مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۸۶-۷۶

بررسی اثر سازگاری سویه در بیان موقت مبتنی بر روش اگروباکتریوم در ارقام خربزه (*Cucumis melo* L.)

Evaluation of strain compatibility effects on Agrobacterium-mediated transient expression in melon cultivars

صهبا طوسی [۱]، فرهاد شکوهی‌فر*[۲]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۳]، عبدالرضا باقری[۳]
Sahba Toosi[1], Farhad Shokouhifar[2*], Saeid Malekzadeh Shafaroudi[3], Abdolreza Bagheri[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

1. M.Sc student, Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Faculty Member of Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Faculty Members of Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shokouhifar@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۹)

چکیده

بیان موقت یک ژن اثرگذار در بیماری‌زایی (effector) در گیاه میزبان با استفاده از اگروایتجکشن، یک روش قابل قبول برای بررسی نقش ژن در بیماری‌زایی است. در این مطالعه تاثیر دو سویه اگروباکتریوم بر چهار رقم استاندارد و دو رقم محلی خربزه در بررسی بیان موقت مورد ارزیابی قرار گرفت. سازگاری سویه‌های LBA4404 و GV3101 به وسیله تزریق سلولهای باکتری به برگ ارقام خربزه تعیین شد. زنده‌مانی سلول‌های اگروباکتریوم تزریق شده در بافت برگ به وسیله ارزیابی بیان پروکاریوتی ژن GUS ۲۴ ساعت پس از تزریق تعیین شد. سویه LBA4404 پس از انتقال ناقل pCAMBIA3301 دارای ژن GUS اینترون‌دار به عنوان کنترل مثبت برای تایید بیان موقت این ژن در سلول‌های گیاه استفاده شد. انتقال ناقل‌های pBI121 و pCAMBIA3301 به سویه LBA4404 با روش کلنی PCR با آغازگرهای PSh3-F/R تایید شد. راندمان بیان موقت در برگ‌های ارقام خربزه، ۴۸ ساعت پس از اگروایتجکشن سویه LBA4404 حامل ناقل pCAMBIA3301 به وسیله سنجش هیستوشیمیایی ژن GUS مشخص شد. برگ‌های تزریق شده با سویه LBA4404 دارای ناقل pBI121 فعالیت ژن GUS را نشان دادند که تایید کننده زنده بودن سلول‌های اگروباکتریوم در برگ ارقام خربزه بود. تمام ارقام ژن GUS را به صورت موقت با استفاده از اگروایتجکشن پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان کردند. این نتایج می تواند در مطالعات آینده به منظور بررسی عملکرد ژن‌های اثرگذار منتخب در برهمکنش با ارقام استاندارد خربزه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

ارقام استاندارد خربزه
اگروباکتریوم
بیان موقت
سنجش GUS

مقدمه

بیان موقت یک ژن اثرگذار در بیماری‌زایی در بافت‌های گیاه میزبان روش مفیدی در بررسی نقش آن در فعال سازی سیستم دفاعی گیاه است (Van der Hoorn *et al.* 2000). در روش‌های بیان موقت یک تراژن پس از انتقال به درون سلول‌های گیاه و انتقال به درون هسته برای مدت زمان کوتاه درون سلول‌های گیاه بیان می‌شود. در این روش تلفیق شدن تراژن درون ژنوم جهت بیان آن ضروری نیست و توارث نیز نخواهد یافت (Shokouhifar *et al.* 2014). سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دائمی مزیت‌های فراوانی برای ارزیابی بیان ژن‌ها دارد. از جمله این مزیت‌ها می‌توان به عدم نیاز به باززایی گیاه از سلول تراریخته و کاهش زمان رسیدن به نتیجه بیان ژن اشاره نمود. روش بیان موقت در جهت رفع مشکلات مربوط به تراریختی دائم در مطالعات مختلفی از جمله تجزیه و تحلیل فعالیت پیشبر مورد توجه قرار گرفته است (Wroblewski *et al.* 2005 Yang Y 2000). علاوه بر این بیان موقت در مواردی مانند تجزیه و تحلیل بیان ژن خارجی (Kapila *et al.* 1997)، خاموشی ژن پس از رونویسی (Voinnet *et al.* 2003) روابط متقابل بین ژن‌های مقاومت گیاهی و بیماریزایی پاتوژن (Van der Hoorn *et al.* 2000)، تولید پروتئین (Andrews and Curtis 2005) به کار می-رود.

روش‌های مختلفی جهت انتقال تراژن به داخل سلول‌های گیاه و بیان موقت آن مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله این روش-ها می‌توان به اگروانفیلتراسیون، ریزپرتابی و ناقل‌های ویروسی اشاره کرد. اساس این روش‌ها فیزیکی، شیمیایی یا زیستی است. در روش ریزپرتابی مبنا فیزیکی است مانند استفاده از ذرات بسیار ریز طلا یا تنگستن (Higo *et al.* 2005). در روش‌های شیمیائی به عنوان مثال از پلی اتیلن گلایکول (PEG) جهت انتقال سازه به درون سلول میزبان استفاده می‌شود (Nugent *et al.* 2006). در روش زیستی از سلول اگروباکتریوم (Kapila *et al.* 1997; Yang Y 2000).و یا ناقل ویروسی (Shokouhifar *et al.* 2014) جهت انتقال ژن هدف به درون سلول میزبان و بیان آن استفاده می‌شود.

در این بین روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم به دلیل عدم نیاز به امکانات پیشرفته، در دسترس بودن و سادگی روش، عدم محدودیت اندازه پروتئین مورد نظر در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Shokouhifar *et al.* 2014).

بمنظور بهره گیری از این روش در مطالعات تجزیه و تحلیل بیان تراژن ضروری است ابتدا شرایط بیان موقت در گیاه هدف تعیین شود. تاکنون این روش در گیاهان مختلفی مثل یونجه (D'Aoust *et al.* 2004)، کاهو، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس (Wroblewski *et al.* 2005) بهینه سازی شده است. این روش همچنین برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن در میوه گوجه فرنگی نیز انجام شد و نشان داده شد که تزریق اگروباکتریوم از طریق نوک سرنگ منجر به نفوذ آن و بیان موقت پروتئین در میوه گیاه می‌شود. در برگ لوبیا نیز با توجه به نفوذپذیری بسیار اندک از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم جهت بیان پروتئین خارجی استفاده شده است (Mozafari *et al.* 2013). با توسعه دستورالعمل تراریختی موقت به واسطه اگروباکتریوم در برنج مشخص شد که این روش را می‌توان برای گونه‌های تک لپه ای نیز به کار برد. البته کارایی اگروانیجکشن از میزبانی به میزبان دیگر متفاوت است و در تعدادی از گونه‌ها قابل اجرا نمی‌باشد (Song and Yamaguchi 2003). با این حال بیشترین گزارش‌ها در گونه بنتامیانا توتون *(Nicotiana benthamiana)* بوده است (Wroblewski *et al.* 2005). گونه بنتامیانا برای بیان موقت پروتئین دارای مزیت‌هایی است که از جمله می‌توان به کشت و داشت ساده، سازگاری با سویه‌های معمول اگروباکتریوم، بافت مزوفیل نفوذ پذیر مناسب جهت تزریق سلول‌های اگروباکتریوم، راندمان تراریختی بالا و توان بیان بالای پروتئین خارجی اشاره کرد (Kapila *et al.* 1997). در راندمان بیان موقت عوامل زیادی موثرند نظیر ساختار برگ، سویه باکتری، غلظت استفاده شده از سوسپانسیون باکتری و غیره. در این بین، سازگاری سویه باکتری و گیاه میزبان بر راندمان بیان موقت تاثیر به‌سزایی دارد. بعضی از سویه‌های اگروباکتریوم قدرت تهاجمی متفاوتی برروی یک گونه گیاهی دارند و گونه‌های گیاهی نسبت به سویه خاصی از اگروباکتریوم سطوح مختلفی از

حساسیت را نشان می‌دهند (Anderson and Moore 1979). در آزمایشی که بر روی تعداد زیادی سویه اگروباکتریوم بر روی گیاه گوجه‌فرنگی و داتوره انجام گرفت، مشخص شد که تعدادی از سویه‌ها برروی گوجه‌فرنگی بیماری زا هستند در حالیکه بعضی از سویه‌ها تنها روی داتوره علائم نشان دادند (Anderson and Moore 1979).

از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم برای بررسی برهمکنش ژن‌های مقاومت گیاه و بیماری زای پاتوژن در مطالعات متعددی استفاده شده است (Jones and Dangl 2006). در مطالعه دیگری با بررسی رابطه متقابل ژن‌های Avr/Cf با استفاده از اگروانیفیلتراسیون نشان داده شد که مسیرهای هدایت سیگنالی تحت القای ژن‌های مقاومت گیاه و بیماری زای پاتوژن در گونه-های خانواده سولاناسه حفاظت شده است (Van der Hoorn *et al.* 2000). علی‌رغم برتری های این روش و نقش تاثیر گذار آن در مطالعه برهمکنش ژن‌های بیماریزایی و مقاومت، تاکنون گزارشی از استفاده از تزریق اگروباکتریوم در خربزه ارائه نشده است. ضرورت بهره‌گیری از آزمایشات بیان موقت در خربزه سبب شده است تا روش‌های دیگر بیان موقت مانند استفاده از روش ریزپرتابی در مطالعات مختلفی (Mizuno *et al.* 2006; Tan *et al.* 1995; Yamagata *et al.* 2002) مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه ای با هدف بررسی نقش بیماریزایی پروتئین‌های رمز شونده توسط ویروس لکه نکروزی خربزه (MNSV) از روش ویروس و تلقیح آن در گیاه خربزه استفاده شده است (Genoves et al. 2006). با توجه به زمانبر بودن و هزینه‌بر بودن این روش‌ها در صورت بهینه شدن روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم می‌توان مسیر مطالعات برهمکنش ژن های بیماری زایی را تسهیل و تسریع نمود.

به‌منظور مهیا شدن شرایط جهت مطالعه برهمکنش ژن‌های بیماریزایی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) و ژن‌های مقاومت مربوط در ارقام خربزه بهینه سازی روش اگروانیجکشن ضروری است. بنابراین در مطالعه حاضر عوامل تاثیر گذار در بیان موقت تراژن با استفاده از روش مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم در بافت برگ ارقام استاندارد (Chikh-Rouhou *et al.* 2008) و محلی حامل ژن‌های مقاومت به *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) ، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتریایی و ناقل‌ها

بذور گیاه توتون *Nicotiana benthamiana*، و خربزه ارقام Charentais-Fom2، Charentais-Fom2، BG5384، M8 و M10 از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جهت بررسی برهمکنش سویه‌های اگروباکتریوم با ارقام خربزه از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌های GV3101 و LBA4404 و جهت بررسی بیان موقت از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. ناقل‌های pCAMBIA3301 (CAMBIA، استرالیا) و pBI121 (Chen *et al.* 2003) تهیه شده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد) به ترتیب حاوی ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز اینترون‌دار و فاقد اینترون در آزمایش‌های بیان موقت به کارگرفته شد (شکل ۱).

آماده سازی ارقام گیاهی

ضدعفونی بذور بر اساس روش چنارانی و همکاران (Chenarani *et al.* 2012) انجام شد. بر این اساس ابتدا پوست بذور حذف و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. آبکشی بذرها سه بار جمعاً به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل و تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. سپس بذور استریل در زیر هود داخل پتری دیش دارای کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شد و به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شدند. بذور جوانه دار شده به درون گلدان حاوی کود ورمی کمپوست و مخلوط ورمی کولیت، پیت ماس و کوکوپیت انتقال یافت. گلدان‌ها در نور مصنوعی با شرایط دمایی ۲۲ درجه و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت مناسب قرار داده شدند.

بررسی برهمکنش دو سویه و سه رقم استاندارد و دو رقم محلی خربزه

به منظور آماده سازی سویه‌های آگروباکتریوم، ابتدا از سویه‌ها کشت تک کلنی بر روی محیط LB حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین به صورت زیکزاکی کشت داده شد. تک کلنی حاصل، در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و سطح برگ در پنج رقم به سوسپانسیون باکتری با OD600= ۰/۸ آغشته شد. این عمل در دو تکرار و برای هر کدام از سویه‌های باکتری دو مرتبه انجام شد. سپس در فواصل زمانی مختلف از نمونه عکس برداری شد.

انتقال سازه‌ها به سویه باکتری و تایید آن

تهیه سلول‌های مستعد و تراریختی سویه LBA4404 با روش انجماد آنی انجام شد (Weigel and Glazebrook 2005). کلنی-های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR (Sambrook and Russell 2001) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh3-F با توالی 5'- GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AGG A -3' و پرایمر PSh3-R با توالی 5'-AGG ATT CGA TAA CGT GCT GAT GG-3' (Shokouhifar *et al.* 2013a) تایید شدند. محتویات واکنش شامل یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (Ginet Bio)، یک میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲۰۰ میکرو مولار از مخلوط dNTPs (Genet Bio. Co, South Korea)، ۱.۵ میلی مولار MgCl2 و ۵ پیکومول از جفت پرایمر PSh3-F/R در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و با استفاده از نوک سمپلر استریل هریک از کلنی‌های انتخاب شده بعنوان الگو در واکنش اضافه شدند و بصورت همزمان روی محیط LB حاوی کانامایسین کشت شدند. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Personal Thermocycler, MWG Co. Germany) با ۵ دقیقه در ۹۳ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۵ چرخه با برنامه ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد ، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱۰ درصد رنگ Green viewer (Ginet Bio) الکتروفورز و تصویر الگوی باندی تکثیر شده از نمونه با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

سنجش بیان پروکاریوتی ژن GUS دو سویه باکتری

به منظور سنجش بیان پروکاریوتی ژن GUS سویه‌های آگروباکتریوم، ابتدا از تک کلنی سویه‌های حاوی ناقلین pCAMBIA3301 و pBI121 بر روی محیط LB حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین به صورت زیکزاکی کشت داده شد. از تک کلنی حاصل در ۳ میلی لیتر LB مایع حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین حل شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شدند. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، رسوب‌های باکتری در محلول سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیدازی شامل بافر فسفات ۱ مولار تهیه شده از دو نمک Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4، تریتون X-100، EDTA نیم‌مولار، K3Fe(CN)6 ۵ میلی مولار، K4Fe(CN)6 ۵ میلی مولار، مرکاپتواتانول ۰/۷۸ میکرولیتر در میلی لیتر، X-Gluc با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت تیمار شدند.

تصویربرداری

جهت تصویر برداری از میکروسکوپ دیجیتال (Dino-Lite مدل Am-313 T Plus) با بزرگنمایی ۴ استفاده شد. به منظور تصویر برداری از برنامه نرم افزاری اختصاصی دوربین (Dinocapture 2.0) استفاده شد

آماده سازی سوسپانسیون باکتری و تزریق در برگ ارقام

به منظور آماده سازی سلول‌ها جهت تزریق (Yang 2000)، کلنی-های تایید شده در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ریفامپسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، در محیط القاء (یک گرم بر لیتر NH4Cl، ۰/۳ گرم بر لیتر $MgSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۱۵ گرم بر لیتر KCl، ۰/۰۱ گرم بر لیتر CaCl2، ۲/ ۵ میلی گرم بر لیتر FeSO4-7H2O، ۲ میلی مولار بافر فسفات، ۲۰ میلی مولار MES، یک درصد ساکارز با اسیدیته ۵.۵) به مدت یک شب و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد معلق شدند.

سلول‌ها سپس با سانتریفیوژ مجدد در ۲۵۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۵دقیقه رسوب داده شدند و سپس در محلول تزریق شامل MgSO4 و MES با اسیدیته ۵/۵ تا حصول OD600= ۰/۸ رقیق شدند. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری درون فضای میان سلولی برگ‌های سالم و متصل به گیاه با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۱ میلی لیتری تزریق شد. گیاهچه‌ها بعد از تزریق بوسیله پوشش‌های پلاستیکی پوشانده شدند و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پوشش‌های پلاستیکی حذف شدند و برگ‌های تزریق شده بعد از ۳ روز جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن GUS مورد استفاده قرار گرفتند .

سنجش هیستوشیمیایی عملکرد ژن GUS

جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت GUS، دیسک‌های برگی به قطر ۱ سانتی‌متر ۴۸ ساعت پس از آلودگی از محل تزریق تهیه شد و یک شب در محلول سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز تیمار شد. کلروفیل دیسک‌های برگی با استفاده از الکل ۷۰ درصد و در دمای۵۰ درجه سانتیگراد در چند مرحله حذف شد (Cervera 2004).

نتایج و بحث

در این مطالعه شرایط بیان موقت با استفاده از روش اگروباینجکشن در ارقام استاندارد و محلی خربزه با دو سویه اگروباکتریوم GV3101 و LBA4404 که از لحاظ قدرت تهاجمی با یکدیگر متفاوت هستند (Wroblewski *et al.* 2005) به همراه دو ناقل pBI121 و pCAMBIA3301 مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور سلولهای آگروباکتریوم روی سطح برگ ارقام استاندارد و محلی خربزه تلقیح شدند. واکنش ارقام در زمان‌های مختلف از ۲ ساعت تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح مشاهده و ثبت شد. نتایج نشان داد واکنش ارقام به دو سویه به طور کامل متفاوت است (شکل ۲).

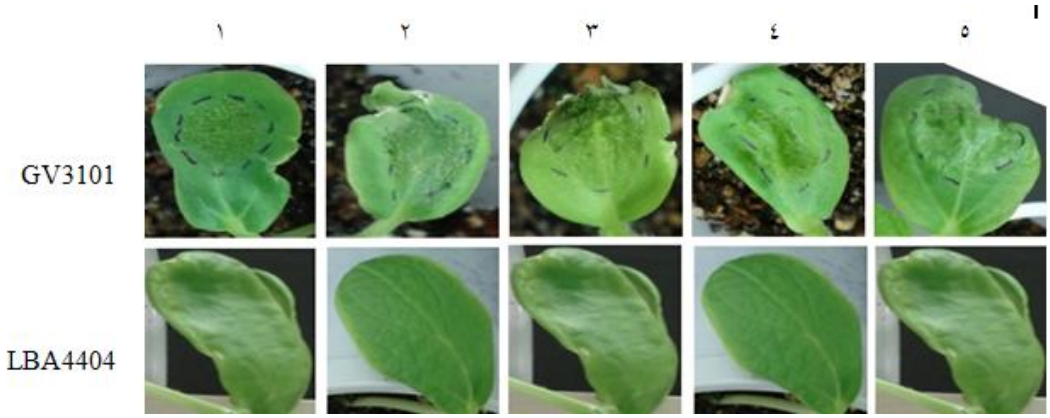
سویه GV3101 در هر دو رقم سبب بروز نکروز شد. شدت واکنش ارقام به سویه GV3101 با گذشت زمان افزایش یافت. در مقابل سویه LBA4404 علائم نکروزه روی ارقام نشان نداد و حتی با گذشت ۷۲ ساعت نمونه‌ها از نظر ظاهری با کنترل تفاوتی نشان ندادند. با هدف بررسی سنجش برهمکنش ژن‌های اثرگذار روی برگ‌های حقیقی، سازگاری سویه با برگ‌های مشابه بررسی شد. نتایج بدست آمده تایید نمود که سویه LBA4404 روی برگ‌های حقیقی نیز سازگار است و علائم نکروز بافت برگ تا ۴۸ ساعت مشاهده نشد. راندمان انتقال ژن در آزمایش‌های بیان موقت تا حد زیادی به چگونگی برهمکنش سویه باکتری و گونه گیاهی بستگی دارد (Van der Hoorn *et al.* 2000; Wroblewski *et al.* 2005; Zottini *et al.* 2008).

در صورتیکه سیستم دفاعی گیاه در پاسخ به آلودگی با یک سویه باکتری فعال شود، سلول‌های مجاور محل تزریق نکروزه شده و در نتیجه امکان انتقال ژن و بیان تراژن وجود نخواهد داشت (Van der Hoorn *et al.* 2000). براساس این نتایج سویه LBA4404 واکنش سازگار با ارقام خربزه مورد مطالعه نشان داد، بنابراین جهت بررسی بیان موقت مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۱- نمای شماتیک منطقه T-DNA سازه‌های pBI121 و pCAMBIA3301 نشان دهنده مجموعه ژن گزارشگر و موقعیت اتصال آغازگرهای اختصاصی و اندازه باند-های قابل تکثیر

LB: مرز چپ، Nos-T: پایان دهنده رونویسی نوپالین سنتاز، *Npt*II : نئومایسین فسفوترانسفراز، Nos-P: پیشبر نوپالین سنتاز، p 35S: پیشبرCaMV 35S، p 2X 35S: پیشبر 2X CaMV35S، Int: اینترون، GUS: ژن بتا گلوکرونیداز، Poly A: دنباله پلی آدنیلاسیون، RB: مرز راست.

Fig. 1. Schematic diagrams of T-DNA region of the pBI121 and pCAMBIA3301 vectors showing the reporter gene: promoter cassettes, primer match sites and the expected size of the amplicons.
LB: left border, Nos-T: nopaline synthase terminator, *Npt*II - neomycin phosphotransferase II, Nos-P - nopaline synthase promoter,P 35S: CaMV 35S promoter, P2X35S: two repeat of CaMV 35S promoter, Poly A: Polyadenylation terminator, RB - right border. pGMP contains CaMV 35S minimal promoter used as negative control.



شکل۲- برهمکنش سویه‌های اگروباکتریوم بر روی ارقام خربزه ۶ ساعت پس از آلودگی.

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب برگ کوتیلدونی ارقام C-F1، C-F2، BG ، M8 و M10 آلوده شده به سویه‌های GV3101 و LBA4404 اگروباکتریوم

Fig. 2: Interaction between *Agrobacterium* strains and melon varieties 6 hours post infection.
1, 2 and 3: *Cucumis melo* var. C-F1, C-F2 and BG, respectively. 4 and 5: Iranian melon cultivars Daragazi and Khatooni.

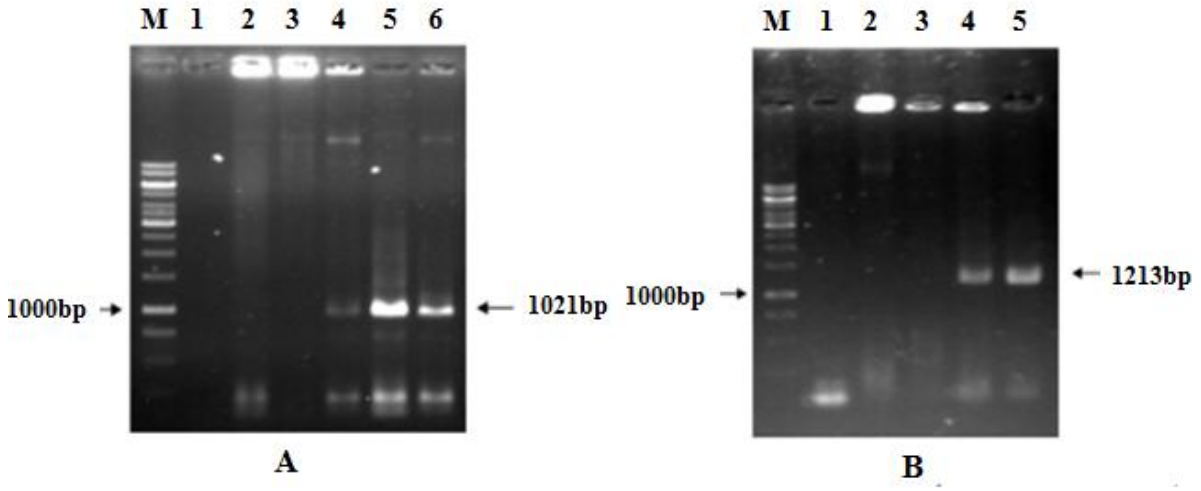
در روش اگروواینجکشن سلول‌های باکتری حامل ناقل بیانی در فضای آپوپلاستی برگ گیاه تزریق می‌شوند. هرچند سازگاری سویه LBA4404 با ارقام در مرحله قبل تایید شد، با این حال ضروری است زنده مانی سلول‌های تزریق شده در بافت برگ ارقام مختلف تایید شود. بدین منظور ناقل pBI121 به سویه LBA4404 منتقل شد. این ناقل دارای ژن گزارشگر GUS فاقد اینترون است (شکل ۱). بنابراین انتظار می‌رود در سلول باکتری ژن گزارشگر GUS بیان شود. در نتیجه در صورت زنده بودن سلول‌ها در ناحیه تزریق بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر GUS به‌صورت تظاهر رنگ آبی تایید می‌شود. سلول‌های اگروباکتریوم حامل با ناقل pBI121 با استفاده از کلنی PCR و به وسیله آغازگرهای اختصاصی Psh3-FR تایید شدند. نتایج کلنی PCR نشان داد در کلنی‌های مثبت، تک باند ۱۰۲۱ جفت بازی معادل باند 1Kb نشانگر وزنی تکثیر شده است (شکل ۳-الف).

قدرت و صحت بیان ژن گزارشگر GUS در سویه تراریخته شده با ناقل pBI121 با سنجش فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در رسوب سلول‌های کشت شده در محیط LB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، فعالیت شدید آنزیم بتا گلوکورونیداز را با بروز رنگ آبی در سلول‌ها نشان داد (شکل ۴- الف) و قدرت بیان این ژن در سویه تراریخته شده تایید شد. در حالیکه سویه LBA4404 فاقد ناقل pBI121 قدرت بیان ژن GUS را نشان نداد (شکل ۴- ب).سلول‌های سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، جهت بررسی زنده مانی آن‌ها پس از تزریق در بافت برگ ارقام مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی LBA4404 پس از آماده سازی در محلول القاء و تلقیح، در بافت برگ ارقام خربزه تزریق شد. همچنین به منظور اطمینان از مرحله تزریق از گیاه توتون رقم بنتامیانا نیز به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در محل تزریق سوسپانسیون باکتری قابل مشاهده است (شکل ۵- الف)، در حالیکه در نمونه‌های تهیه شده از برگ گیاهان بدون تزریق فعالیت درونزاد آنزیم بتا گلوکورونیداز مشاهده نشد (شکل ۵- ج).

فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز در نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، تا حدی با یکدیگر تفاوت نشان داد. باکتری تزریق شده در فضای بین سلولی ارقام خربزه را می‌توان علت این تفاوت دانست. در حالیکه شدت بالای فعالیت آنزیمی در ناحیه تزریق در برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا ناشی از حضور بالای سلول‌های اگروباکتریوم در فضای آپوپلاستی است. مقایسه بافت برگ توتون و خربزه به خوبی تایید کننده این تفاوت است. نتایج این آزمایش نشان داد سلول-های زنده مربوط به سویه LBA4404 حامل ناقل pBI121، در مدت ۴۸ ساعت پس از تزریق در فضای بین سلولی بافت برگ تمامی ارقام خربزه با فراوانی متفاوتی حضور دارند و ژن گزارشگر GUS را حداقل به صورت پروکاریوتی در این فضا بیان کرده اند.

در آزمایش تجزیه و تحلیل بیان موقت، هدف، بیان تراژن در سلول‌های گیاه است. با توجه به یوکاریوتی بودن سلول-های گیاهی امکان پردازش RNA نسخه برداری شده از تراژن در آن‌ها وجود دارد. در حالیکه سلول‌های پروکاریوتی فاقد این قابلیت می‌باشند. به منظور بررسی امکان انتقال تراژن به سلول‌های بافت برگ ارقام خربزه و بیان آن در گیاه، آزمایشی با استفاده از ناقل pCAMBIA3301 طراحی شد. این ناقل دارای ژن گزارشگر GUS واجد اینترون است (شکل ۱- ب). بنابراین تنها در صورت انتقال ژن گزارشگر به سلول گیاه و بیان یوکاریوتی گیاهی امکان پردازش RNA نسخه برداری شده فراهم می‌شود. بدین منظور ناقل pCAMBIA3301 به سویه LBA4404 منتقل شد و کلنی-های نوترکیب با استفاده از آغازگرهای Psh3-FR مورد تایید قرار گرفتند. نتایج کلنی PCR تکثیر قطعات اختصاصی با اندازه مورد انتظار ۱۲۱۳ جفت باز را تایید نمود (شکل ۳- ب).

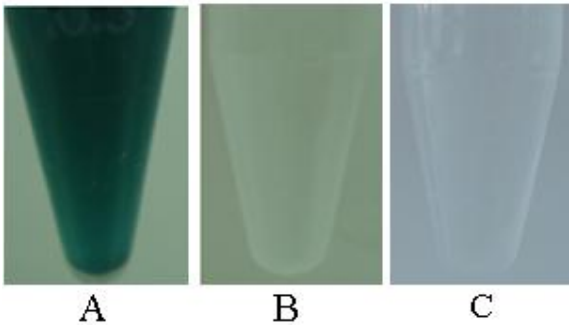
به منظور تایید عدم بیان پروکاریوتی، کشت شبانه سلول‌های اگروباکتریوم سویه LBA4404 حامل ناقل pCAMBIA3301 از نظر فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۳ - تایید کلنی‌های اگروباکتریوم حامل ناقل‌های pCAMBIA3301 و pBI121 با استفاده از کلنی PCR

الف: تائید کلنی‌های نوترکیب حامل سازه pBI121 با استفاده از آغازگرهای PSh3FR (۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳ کلنی‌های فاقد باند منطبق؛ ۴، ۵ و ۶ کلنی‌های نوترکیب، M: نشانگر وزنی 1Kb DNA)؛ ب: تائید کلنی‌های نوترکیب حامل سازه pCAMBIA3301 با استفاده از آغازگرهای PSh3FR (۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳ کلنی‌های فاقد باند منطبق؛ ۴ و۵ کلنی‌های نوترکیب، M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb).

Fig3: Colony PCR analysis of transformed *Agrobacterium* colonies by the pBI121 and pCAMBIA3301 vectors using specific primers (PSh3FR).
A: Lane 1- negative control; 2, 3- false positive colonies; 4, 5, 6- confirmed colonies harboring pBI121showing a specific band in expected size.
B: Lane 1- negative control; 2, 3- false positive colonies; 4, 5- confirmed colonies harboring pCAMBIA3301showing a specific band in expected size.
M: 1 Kb DNA ladder (Fermentas, Canada)



شکل ۴- سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در سویه LBA4404 اگروباکتریوم حامل ناقل‌های pBI121 (A)، pCAMBIA3301 (B) و فاقد ناقل حامل ژن GUS (C).

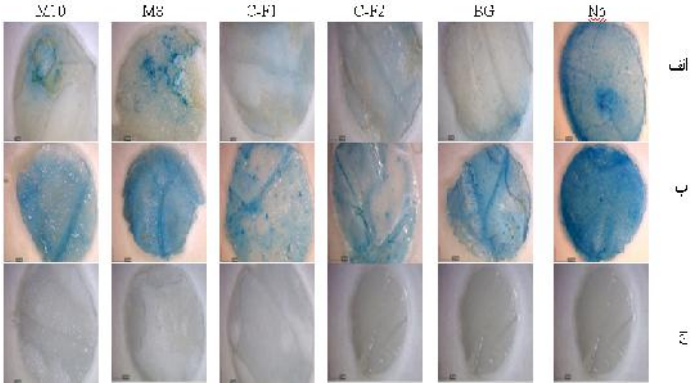
A: فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز ناشی از بیان پروکاریوتی ژن GUS، B: عدم فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در سلول پروکاروتی به دلیل وجود اینترون در توالی ژن GUS، C: سویه LBA4404 فاقد وکتور بیانی.

Fig4: analysis of Beta-glucronidase activity in *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring pBI121 (A), pCAMBIA3301 (B) and LBA4404 lacking GUS gene.
A: showing GUS activity due to prokaryotic GUS expression, B: no recordable GUS activity in prokaryotic cells due to intron-containing GUS, C: Empty LBA4404 strain.

نتایج سنجش فعالیت ژن گزارشگر GUS در این سلول-ها منفی بود (شکل ۴- ب). این نتایج نشان داد سازه pCAMBIA3301 همانگونه که انتظار می‌رفت در سلول‌های باکتری قادر به تولید آنزیم بتا گلوکورونیداز نیست. بنابراین در صورت تزریق این سلول‌ها به بافت برگ و بروز فعالیت آنزیمی انتقال و بیان ژن گزارشگر به سلول گیاه انجام شده است.

سلولهای سویه LBA4404 حامل سازه pCAMBIA3301 پس از آماده سازی در محلول القاء و تزریق در بافت برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا تزریق شد تا صحت سازه و قدرت بیان آن تایید شود. نتایج به خوبی نشان داد رنگ آبی ناشی از بیان موقت ژن گزارشگر GUS از زمان ۴۸ ساعت پس از تزریق در بافت برگ گیاه توتون رقم بنتامیانا قابل مشاهده است. (شکل ۵- ب). نتایج آزمایش‌های اولیه تایید نمود که سویه LBA4404 در بافت برگ ارقام خربزه به صورت زنده نفوذ کرده و قادر به بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر GUS می‌باشد. از سوی دیگر نشان داده شد سویه حامل pCAMBIA3301 قادر است در بافت برگ گیاه توتون گونه بنتامیانا ژن گزارشگر GUS را پس از انتقال بیان نماید. در آزمایش نهایی امکان بیان موقت ناقل pCAMBIA3301 در سلول‌های ارقام خربزه مورد مقایسه قرار گرفت. بدین منظور سلولهای LBA4404 حامل سازه pCAMBIA3301 پس از آماده سازی در محلول القاء و تزریق در بافت برگ ارقام استاندارد و محلی خربزه تزریق شد. نتایج سنجش هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در دیسک-های برگی تهیه شده از محل تزریق، رنگ آبی را در حاشیه رگبرگ‌ها نشان داد (شکل ۵- ب). در حالیکه در بافت برگ گیاه سالم فعالیت درونزاد ژن گزارشگر GUS مشاهده نشد (شکل ۵- ج). شدت بروز رنگ آبی در ارقام مختلف متفاوت بود. بیشترین و کمترین میزان بیان به ترتیب در رقم M8 و رقم BG5384 مشاهده شد. این تفاوت در دو تکرار مربوط به هر تیمار مشابه بود. به‌نظر می‌رسد تفاوت میزان بیان در نمونه‌های تزریق شده با ناقل pBI121 به دلیل نفوذپذیری متفاوت ارقام باشد. این تفاوت در نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل pBI121 نیز قابل مشاهده بود. نتایج این مطالعه نشان داد سویه LBA4404 قادر است با انتقال منطقه T-DNA به سلول‌های ارقام خربزه مورد مطالعه، ژن گزارشگر GUS را در این سلول‌ها به طور موقت بیان نماید. تفاوت شدت بیان در ارقام مختلف خربزه تا حدی به دلیل نفوذپذیری متفاوت برگ‌ها می‌باشد. چون این تفاوت در نتیجه سنجش نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4404 حامل سازه pBI121 نیز مشاهده شد. در مطالعات مشابهی که بر روی گونه بنتامیانا توتون (*Nicotiana benthamian*) ، اطلسی (*Petunia hybrid*)، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس انجام شد نشان داده شده است که ساختار برگ تا حد زیادی بر اگروانفیلتراسیون موثر است. به این صورت که در گونه بنتامیانا توتون (*Nicotiana benthamian*) ، اطلسی (*Petunia hybrid*)، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس سوسپانسیون باکتری به راحتی در بافت برگ پخش می‌شود اما در کاهو، فلفل، *Nicotiana tabacum* و پنبه سوسپانسیون باکتری در داخل لایه نازک برگ پخش می‌شود اما مسیر آن توسط رگبرگ‌های برگ محدود می‌شود (Wroblewski et al. 2005). در مطالعه دیگری که چندین رقم توتون به عنوان میزبان بیان موقت بر پایه اگروباکتریوم استفاده شد، ضرورت استاندارد سازی شرایط اگروانیجکشن با در نظر گرفتن رابطه متقابل سویه باکتری با گونه یا رقم گیاهی نشان داده شد (Bahrabadi et al. 2014). شکوهی‌فر و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مقایسه بافت برگ گیاهان کلزا، توتون و لوبیا دلایل اصلی تفاوت در راندمان بیان موقت را نفوذپذیری بسیار پایین بافت برگ کلزا و لوبیا دانستند. براساس نتایج این مطالعه سویه LBA4404 با ارقام خربزه مورد مطالعه سازگار بود و جهت بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم قابل توصیه است. با توجه به راندمان کم بیان موقت در بافت برگ ارقام به نظر می رسد مشکل اصلی به دلیل نفوذپذیری اندک بافت برگ باشد بنابراین در مطالعات تکمیلی توصیه می‌شود، روش‌های دیگر فیلتراسیون سوسپانسیون

باکتری در بافت برگ و یا تلقیح سطحی روی سطح برگ باید مورد توجه قرار گیرد.



شکل ۵- سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز ۴۸ ساعت پس از اگروانیجکشن در برگ ارقام خربزه. الف: تزریق سویه LBA4404 حاوی سازه pCAMBIA3301 ، ب: تزریق سویه LBA4404 حاوی سازه pBI121، ج: بدون تزریق سویه بیان کننده عدم بیان داخلی ژن بتاگلوکرونیداز در نمونه‌ها M10 و M8 به ترتیب رقم درگزی و رقم خاتونی، C-F1 ، C-F2 و BG ارقام استاندارد خربزه، Nb: توتون رقم بنتامیانا بعنوان کنترل

Fig 5: Histochemical beta glocronidase assay 48 hours post injection in melon varieties and *N. bentamiana* A and B: injected leaf disks by LBA4404 harboring pCAMBIA3301 and pBI121 respectively, C: mucked injection leaf disks; M10 and M9: Iranian melon cultivars Daragazi and Khatooni, respectively; C-F1, C-F2 and BG: *Cucumis melo* var. Charentais-Fom1, Charentais-Fom2 and BG5384, respectively; *Nb*: *N. bentamiana* as control.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت تامین منابع مالی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم جهت اجرای این تحقیق را مهیا کردند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

Anderson A, Moore L. 1979. Host specificity in the genus agrobacterium. Phytopathology. 69:320-323.

Andrews LB, Curtis WR. 2005. Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. Biotechnology progress. 21:946-952.

Bahrabadi M, Shokouhifar F, Ebrahimi MA. 2014. 13th Iranian Genetics Congress, Tehran.(In Farsi with English abstract).

Cervera M. 2004. Histochemical and fluorometric assays for uida (gus) gene detection. Springer: 286:203-213.

Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular breeding. 11:287-293.

Chenarani Z, Shokouhifar F, Mamarabadi M, Farrokhi N. 2012. Study the effects of explant and medium types in direct regeneration induction in melon *(cucumis melo* l., *cv. Khatooni*). 12th Iranian Genetics Congress, Tehran.(In Farsi with English abstract).

Chikh-Rouhou H, González Torres R, Alvarez J, Pitrat M. 2008. Characterization of the resistance to *fusarium oxysporum* f. Sp. *Melonis* race 1.2 in cucumis melo 'BG-5384'. Centre de Recherche d'Avignon. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet (France).

D'Aoust M, Lerouge P. Busse U. 2004. Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. John Wiley & Sons, NY,1-12.

Genoves A, Navarro JA, Pallas V. 2006. Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. Journal of general virology. 87:2371-2380.

Higo H, Tsuruya K, Mano H, Hasegawa K, Minobe Y. 2005. New chimeric promoter useful for expression of selectable marker genes in rice transformation. Plant Biotechnology. 22:287-294.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature. 444:323-329.

Kapila J, De Rycke R, Vanmontagu M, Angenon G. 1997. An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant science. 122:101-108.

Mizuno S, Hirasawa Y, Sonoda M, Nakagawa H, Sato T. 2006. Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). Plant science. 170:1156-1163.

Mozafari Z, Mirakhorli N, Shiran B, Khodambashi M. 2013. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating gene expression systems in common bean. Modern genetics journal. 8:273-282. (In Farsi with English abstract).

Nugent G, Coyne S, Nguyen T, Kavanagh T, Dix P. 2006. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. Botrytis (cauliflower) using peg-mediated uptake of DNA into protoplasts. Plant science.170:135-142.

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold pring Harbor Laboratory Press, New York.

Shokouhifar F, Abbaspour N, Ghafariania N. 2013a. Construction of a promoterless binary expression vector to analysis regulatory elements in plants. Iranian Journal of Plant Biotechnology Submited.

Shokouhifar F, Mottalebi M, Zamani MR. 2014. Construction of pGCGi an expression vector carries intron containing gus and analysis using micro-bombardment and agroinjection. Iranian Journal of Plant Biology. Submited. (In Farsi with English abstract).

Song G, Yamaguchi K. 2003. Efficient agroinfiltration-mediated transient gus expression system for assaying different promoters in rice. Plant Biotechnology. 20:235-239.

Tan S, Saleh NM, Ichinose Y, Yamada T. 1995. Transient expression of heterologous pal gene in the cells and tissues of muskmelon (Cucumis melo l. Cv. Birdie).In2. UPM-JICA Biotechnology Seminar, Seremban, Negeri Sembilan (Malaysia).

Van der Hoorn RA, Laurent F, Roth R, DeWit PJ. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr 9/Cf-9-induced and Avr 4/Cf-4-induced necrosis. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13:439-446.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal. 33:949-956.

Weigel D, Glazebrook J. 2005. Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. CSH protocols 2006. No 7:1031-1036.

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.

Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, Aizono Y. 2002. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of thecucumisin gene. Journal of Biological Chemistry. 277:11582-11590.

Yang Y LR, Qi M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by Agroinfiltration of tobacco leaves. Plant Journal. 22:543-551.

Zottini M, Barizza E, Costa A, Formentin E, Ruberti C, Carimi F, Schiavo FL. 2008. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant cell reports. 27:845-853.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Evaluation of strain compatibility effects on Agrobacterium-mediated transient GUS expression in melon cultivars

Sahba Toosi[1], Farhad Shokouhifar[2*], Saeid Malekzadeh Shafaroudi[3], Abdolreza Bagheri[3]

1. M.Sc student, Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

2. Faculty Member of Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3. Faculty Members of Biotechnology and Plant breeding Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

*Corresponding Author, Email: Shokouhifar@um.ac.ir

A B S T R A C T

Transient expression of a candidate effector gene in host plants following Agroinfiltration is a useful method to investigate the role of the gene in pathogenecity. In this study, the effects of two *Agrobacterium tumefaciens* strains on four standard melon lines and two Iranian melon cultivars were investigated to establish transient expression in melon. Compatibility of the LBA4404 and GV3101 strains was defined by injection of the bacterial suspensions into the leaves of cultivars. Viability of the injected *Agrobacterium* strain cells in leaf tissues was evaluated 24 hours after injection by prokaryotic GUS reporter gene assay. The LBA4404 strain harboring the pCAMBIA3301 vector containing an intron-GUS reporter gene was used to confirm eukaryotic GUS expression in the plant cells. The LBA4404 strain was transformed by the pBI121 and pCAMBIA3301 expression vectors and transient transformation was confirmed by colony PCR technique using the PSh3-F/R primers. The efficiency of transient transformation of the melon leaves was evaluated 48 hours after Agroinjection of the LBA4404 strain containing pCAMBIA3301 by the histochemical GUS assay. The leaves that were injected by LBA4404 harboring pBI121 showed GUS activity. All the melon cultivars transiently expressed the GUS reporter gene 24 hours after Agroinjection. These findings could be used in the future studies to evaluate function of candidate effector genes in interaction with standard melon lines.

Key Words

Agroinjection , GUS assay, Melon, Transient expression