

بررسی و بهینه‌سازی برخی عوامل موثر بر انتقال ژن بتا-گلوکورونیداز (gusA) با واسطه آگروباکتریوم در سیب پاکوتاه (*Malus domestica*.Borkh var.Gami Almasi)

Optimizing Factors Affecting *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation Of Dwarf Rootstock Of Apple (*Malus Domestica* Borkh Cv Gami Almasi)

مهدی محسنی آذر^۱، سنبل ناظری^{۲*}، محمد علی ملبویی^۳، مرتضی قدیم‌زاده^۴، ابولفضل برزگری^۵ و علیرضا فرخزاد^۶

چکیده

سیب گمی‌الماسی یکی از ارقام پاکوتاه سیب است که منشاء آن شمال غرب ایران بوده و به لحاظ ویژگی‌های مناسب از نظر باغبانی حائز اهمیت می‌باشد. انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم یکی از روش‌های تراریختی است که تاکنون در مورد بسیاری از گونه‌ها و ارقام انجام گرفته است. بهینه‌سازی عوامل مختلف تاثیر گذار در تراریختی و باززایی گیاهان تراریخت لازم برنامه‌های انتقال ژن محسوب می‌شود. در این پژوهش با استفاده از انتقال ژن بتا گلوکورونیداز برخی از عوامل موثر در تراریختی سیب □ گمی برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت. سویه آگروباکتریوم، غلظت باکتری، مدت زمان تلقیح، طول مدت کشت همزمان و نوع محیط القای بیماری‌زایی باکتری و تاثیر آن‌ها در میزان تراریختی، از عوامل مورد بررسی بودند. در آزمایش‌های تراریختی غلظت موثر کانامایسین برای انتخاب تراریخت‌ها ۵۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد و از بین تیمارهای مختلف سویه GV3850 نسبت به GV3101 موثرتر بود. بر اساس نتایج دو روز کشت همزمان و استفاده از محیط LB به عنوان محیط آلودگی آگروباکتریومی نسبت به AB مناسب‌تر تشخیص داده شد. درصد تراریختی در بهترین تیمار ۲ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، سیب، گمی، gusA، استرین، انتقال

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان
۳. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی تهران
۴. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۵. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۶. استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*: نویسنده مسوول

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه بوعلی سینا می‌باشد.

به دلیل اهمیت نوع پایه درختان سیب در سیستم پرورش و مدیریت باغ، میزان تولید و عملکرد، کیفیت میوه و عمر اقتصادی درختان سیب، در غالب کشورهای مهم تولید کننده سیب دنیا پایه های متنوعی اصلاح و معرفی گردیده است. اغلب پایه های معرفی شده در این کشورها با توجه به نیاز اقلیمی و نیاز باغداران آن کشور بوده است. یکی از شیوه های اصلاح نباتات، اصلاح و به نژادی ارقام بومی است. در ایران در مورد پایه پاکوتاه گمی آلماسی در طی سالهای اخیر مطالعاتی در زمینه سازگاری پایه و پیوندک و خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و گیاهشناسی آن انجام گرفته است (Zadshakouyan, 1992; & Naseri et al. 2006). (Ghasemi, 2002). علی رغم این که ایران جزء شش کشور مهم تولید کننده سیب در دنیا است، (آمار سازمان فائو^۱ ۲۰۱۰) متأسفانه هنوز پایه ای ایرانی و مناسب برای شرایط سیب کاری کشورمان اصلاح و معرفی نگردیده است. برای این منظور لازم است بررسی، مطالعه و ارزیابی جامعی از وضعیت کشت بافت و باززایی و انتقال ژن و بهینه سازی عوامل مختلف تاثیرگذار در تریاریختی این پایه ها در کشور انجام گیرد. پژوهش حاضر در مورد بهینه سازی برخی عوامل موثر در تریاریختی سیب صورت گرفته است.

به طور کلی تولید سیب های تریاریخت شده به تعداد زیاد مشکل است. اولین ترانسفورماسیون با واسطه آگروباکتریوم در سال ۱۹۸۸ با استفاده از کولتیوار گرین اسلیوز گزارش شد جیمز و همکاران (Jamse et al. 1988). کاربرد تکنیک دیسک برگ برای تریاریختی و انتخاب تریاریخت ها، به وسیله هورش و همکاران (Horsh et al. 1985) شرح داده شده است. در طی سال های اخیر تعدادی از عوامل مختلف که در باززایی بعد از تریاریختی تاثیر می گذارند شامل استرین آگروباکتریوم، وکتور تریاریختی (Dandiker et al. 1996)، تاثیر فنل گیاهی استوسیرینگون^۲ روی بیماری زایی باکتریایی (Stachel et al. 1985)، طول دوره هم کشتی، نوع و کیفیت آگار و آگارز (De Bondet et al. 1994, 1996) مطالعه و بررسی شده اند. انتخاب فیتوهومون ها در طول باززایی، طول دوره انتخاب در روی کانامایسین و عمر و موقعیت ریزنمونه ها نیز بررسی شده اند (James & Pussy, 1989; James, 1991; Welander & Mahsvaran, 1991 and Stachel et al. 1985). موقعیت برگ روی گیاه مادر کارایی انتقال را تحت تاثیر قرار می دهد. برای مشخص کردن تاثیر

بررسی و بهینه سازی برخی عوامل موثر بر انتقال ژن بتا-گلوکورونیداز

ژنوتیپ روی بیان ژن *gus*، شش کولتیوار مختلف جوناگلد، الستار، گالا، برابرین، مرلیجن^۳ و فوجی^۴ آزمایش شد. بیش ترین سطح بیان زود گذر (نواحی آبی بلافاصله چهار روز بعد از دوره هم کشتی^۵) مربوط به کولتیوارهای ۱- برابرین^۶، ۲- جوناگلد^۷، ۳- گالا^۸، بود. بر اساس نتایج عوامل وابسته به ژنوتیپ ممکن است روی جذب DNA و تلفیق DNA به طور متفاوتی تاثیر بگذارند. بیش ترین فراوانی باززایی جوانه های تریاریخت شده برای کولتیوار رویال گالا گزارش شده است (Yao et al. 1995). در حالی که سیستم های باززایی و تریاریختی برای سیب توسعه یافته است، در عین حال این روش ها کارایی و راندمان پایین و تغییر پذیری ژنتیکی بالا دارند (Norelli et al. 1996). برای دست یافتن به مزیت بیوتکنولوژی در بهبود کیفیت سیب، این روش ها بایستی تا رسیدن به سطح اقتصادی کافی بهبود یابد. برای اولین بار در کشور افزایش کارایی ترانسفورماسیون و توسعه شرایط ویژه برای یک ژنوتیپ بومی سیب با صفات باغی مناسب از جمله پا کوتاهی و مقاومت به خاک های آهکی برای بهبود کارایی ترانسفورماسیون هدف پژوهش حاضر قرار گرفته است.

مواد روش ها

تاثیر آنتی بیوتیک روی باززایی برگ ها: برای بررسی غلظت آنتی بیوتیک کانامایسین روی باززایی برگ های سیب، غلظت های مختلف کانامایسین شامل صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵، و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تیمار و سه تکرار انجام شد و تعداد جوانه های باززایی شده و میزان تولید کالوس یادداشت شدند. محیط کشت شامل محیط MS حاوی ۷/۵ میلی گرم در لیتر BA^۹ و ۲ میلی گرم در لیتر NAA^{۱۰} بود. برگ ها ابتدا به مدت دو روز در محیط باززایی بدون آنتی بیوتیک قرار گرفتند (این مدت زمان معادل با دوره کشت همزمان با باکتری است که در آزمایش های تریاریختی انجام می گیرد)، نمونه ها سپس به محیط باززایی به اضافه غلظت های مختلف کانامایسین و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند و دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

3. Merlijen
4. Fuji
5. Co-Cultivation
6. Brabern
7. Jonagold
8. Gala
9. Benzyl Adenin
10. Naphthalene Acetic Acid

1. FAO
2. Acetosyringon

سویه آگروباکتریوم و پلاسمید

در این آزمایش از آگروباکتریوم *tomofaciens* (GV3850)، سویه‌های GV3101 که دارای سیستم حامل دوگانه pBI121 بود، جهت تراریختی ریزنمونه‌های برگ سیب استفاده گردید. پلاسمید pBI121 یک ناقل گیاهی است که به‌منظور انتقال ژن به گیاه با واسطه آگروباکتریوم استفاده می‌شود. باکتری‌ها و پلاسمید از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شده بودند.

برای القای بیماری‌زایی آگروباکتریوم از دو محیط LB و AB^۱ استفاده شد تا اختلاف این دو محیط بر روی میزان تراریختی بررسی شود. ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت عبارتند از: 1gr/l NaH₂PO₄, 3gr/l K₂HPO₄, 1gr/l CaCl₂, 0.15gr/l KCl, 0.3gr/l MgSO₄.7H₂O, NH₄Cl, 0.01gr/l FeSO₄.7H₂O, 2.5mg/l Glucose, 0.5% pH ۵/۲ تنظیم شد. در حالی که pH محیط LB که برای کشت شبانه باکتری استفاده شد، برابر هفت بود.

پیش‌کشت برگ‌ها: برگ‌ها قبل از تلقیح به مدت ۴ روز در محیط پیش‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۱۰ گرم در لیتر سوربیتول و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند به‌طوری‌که سطح زیرین برگ‌ها با محیط کشت در تماس بود. سپس نمونه‌های برگ‌ها در داخل پتری با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. در یک آزمایش مقدماتی مدت زمان‌های مختلف تلقیح (۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه) برای به‌دست آوردن زمان مناسب در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از ۳ تکرار، و هر تکرار شامل ۱۴ نمونه برگ‌ها آزمایش شد.

کشت برگ در محیط انتخابی: برگ‌ها در حین تلقیح با سوسپانسیون باکتری با استفاده از اسکالپل زخمی و بعد از تلقیح ابتدا در روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا کمی رطوبت آن‌ها گرفته شود، سپس در محیط کشت هم-زمان^۳ قرار داده شدند. بعد از دو تا سه روز کشت هم‌زمان، برگ‌ها ابتدا با محیط MS حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت ۲ ساعت (روی شیکر با سرعت ۸۰ دور دقیقه) شسته شدند. سپس با آب مقطر استریل حاوی ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت ۱۰ دقیقه شسته شده و

بعد از آب‌کشی دوباره با آب مقطر استریل در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت شدند. برای تراریختی در قالب طرح کاملاً تصادفی چهار تیمار در هر تیمار از ۸ تکرار استفاده شد و در هر تکرار ۱۳ ریز نمونه قرار داده شد. تیمارهایی که برای بررسی تراریختی و انتقال ژن استفاده شد، در جدول یک آمده است.

تست غربالگری با استفاده از روش هیستوشیمیایی: بعد از تلقیح و تراریختی جداکشت‌ها آزمون GUS با استفاده از روش جفرسون (1987) انجام شد. برای انجام این آزمون از هر تکرار یک نمونه تصادفی انتخاب شد.

بررسی بیان گاس: به‌منظور بررسی بیان ژن gus از جداکشت‌های تلقیح شده که در محیط انتخابی حاوی ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت شده بودند، استفاده شد. پس از گذشت حدود هفت روز از کشت، جداکشت‌ها در بافر حاوی X-Gluc به‌صورتی که در زیر آمده، قرار گرفتند و آزمون GUS انجام گرفت.

از هر پتری به‌طور تصادفی یک نمونه برداشته شد و در محلول GUS قرار داده شد. درصد تراریختی بعد از آزمون GUS از تقسیم تعداد نمونه‌هایی که دارای نقاط آبی بودند بر کل نمونه‌های تست شده‌ی یک تیمار به‌دست آمد و به‌صورت درصد بیان شد.

تائید مولکولی توسط PCR: برای استخراج DNA گیاه با استفاده از روش دوپیل و دوپیل^۴ (Doyel & Doyel, 1987) از نمونه برگ‌ها استفاده گردید. جهت تائید انتقال و تلفیق قطعه ژن gus به ژنوم گیاه یک قسمت از ژن gus توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

پرایمر رو به جلو:

5'_CCTGTAGAAACCCCAACCCG_3'

و پرایمر معکوس:

5'_CTGACCGGATGCCGACGCGA_3'

نتیجه PCR تکثیر یک قطعه با اندازه تقریبی ۹۳۰ جفت بازی بود.

1. Tuki, 1997

2. Agrobacterium Infection Medium

3. Co-Cultivation

4. Doyle and Doyle

جدول ۱: تیمارهای مختلف اعمال شده برای تراریختی

Table 1: Different treatments for transformation

تیمار	سویه باکتری	محیط کشت القای بیماریزایی	دوره هم‌کشتی
treatment	Bacterial Strain	A.I.M	Co-cultivation period
1	GV3850	LB	3 Day
2	GV3850	LB	2 Day
3	GV3850	AB	2 Day
4	GV3101	LB	2 Day
Control	Without Agrobacterium		

شرایط PCR

ترکیبات واکنش شامل: آغازگر رو به جلو ۲μl آغازگر معکوس ۲μl بافر پی‌سی‌آر ۲μl، کلرید منیزیم ۲μl، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۴μl، دی‌ان‌آ ۵μl، آنزیم Tag پلیمرز ۲μl آب ۳μl بود. چرخه‌های واکنش شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام چرخه تکثیر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز یک درصد بارگذاری و الکتروفورز در ۷۰ ولت به مدت ۱ ساعت انجام گردید.

نتایج

اثر غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک کانامایسین روی ریز نمونه های برگ

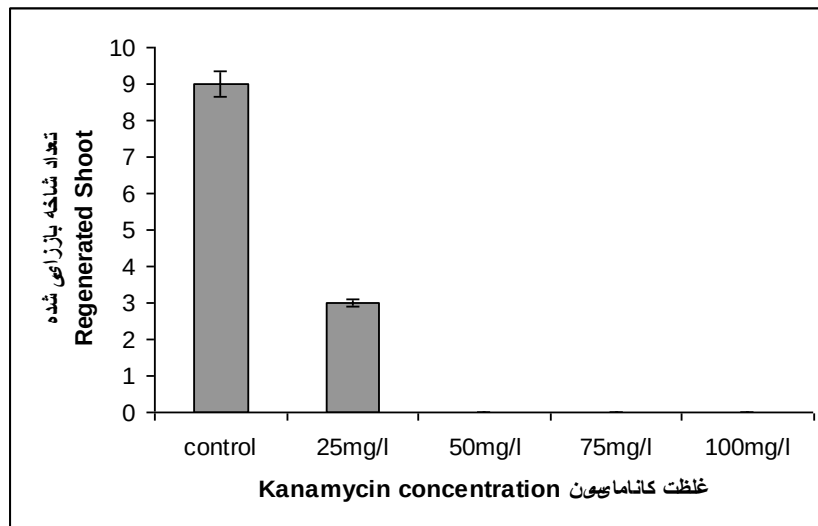
نتایج کشت جداکشت‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین بعد از حدود چهار هفته نشان داد که کانامایسین به شدت از باززایی جداکشت‌های سیب جلوگیری می‌کند. بیشترین تعداد باززایی در نمونه‌های تیمار

شاهد (بدون کانامایسین) مشاهده شد. تعداد شاخه‌های باززایی شده با افزایش غلظت کانامایسین به شدت کاهش یافت و در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تعداد زیادی از جداکشت‌ها از بین رفتند. سه غلظت انتهایی از نظر تعداد ریز نمونه از بین رفته با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند. کمترین تعداد ریز نمونه‌های از بین رفته در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین مشاهده گردید. در این غلظت تنها ۳۵ درصد از نمونه‌ها از بین رفتند و بقیه که باقی مانده بودند، تا حدی تولید کالوس کرده و باززایی داشتند. میانگین جوانه‌های باززایی شده در تیمار شاهد ۹ شاخه و در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ۳ شاخه و در بقیه تیمارها صفر بود. تعداد جداکشت از بین رفته با افزایش غلظت کانامایسین سیر صعودی داشت. اما تفاوت معنی‌داری در سطوح بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد ($P < 1\%$). به همین دلیل نیازی به استفاده از غلظت‌های بالاتر جهت انتخاب گیاهان تراریخت در محیط انتخابی نبود و سطح مؤثر غلظت کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد و در همه محیط‌های انتخابی جهت القای کالوس، باززایی جوانه و نیز تشکیل ریشه از همین غلظت استفاده گردید (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲: جدول ANOVA مربوط به آزمایش غلظت کشنده کانامایسین

Table 2: ANOVA Table of Kanamycin fatality concentration test

Pr.	F value	میانگین مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
		Mean of Square	d.f	Source of Variation
0.0001	144.75	45.9	4	Treatment
		0.4	10	Error
		26.35		CV



شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر باززایی سیب رقم گمی از برگ ($P=0.01$)

Fig 1: Effect of Kanamycin concentration on regeneration from apple (cultivar Gami) leaf ($P=0.01$)

نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱ و ۰/۷ باعث رشد زیاد باکتری بر روی ریز نمونه شده و آن را بعد از چند روز از بین می‌برد. غلظت ۰/۵ نسبت به دو غلظت قبلی نتیجه بهتری داشت و برای تلقیح تیمارها از این غلظت استفاده شد. تلقیح جداکشت‌ها با سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه نسبت به دو تیمار دیگر (۱۰ و ۳۰ دقیقه) نتیجه بهتری داشت، تلقیح به مدت ۳۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه باعث رشد بیش از حد باکتری و از بین رفتن جداکشت‌ها گردید. سویه GV3850 بدلیل سرعت رشد زیاد در طول ۳ روز دوره هم-کشتی نیز در برخی موارد باعث از بین رفتن ریز نمونه گردید.

نمونه‌های تلقیح شده بعد از انجام تست GUS بیان ژن بتا گلوکورونیداز را نشان می‌دادند. (شکل ۲ سمت چپ) از مجموع ۳۸۶ نمونه تلقیح شده تنها ۱۲ جوانه باززایی شدند که از این تعداد، چهار نمونه متعلق به تیمار ۱ و دو نمونه مربوط به تیمار ۳ بود. تیمارهای ۲ و ۴ هرکدام سه جوانه باززایی شده داشتند (نوع تیمارها قبلاً در جدول ۱ اشاره شده است)، این جوانه‌ها تراریخت احتمالی بودند. از بین دو سویه ذکر شده (GV3850 و GV3101) سویه GV3850 نتایج بهتری نسبت به سویه دیگر داشت که بعد از باززایی جداکشت‌ها و بررسی مولکولی نتایج، مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۳).

بررسی نتایج بهینه‌سازی تراریختی با ژن *gus*

نتایج بررسی آزمون GUS نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری از نظر سلول تراریخت یا محل تراریختی وجود دارد. تعداد ریز نمونه‌های بروز دهنده رنگ آبی که نشان دهنده سلول‌های تراریخت هستند در سویه GV3850 بیش‌تر از سویه GV3101 بود. هم‌چنین تیمارهایی که در آن‌ها از محیط AB برای تحریک ژن‌های بیماری‌زایی باکتری استفاده شده بود میزان مناطق تراریخت پایینی داشتند. تعداد روزهای کشت هم‌زمان تأثیری روی تعداد مناطق تراریخت بیان‌کننده ژن گاس نداشت. در مورد محل رنگ‌پذیری، بیشتر قسمت‌های نزدیک به دم‌برگ و اطراف محل زخم‌ها و کناره‌های برگ رنگ می‌گرفت و این محل‌ها تقریباً محل‌هایی بودند که جوانه‌ها باززایی می‌شدند (شکل ۲).

تأثیر غلظت سوسپانسیون، سویه آگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح روی تراریختی

برای بررسی مدت زمان تلقیح و غلظت سوسپانسیون باکتری، دوره‌های مختلف تلقیح (۵ دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه) و غلظت‌های (۰/۵، ۰/۷ و $OD=1$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به کار رفت.

بررسی و بهینه‌سازی برخی عوامل موثر بر انتقال ژن بتا-گلوکورونیداز



شکل ۲: آزمون هیستوشیمیایی GUS برای انتقال این ژن به برگ سیب (چپ: بیان *gus*، ۷ روز بعد از تلقیح، راست: بیان دائمی بعد از باززایی)

Fig. 2: Histochemical GUS assay for transformation to apple leaf (Left: expression after 7 days, Right: stable integration after regeneration)



شکل ۳: بررسی تراریختی جوانه‌های باززایی شده با استفاده از روش PCR. ۷-پلاسمید (کنترل مثبت)، ۸- Ladder(100bps)، ۹- مستر میکس (کنترل منفی)، ۱۰- DNA گیاه شاهد (کنترل منفی)، ۳، ۴، ۱۱، ۱۴ و ۱۶ نمونه‌های تراریخت و ۱، ۲، ۵، ۶، ۱۲، ۱۳ و ۱۵ نمونه‌های غیر تراریخت شده

Fig. 3: Result of PCR reaction [8.Lader(100bps), 7.plasmid, 9.Master Mix, 10.control plant DNA, 3,4,11,14,16. transformed sample, 1,2,5,6,12,13,15. untransformed sample]

DNA در گیاهان غیرتراریخته و شاهد (غیر تلقیح شده با آگروباکتریوم) و مستر میکس به عنوان شاهد منفی تکثیر نگردید. این قطعه ۹۰۰ جفت بازی در داخل قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی ژن *gus* قرار داشت.

نتایج پی‌سی‌آر نشان داد که ژن *gus* در نمونه‌های شماره ۳، ۴، ۱۱ و ۱۶ به درون ژنوم گیاه وارد شده است. نتایج حاصل از درصد باززایی در تیمارهای مختلف و هم-چنین نسبت تراریختی در شکل‌های (۴) و (۵) و جدول (۳) آورده شده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده برای سهولت کار یک دستورالعمل یا پروتکل برای تراریختی و باززایی از ریزنمونه-های برگی در سیب برای رقم گمی تهیه شد (شکل ۶).

تائید مولکولی تراریختی توسط پی‌سی‌آر

پس از انتقال گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به محیط دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، اکثر گیاهچه‌ها در این محیط با تولید و توسعه ریشه به رشد خود ادامه دادند.

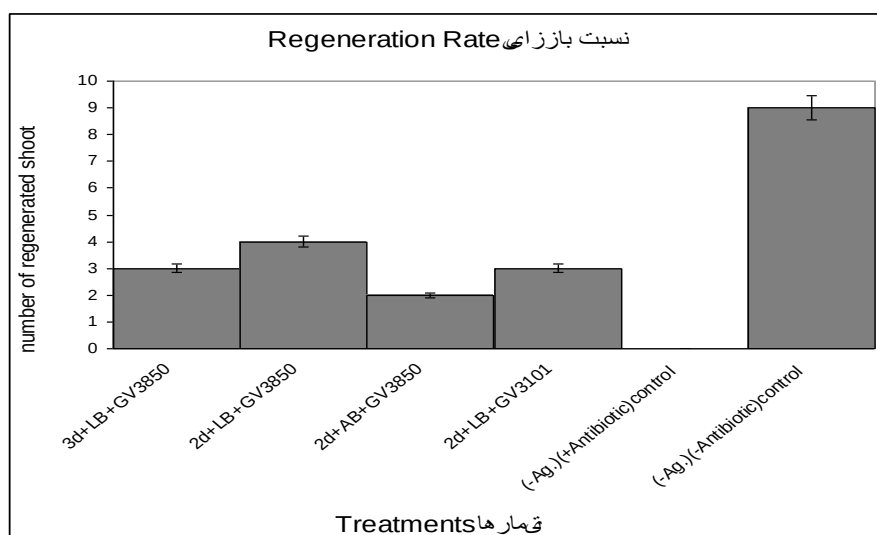
ردیابی ژن انتقالی در ژنوم گیاهان تراریخته به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای ابتدا و انتهای ژن منتقله بررسی شدند.

برای تائید مولکولی ژن انتقال یافته به درون ژنوم گیاه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن بتا-گلوکورونیداز، قطعه‌ای از ژن تکثیر شد. بر اساس نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (شکل ۳) باند مورد نظر با اندازه تقریبی ۹۰۰ جفت باز در گیاهان تراریخته احتمالی تکثیر گردید.

جدول ۳: نتایج تعداد گیاهچه های تراریخت شده سیب رقم گمی

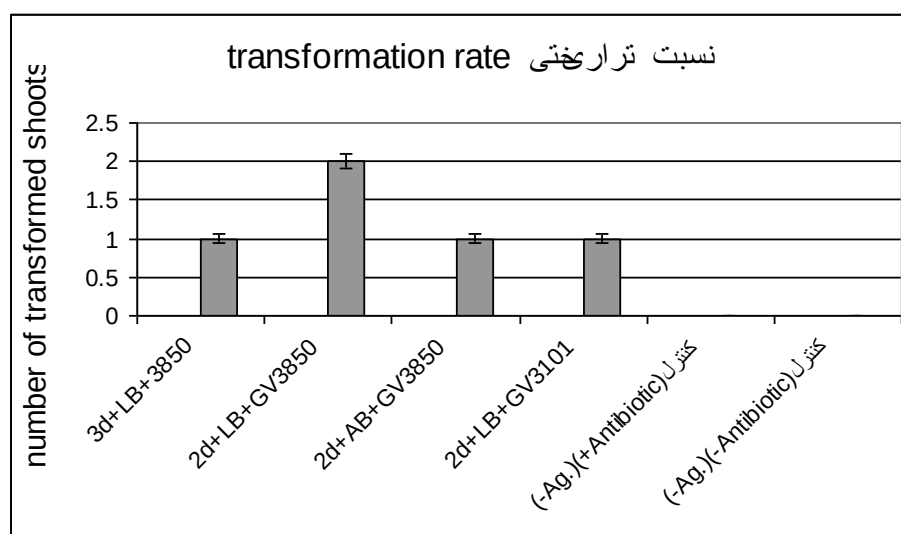
Table 2: Result of transformed explants

تعداد برگهای تلقیح شده با اگروباکتریوم	تعداد گیاهان باززایی شده در روی کانامایسین	تعداد شاخه های باززایی شده	درصد تراریختی
Total No. of infected leaf	Regenerated shoot on Kanamycin	Regenerated Shoot GUS+ PCR+	Transformation Rate
384	12	5 5	0.0135 %



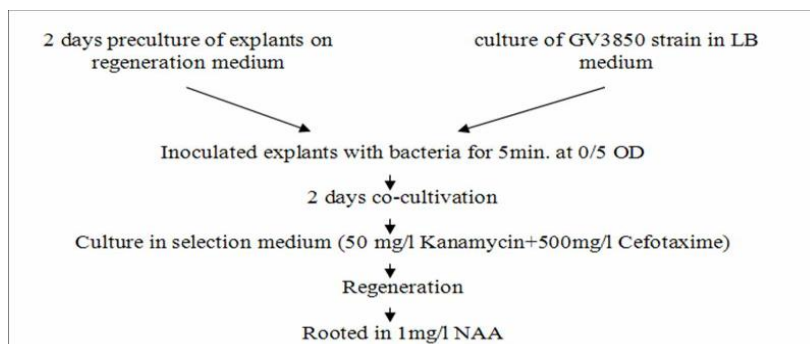
شکل ۴: باززایی سیب رقم گمی روی محیط انتخابی، ۱- (استرین GV3850+LB ۳ روز کشت همزمان)، ۲- (GV3850+LB ۲ روز کشت همزمان)، ۳- (GV3850+AB ۲ روز کشت همزمان)، ۴- (GV3101+LB ۲ روز کشت همزمان)، ۵- کنترل بدون تلقیح با باکتری و کشت در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و ۶- کنترل بدون تلقیح و بدون کانامایسین در محیط کشت

Fig 4: Regeneration on selection medium and controls, 1: Strain GV3850, LB medium as A.I.M with 3 day co cultivation, 2: GV3850, LB medium as A.I.M with 2 day co cultivation, 3: Strain GV3850, AB medium as A.I.M with 2 day co cultivation, 4: Strain GV3101, LB medium as A.I.M with 2 day co cultivation, 5: control without infection, culture in antibiotic and 6: control without infection, without culture in selection medium



شکل ۵: تاثیر تیمار های مختلف در نسبت تراریختی

Fig.5: Factors affected on transformation rate.



شکل ۶: پروتکل تراریختی برای واریته گمی سیب

Fig 6: Transformation protocol for Gami Almasi variety of apple

بحث

می‌دارند که مرحله محدود کننده در تراریختی سیب مرحله تلقیح باکتری و انتقال DNA از آگروباکتریوم به گیاه نیست. در سیب دو هفته بعد از تلقیح بیان پایدار ژن کاهش می‌یابد و مشخص می‌کند که DNA به‌طور موثر به درون ژنوم گیاه تلقیح نمی‌شود و یا اگر تلقیح شود خاموشی ژن در سطح بالا اتفاق می‌افتد. عوامل موثر در ادغام قطعه خارجی در ژنوم گیاه دلیل بر درصد پایین تراریختی در سیب است (Maximova et al. 1998 & De Bondt et al. 1996).

محیط AB محیطی با میزان فسفات پایین و گلوکز بالا در ترکیب خود است. هر دوی این عوامل از موارد تحریک کننده ژن‌های بیماری‌زایی *vir* در آگروباکتریوم هستند (Tuki, 1997). در اکثر موارد از استوسرینگون هنگام کشت در محیط A.I.M برای تحریک ژن‌های بیماری‌زایی استفاده می‌کنند. توکی (1997) برای تراریختی برنج و لی و همکاران (Li et al. 2007) برای تراریختی چنار از محیط کشت AB استفاده نموده‌اند. احتمالاً استرین‌های مختلف در محیط AB نتایج متفاوتی دارند و از آنجایی که در سیب عواملی که در ادغام قطعه DNA موثرند، مربوط به ژنوم گیاه هستند و نه ژن‌های آگروباکتریوم، تحریک ژن‌های بیماری‌زایی باکتری تأثیری بر میزان تراریختی ندارد (Maximova et al. 1998).

در مراحل انتقال DNA از آگروباکتریوم به سلول گیاه محدودیت‌هایی از قبیل فقدان سنتز ترکیبات فنولی، اتصال باکتری به سلول گیاه، انتقال مولکول T-Strand به داخل سیتوپلاسم، و نهایتاً ادغام شدن مولکول T-Strand در ژنوم میزبان وجود دارد. با دست ورزی‌های انجام شده بیشتر این محدودیت‌ها رفع شده است اما در بسیاری از گونه‌های گیاهی محدودیت مربوط به ادغام شدن مولکول T-Strand هنوز به حال خود باقی است. این وضعیت را می‌توان توسط بیان گذرای ژن‌های گزارشگر و عدم بیان پایدار آن‌ها به راحتی اثبات نمود. مثلاً برای گونه‌های گیاهی مثل ذرت، برنج و سیب، به طور تقریبی بازده ترانسفورماسیون پایدار به

کانامایسین به خاطر مهار ریبوزوم‌های ۷۰S از سنتز پروتئین در اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری جلوگیری می‌کند (Norelli et al. 1994). تأثیر غلظت کانامایسین احتمالاً بسته به ژنوتیپ متفاوت است. در آزمایش‌های مختلفی که تاکنون در مورد تراریختی سیب انجام گرفته از غلظت‌های مختلف کانامایسین استفاده شده است (Norelli & Aldwincl, 1993 and Klass et al. 1996). در آزمایش حاضر غلظت مناسب برای این رقم ۵۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. بر روی پلاسمید pBI121 ژن مارکر انتخاب‌گر (مقاومت به کانامایسین) در سمت RB قطعه T-DNA قرار گرفته و در زمان ورود این قطعه به درون ژنوم گیاه، تلقیح از سمت RB شروع می‌شود و به ناحیه LB ختم می‌شود؛ یعنی ابتدا ژن *nptII* تلقیح و بعد ژن *uidA(gus)* وارد ژنوم می‌شود. ورود ژن *nptII* به درون سلول باعث ایجاد مقاومت به کانامایسین می‌شود به همین خاطر ممکن است در برخی نمونه‌های باززایی شده، ژن گاس به‌طور ناقص تلقیح شده یا اصلاً تلقیح نشده باشد. در جوانه‌های باززایی شده مقاوم به کانامایسین که بعد از آزمون پی‌سی‌آر تراریخت بودن آن‌ها تأیید نشد، عدم ورود ژن گاس به این علت می‌تواند باشد. البته اخیراً پیشنهاد می‌شود که از روش تراریختی بدون استفاده از ژن‌های مارکر استفاده شود بدین شکل که موقع تراریختی همراه ژن اصلی مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک یا علف‌کش استفاده نمی‌شود چون این مواد باززایی را به شدت کاهش می‌دهند و در عوض بعد از باززایی تمام نمونه‌های باززایی شده با پی‌سی‌آر غربال اولیه می‌شوند (Zuo et al. 2002).

درصد تراریختی تقریباً همانند کارهایی است که قبلاً گزارش شده است و همگی بر پایین بودن درصد تراریختی در سیب تأکید دارند. ماکسیموف و همکاران (Maximova et al. 1998) و دیبوندت و همکاران (De Bondt et al. 1996) بیان

۱۰۰۰۰ برابر نسبت به بیان گذرا کاهش نشان می‌دهد (Maximova et al. 1998). فرآیند ادغام شدن مولکول T-Strand توسط دو دسته از عوامل پروتئین انجام می‌شود که عبارتند: از پروتئین‌های باکتریایی و پروتئین‌های گیاهی. گزارش‌های اخیر اثر متقابل بین T-DNA و دو رشته‌ای و پروتئین ترمیمی KU80 رشته DNA گیاهی را نشان می‌دهد. مولر و همکاران (Muller et al. 2007). حضور توالی‌های غنی از T و ترکیب نامتقارن DNA در جایگاه تلفیق در مرز سمت چپ LB نشان می‌دهد که اتصال ممکن است ترجیحاً در مکان‌هایی که دارای پایداری مارپیچی پایینی هستند، اتفاق افتد (Fu et al. 2006 & Schneeberger et al. 2005). پروتئین 2 VIR و فاکتورهای میزبان از قبیل KU80 ممکن است در نگهداری انتهای مولکول‌های دو رشته‌ای در سمت RB در یک شکل قابل وصول نقش بازی کنند که اجازه آنیلینگ به مولکول هدف از قبیل DNA گیاهی را می‌دهد. مولر و همکاران (2007) اختلاف ارقام و گونه‌های گیاهی در پاسخ به تلفیق قطعه DNA خارجی ناشی از اختلاف در ساختارهای کروماتین، حضور توالی‌های غنی از T و حضور پروتئین‌های ترمیمی در سلول است. در این گونه گیاهان که مشکل در مرحله تلفیق DNA به ژنوم است شاید استفاده از کشت‌های پرستار و یا استفاده از ارقامی که بازدهی تراریختی بالایی دارند، مناسب باشد. هم‌چنین

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.

استفاده از ژن‌های مارکر جدید مانند فسفو مانوز ایزومراز و د- آمینو اسید اکسیداز ۱ (D-Amino Acid Oxidase 1) نیز در سیب نتیجه خوبی داشته و به دلیل جلوگیری نکردن از باززایی معایب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک را ندارند (Hatash et al. 2009).

در آخر نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر را می‌توان به‌شکل ذیل خلاصه کرد:

کشت آگروباکتریوم استرین GV3850 در محیط LB و کشت ریزنمونه‌های برگی سیب در محیط پیش کشت به-مدت ۲ روز، سپس تلقیح ریزنمونه‌ها به‌وسیله باکتری با غلظت ۵/۵۰ به مدت ۵ دقیقه، و بعد از ۲ روز کشت هم‌زمان، کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت باززایی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، بعد از باززایی ریزنمونه‌ها در محیط ریشه‌زایی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از رئیس وقت پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه جناب آقای دکتر صابری‌وند که امکان انجام بخشی از پژوهش را فراهم آورد اعلام می‌دارند.

Optimizing Factors Affecting *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation Of Dwarf Rootstock Of Apple (*Malus Domestica* Borkh Cv Gami Almasi)

Mohseniazar¹, M., Nazeri^{2*}, S., Malboobi³, M. A., Ghadimzadeh⁴, M., Barzgari⁵, A. And Farokhzad⁶ A.

Abstract

Gami Almasi is a dwarf rootstock of apple (*Malus domestica* Bork) that originated from North West of Iran and has some good horticultural characteristics. *Agrobacterium* mediated gene transformation is a method that perform for introducing of gene into plant species and need for developed to new varieties. Present study performed for first time in this cultivar. Optimizing of factors that affected on transformation is necessary in transformation programs. In this research some factors that affected on transformation such as, *Agrobacterium* strain, bacteria suspension concentration, infection time, Co-cultivation period and *Agrobacterium* infection medium type, were evaluated by insertion of b-glucuronidase gene. In transformation experiments, infection by bacterial suspension in 0.5 OD at 600 wavelengths for 5 minutes, showed better results than other treatments. All regenerated shoots on selective medium tested by histochemical GUS assay and PCR. *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3850, with 2 days co-cultivation period were better than GV3101 strain with 3 days, co-cultivation for transformation performance. LB medium had better effect than AB medium as *Agrobacterium* infection medium. Under the most suitable condition, 2% transformation ratio was observed.

Keywords: *Agrobacterium*, Apple, Gami, GusA, Strain, Transformation

References

- Dandekar, A. M. Uratsu, S. L. and Matsuta, N. 1990. Factors influencing virulence in *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. In Sansavini, S. (eds) *In vitro* culture and horticultural breeding. pp. 483-494.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Druart, P., De Vill, M., Goderis, I., Vandeleyden, J. and Broekaert, W. F. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): An assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports*. 13: 587-593.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Penninckx, I., Goderis, I. and Broekaert, W. F. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): An assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 15: 549-554.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation from small amount of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- F.A.O 2010. www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en
- Fu, D. S., Amand, P. C., Xiao, Y., Muthukrishnan, S. and Liang, G. H. 2006. Characterization of T-DNA integration in creeping bentgrass. *Plant Science*. 170, 225-237.
- Ghasemi, A. 2002 Study of physiological and dwarfing of two native genotype of apple (Gami almasi and azayesh) on commercial apple genotypes. Final report of Seed and Seedling Breeding and Providing Research Institute, Isfahan branch. 34 pp (in Farsi).
- Hattasch, C., Flachowsky, H. and Hanke, M. V. 2009. Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus _ domestica* Borkh.) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, ISAFRUIT Special Issue 188-194.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- James, D. J., Passey, A. J. Predieri, S. and Rugini, E. 1988. Regeneration and transformation of apple plants using wild-type and engineered plasmids in *Agrobacterium* spp. M.R. Ahuja(eds) *Somatic cell genetics of woody plants*. pp. 65-71.

-
1. MSc of Biotechnology , Horticulture Department of Agriculture faculty, Urmia University
 2. Assistant professor of Biotechnology Department of agriculture faculty, Bu-Ali Sina University
 3. Associated professor of National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
 4. Assistant professor of Plant breeding and Agronomy Department of agriculture faculty, Urmia University
 5. Agricultural Biotechnology Research Institute of Tabriz – Iran
 6. Assistant professor of Horticulture Department of Agriculture faculty, Urmia University
- *: Corresponding author

- James, Dj. and Passey, A. J. 1989. Genetic transformation of apple using disarmed Ti_binary vector. Plant Cell Reports 7: 658-661
- James, D. J. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus pumila* Mill) In: M.R., Ahuja, (eds) Woody Plant Biotechnology. pp. 213-226.
- Jefferson, R. A. 1987. GUS-fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal. 6:3901-3907.
- Klaas, J., Puite, J. and Schaart, G. 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivar Gala Golden Delicious and Elestar via an Agrobacterium mediated transformation. Plant Science 119: 125-133.
- Li, Z. N., Fang, F. G., Liu, F. and Bao, M. Z. 2007. Stable Agrobacterium-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.) Plant Cell Report 26:641-650.
- Maximova, S., Dandekar, A. and Guiltinan, M. 1998. Investigation of Agrobacterium-mediated genetic transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are the rate-limiting. Plant Molecular Biology. 37:549-559.
- Muller, A., Ross, E., Atkinson, G., Sandoval, R. B. and Jorgensen, R. A. 2007. Microhomologies between T-DNA ends and target sites often occur in inverted orientation and may be responsible for the high frequency of T-DNA-associated inversions. Plant Cell Report. 26: 617-630.
- Naseri, L., Jalili Marandi, R. Ghadimzadeh, M. 2006. Study of botanical, physiological, and phonological of Gami Almasi apple. Final report of research plan, Agriculture faculty, Urmia university 57 pp. (in Farsi)
- Norelli, J. L., and Aldwinckle, H. S. 1993. The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase transgenic apple tissue. Journal of American Society Horticultural Science. 118: 311-316.
- Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., Beltran, L. D. and Jaynes, J. M. 1994. Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica 77: 123-128.
- Norelli, J. L., Mills, J. and Aldwinckle, H. S. 1996. Leaf wounding increases efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of apple. Hort Science. 31:108-110.
- Parimal, M., Hisashi, Y., Hidenari, S. Masayuki, N. and Mineo, K. 2000. M-13Mutant (virA: Tn5) of Agrobacterium tumefaciens is capable of transferring its T-DNA into the nucleus of host cell but incapable of integrating it into the chromosome. Journal of bioscience and bioengineering. 90:328-331.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Mntagu, M. and Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium. Nature. 318:624-629.
- Schneeberger, R. G., Zhang, K. Tatarinova, T. Troukhan, M. Kwok. S. F. Drais, J. Klinger, K. Orejudos, F. Macy, K. Bhakta, A. Burns, J. Subramanian, G. Donson, J. Flavell, R. and Feldmann, K. A. 2005. Agrobacterium T-DNA integration in Arabidopsis is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions. Functional Integration Genomics. 5: 240-253.
- Tuki, S. 1997. Rapid and efficient agrobacterium-mediated transformation in Rice. Plant Molecular Biology Reporter. 15:16-21.
- Welander, M. and M. Maheswaran, 1991. Regeneration and transformation experiments in apple. In:M.R. Ahuja(eds), Woody plant biotechnology. Proceedings of a Workshop at the Institute of Forest Genetics, USDA Forest Service, October USA. 210:237-246.
- Yao, J., Cohen, D. Atkinson, R. Richardson, k. and Morris, B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. Plant Cell Reports 14: 407-412.
- Zadshakouyan H., 1992. Introducing a new native dwarf rootstock of apple (Gami almasi) abstract of 5th national horticulture research, Mashhad Iran p:14-15(in Farsi).
- Zuo, J., Qi-Wen, N. Yoshihisa, I. and Nam-Hai, C. 2002. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. Current Opinion in Biotechnology. 13:173-180.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 7-15= ۷-۱۵).