تحقیقات غلات
سال دوم/ شماره اول / ۱۳۹۱ (۵۵ -۴۵)

ترانسفورماسیون برنج (*Oryza sativa* L.) با ژن‌های گزینشگر هایگرومایسین (*hpt*) و گزارشگر بتاگلوکورونیداز (*gus*) به روش *In planta*

طیبه سلامت[۱]، سمیه اللهی[۱]، محمد مهدی سوهانی[۲*] و علی اعلمی[۲]

۱ و ۲- به ترتیب دانشجویان سابق کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱۵- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲۰)

چکیده

گیاهان تراریخته اغلب به وسیله روش‌هایی بر پایه کشت بافت تولید می‌شوند که روش‌های پیچیده‌ای بوده و نیاز به آماده سازی و انتخاب دقیق ریزنمونه، انتخاب بافت‌های تراریخت شده و باززایی گیاهان تراریخته در شرایط *in vitro* را دارند. در این آزمایش، گیاهان تراریخته در شرایط غیر استریل تولید شدند. بدین منظور بذور دو رقم برنج بومی تیپ ایندیکا خیسانده شدند تا جنین فعال و شروع به رشد کند. سپس منطقه جنینی با حداقل آسیب به جنین زخم‌زنی و با دو سویه اگروباکتریوم تومه فاشیینس (*Agrobacterium tumefaciens*) حامل ناقل pCAMBIA1105. 1R تلقیح شدند. القاء ژن‌های *vir* در محیط کشت خاصی که بدین منظور طراحی شده است انجام شد. بذور بعداً جوانه‌زده و در تحت شرایط غیر استریل رشد کردند. تأیید الحاق ژن انتقالی به درون ژنوم گیاهان تراریخته نسل T_0 و T_1 با استفاده از روش PCR شامل دو ژن در داخل منطقه T-DNA، مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین و آزمون بافت شیمیایی GUS انجام شد. بیشترین کارایی ترانسفورماسیون در نسل T_0 مربوط به تیمار زخم‌زنی به وسیله خراش با اسکالپل آغشته به اگروباکتریوم به میزان ۱۱/۷۲ درصد در رقم هاشمی ۹/۷۵ درصد بوده است. کارایی ترانسفورماسیون در رقم هاشمی در شرایط سوزن‌زنی همراه با خلاء نیز به طور معنی‌داری از تلقیح تحت شرایط غیرخلاء بیشتر بوده است. به منظور بررسی پایداری ژن تراریخته گیاهان نسل T_1 به طریق مشابه نسل T_0 آنالیز مولکولی شده و نتایج نشان داد که همچنان ۱۹ درصد گیاهان نسل T_1 تراریخت بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: استوسیرینگون، القاء ژن‌های *vir*، برنج، ژن‌های گزینشگر و گزارشگر، *Agrobacterium tumefaciens*

* نویسنده مسئول: msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

تولید گیاهان تراریخت با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* بر پایه کشت بافت (Hiei and Komari, 2008) و یا مستقل از کشت بافت و در اصطلاح *in planta* صورت می‌گیرد (Betchtold, 1993). عمده‌ترین روش‌های ترانسفورماسیون در حال حاضر از گروه اول بوده و طیف وسیعی از گیاهان را در بر می‌گیرند، اما این روش‌ها دارای معایبی بدین شرح هستند: در این قبیل سیستم‌های ترانسفورماسیون، گیاهان تراریخت از یک سلول و بافت ترانسفورم شده بعد از به‌کارگیری روش‌های مختلف باززایی حاصل می‌شوند. اغلب این روش‌ها مستلزم کشت طولانی مدت بافت ترانسفورم شده در شرایط درون شیشه (*in vitro*) هستند (Newell, 2000) که در طی این باززایی‌ها، گیاهان تراریخت ممکن است پتانسیل ریخت‌زایی و باروری خود را از دست بدهند، تنوع سوماکلونال رخ دهد و نوترکیبی کروموزومی در آن‌ها اتفاق بیفتد. از اینرو، این قبیل گیاهان تراریخت الگوی مناسبی برای بررسی بیان ژن انتقال یافته نمی‌باشند (Larkin and Scowcroft, 1982; Kaeppler *et al.*, 2005).

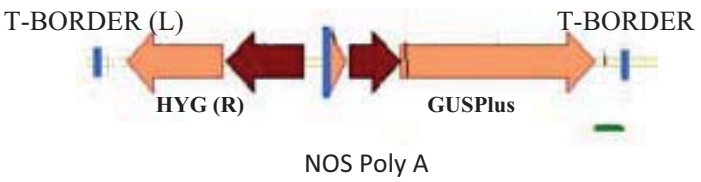
برای سال‌های متمادی ترانسفورماسیون گیاهانی مانند برنج به وسیله اگروباکتریوم درگیر بهبود تکنیک‌های کشت بافت گیاهی بوده است. با این وجود سیستم‌های باز زایی یک فرایند عمومی نیستند و حتی گونه‌های یک رقم نیاز به یک روش آزمایشگاهی بهینه شده و جداگانه دارند (Danivola, 2007). لذا، کشت بافت همچنان یک عامل بسیار محدود کننده به شمار می‌آید. علاوه بر این‌ها، ترانسفورماسیون ارقام برنج تیپ ایندیکا که در کشور ما وجود دارند با استفاده از روش‌های مرسوم به علت ظرفیت پایین باز زایی آنها مشکل‌تر از تیپ‌های ژاپونیکا است (Hiei and Komari, 2008). بنابراین، با حذف مرحله باز زایی در برنج شانس تولید گیاهان ترانسفورم شده افزایش می‌یابد و صرفه جویی بالایی در وقت و هزینه‌ها خواهد بود (Rakoczy- trojano Wska, 2002).

هدف از انجام این مطالعه، توسعه یک روش سریع و کارآمد به منظور ترانسفورماسیون ژنتیکی گیاه برنج بدون استفاده از سیستم کشت بافت است، که امروزه تحقیقات زیادی در این خصوص در حال انجام است. در این آزمایش تأثیر نوع رقم، روش‌های مختلف زخم زنی به منظور تلقیح و سویه‌های مختلف اگروباکتریوم تومه فاشیینس بر کارایی ترانسفورماسیون در نسل T_0 و T_1 بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

ارقام برنج و ضدعفونی آنها: در این تحقیق دو رقم برنج ایرانی هاشمی و گرده از ارقام بومی تیپ ایندیکا (*O. sativa* ssp. *Indica*) از موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت تهیه و استفاده شد. به منظور ضد عفونی بذر، ابتدا بذرها به مدت چند دقیقه در آب استریل قرار گرفتند، سپس به مدت ۱ دقیقه در اتانل ۹۰٪ ضد عفونی شدند. در ادامه بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم (کلر فعال ۵٪) ۳۰٪ غوطه‌ور و در مرحله آخر به طور کامل با آب استریل آبکشی شدند. به منظور آغاز جوانه زنی، بذرها به مدت ۲ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در آب خیسانده شدند. بعد از گذشت ۲ روز و سفید شدن منطقه جنینی، بذرها آماده تلقیح با اگروباکتریوم شدند.

ناقل دوگانه و سویه‌های اگروباکتریوم مورد استفاده: در این تحقیق از دو سویه اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) شامل LBA4404 و EHA105 استفاده شد که دومی یک نژاد غیر غده‌زا و با قدرت بیماری‌زایی بالا است. سویه‌های اگروباکتریوم با استفاده از روش الکتروپوریشن (Bio-Rad) با ناقل pCAMBIA1105.1R (کامبیا، کانبرا، استرالیا، با شماره دسترسی بانک ژن AF354045) ترانسفورم شدند. این ناقل حاوی ژن مقاومت به ژن گزینشگر هایگرومایسین (*hpt*) و همچنین حاوی ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز (*GUSPlus*) با اینترون چالکون سینتاز در نزدیک پایانه 5′ است. هر دو ژن در ناحیه T-DNA قرار دارند و به منظور انتخاب بافت‌های گیاهی تراریخت شده استفاده می‌شوند. ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (*aadA1*) به منظور گزینش باکتری‌های تراریخت شده در این وکتور طراحی شده است. این ژن در مقایسه با ژن *E. coli gusA* دارای حساسیت بیشتری است و باعث رنگ پذیری سریع قطعات برگی تحت تیمار می‌شود و احتمال نفوذ رنگ آبی به قسمت‌های غیر تراریخت شده را کاهش می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه ناحیه T-DNA وکتور pCAMBIA1105. 1R شامل ژن‌های مقاومت به هایگرومایسین (HYG) و ژن گزارشگر (GUSPlus) به همراه اینترون چالکون سنتاز در نزدیک پایانه ′5 و خاتمه دهنده NOS در داخل مرزهای راست (R) و چپ (L).

Figure 1. Plasmid map of pCAMBIA1105. 1, the plasmid has hygromycin resistance (HYG) and β-*glucuronidase* (GUSPlus) genes with castor bean catalase gene intron near the 5′ end.

محیط کشت القایی ژن‌های *vir*. کشت باکتری‌ها طی سه مرحله و به منظور القاء مناسب ژن‌های بیماری‌زا انجام شد (Gelvin, 2006). مختصراً اینکه نژادهای اگروباکتریوم در دمای ۲۸°C و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت YEP (۱۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مالت، ۵ گرم NaCl در لیتر) حاوی ریفامپیسین (۱۰۰ µg/mL) و اسپکتینومایسین (۱۰۰ µg/mL) در ۲۵۰ rpm در طول شب کشت شدند. حدوداً ۰/۱ میلی‌لیتر از این محیط کشت در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حداقل ساکارز AB (AB با ۲۰ برابر غلظت: ۶۰ گرم K_2HPO_4، ۲۰ گرم NaH_2PO_4، تنظیم pH روی ۷) و ۵۰ ml بافر نمک‌های AB با ۲۰ برابر غلظت (۲۰ گرم NH_4Cl، ۶ گرم $MgSO_4{\cdot}7H_2O$، ۳ گرم KCl، ۰/۲ گرم $CaCl_2$ و ۵۰ میلی‌گرم $FeSO_4{\cdot}7H_2O$) با ۹۰۰ میلی‌لیتر ساکارز ۰/۵ درصد شامل آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده کشت و تا رسیدن به غلظت $A_{600} = 0.8$ رشد یافتند. سپس باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۰۰۰ g سانتریفوژ و در ۲ برابر حجم محیط کشت القایی به مدت ۲۴-۱۴ ساعت کشت و به آهستگی و در ۵۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. در انتها باکتری‌ها سانتریفوژ و در محیط کشت بافت‌های گیاهی MS با غلظت نیم برابر حل و بذور با آن تلقیح شدند.

در محیط القایی از یک ماده القاگر ژن‌های بیماری‌زا به نام استو سرینگون (۳ و ۵- متوکسی- ۴- هیدرو کسی استوفنون، AS; Sigma-Aldrich) با غلظت ۱۰۰ میکرومول استفاده شد.

ترانسفورماسیون بذرهای مورد نظر با استفاده از اگروباکتریوم. بذرهای ضد عفونی شده به مدت ۲ روز در آب مقطر خیسانده شده و آب در طی این مدت ۱ بار برای جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا تعویض شد. در این زمان قسمت جنینی بذرها سفید شد، اما هنوز ریشه‌چه و ساقه‌چه ظاهر نشدند. به منظور تلقیح بذرها با اگروباکتریوم پوسته قسمت جنینی بذر که در آینده از آن ساقه‌چه خارج می‌شود با یک سوزن (به قطر ۰/۵میلی‌متر) و یا اسکالپل آغشته به باکتری به عمق حدود ۱ میلی‌متر به ترتیب سوراخ یا خراشیده شد. در تیمارهای خلأ نمونه‌های بذر همراه با باکتری تا زمان جوش آمدن اینوکولوم در دستگاه وکیوم (Eppendorf, Germany) قرار داده شدند. بذور تلقیح شده به درون شیشه‌های حاوی پرلایت مرطوب و روی کاغذ صافی انتقال داده شدند و به مدت ۹ روز در تاریکی و در دمای ۲۳°C نگهداری شدند. پس از ۹ روز و جوانه‌زنی حدود ۷۵٪ بذور، به منظور حذف باکتری از محلول سفوتاکسیم ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. بذور به مدت ۱ ساعت در محلول سفوتاکسیم خیسانده شدند و سپس کاملاً با آب استریل آبکشی و گیاهچه‌ها به درون گلدان‌های حاوی خاک مناسب انتقال داده شدند. گیاهچه‌ها تا مرحله تولید بذر در اتاقک رشد و در دمای ۲۸°C در تحت شرایط مناسب نگهداری شدند (Lin *et al.*, 2009).

بـه منظـور تاییـد حـذف کامـل اگروبـاکتریوم از گیاهچـه‌هـای ترانسـفورم شـده پـس از تیمـار آنهـا بـا آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، قطعاتی به طول ۲-۱ سانتی‌متر از برگ‌های انتهایی گیاهان نسل T_0 تهیه و در آب استریل در داخل تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر آسیاب شدند. عصاره حاصل روی ظـروف پتـری حـاوی محـیط کشـت YEP جامـد و آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و ریفامپیسین بـه مـدت سه روز در دمای ۲۸°C کشت شدند.

استخراج DNA و انجام واکنش‌های PCR. به منظور کاهش انتخاب گیاهان شیمر برگ پرچمی به عنوان نمونه به منظور استخراج DNA استفاده شد زیرا، برگ پرچمی هم از بخش‌های انتهایی منشاء می‌گیرد و احتمالاً این بخش‌های انتهایی در تولید سلول‌های زایشی مانند دانه گرده و سلول تخم نقش دارند (Supartana *et al.*, 2005). به منظور تایید تراریخت بودن گیاهان از واکنش PCR با ۲ جفت آغازگر استفاده شد. شامل آغازگرهای مستقیم: 5′-GAT GTT GGC GAC CTC GTA T-3′ و معکوس 5′-GTG CTT GAC ATT GGG GAG T-3′ که یک قطعه ۴۸۰ bp از ژن هایگرومایسین و آغازگرهای مستقیم: 5′-GAA TCC TGT TGC CGG TCT T-3′ و معکوس 5′-TTG CGC GCT ATA TTT TGT TTT-3′ که یک قطعه ۱۷۰ bp از پایان دهنده ناس (nos) را در انتهای ژن بتاگلوکورونیداز تکثیر می‌کنند. چرخه دمایی واکنش PCR برای تکثیر ژن هایگرومایسین شامل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، مرحله تکثیر: واسرشت سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و به تعداد ۳۵ چرخه و بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. چرخه دمایی واکنش PCR برای تکثیر قطعه bp ۱۷۰ از پایان‌دهنده nos نیز مشابه ژن هایگرومایسین انجام شد فقط دمای اتصال در این واکنش PCR، در دمای °C ۵۷ به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد.

آزمون مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین. به منظور انجام آزمون مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین، قطعات برگی به طول ۲ سانتی‌متر از بالاترین برگ گیاهچه‌های تلقیح شده تهیه و در محیط انتخابی حاوی ۶-بنزیل آمینوپورین (6-BA) و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایگرومایسین به مدت ۷ روز قرار گرفتند (Wang and Waterhouse, 1997).

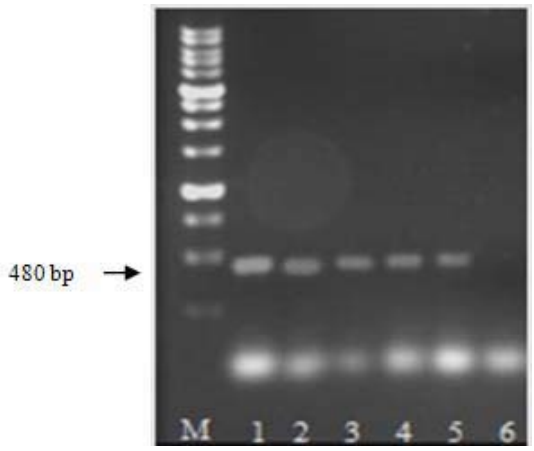
آزمون بافت شیمیایی فعالیت بتا-گلوکورونیداز (GUS). آزمایش بافت شیمیایی GUS به منظور بررسی بیان ژن *GUSPlus* در گیاهان تلقیح شده انجام شد. قطعات برگی (۰/۵ میلی‌متر) در دمای ۳۷°C به مدت ۳-۲ روز در بافر فسفات M ۰/۰۵۰ (pH=7) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ماده ۵-برومو-۴کلرو-۳-ایندولیل-بی دی-گلوکورونید (X-gluc) قرار گرفتند. به طور همزمان یک دوره کوتاه مدت خلأ نیز اعمال شد. جهت حذف کلروفیل برگ‌ها در طی شب در اتانل ۷۰٪ قرار داده شدند (Jefferson, 1987).

در این تحقیق داده‌ها مربوط به نتایج نسل T_0 پس از تایید انتقال ژن در نسل T_1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند برای این منظور آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل ۵۰۰ بذر اجرا شد. فاکتورهای مورد نظر عبارتند از رقم (رقم‌های محلی گرده و هاشمی) و نحوه تلقیح (سوزن ۰/۵ میلی‌متر، سوزن ۰/۵ میلی‌متر همراه با جذب در شرایط خلأ و خراش با اسکالپل) و سویه باکتری (EHA105 و LBA4404). همچنین داده‌ها پس از تبدیل با استفاده از نرم افزار SAS (Version 8. 0) تجزیه واریانس و برای آزمون مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

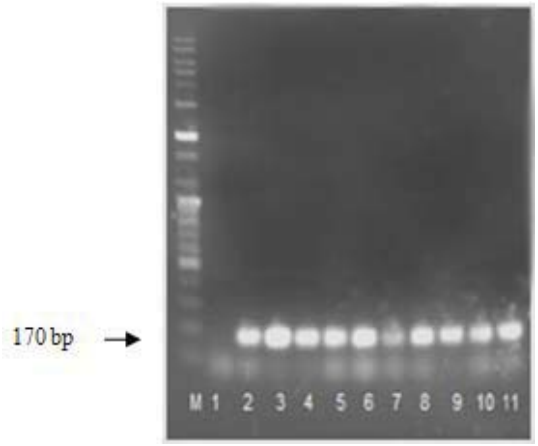
در این آزمایش بررسی کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از واکنش PCR، آزمون مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین و آزمون بافت شیمیایی GUS روی گیاهان نسل T_0 و T_1 انجام شد. فقط گیاهانی تراریخت شده واقعی تلقی شدند که نتیجه هر سه آزمون PCR، مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین و آزمون بافت شیمیایی GUS آنها مثبت بودند.

واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های انتقال یافته در گیاهان. به منظور تأیید حضور ژن مقاومت به هایگرومایسین در گیاهان تلقیح شده نسل T_0 و T_1 واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی این ژن انجام شد که یک قطعه ۴۸۰ bp از این ژن تکثیر شد (شکل ۲). همچنین به طور همزمان واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی پایان دهنده ناس نیز انجام گرفت، که یک قطعه ۱۷۰ bp از پایان دهنده ناس در انتهای ژن بتاگلوکورونیداز را تکثیر می‌کنند (شکل ۳). وجود این باندها در گیاهان تلقیح شده می‌تواند نشانه درج ژن هایگرومایسین و بتاگلوکورونیداز در داخل ژنوم گیاه برنج باشد.



شکل ۲- واکنش PCR ژن هایگرومایسین در نسل T_0. M: نشانگر اندازه، ۱: کنترل مثبت (pCAMBIA1105. 1R)، ۲-۵: گیاهان تراریخت شده، ردیف ۶: کنترل منفی (گیاهان غیر تراریخت شده).

Figure 2. PCR amplification of *hpt* gene. M: Size marker, 1: positive control (pCAMBIA1105. 1R), 2-5: putative transformed plants, 6: non-transformed control plants.

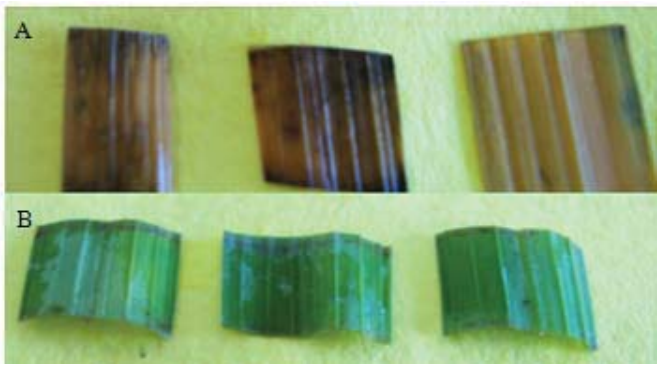


شکل ۳- واکنش PCR قطعه nos. M: نشانگر اندازه، ۱: کنترل منفی (گیاهان غیر تراریخت شده)، ۲-۱۱: گیاهان تراریخت شده در گیاهان نسل T_1.

Figure 3. PCR Reaction of nos fragment. M: Size marker, lane1: negative control (non-transformed plants), lanes 2-11: putative transformed plants (170 bp band).

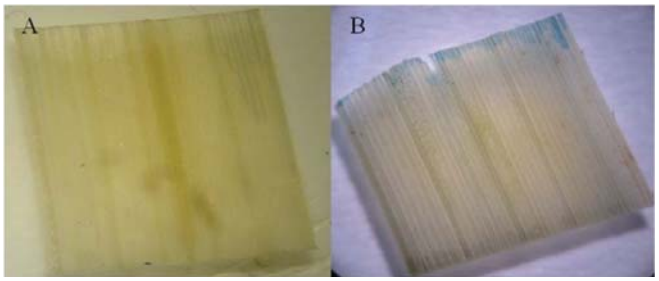
تست مقاومت بافت‌های برگی به هایگرومایسین. بررسی بیان ژن هایگرومایسین در گیاهان حاصل از تلقیح در نسل T_0 و T_1 انجام شد. نتایج نشان داد که بافت برگی گیاهان تراریخت شده در محلول انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین بعد از گذشت ۷ روز همچنان سبز رنگ باقی می‌ماند اما، گیاهان غیر تراریخت شده بعد از گذشت چند روز شروع به نکروزه شدن و در نهایت در پایان آزمایش کاملاً قهوه‌ای رنگ شدند (شکل ۴).

تست بافت شیمیایی GUS. تأیید نهایی تراریخت بودن گیاهان با استفاده از آزمون بافت شیمیایی GUS بر اساس دستورالعمل جفرسن (Jefferson, 1987) انجام شد. گیاهان نسل T_0 و T_1 که آزمون PCR و مقاومت به هایگرومایسین آن‌ها مثبت بود، تحت آزمون بافت شیمیایی GUS قرار گرفتند. پس از تیمار بافت‌های برگ، لکه‌های آبی رنگ در گیاهان تراریخت مشاهده شد (شکل ۵). نکته مهم اینکه آزمون بافت شیمیایی GUS تمامی گیاهان مقاوم به هایگرومایسین مثبت نبود که ممکن است علل مختلف از جمله رخدادن خاموشی ژن و یا درج ناقص ژن بتاگلوکورونیداز باشد (Yasmeen *et al.*, 2009).



شکل ۴- واکنش بافت‌های برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین ۷ روز پس از شروع آزمایش. A: کنترل منفی (گیاهان غیر تراریخت شده)، B: گیاهان تراریخت شده. برگ گیاهان تراریخت شده در پایان آزمایش همچنان سبز باقی ماندند.

Figure 4. Leaf tissues reactions to Hygromycin. A: Negative control (non-transformed) plants, B: transformed plants. Leaf tissues from transformed plants remain green till the end of experiment.



شکل ۵- آزمون بافت شیمیایی GUS قطعات برگی برنج. A: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت شده)، B: قطعه برگی از گیاه تراریخت شده، حاشیه برگ گیاهان تراریخت شده به رنگ آبی درآمده‌اند در حالی که انواع غیر تراریخت بی رنگ بوده‌اند.

Figure 5. Histiochemical GUS assay of leaf tissues. A: Negative control (non-transformed plant), B: Leaf fragment of transformed plant.

نتایج تجزیه واریانس درصد ترانسفورماسیون در تیمارهای مختلف. از آنجا که داده‌ها بر حسب درصد بوده‌اند، جهت نرمال سازی از روش ArcSin برای تبدیل داده‌ها استفاده شد. نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفت درصد کارایی ترانسفورماسیون نشان داد که اثرات اصلی رقم و نحوه تلقیح و نیز اثر متقابل رقم × نحوه تلقیح در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد ترانسفورماسیون در تیمارهای مختلف

Table 1. Analysis of variance for transformation percentage in different treatments

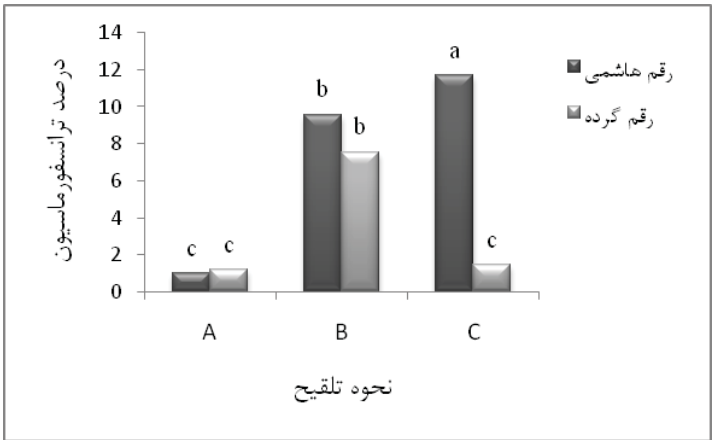
منابع تغیر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
رقم Cultivar	1	1. 462*
باکتری Bactrium	1	0. 066ns
نحوه تلقیح Inoculation	2	1. 794*
رقم × باکتری C×B	1	0. 013ns
رقم × نحوه تلقیح C×I	2	0. 908*
باکتری× نحوه تلقیح B×I	2	0. 062 ns
رقم× باکتری× نحوه تلقیح C×B×I	2	0. 003ns
خطای آزمایش Experimental Error	24	0. 094

ns غیر معنی‌دار Non significant

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ Significant at 5% level of probability.

نمودار اثر متقابل رقم × نحوه تلقیح روی درصد ترانسفورماسیون در نسل T_0 نشان داد که بیشترین درصد ترانسفورماسیون (۱۱/۷۲٪) مربوط به رقم هاشمی و به وسیله خراش با اسکالپل آغشته به اگروباکتریوم به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با درصد ترانسفورماسیون دیگر تیمارها داشت (شکل ۶). رقم هاشمی تحت شرایط تلقیح با سوزن ۰/۵ میلی‌متر همراه با وکیوم نیز دارای درصد ترانسفورماسیون قابل توجهی (۹/۷۵٪) بود که تفاوت معنی‌داری با تلقیح تحت شرایط سوزن ۰/۵ میلی‌متر بدون وکیوم داشت. در ارتباط با رقم گرده بیشترین درصد ترانسفورماسیون (۷/۵۴٪) در شرایط تلقیح با سوزن ۰/۵ میلی‌متر همراه با وکیوم به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با تلقیح به وسیله خراش با اسکالپل (۱/۴٪) و تلقیح با سوزن ۰/۵ میلی‌متر بدون وکیوم (۱/۲٪) داشت (شکل ۶).

نتایج نشان داد که تعیین مکان مناسب برای تلقیح بذرها با سوزن آلوده به اگروباکتریوم در گیاه برنج دارای اهمیت زیادی است. در جنین بذرهای برنج در حال جوانه-زنی، توده‌های سلولی اولیه یا پریموردیا (Primordial) اندام‌های مختلف شکل گرفته است، اما فقط مریستم انتهایی جنین‌ها در تولید سلول‌های زایشی دخیل هستند (Lersten, 2004). تنها در صورت ترانسفورماسیون این قبیل سلول‌های زایشی است که ژن انتقالی به نسل بعد انتقال می‌یابد. بنابراین، بهترین مکان برای تلقیح کنار مریستم انتهایی ساقه‌چه بذرهای جنینی است که بعداً ساقه چه از آن خارج می‌شود.



شکل ۶- اثر متقابل رقم × نحوه تلقیح روی کارایی ترانسفورماسیون. تلقیح دو رقم هاشمی و گرده با سه روش A) سوزن با قطر ۰/۵ میلی‌متر، B) سوزن با قطر ۰/۵ میلی‌متر همراه با وکیوم و C) خراش با اسکالپل انجام شد. ستون‌های تیره و روشن به ترتیب متعلق به رقم هاشمی و گرده می‌باشند.

Figure 6. The interaction effect of cultivar × inoculation on transformation efficiency. Two rice cultivar (Hashemi and Gerdeh) were used in combination with three types of inoculations: A) needle with 0. 5 mm, B) needle with 0. 5 mm ϕ and vacuum; C) Wounding with an scalpel.

با وجود این، اگر سوزن مستقیماً به درون ساقه‌چه جنینی بذرها وارد شود، ساقه چه ممکن است به شدت آسیب دیده و در مراحل بعدی نمو از بین برود. در این خصوص هر دو رقم برنج به شدت به زخم زنی حساسیت نشان دادند به گونه‌ای که تا حداکثر ۴۵٪ مرگ گیاه‌چه در برخی تکرارها مشاهده شد.

بیشترین درصد ترانسفورماسیون در نسل T_0 در رقم هاشمی و به وسیله خراش با اسکالپل آغشته به اگروباکتریوم به دست آمد، در صورتی که رقم گرده تقریبا کمترین مقدار را تحت این شرایط داشت و از آنجایی که رقم هاشمی نسبت به رقم گرده دارای بذور بزرگتری است این نتیجه می‌تواند به علت عدم کنترل دقیق مکان تلقیح با اسکالپل نسبت به سوزن در رقم گرده باشد. اسکالپل می‌تواند امکان نفوذ باکتری‌ها را به ریزنمونه افزایش دهد اما، آسیب وارده از طریق اسکالپل بر روی رقم گرده تأثیر بیشتری روی میزان مرگ و میر بذور تلقیح شده داشت.

تحت شرایط تلقیح با سوزن ۰/۵ میلی‌متر همراه با وکیوم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نیز با تلقیح تحت شرایط سوزن ۰/۵ میلی‌متر بدون وکیوم داشت که در رقم هاشمی نیز درصد ترانسفورماسیون تحت شرایط تلقیح با سوزن ۰/۵ میلی‌متر همراه با وکیوم قابل توجه بود که این نتایج نشان داد که استفاده از شرایط خلأ می‌تواند نقش موثری را در افزایش نفوذ باکتری به بافت ریزنمونه داشته باشد. استفاده از شرایط خلأ در روش ترانسفورماسیون *in planta* به منظور افزایش نفوذ باکتری به فضای بین سلولی در گیاه و افزایش تعداد گیاهان تراریخت شده ابتدا در گیاه آرابیدوپسیس انجام شد (Bechtold *et al.,* 1993). آزمایش فعلی نیز تأثیر استفاده از خلأ در افزایش درصد گیاهان تراریخت شده را تأیید کرد. هر دو سویه EHA105 و LBA4404 در آزمایش‌های مختلف به عنوان سویه‌های مناسب برای ترانسفورماسیون غلات معرفی شدند (Hellens *et al.,* 2000). در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین دو سویه EHA105 و LBA4404 از نظر کارایی ترانسفورماسیون مشاهده نشد.

بررسی اثر متقابل رقم × نحوه تلقیح نشان داد که درصد ترانسفورماسیون رقم هاشمی نسبت به رقم گرده به طور معنی‌داری بیشتر است. یک علت عمده ممکن است ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی این دو رقم بومی باشد که هر کدام در خصوص حدود ۴۰ هزار ژن برنج دارای تنوع ژنتیکی وسیع و مستقل از یکدیگر در داخل جمعیت هستند.

اطلاعات در مورد زمان و نوع پاسخی که گیاه میزبان در برابر اگروباکتریوم نشان می‌دهد و مقایسه آن با پاسخ گیاه به دیگر باکتری‌ها و تنش‌های عمومی کم و خیلی محدود است (Anand *et al.,* 2011). در یک تحقیق به منظور تعیین طبیعت واکنش دفاعی گیاهان به تلقیح با اگروباکتریوم از روش cDNA-AFLP استفاده شد. هدف آزمایش شناسایی ژن‌هایی بوده است که در کشت سلول گیاه *Ageratum conyzoides* تلقیح شده با اگروباکتریوم در مقایسه با شاهد به طور افتراقی بیان می‌شوند. آنالیز ۱۶۰۰۰ قطعه cDNA نشان داد که ۲۵۱ تای آن‌ها (۱/۶٪) بعد از ۴۸ ساعت دارای الگوی بیان متفاوتی بوده‌اند که شامل ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، درک سیگنال و انتقال سیگنال بوده‌اند (Ditt *et al.,* 2001). این نتایج نشان می‌دهد که تا چه حد ژن‌های متفاوتی در کنش متقابل این باکتری بیماری‌زا و گیاه می‌تواند نقش داشته باشد.

همچنین در این روش از غلظت ۱۰۰ µM AS به منظور القاء ژن‌های بیماری‌زا استفاده شد، استفاده از ترکیبات شیمیایی القاگر مانند AS برای القای ژن‌های بیماری‌زا در بیشتر دستورالعمل‌های مورد استفاده برای ترانسفورماسیون غلات توصیه شده است (Hiei *et al.,* 2006; Saharan *et al.,* 2004). اگرچه ترکیبات القاگر مختلفی وجود دارند اما AS بیشتر استعمال می‌شود زیرا در غلظت‌های پایین نسبت به سایر ترکیبات القاگر دارای خاصیت القاء کنندگی بیشتری است و از نظر تجاری در دسترس و قیمت مناسب‌تری دارد (Dye *et al.,* 1997).

در این آزمایش احتمال حذف کامل باکتری اگروباکتریوم بعد از ترانسفورماسیون و تیمار بذور با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بررسی شد. پس از گذشت سه روز هیچ کلونی روی پتری‌ها تشکیل نشد که نشان دهنده حذف کامل اگروباکتریوم از بافت‌های گیاهی تلقیح شده و کارایی آنتی‌بیوتیک بود. در نتیجه، احتمال آلودگی و ایجاد باندهای کاذب PCR در نمونه‌های گیاهی که حاصل از اگروباکتریوم باشد منتفی بوده است.

در خصوص نوع محیط کشت القائی در این تحقیق، قبلاً ثابت شده است که القاء ژن‌های *vir* در pH اسیدی (۵/۲-۶) در حداکثر مقدار است (Chang *et al.,* 1996). AS نیز در دامنه اسیدی ۵/۵- ۵ دارای بالاترین تأثیر در القاء این ژن‌ها است (Yuan *et al.,* 2008). دمای القاء ژن‌های *vir* حدود ۲۵°C است که عموماً پایین‌تر از مقدار آن برای رشد رویشی اگروباکتریوم (۲۵-۲۸°C) است (Alt-Moerbe *et al.,* 1988). در پروتکل حاضر از محیط کشت MS ۱/۲ جهت تهیه اینوکولوم استفاده شد و نتایج رضایت بخش بود در حالی که در برخی از آزمایش‌ها آب پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه گیلان و قطب علمی برنج برای انجام این پژوهش که قسمتی از پایان‌نامه نویسنده اول است، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., Von Lintig, J. and Schroder, J. 1988. Temperature-sensitive step in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by Agrobacteria. **Molecular Genomics and Genetics** 213: 1-8.

Anand, A., Vaghchhipawala, Z. E. and Mysore, K. S. 2011. Genomics of *Agrobacterium*–plant interaction: An approach to refine the plant transformation technology. In: Stewart, C. N., Touraev, A., Citovsky, V. and Tzfira, T. (Eds.). Plant transformation technologies. Willey Blackwell Publishing, Iowa, USA. pp. 31-49.

Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes Rendus de l Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie (Paris)** 316: 1194-1199.

Chang, C. H., Zhu, J. and Winans, S. C. 1996. Pleiotropic phenotypes caused by genetic ablation of the receiver module of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. **Journal of Bacteriology** 178: 4710-4716.

Danilova, S. A. 2007. The technologies for genetic transformation of cereals. **Russian Journal of Plant Physiology** 54: 569-581.

Ditt , R. F., Nester, W. and Comai, L. 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*, **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America** 19: 10954–10959.

Dye, F., Berthelot, K., Griffon, B., Delay, D. and Delmotte, F. M. 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.

Gelvin, S. B. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. In: Wang, k. (Ed.). *Agrobacterium* protocols, methods in molecular biology. Vol. 343 (2nd edn.). Hummana Press, Totowa, USA. pp: 77-84.

Hellens, R., Mullineaux, P. and Klee, H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science** 5: 446-451.

Hiei, Y. and Komari, T. 2006. Improved protocols for transformation of *indica* rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* . **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 85: 271-283.

Hiei, Y. and Komari, T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryo or calli induced from mature seed. **Nature** 3: 824-834.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The gus gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter** 5: 387-450.

Kaeppler, S. M., Kaeppler H. F. and Rhee, Y. 2005. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology** 43: 179-188.

Larkin, P. J. and Scoweroft, W. R. 1982. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics** 60: 197-214.

Lersten N. R. 2004. Flowering plant embryology with emphasis on economic species. Blackwell, Ltd.

Lin, J., Zhou, B., Yang, Y., Mei, J., Zhao, X., Guo, X., Huang, X., Tang, D. and Liu, X. 2009. Piercing and vaccum in filtration of mature embryo: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica* rice. **Plant Cell Reports** 28: 1065-1074.

Newell, C. A. 2000. Plant transformation technology, Developments and applications. **Molecular Biotechnology** 16: 53-65.

Saharan, V., Yadav, R. C., Yadav N. R. and Ram, K. 2004. Studies on improved for *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L). **African Journal of Biotechnology** 3: 572-575.

Supartana, P., Shimizu, T., Shiori, H., Nogawa, M., Nozue, M. and Kojima, M. 2005. Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 100: 391-397.

Wang, M. B. and Waterhouse, P. M. 1997. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. **Plant Molecular Biology Reporter** 15: 209-215.

Yasmeen, A., Mirza, B., Inayataullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S. and Choudry, M. F. 2009. In planta transformation of tomato plant. **Plant Molecular Biology Report** 27: 20-28.

Yuan, Z. C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K. F. and Nester, E. W. 2008. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ-amino butyric acid reveals signaling cross-talk and *Agrobacterium*–plant co-evolution. **Cellular Microbiology** 10: 2339–2354.

Transformation of rice (*Oryza sativa* L.) using hygromycin (*hpt*) selector and β-glucuronidase (*gus*) reporter genes by *in planta* method

Tayebeh Salamat[1], Somaye Elahi[1], Mohammad Mehdi Sohani[2*] and Ali Aalami[2]

1 and 2. Graduated MSc Students and Assist. Profs., respectively, Dept. of Agricultural Biotechnology, University of Guilan

(Received: March 5, 2012- Accepted: November 10, 2012)

Abstract

Transgenic plants are often produced by tissue culture-dependent methods that require careful preparation and selection of explants, selection of transformed cells and regeneration of transgenic plants. In this in planta transformation method, the mature embryos of soaked seed were pierced by an *Agrobacterium tumefaciens* -coated needle or scalpel. The inoculated seeds were germinated and grew under no sterile conditions. In order to evaluate the effects of cultivars (Hashemi and Gerdeh), *A. tumefaciens* strains (EHA105 and LBA4404) and Three methods of inoculation (0. 5 mm Ø needle, 0. 5 mm Ø needle together with vacuum infiltration, Wounding with a scalpel) on transformation efficiency. A CRD based factorial experiment with three replications was applied. Integration of the transgene into the genome of transformed plants (T_0 and T_1) was confirmed using PCR method, resistance of leaf tissues to hygromycin and histiochemical GUS assay. Accordingly, the highest significant transformation efficiency (11. 72 %) was obtained in Hashemi cultivar wounded with a scalpel. Transformation efficiency of the same cultivar inoculated by a needle under vacuum infiltration was significantly higher than treatment of inoculation in the absence of vacuum. Seventy T_0 seedlings were selected randomly and analysed further at T_1 generation, which ~19% confirmed to be positive.

Keywords: Acetocyringone, *Agrobacterium tumefaciens*, Reporter genes, Rice, Vir genes induction

*Corresponding author: msohani@guilan.ac.ir