیل شدند.

نتایج و بحث

به‌منظور تجزیه و تحلیل و تأیید تراریخته بودن نمونه‌های گیاهی مورد بررسی، ابتدا تست هیستوشیمیایی گاس روی نمونه‌ها انجام شد. بر این اساس درصد بالایی از نمونه‌های غیر تراریخته حذف و بقیه جهت واکنش پی.سی.آر آزمون شدند. در ادامه نیز جهت کاهش حجم نمونه‌ها، هرکدام از نمونه‌ها که در آزمون پی.سی.آر یک ژن فاقد باند بودند کنار گذاشته شدند. فقط گیاهانی که نتیجه هر دو آزمون هیستوشیمیایی گاس و واکنش پی.سی.آر آن‌ها با هر سه ژن مورد بررسی مثبت بود، تراریخته تلقی شدند.

از آن‌جا که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین خارج از ناحیه‌ی T-DNA پلاسمید گیاهی pCAMBIA1105.IR قرار دارد بنابراین ژن فوق در واکنش پی.سی.آر گیاهان ترانسفورم شده واقعی تکثیر نمی‌شود. بررسی تکثیر این ژن کمک می‌کند که بتوان تشخیص داد آیا باندهای حاصل از پی.سی.آر سایر ژن‌های وکتور مانند Hyg و GUS، حاصل از آلودگی‌های باکتریایی گیاهچه‌ها بوده است یا خیر. در این آزمایش حذف کامل اگروباکتریوم بعد از ترانسفورماسیون به طریق دیگر نیز بررسی شد. پس از تلقیح با اگروباکتریوم و تیمار گیاهچه‌ها با آنتی‌بیوتیک Cef، قطعات برگی از گیاهان T_0 تهیه و در ۱ میلی‌لیتر آب استریل در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری آسیاب شدند. سپس ۱۰۰ µl از سوسپانسیون فوق در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک Spec به مدت سه روز کشت شد. فقدان کلونی بر روی ظروف پتری نشان دهنده عاری بودن گیاهان مربوط به آلودگی باکتریایی بوده است.

آزمون گاس از نمونه‌های برگی و بافت‌ها انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ برای بیان ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS*) بررسی شدند (شکل ۱). این ژن گزارشگر را جایگاه ژنی *UidA* رمز می‌کند و بیش‌ترین کاربرد را در گیاهان تراریخته دارد (Yu *et al.*2007). آنزیم بتاگلوکورونیداز، محصول این ژن است که گلوکورونیدها را تجزیه و منجر به ایجاد یک محصول رنگی می‌شود. در اثر این واکنش رنگ آبی بین سلول‌های ترانسفورم تولید می‌شود (Jefferson *et al.*, 1987). در این آزمایش از ناقل pCAMBIA1105.1R استفاده شد که حاوی ژن *GUS-Plus* با منشأ *Staphylococcus sp.* است و حساسیت بیش‌تری نسبت به ژن *UidA* از *E.coli* دارد. این ژن هم‌چنین حاوی یک اینترون است که مانع بیان آن در باکتری شده و از آلودگی باکتریایی



شکل ۲- آزمون پی.سی.آر گیاهچه‌های ترانسفورم شده. تکثیر باند ٤٤٥bp از ژن *GUS-Plus*، گیاهچه‌های ترانسفورم شده در تیمار سویه EHA105 در غلظت ۲۰۰µM استوسیرینگون گندم رقم آذر ۲ همراه با اعمال خلأ (A). ترانسفورماسیون با استفاده از سویه EHA105 در غلظت ۱۰۰µM استوسیرینگون همراه با اعمال خلأ در برنج رقم حسن سرایی و تکثیر باند ۱۷۰bp از ترمیناتور *nos* (B)، و تکثیر باند ٤٨٠bp از ژن مقاومت به هایگرومایسین (C)، M مارکر، + کنترل مثبت، - کنترل منفی و شماره‌ها مربوط به نمونه‌های گیاهی مورد آزمون هستند.

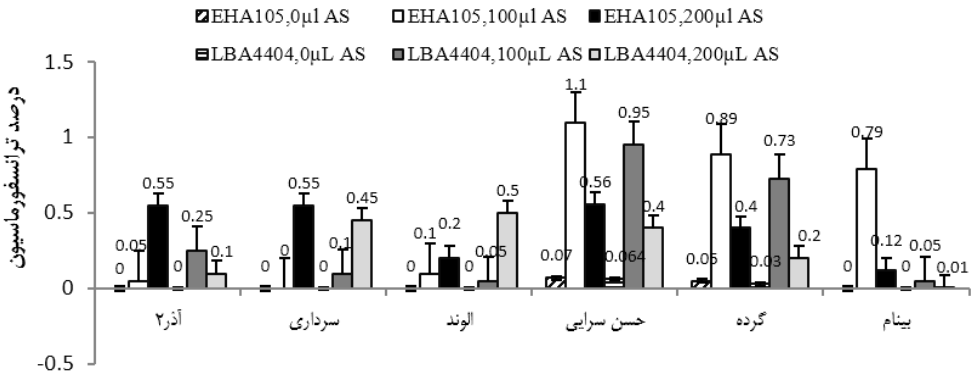
Figure 2 – PCR analysis of transformed wheat and rice seedlings. Amplification of a 445 bp from *GUS-Plus* gene in wheat transformed with EHA105 strain plus 200 µM Acetosyringone in Azar 2 cultivar (A); Amplification of a 170 bp from the *nos* terminator gene (B) and a 480 bp from Hygromycin resistance gene (C) in Hasan saraie rice cultivar, respectively transformed with EHA105 strain plus 100 µM Acetosyringone. M. Marker, + or C: positive control samples and numbers are correspond with the individual plants that were tested.

جلوگیری می‌کند.

بر اساس آغازگرهای استفاده و طراحی شده تکثیر ژن *GUS-Plus* یک قطعه به طول ٤٤٥bp (شکل ۲، A)، ژن مقاومت به هایگرومایسین یک قطعه به طول ٤٨٠bp (شکل ۲، C) و تکثیر پایانبر *nos* یک قطعه به طول ۱۷۰bp (شکل ۲، B) را تولید می‌کند. نتایج پی.سی.آر با استفاده از ژل آگارز بررسی شد و نمونه‌هایی که باندهای مورد نظر را تکثیر کرده‌اند، پی.سی.آر مثبت و گیاهان تراریخته تلقی شدند.

بررسی اثرهای متقابل سطوح AS، باکتری و رقم بر کارایی انتقال ژن با استفاده از آزمون‌های گاس و پی.سی.آر نشان داد که در بین ارقام برنج مورد استفاده در این پژوهش سویه‌ی EHA105 از اگروباکتریوم بیشترین کارایی را دارد. بیشترین کارایی انتقال ژن ارقام برنج مربوط به رقم محلی حسن سرایی و استفاده از سویه‌ی EHA105 ،در غلظت ۱۰۰µM از AS به میزان ۱/۱ درصد بوده است. بیشترین کارایی انتقال ژن در رقم برنج گرده نیز دوباره همراه با سویه‌ی EHA105، در غلظت ۱۰۰µM از AS به میزان ۰/۸۹ درصد بدست آمد. رقم بینام برنج نسبت به دو رقم دیگر کارایی انتقال ژن کم‌تری داشت اما بیش‌ترین مقدار کارایی انتقال ژن با سویه‌ی EHA105، در غلظت ۱۰۰µM از AS به میزان ۰/۷۹ درصد نشان داد. سویه‌ی LBA4404 نیز دارای کارایی نسبتا متوسطی بود. این کارایی در غلظت ۱۰۰µM از AS به ترتیب در ارقام حسن سرایی، گرده و بینام معادل ۰/۹۵، ۰/۷۳ و ۰/۰۵ درصد بود. کارایی انتقال ژن در غلظت ۲۰۰µM از AS در بین سه رقم برنج نسبت به غلظت ۱۰۰µM از AS کم‌تر بود به‌طوری که این کارایی با سویه‌ی EHA105 در رقم حسن سرایی ۰/٥٦، در رقم گرده ۰/٤ و در رقم بینام ۰/۱۲ درصد بود. هم‌چنین قابل ذکر است که این کارایی همراه با سویه‌ی LBA4404 در رقم حسن سرایی ۰/٤، در رقم گرده ۰/۲ و در رقم بینام معادل ۰/۰۱ درصد بود. قابل ذکر است که کم‌ترین کارایی انتقال ژن در غلظت ۰µM از AS بدست آمد. این کارایی با سویه‌ی EHA105 در رقم حسن سرایی ۰/۰۷، در رقم گرده ۰/۰۵ و در رقم بینام۰ درصد بود. هم‌چنین کارایی با سویه‌ی LBA4404 در رقم حسن سرایی ۰/۰٦، در رقم گرده ۰/۰۳ و در رقم بینام معادل ۰ درصد بود (شکل ۳).

در بین ارقام گندم مورد استفاده در این پژوهش سویه‌ی EHA105 از اگروباکتریوم همراه با غلظت ۲۰۰µM از AS بیش‌ترین کارایی انتقال ژن (۰/۵۵ درصد) را داشت که در هر دو رقم آذر ۲ و سرداری مشاهده شد (شکل ۳). این مقدار در رقم



شکل ۳- کارایی انتقال ژن سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام) و سه رقم گندم (آذر۲، سرداری و الوند) همراه با اثرات متقابل سه غلظت استوسیرینگون (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰µM) و دو سویه‌ی باکتری (EHA105 و LBA4404).

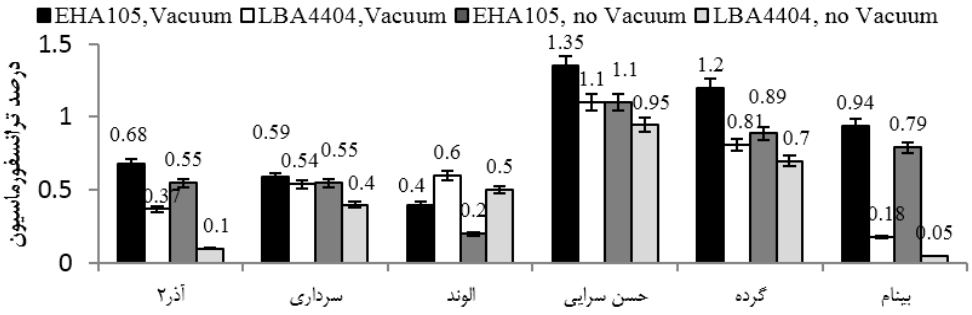
Figure 3 - Transformation efficiency of three cultivars of rice (Hasan saraie, Gerdeh and Binam) and three cultivars of wheat (Azar 2, Sardari and Alvand). The interaction effects of three concentrations of acetosyringone (0, 100 and 200µM) and two strains of *Aarobacterium* (EHA105 and LBA4404) are presented in this figure.

گندم الوند معادل ۰/۲ درصد بود. کارایی انتقال ژن مربوط به سویه‌ی LBA4404، در غلظت ۲۰۰µM از AS در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب ۰/۱، ۰/۴۵ و ۰/۵ درصد بود است. کارایی انتقال ژن با سویه‌ی EHA105، در غلظت ۱۰۰µM از AS نیز در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب به میزان ۰/۰۵، ۰ و ۰/۱ درصد بود. این کارایی با سویه‌ی LBA4404، در غلظت ۱۰۰µM از AS نیز در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب به میزان ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد بود.

بر اساس نتایج بدست آمده سویه‌ی EHA105 و رقم حسن سرایی برنج همراه با غلظت ۱۰۰µM از AS بیشترین کارایی انتقال ژن (۱/۱ درصد) و نیز ارقام آذر۲ و سرداری در گیاه گندم با سویه‌ی EHA105 و با حضور ۲۰۰µM AS بیش‌ترین کارایی انتقال ژن (۰/۵۵ درصد) را داشته است. میزان انتقال ژن با سویه مذکور در رقم الوند معنی‌دار نشده و کم‌تر از سویه‌ی LBA4404 بوده است (۰/۲ درصد). به عبارت دیگر، سویه EHA105 در رقم الوند گندم کارایی کم‌تری نسبت به کارایی این سویه در سایر ارقام داشته است.

در مورد غلظت‌های مختلف AS نیز مشاهده شد که عدم استفاده از این ماده منجر به کاهش کارایی انتقال ژن شده است که نشان دهنده اثر مثبت این ترکیب فنولیک در این دو گیاه است (Zhao *et al.* 2001). افزایش غلظت AS تا غلظت ۲۰۰µM در ارقام برنج مورد استفاده در این پژوهش منجر به کاهش کارایی انتقال ژن نسبت به غلظت ۱۰۰ µM شده است که احتمال دارد به دلیل اثر سمیت و ممانعت کنندگی AS در غلظت‌های بیشتر باشد (Saharan *et al.* 2004). اما در مورد ارقام گندم استفاده شده در این پژوهش غلظت AS۲۰۰µM بیش‌ترین کارایی را داشت. اگرچه ترکیبات القاگر مختلفی وجود دارند اما AS بیشتر استعمال می‌شود زیرا در غلظت‌های پایین نسبت به سایر ترکیبات القاگر دارای خاصیت القا کنندگی بیش‌تری است و از نظر تجاری در دسترس و قیمت مناسب‌تری دارد (Dye *et al.* 1997).

استفاده از ترکیب شیمیایی القاگر برای القا ژن‌های بیماری‌زا در بسیاری از دستورالعمل‌های مورد استفاده برای انتقال ژن غلات توصیه شده است. گیاهان تک لپه یا به‌هیچ عنوان AS تولید نکرده و یا آن را در مقادیر بسیار کم تولید می‌کنند که برای القای ژن‌های بیماری‌زا اگروباکتریوم کافی نیست بدین منظور از این ترکیب فنولی در محیط کشت القا ژن‌های بیماری‌زا استفاده شد. ویکز همکاران (۲۰۰۸) در مورد توسعه روش انتقال ژن *in planta* از غلظت ۲۰۰µM AS استفاده کردند. هی و همکاران (۲۰۱۰) تا غلظت ۴۰۰µM AS را در گندم قابل تحمل گزارش و مشاهده کردند که این غلظت منجر به افزایش بیان ژن بتاگلوکورونیداز شده است. غلظت‌های بین ۵۰µM تا AS۵۰۰µM در مورد انتقال ژن گیاه برنج گزارش شده است، اما غلظت‌های بیش‌تر از ۵۰۰µM



شکل ٤- کارایی انتقال ژن اثرات متقابل سویه های باکتری (EHA105 و LBA4404) و شرایط خلأ همراه با سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام) و سه رقم گندم (آذر۲، سرداری و الوند).

Figure 4 - Transformation efficiency of three cultivars of rice (Hasan saraiy, Gordeh and Binam) and three cultivars of wheat (Azar 2, Sardary and Alvand). The interaction effects of bacterial strains (EHA105 and LBA4404) and vacuum are presented in this figure.

AS بر روی رشد باکتری اثر سمیت و ممانعت کنندگی دارد (Saharan *et al.* 2004). در زمینه بهبود انتقال ژن ارقام مختلف برنج، سویه EHA105 و غلظت AS۱۰۰ µM به‌عنوان یک شرایط بهینه برای انتقال ژن معرفی شده است (Hiei *et al.* 2008).

هر دو سویه EHA105 و LBA4404 در گیاهان و آزمایش‌های مختلف سویه‌های مناسب برای انتقال ژن غلات معرفی شده‌اند. در این آزمایش و در ارتباط با ارقام برنج و گندم مورد استفاده کارایی انتقال ژن سویه EHA105 به‌طور معنی‌داری بالاتر از سویه LBA4404 بوده است. سویه‌ی EHA105 به دلیل داشتن ژن‌های اضافی بیماری‌زا نسبت به سویه‌ی LBA4404، فوق بیماری‌زا با دامنهٔ میزبانی وسیع است. در انتقال ژن در بیشتر مواقع از سویه‌های با قدرت بیماری‌زا بالا و سرعت رشد سریع استفاده می‌شود (Wang. 2006).

بر اساس پژوهش‌های انجام شده در این آزمایش، سویه‌های مختلف باکتری دارای شدت و درجه بیماری‌زایی متفاوتی در ارقام مختلف گیاهان برنج و گندم بوده‌اند. باکتری‌ها تکامل یافته‌اند تا با به‌کارگیری انواع فاکتورها شامل مواد سمی، آنزیم‌ها، هورمون‌ها، پلی‌ساکاریدها و مهم‌ترین آن‌ها افکتورهای پروتئینی نوع سوم ایجاد بیماری کنند. بسیاری از این فاکتورها برای سرکوب ژن‌های مقاومت گیاه و آزادسازی مواد غذایی به کار گرفته می‌شوند. این شرایط فیزیولوژیک منشا استقرار و تکثیر سلول‌های باکتری است (Jones and Dangle. 2001). تعدادی از مکانیسم‌های گیاهی هدف بالقوه برای سرکوب باکتری هستند که از جمله آن‌ها سیگنال‌دهی کلسیم است (Aslam *et al.* 2008). بر این اساس میزان سرکوب ژن‌های دفاعی در رقم حسن سرایی برنج و آذر و سرداری گندم احتمال دارد بیشتر از سایر ارقام بوده و میزان بیان آن‌ها به طور معنی‌دار کاهش یافته است. احتمال دیگر تأخیر در فعال شدن این ژن‌ها در ارقام مذکور بوده است زیرا زمان و شدت فعال شدن ژن‌های مقاومت اثر زیادی در واکنش سازگار یا ناسازگاری دارد (Kiedrowski *et al.* 1992) و بنابراین شاید علت موفقیت برخی سویه‌ها در بهره‌برداری بهتر از ماشین سلول میزبان در برخی ارقام شده است. از طرفی ارقام برنج و گندم استفاده شده در این آزمون "ارقام محلی" هستند. این قبیل ژنوتیپ‌ها بر خلاف ارقام "اصلاح شده" دارای تنوع ژنتیک داخل جمعیت و بین جمعیت بالایی هستند و واکنش‌های مقاومت در مقابل پاتوژن را می‌توان از آن‌ها انتظار داشت. شاید استفاده از ارقام اصلاح شده در مقایسه با ارقام محلی، به سبب تنوع ژنتیک به‌طور نسبی کمتر، بهتر می‌توانست کنش متقابل ژنوتیپ‌های گیاه و سویه‌های باکتری را آشکار کند.

بررسی کارایی انتقال ژن در شرایط خلأ و اثرهای متقابل سویه‌های باکتری (EHA105 و LBA4404) و ارقام برنج و سه رقم گندم استفاده شده نشان داد که ایجاد کوتاه مدت شرایط خلأ منجر به افزایش کارایی انتقال ژن می‌شود به‌طوری که کارایی انتقال ژن همراه با سویه‌ی EHA105 با استفاده از شرایط خلأ و

بدون استفاده از آن به ترتیب در رقم آذر ۲ ۰/۶۸ و ۰/۵۵ درصد، در رقم سرداری ۰/۵۹ و ۰/۵۵ درصد و در رقم الوند ۰/٤ و ۰/۲ درصد بوده است و نیز کارایی انتقال ژن همراه با سویه‌ی EHA105 با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب در رقم حسن سرایی برنج ۱/۳۵ و ۱/۱ درصد، در رقم گرده ۱/۲ و ۰/۸۹ درصد و در رقم بینام ۰/۹٤ و ۰/۷۹ درصد بود. هم‌چنین در سویه‌ی LBA4404 نیز این افزایش کارایی در مقدار انتقال ژن مشاهده می‌شود به‌طوری که کارایی انتقال ژن با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب در گندم رقم آذر ۲، ۰/۳۷ و ۰/۱ درصد، در رقم سرداری ۰/٥٤ و ۰/٤ درصد و در رقم الوند ۰/٦ و ۰/٥ درصد بود. هم‌چنین در برنج رقم حسن سرایی با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب ۱/۱ و ۰/۹٥ درصد، در رقم گرده ۰/۸۱ و ۰/۷ درصد و در رقم بینام ۰/۱۸ و ۰/۰٥ درصد بود (شکل ٤).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از شرایط خلأ پس از انجام تلقیح بذور، منجر به افزایش کارایی انتقال ژن شد که احتمالا دارد به سبب بهبود راندمان ورود باکتری به داخل فضای بین سلول‌های گیاهی بوده است. ضمن اینکه آسیب ناشی از شرایط خلأ در حدی نیست که آسیب جدی به اپی‌کوتیل این غلات وارد کند. اولین گزارش مربوط به استفاده از خلأ جهت انتقال ژن، مربوط به گیاه آرابیدوپسیس است (Bechtold *et al.* 1993). استفاده از خلأ جهت تلقیح، در گیاهان دیگر از قبیل کلزا (Xu *et al.* 2004)، لوبیا (Liu *et al.* 2005) و برنج (Lin *et al.* 2009) نیز گزارش شده است.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه‌های آماری در نهایت مشخص شد که رقم حسن سرایی در گیاه برنج و اگروباکتریوم سویه‌ی EHA105، با حضور AS ۱۰۰μM همراه با استفاده از شرایط خلأ (به میزان ۱/۱ درصد) دارای برتری در کارایی انتقال ژن نسبت به سایر ارقام برنج و گندم بود. ارقام گیاه برنج مورد استفاده در این پژوهش نسبت به ارقام گندم کارایی انتقال ژن بالاتری نسبت به ارقام گیاهان گندم داشتند که دلیل آن می‌تواند تفاوت‌های عمده ژنتیک میان این گیاهان باشد. قابل ذکر است که در بین ارقام گندم مورد استفاده در این پژوهش، ارقام آذر۲ و سرداری در سویه‌ی EHA105 از اگروباکتریوم، با حضور AS ۲۰۰μM همراه با استفاده از شرایط خلأ کارایی معنی‌دار (به میزان ۰/۵۵ درصد) داشتند. با استفاده از نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان کاربرد موفقیت‌آمیز روش انتقال ژن *in planta* با واسطهٔ *Agrobacterium tumefaciens* را در انتقال ژن ارقام مختلف بومی برنج و نیز ارقام مختلف گندم گزارش داد.

لازم به‌توضیح است که گیاهان حاصل از انتقال ژن در این‌پژوهش باید سایر آزمون‌های مولکولی را بگذرانند تا تراریخته بودن آن‌ها تایید شود بنابراین این گیاهان ترانسفورم شده هستند تا تراریخته.

در ضمن لازم به توضیح است که خانم صدیقه نصررمزی و آقای محسن ایمان‌زاده سهم مساوی در انجام آزمایش داشته‌اند.

منابع

1. Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Tandrup Jensen T, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR. 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. Current Biology 18:1078–1083.
2. Bartels MS. 2011. Population genetics of cell-to-cell movement of wheat streak mosaic virus. University of Nebraska-Lincoln.
3. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Academy of Science. Paris Life Science 316: 1194-1199.
4. Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology 115: 971–980.
5. Chumakov MI, Rozhok NA, Vlikov VA, Tyrnov VS, Volokhina IV. 2006. *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of maize via pistil filaments. Russian Journal of Genetic 42: 893-897.
6. 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.
7. Dangl JL, Jones JDG. 2000. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826–833.
8. Dye F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte FM. 1997. Alkysyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 379-383.

9. Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. Molecular Biology 343: 77-84.
10. He Y, Jones HD, Chen S, Chen XM, Wang DW, Li KX, Wang DS, Xia LQ. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. Journal of Experiment Botanic 61: 1567-1581.
11. Hiei Y, Komari T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryo or calli induced from mature seed. Nature. 3: 824-834.
12. Imanzade M. 1391. Possibility of *Agrobacterium* -mediated transformation of Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in planta* approach. M.Sc. Thesis, Guilan University, Rasht, Iran. (In Farsi)
13. Janice M, Zale S, Agarwal S, Loar CM, Steber. 2009. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Report 28: 903–913.
14. Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology 5: 387-450.
15. Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich, I E, Dangl JL. 1992. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. EMBO Journal 11, 4677-4684.
16. Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, Liu X. 2009. Piercing and vacuum in filtration of mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. Plant Cell Report 28: 1065-1074.
17. Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T. 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. Molecular Breeding 16: 189-197.
18. Mohan JS. 2001. Tissue culture-derived variation in crops improvement. Journal of Plant Breeding 118: 153-160.
19. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.
20. Raineri D, Bottino P, Gordon M, Nester E. 1990. *Agrobacterium* transformation of rice (*Oryza sativa* L.) Biotechnology 8: 33-38.
21. Razzaq A, Hafize I, Mahmood I, Hussain A. 2011. Development of *in planta* transformation protocol for wheat. African Journal of Biotechnology 740-750.
22. Saharan V, Yadav RC, Yadav NR, Rab K. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 3 (11): 572-575.
23. Supartana P, Shimizu T, Shiori H, Nogawa M, Nozue M, Kojima M. 2005. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) Using *Agrobacterium tumefaciens*. Bioscience and Bioengineer 100: 391-397.
24. Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Hidenari S, 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*. Bioscience and Bioengineer 102 (2): 162-170.
25. Wang K. 2006. Methods in Molecular Biology, vol. 343: *Agrobacterium* Protocols, 2/e, volume 1 Humana Press Inc., Totowa, NJ.
26. Wang MB, Waterhouse PM. 1997. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. Plant Molecular Biology Report 15: 209-215.
27. Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. Plant Cell Report 21: 659-668.
28. Xu GS, Rao YQ, Chen Y, Zhang CY, Meng JL. 2004. Genetic transformation of *Brassica napus* with *in planta* method. Acta Agronomy Sinica 30: 1-5.
29. Yu XD, Shalitin X, Liu M, Maymon J, Klejnot H, Yang J, Lopez X, Zhao KT, Bendehakkalu L, Chentao L. 2007. Depression of the NC80 motif is critical for the photo activation of *Arabidopsis* CRY2. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104: 7289-7294.
30. Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM. 2006. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. Plant Cell Report 25:1199–1204.
31. Zhao Z, Sagulenko E, Ding Z, Christie PJ. 2001. Activities of *virE1* and *virE1* secretion chaperone in export of the multifunctional *virE2* effectors via an *Agrobaterium* type IV secretion pathway. Journal of Bacteriology 183: 3855-3865.