

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران  
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۲۴۰-۲۲۵ (۱۳۹۳)

## القاء کالوس و تراریزش ژنتیکی در ارغوان (*Cercis griffithii* Boiss.) به کمک آگروباکتریوم تومه فاشینس

نقی شعبانیان<sup>۱</sup>، مونا نصری<sup>۲</sup> و محمدشفیع رحمانی<sup>۳\*</sup>

۱- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

۲- کارشناس ارشد، جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

۳- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی گیاهی، آزمایشگاه بیولوژی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

پست الکترونیک: m.rahmani@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۷

### چکیده

ارغوان (*Cercis* spp.) به دلیل ارزش زیبایی‌شناختی، در جنگل‌داری شهری از اهمیت بالایی برخوردار است، اما برخی صفات نامطلوب استفاده از آن را با محدودیت مواجه کرده‌اند که می‌توان آنها را از طریق مهندسی ژنتیک اصلاح کرد. در این مطالعه، ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای ارغوان در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد به منظور القاء کالوس کشت شدند. سویه‌های EHA105 و AGL1 آگروباکتریوم تومه فاشینس با پلاسمید pCAMBIA2301 ناقل ژن‌های *nptII* و *gus*، به ترتیب عامل ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و تولیدکننده پروتئین آنزیمی گزارشگر  $\beta$ -گلوکورونیداز، بر پایه دو روش کلرید کلسیم و تریس تراریزش شدند. سپس سلول‌های کالوس و جنین زایگوتی بالغ با تراکم‌های مختلفی از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در دو شرایط خلأ و غیرخلأ تلقیح گردیدند. نتایج نشان داد که افزودن ۲۲/۴ و ۹/۱ میکرومول تو، فور-دی کلروفونوکسی‌استیک اسید (2,4-D) به محیط کشت به ترتیب با ۹۲ و ۹۷ درصد، بهترین نتیجه را برای کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه به دنبال داشت. غلظت بهینه آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای انتخاب بافت و سلول‌های تراریخته تعیین شد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از سویه AGL1 با تراکم نوری ۰/۸ در شرایط خلأ بیشترین درصد تراریختی بدست آمد. سنجش هیستوشیمیایی ژن گزارشگر و تجزیه و تحلیل مولکولی، ادغام ژن انتقالی در ژنوم شاخساره‌های حاصل از رشد جنین و کالوس القاء شده از این شاخساره‌ها را تأیید کرد. سیستم تراریزش آگروباکتریومی که برای اولین بار در این گزارش توصیف شده است می‌تواند مسیری کارآمد را برای تولید درختان *C. griffithii* تراریخت با استفاده از جنین زایگوتی به عنوان ریزنمونه ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: کشت درون‌شیشه‌ای، آگروباکتریوم تومه فاشینس، بیان ژن *gus*، کانامایسین.

### مقدمه

واقع در مناطق معتدله شمالی از جنوب اروپا تا آسیا و آمریکای شمالی را شامل می‌شود (Cheong & Pooler, 2003). گونه‌های این جنس به دلیل برخوردارگی از

جنس *Cercis* (Fabaceae) که معمولاً به اسم ارغوان شناخته شده است، تقریباً ۱۰ گونه درختی و درختچه‌ای

از ناقل‌های آگروباکتریومی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تراریزش ژنتیکی دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. رخدادهای اولیه انتقال T-DNA به داخل ژنوم سلول‌های گیاه میزبان از طریق تشخیص هیستوشیمیایی فعالیت ژن گزارشگر  $\beta$ -گلوکورونیداز (gus) تأیید می‌شود. ابداع ناقل دوتایی تراریزش حامل ژن شیمری گزارشگر که در آن توالی رمزشونده gus به‌وسیله یک اینترون قطع شده است، این اطمینان را به‌وجود آورد که فعالیت آنزیمی ژن گزارشگر به جای سلول‌های باکتریایی در داخل سلول‌های گیاه میزبان انجام گیرد (Vancanneyt et al., 1990). با استفاده از تکنیک سنجش سریع فعالیت آنزیم گزارشگر gus، ارزیابی سریع اهمیت پارامترهای مختلف اعمال‌شده برای بهینه‌کردن تراریزش و انتقال T-DNA به ریزنمونه‌ها و سلول‌های میزبان امکان‌پذیر شد. تراریزش ژنتیکی به‌کمک آگروباکتریوم به‌طور مؤثر برای مهندسی ژنوم بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌منظور دستیابی به صفات مطلوب به‌کار گرفته شده است (Gelvin, 2009). این سیستم به‌دلیل ادغام تعداد کمتری ژن انتقالی به داخل ژنوم میزبان، پایداری ژن انتقالی در سلول‌های میزبان و کارایی بالای تراریزش، به دیگر روش‌های تراریزش ژنتیکی همانند بمباران ذره‌ای و الکتروپوراسیون ترجیح داده می‌شود (Dai et al., 2001; Travella et al., 2005). هدف از این مطالعه، بهینه‌کردن شرایط مختلف کالوس‌زایی و تراریزش ژنتیکی ارغوان به‌کمک آگروباکتریوم تومه‌فاشینس ناقل پلاسمید حامل ژن گزارشگر gus بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

بذر درخت ارغوان از جنگل‌های پل‌دختر ملاوی واقع در استان لرستان جمع‌آوری، و تا زمان استفاده در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. به‌منظور شکستن خواب، بذرها به مدت ۹۰ دقیقه با اسید سولفوریک غلیظ (۹۷-۹۵ درصد) تیمار شدند (Schopmeyer, 1974). پس از شکستن خواب و

شکوفه‌های ارغوانی‌رنگ در اوایل بهار، برگ‌های قلبی شکل و سازگاری با شرایط محیطی متنوع، در جنگل‌داری شهری از ارزش زیباشناختی بالایی برخوردارند. افزون بر این، گونه‌های این جنس دامنه بردباری وسیعی به نور دارند، به‌طوری‌که نور کامل تا سایه را به‌خوبی تحمل می‌کنند (Distabanjong & Geneve, 1997). از دیگر مزایای این گونه می‌توان به قابلیت رشد سریع در خاک‌های مختلف، امکان فرم‌دهی مناسب (هرس) و مقاومت بالا به آلودگی‌های محیطی اشاره کرد (Cheong & Pooler, 2003). با وجود این مزایا، حساسیت ارغوان به آلودگی قارچ *Botryosphaeria ribis* عامل بیماری شانکر، آسیب‌پذیری از آفات مختلف تغذیه‌کننده از شاخ و برگ آن در اواخر تابستان (مانند شپشک‌های برگ‌خوار همانند *Callirhopalus bifasciatus*) و دشوار بودن تکثیر کلنی انبوه آن از عوامل محدودکننده استفاده وسیع از این گونه به‌شمار می‌روند (Distabanjong & Geneve, 1997). بنابراین، اصلاح ژنتیکی در راستای برطرف کردن موانع و محدودیت‌های این گونه ضروری به‌نظر می‌رسد. برنامه‌های سنتی اصلاح ژنتیکی به‌دلیل طولانی بودن مرحله جوانی در بسیاری از درختان کند پیش می‌روند. تراریزش ژنتیکی به‌عنوان رویکردی نوین و کارآمد، می‌تواند برای ایجاد تغییرات اختصاصی و سریع در ژنوتیپ یا ژنوتیپ‌های هدف بدون به‌هم خوردن زمینه ژنتیکی آنها به‌کار گرفته شود (Shuerman & Dandekar, 1993). در راستای حل مشکلات مشابه در دیگر گونه‌های مهم چوبی با استفاده از تکنیک‌های تراریزش ژنتیکی یافته‌های ارزشمندی گزارش شده است (Strauss et al. 1995; Li et al. 2003; Li et al., 2007). با وجود این، تاکنون تراریزش موفق ژنتیکی در ارغوان گزارش نشده است. البته با بهینه‌کردن تکنیک‌های کشت بافت و شرایط لازم برای تراریزش به‌کمک آگروباکتریوم تومه‌فاشینس، باززایی گیاه تراویخت در این گونه مهم نیز به‌مانند بسیاری از گونه‌های مهم اقتصادی همانند صنوبر ممکن می‌شود.

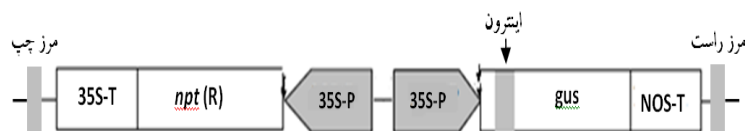
### سویه‌های آگروباکتریوم تومه‌فاشینس

برای انجام آزمایش‌های تراریختی از سویه‌های C58C1, EHA105 و AGL1 آگروباکتریوم تومه‌فاشینس استفاده شد. دو سویه EHA105 و AGL1 ابتدا فاقد پلاسمید دارای ژن *gus* بودند و با استفاده از ناقل دوتایی (CAMBIA, Canberra, pCAMBIA2301) [www.cambia.org](http://www.cambia.org) حامل ژن *gus* استخراج شده از سویه C58C1 بر پایه دو روش استفاده از  $\text{CaCl}_2$  یا Tris-HCL تراریزش شدند. ناحیه T-DNA این پلاسمید دو ژن تئومایسین فسفوترانسفراز (*nptII*) بخشنده مقاومت به سلول‌های گیاهی در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Kan) و ژن گزارشگر هیستوشیمیایی  $\beta$ -گلوکورونیداز (*gus*)، که ناحیه رمزشونده آن به واسطه یک توالی اینترونی قطع شده است، را حمل می‌کند (شکل ۱). کشت‌های باکتریایی سویه‌های C58C1, EHA105 و AGL1 به منظور هم‌کشتی با سلول‌های گیاهی، به طور جداگانه در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (Rif) و Kan کشت شدند. این کشت‌ها تا دستیابی به تراکم نوری  $0.8 \pm 0.1$  (OD<sub>600</sub>) تا ۱ بر روی شیکر افقی (۱۸۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۸°C رشد داده شدند. به منظور تهیه تراکم‌های مختلف، این کشت‌ها با استفاده از محیط LB رقیق گردیدند. قبل از هم‌کشتی باکتری‌ها با سلول‌های گیاهی، به سوسپانسیون‌های باکتریایی استوسیرنگان (SIGMA-ALDRICH با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومول (Takeshi *et al.*, 1997) افزوده شد.

شستشوی آنها با آب در حال جریان به مدت ۲۰ دقیقه، بذرها در هیپوکلریدسدیم ۲۰ درصد همراه با چند قطره تون-۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه به صورت سطحی ضدعفونی و به دنبال آن سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس در محیط استریل ابتدا با غوطه‌ور کردن در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه، پس از آن در هیپوکلریدسدیم ۲۰ درصد به مدت ۳ دقیقه و در نهایت سه بار شستشو (هر بار به مدت حداقل ۳ دقیقه) با آب مقطر، بذرها ضدعفونی گردیدند. به منظور تولید گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای، بذرها ضدعفونی شده در شیشه‌های کشت حاوی ۳۵ میلی‌لیتر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) بدون هورمون، در دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی کشت شدند.

### القاء کالوس

برای القاء کالوس ریزنمونه‌های ۸ تا ۱۰ میلی‌متری ساقه و کوتیلدون گیاهچه‌های ۱۰-۷ روزه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد تو، فوردی کلروفوکسی‌استیک اسید (2,4-D) (۴/۵، ۹/۱، ۱۷/۹ و ۲۲/۴ میکرومول) یا نفتالن‌استیک اسید (NAA) (۵/۴، ۱۰/۸، ۲۱/۶ و ۲۶/۵ میکرومول) به تنهایی یا در ترکیب با ۴/۴ میکرومول بنزیل‌آدنین (BA) کشت شدند. تیمارها در قالب ۸ تکرار با ۵ ریزنمونه در هر تکرار بر پایه طرح کاملاً تصادفی اعمال شدند. همه کشت‌ها در دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، نگهداری و پس از گذشت ۴ هفته از زمان کشت، میانگین تعداد و میانگین وزنی کالوس‌های القاء شده از هر تیمار ثبت شد.



شکل ۱- ساختار خطی ناحیه T-DNA پلاسمید pCAMBIA2301

ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌متری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بر لیتر محیط کشت LB غوطه‌ور، و به مدت ۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۸°C بر روی شیکر افقی (۱۰۰ دور در دقیقه) قرار

هم‌کشتی ریزنمونه‌های کالوس و جنین زایگوتی با آگروباکتریوم ریزنمونه‌های کالوس (قطعات با قطر ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌متر) و جنین‌های بالغ زایگوتی به طور جداگانه در

قرار گرفتند. بافت‌های گیاهی رنگ‌آمیزی شده سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد کلروفیل‌زدایی شدند. تعداد بافت‌های متمایز شده از ریزنمونه‌ها که حداقل در یک نقطه رنگ آبی به خود گرفته بودند، به صورت درصد از کل ریزنمونه‌های هم‌کشت شده برای هر یک از تیمارهای مورد بررسی ثبت شد. در تمامی بررسی‌ها، بافت‌های متمایز شده غیر تراریخت نیز به عنوان شاهد در بررسی‌های سنجش هیستوشیمیایی gus در بافر حاوی سوپسترا قرار داده شدند.

### تجزیه PCR

DNA ژنومی ریزنمونه‌های تراریخت، شاخساره‌های تشکیل شده از جنین زایگوتی و کالوس القاء شده از این شاخساره‌ها با استفاده از CTAB و بر پایه روش Keblians و همکاران (۲۰۰۲) با کمی تغییرات استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر نمونه DNA ژنومی (۴۰ نانوگرم)، ۴ میکرولیتر مسترکیت (۱/۸ میلی‌مولار  $Mg^{2+}$ ، ۱۵۰ میکرومولار dNTP و یک واحد تگ پلیمرز)، ۳ میکرولیتر آب دی‌یونیزه، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مسطح‌تقیم (5' - CGATCAGGTCGCCGAGG - 3') و (5' - GGTCGCGGAGGGTATCG - 3') (۱۰ میکرومولار) و ۵ میکرولیتر روغن معدنی با برنامه زیر انجام شد: مرحله ۳ دقیقه‌ای پیش‌گرمای در دمای  $94^{\circ}C$ ، سپس ۳۵ چرخه  $94^{\circ}C$  به مدت ۶۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)،  $63^{\circ}C$  به مدت ۶۰ ثانیه (اتصال) و  $72^{\circ}C$  به مدت ۹۰ ثانیه (سنتز) و سرانجام مرحله بسط نهایی در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت ۱۲ دقیقه (پلیمریزاسیون). محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد تفکیک و DNA تکثیر شده پس از رنگ‌آمیزی با محلول ۰/۱ درصد اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومننت آشکارسازی شد. از خط‌کش ژنی یک کیلوبازی (سیناژن) برای تعیین اندازه نوار تکثیر شده استفاده شد.

داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تراکم‌های نوری مختلف آگروباکتریوم (۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸) انکوبه و پس از آن به مدت ۵ روز در محیط هم‌کشتی (MS + 9.1  $\mu M$  2,4-D + 4.4  $\mu M$  BA + 200  $\mu M$  AS + 8 g  $\Gamma^{-1}$  agar) به منظور بررسی تأثیر نوع سویه بر فراوانی تراریزش، به طور جداگانه با هر یک از سویه‌های باکتریایی هم‌کشت شدند. به منظور بررسی اهمیت شرایط خلأ بر تراریزش، ریزنمونه‌های کالوس و جنین بالغ زایگوتی که به شیوه بالا در محیط کشت LB پیش‌تیمار شده بودند، با سویه AGL1 در تراکم نوری ۰/۸ در دو شرایط وجود خلأ و عدم وجود خلأ تلقیح گردیدند. زنده‌مانی ریزنمونه‌های تلقیح شده در تیمارهای مختلف از طریق قرار دادن آنها در محیط حذف باکتریایی (MS + 9.1  $\mu M$  2,4-D + 4.4  $\mu M$  BA + 500 mg  $\Gamma^{-1}$  Rif + 8 g  $\Gamma^{-1}$  agar) در دمای  $28^{\circ}C$  در تاریکی و بعد ارزیابی رشد آنها تا ۵ هفته بررسی شد. پس از آن ریزنمونه‌ها برای بیان ژن gus نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### تعیین غلظت بهینه آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای انتخاب کالوس و شاخساره تراریخت

برای تعیین غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای انتخاب شاخساره تراریخته احتمالی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (MS + 9.1  $\mu M$  2,4-D + 4.4  $\mu M$  BA + 100  $\mu M$  AS + 8 g  $\Gamma^{-1}$  agar) چهار غلظت صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین انتقال داده شدند. رشد و تمایز کالوس و شاخساره‌های در حال رشد طی یک دوره زمانی ۱ تا ۲ ماهه بر اساس متوقف‌شدن رشد و سرعت از دست رفتن کلروفیل آنها به صورت مشاهده‌ای بررسی شد.

### سنجش هیستوشیمیایی ژن گزارشگر gus

به منظور تشخیص هیستوشیمیایی ژن گزارشگر gus، شاخساره‌های باززایی شده از ریزنمونه‌های هم‌کشت شده و کالوس القاء شده از این شاخساره‌ها به مدت یک شب در دمای  $37^{\circ}C$  در بافر حاوی سوپسترای آنزیم (X-Gluc) بر اساس روش Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) با کمی تغییرات

## کالوس‌زایی ریزنمونه‌های تراریخت شده

پس از رشد گیاهچه‌های تراریخته حاصل از رشد جنین تلقیح‌شده با آگروباکتریوم در محیط رشد انتخابی و تأیید حضور ژن *gus* در ژنوم آنها، از ساقه و کوتیلدون برگی این گیاهچه‌ها به‌عنوان ریزنمونه برای القاء کالوس استفاده شد. ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم + ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، و ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم + ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین کشت، و در دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۴ هفته رشد داده شدند. پس از القاء کالوس، تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی و PCR برای ارزیابی حضور ژن *gus* به‌مانند روش‌های توصیف‌شده در بالا انجام شد.

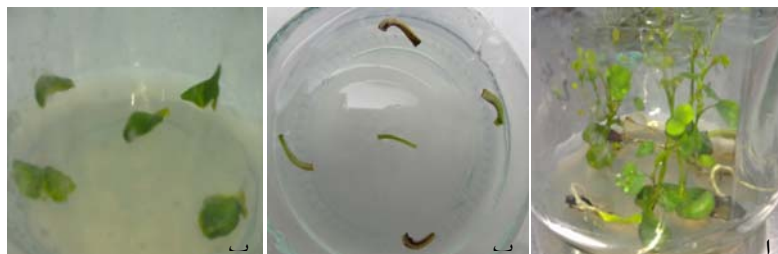
## تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از یادداشت‌برداری مراحل کالوس‌زایی و تراریخت ریزنمونه‌های کالوس و جنین زایگوتی بالغ پس از بررسی نرمال‌بودن با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌های حاصل پس از تأیید همگنی واریانس‌ها، با استفاده از آزمون دانکن انجام گردید.

## نتایج کالوس‌زایی

به‌منظور جوانه‌زنی و تولید گیاهچه مورد نیاز انجام آزمایش‌های مختلف، بذره‌ای تیمار شده با اسید سولفوریک غلیظ پس از ضدعفونی در محیط کشت MS کشت شدند و پس از گذشت یک هفته جوانه زدند (شکل ۲؛ الف). پس از گذشت یک هفته از کشت در محیط‌های کشت کالوس‌زایی (شکل ۲؛ ب، پ)، ریزنمونه‌ها متورم و آغازه‌های کالوس در مناطق برش ریزنمونه‌ها (در ریزنمونه ساقه) و یا کنارها (ریزنمونه‌های کوتیلدونی) نمایان شدند (شکل ۳؛ الف، ت) و با تداوم رشد توده کالوس تشکیل شده (شکل ۳؛ ب، ث) در هفته سوم ریزنمونه‌ها تقریباً به‌طور کامل از توده سلولی پوشیده شدند (شکل ۳؛ پ، ج).

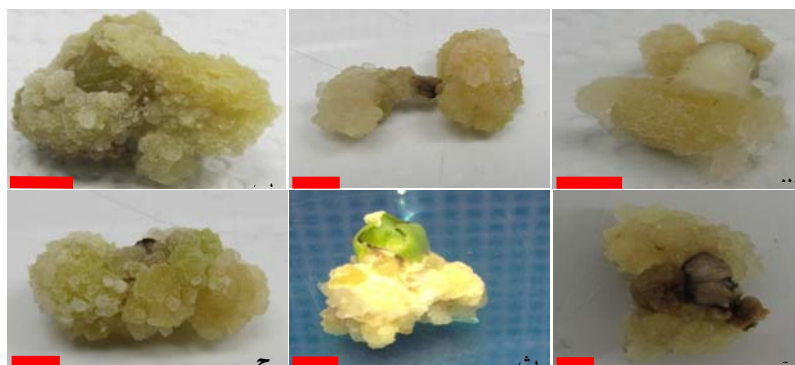
براساس مشاهدات انجام شده، به لحاظ سرعت تشکیل و پیدایش کالوس، بین دو ریزنمونه ساقه و کوتیلدون تفاوت وجود داشت، به‌طوری‌که این سرعت در ریزنمونه‌های ساقه بیشتر بود. چهار هفته پس از کشت ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه در محیط‌های القاء کالوس، پارامترهای درصد کالوس‌زایی و وزن کالوس‌های حاصل از تیمارهای مختلف یادداشت‌برداری شد که در جدول ۱ نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها نشان داده شده است. همانطور که این جدول نشان می‌دهد سطوح مختلف اثرات نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده و اثرات متقابل آنها با هم بر هر دو صفت کالوس‌زایی (درصد) و وزن کالوس‌های به‌دست آمده (گرم) در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).



شکل ۲- رشد گیاهچه حاصل از جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای بذر ارغوان پس از گذشت ۱۰ روز از آغاز کشت (الف) در محیط کشت MS؛ کشت ریزنمونه‌های ساقه (ب) و کوتیلدون (پ) برگرفته از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای

غلظت‌های ۵/۴ و ۱۰/۸ میکرومول NAA در ترکیب با ۴/۴ میکرومول BA کمتر از ۱۵ درصد بود (جدول ۲). علاوه بر این، بیشترین (۱/۴ گرم) و کمترین (۰/۱۵ گرم) میانگین وزنی کالوس‌های القاء شده از ریزنمونه‌های کوتیلدون به ترتیب در محیط‌های کشت برخوردار از ۲۲/۴ میکرومول از 2,4-D به تنهایی، و ۲۶/۵ میکرومول NAA در ترکیب با ۴/۴ میکرومول BA ثبت شد؛ در مقابل بیشترین و کمترین میانگین ثبت شده برای این صفت در ریزنمونه ساقه به ترتیب مربوط به محیط‌های کشت حاوی ۹/۱ میکرومول 2,4-D به تنهایی (۰/۹۱ گرم)، و ۲۶/۵ میکرومول از NAA در ترکیب با ۴/۴ میکرومول BA (۰/۲۱ گرم) بود (جدول ۲).

پس از تأیید فرض همگنی واریانس‌ها، میانگین‌های محاسبه شده با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند (جدول ۲). همانطور که جدول ۲ نشان می‌دهد محیط کشت دارای ۲۲/۴ میکرومول 2,4-D با ۹۷/۵ درصد کالوس‌زایی بیشترین درصد کالوس را از ریزنمونه‌های کوتیلدون باعث شد؛ در مقابل بیشترین کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه (۹۲/۵ درصد) زمانی مشاهده شد که این ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی ۹/۱ میکرومول از همین تنظیم‌کننده کشت شدند. با وجود این، فراوانی کالوس‌زایی در کوتیلدون‌های کشت شده در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۵/۴، ۱۰/۸ و ۲۱/۶ میکرومول NAA در ترکیب با ۴/۴ میکرومول BA، و همچنین در ساقه‌های جوان کشت شده در محیط‌های کشت حاوی



شکل ۳- کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ساقه پس از گذشت یک (الف)، دو (ب) و چهار هفته (پ) در محیط کشت MS حاوی ۹/۱ میکرومول 2,4-D و کوتیلدون پس از گذشت دو (ت)، سه (ث) و چهار هفته (ج) در محیط کشت MS حاوی ۲۲/۴ میکرومول 2,4-D (خط‌کش: ۱۰ میلی‌متر)

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی در ارغوان

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
وزن کالوس	درصد کالوس		
۱/۲۱**	۲۶۲۸/۱**	۱	نوع ریزنمونه
۱۱/۲۴**	۶۹۳۷۸/۱**	۱	نوع تنظیم‌کننده رشد
۰/۸**	۵۰۷۸/۱**	۳	غلظت تنظیم‌کننده رشد
۲/۹**	۱۱۶۲۸/۱**	۱	نوع ریزنمونه × نوع تنظیم‌کننده رشد
۰/۹۱**	۳۹۸۶/۴**	۳	نوع ریزنمونه × غلظت تنظیم‌کننده رشد
۰/۳۳**	۵۲۶۹/۷**	۳	نوع تنظیم‌کننده رشد × غلظت تنظیم‌کننده رشد
۱/۶۹**	۸۳۵۳/۱**	۳	نوع ریزنمونه × نوع تنظیم‌کننده رشد × غلظت تنظیم‌کننده رشد
۰/۰۳	۱۱۴/۷	۱۱۲	خطای آزمایشی
۱۱/۰	۱۸/۸	-	ضریب تغییرات (درصد)

\*\* : معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ۲- میانگین درصد کالوس‌زایی و وزن کالوس‌های القاء شده در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد

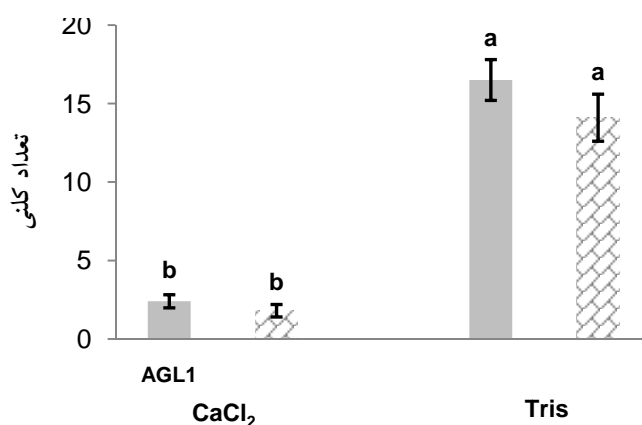
ریزنمونه	تنظیم‌کننده رشد (میکرومول)	درصد کالوس ( $\mu \pm SE$ )	وزن کالوس ( $\mu \pm SE$ )
کوتیلدون	BA+NAA	۴/۴ + ۵/۴	۰/۰۹ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>
		۴/۴ + ۱۰/۸	۰/۱۳ ± ۰/۰۱ <sup>f</sup>
		۴/۴ + ۲۱/۶	۰/۱۱ ± ۰/۰۱ <sup>f</sup>
		۴/۴ + ۲۶/۵	۰/۱۵ ± ۰/۰۴ <sup>ef</sup>
	2,4-D	۴/۵	۰/۲۴ ± ۰/۰۶۶ <sup>def</sup>
ساقه		۹/۱	۰/۶۹ ± ۰/۰۸۱ <sup>c</sup>
		۱۷/۹	۱/۴۰ ± ۰/۱۴۶ <sup>a</sup>
		۲۲/۴	۱/۳۸ ± ۰/۰۸۶ <sup>a</sup>
	BA+NAA	۴/۴ + ۵/۴	۰/۱۰ ± ۰/۰۱ <sup>f</sup>
		۴/۴ + ۱۰/۸	۰/۱۲ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>
		۴/۴ + ۲۱/۶	۰/۳۶ ± ۰/۰۲ <sup>de</sup>
		۴/۴ + ۲۶/۵	۰/۲۱ ± ۰/۰۵ <sup>de</sup>
	2,4-D	۴/۵	۰/۳۹ ± ۰/۰۷ <sup>d</sup>
		۹/۱	۰/۹۱ ± ۰/۱۰ <sup>b</sup>
		۱۷/۹	۰/۲۱ ± ۰/۰۶ <sup>def</sup>
	۲۲/۴	۰/۲۲ ± ۰/۰۵ <sup>def</sup>	

### تراریزش سویه‌های آگروباکتریوم

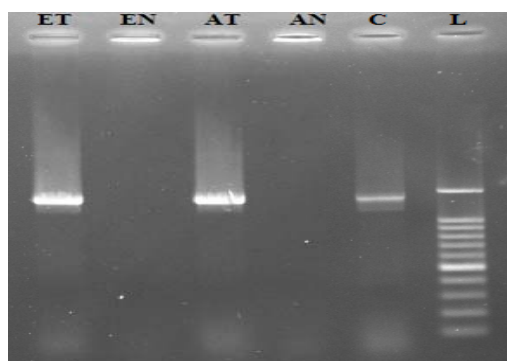
پلاسمید حامل ژن‌های توامایسین فسفوترانسفراز (*nptII*) و  $\beta$ -گلوکورونیداز (*gus*) از سویه C58C1 استخراج شد و سویه‌های EHA105 و AGL1 از طریق دو روش تراریختی (استفاده از کلریدکلسیم یا استفاده از تریس) با آن تراریزش شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سویه‌های تراریزش شده احتمالی در محیط انتخابی، تعداد کلنی‌های رشدیافته شمارش شدند. مقایسه میانگین تعداد کلنی‌های تشکیل شده از دو روش مختلف تراریزش که دارای اختلاف معنی‌دار بود، نشان داد که روش استفاده از تریس برای رشد تعداد کلنی تراریخته بیشتر کارآمدتر است (شکل ۴). تکثیر ژن  $\beta$ -گلوکورونیداز در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود این ژن را در ژنوم سویه‌های تراریخت شده تأیید کرد (شکل ۵).

### تعیین غلظت بهینه عامل گزینش‌گر

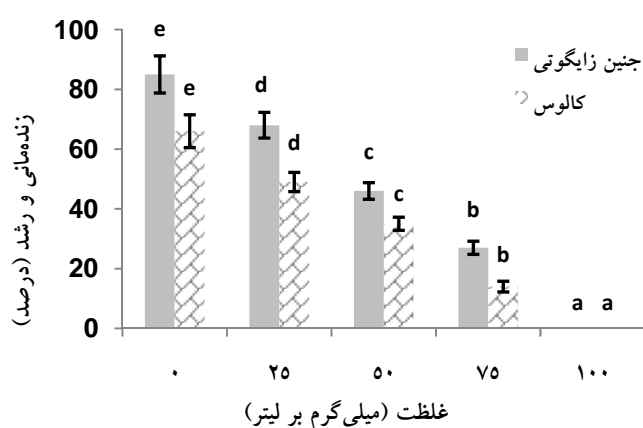
به منظور تعیین غلظت بهینه کانامایسین در محیط کشت برای رشد انتخابی سلول‌های تراریخت شده احتمالی، قطعات کالوس و جنین‌های زایگوتی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین کشت شدند. هنگامی که ریزنمونه‌های جنین زایگوتی تلقیح نشده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین قرار گرفتند، تعداد ریزنمونه‌های قادر به ادامه رشد و تولید یک یا تعداد بیشتری شاخساره از ۸۶ درصد در محیط شاهد حاوی صفر میلی‌گرم بر لیتر، به ۶۸، ۴۶، ۲۷ و صفر درصد به ترتیب در محیط‌های کشت حاوی ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین کاهش یافت (شکل ۶).



شکل ۴- تأثیر دو روش استفاده از کلرید کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) و تریس (Tris) در تراریزش بر فراوانی کلنی‌های تراریخته

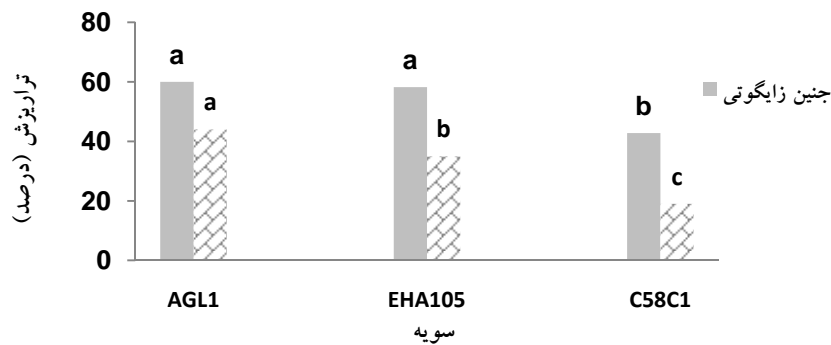


شکل ۵- الکتروفورز محصول Nested PCR تکثیر ژن  $\beta$ -گلوکورونیداز از پلاسמיד سویه‌های باکتریایی تراریخته شده. ET: EHA105 تراریخته؛ EN: EHA105 غیر تراریخته؛ AT: AGL1 تراریخته؛ AN: AGL1 غیر تراریخته؛ C: C58C1 ناقل ژن *gus*؛ L: نشانگر اندازه ۱/۵ کیلوبازی



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف کانامایسین بر رشد ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و کالوس (محیط کشت: MS دارای ۹/۱ یا ۲۲/۴ میکرومول 2,4-D در ترکیب با ۴/۴ میکرومول BA)





شکل ۷- مقایسه میانگین تأثیر نوع سویه آگروباکتریوم تومه فاشینس بر فراوانی ریزنمونه‌های تراریخته

درصد افزایش یافت؛ تلقیح ریزنمونه‌ها با سویه AGL1 تعداد جنین زایگوتی و کالوس تراریزش شده را به ۶۰/۱ و ۴۴ درصد افزایش داد (شکل ۷).

#### اثر شرایط خلأ بر بیان ژن gus در ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و کالوس

تأثیر و اهمیت شرایط خلأ بر توان تراریختی سویه‌های آگروباکتریوم در هم‌کشتی با ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و کالوس القاء شده بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از پمپ خلأ در تراریزش کالوس و جنین‌های زایگوتی، منجر به افزایش معنی‌دار (در سطح احتمال یک درصد) فراوانی تراریزش ریزنمونه‌های جنین زایگوتی از ۴۵/۶ به ۶۰/۴ درصد و ریزنمونه‌های کالوس از ۳۸/۵ به ۵۱/۸ درصد شد (شکل ۸).

#### اثر تراکم سلولی آگروباکتریوم بر بیان ژن gus در ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و کالوس

ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و قطعات کالوس به‌منظور بررسی تأثیر تراکم سلولی آگروباکتریوم در سوسپانسیون باکتریایی با تراکم‌های سلولی متفاوت در شرایط خلأ تلقیح شدند. هنگامی که تراکم سلولی سوسپانسیون سویه AGL1 ۰/۴ بود، فقط ۱۸ درصد از قطعات تلقیح شده کالوس و ۴۲ درصد از ریزنمونه‌های جنین زایگوتی نسبت به تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی gus رنگ آبی به خود گرفتند. با افزایش تراکم سلولی آگروباکتریوم، بر فراوانی کالوس یا ریزنمونه‌های جنین

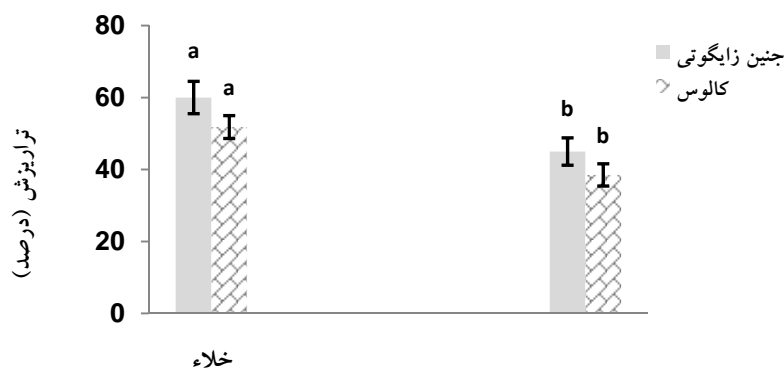
به‌طور مشابه، با کشت قطعات کالوس در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، فراوانی ریزنمونه‌های در حال رشد از ۶۶ درصد در محیط عاری از این آنتی‌بیوتیک، به ۴۹، ۳۵، ۱۴ و ۰ درصد به ترتیب در محیط‌های کشت دارای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین کاهش یافت (شکل ۶). با وجود این، غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این آنتی‌بیوتیک در محیط کشت انتخابی، علاوه بر توقف رشد منجر به قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها شد. بدین ترتیب، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت برای انتخاب ریزنمونه‌های هم‌کشت‌شده انتخاب شد.

#### اثر نوع سویه آگروباکتریوم بر بیان ژن gus در ریزنمونه‌های جنین زایگوتی و کالوس

جنین‌های زایگوتی (۲۵۰ ریزنمونه) و قطعات کالوس (۱۰۰ ریزنمونه) با استفاده از سه سویه EHA105، C58C1 و AGL1 آگروباکتریوم تومه فاشینس به‌منظور پی‌بردن به کارآمدترین آنها به‌لحاظ توان تراریختی، در تراکم‌نوری ۶۰۰/۸ و در شرایط خلأ تلقیح شدند. نتایج نشان داد که نوع سویه بر فراوانی کالوس‌ها و جنین‌های زایگوتی تراریخته به‌طور معنی‌داری موثر است. هنگامی که این ریزنمونه‌ها با سویه C58C1 تلقیح شدند، فراوانی تراریزش در ریزنمونه‌های جنین زایگوتی ۴۲/۸ و در ریزنمونه‌های کالوس ۱۹ درصد بود؛ این فراوانی در جنین‌های زایگوتی تلقیح‌شده با سویه EHA105 به ۵۸/۲ درصد و در ریزنمونه‌های کالوس به ۳۵

زایگوتی دارای رنگ آبی ناشی از دریافت ژن  $\beta$ -گلوکورونیداز افزوده شد، به طوری که تلقیح ریزنمونه‌ها در تراکم نوری ۰/۸ منجر به افزایش این فراوانی تا ۴۸/۶ درصد در ریزنمونه‌های کالوس و ۶۵/۴ درصد در ریزنمونه‌های جنین

زایگوتی شد (شکل ۹). البته در این آزمایش تراکم‌های بیشتر آگروباکتریوم مورد بررسی قرار نگرفتند، زیرا تراکم‌های خیلی بالا منجر به بیش‌رشد باکتری‌ها بر روی ریزنمونه‌ها و به دنبال آن کاهش توان رشد ریزنمونه‌ها می‌شد.

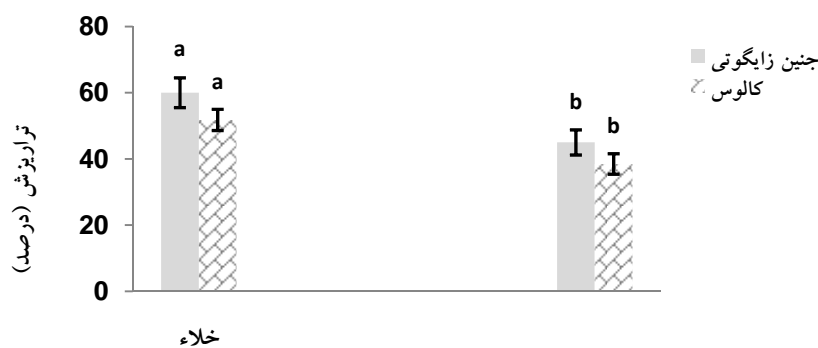


شرايط تراریزش

۲۸ روز از کشت، فقدان توان ریزنمونه‌های غیرترایخت برای ادامه رشد در محیط انتخابی با توقف رشد آشکار گردید. ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه حاصل از گیاهچه‌های تراریخت احتمالی برای القاء کالوس در محیط کشت MS حاوی ۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم کشت شدند. پس از گذشت ۴ هفته کالوس‌های تراریخته احتمالی، برای تأیید تراریختی به صورت هیستوشیمیایی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند

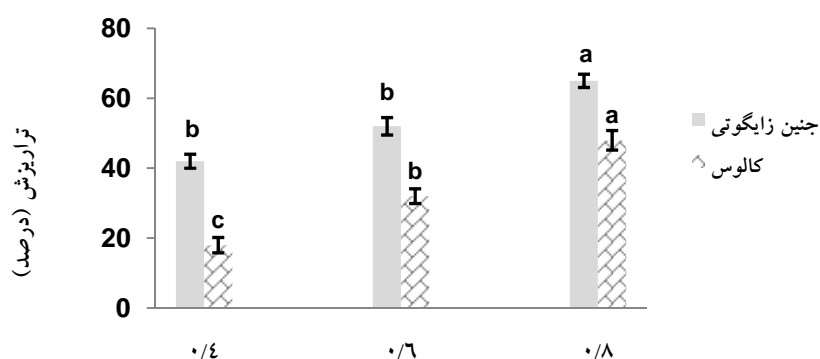
#### باززایی شاخساره از جنین زایگوتی تراریخته و القاء کالوس از شاخساره‌های تشکیل شده

پس از تلقیح ریزنمونه‌های جنین زایگوتی با سویه AGL1 آگروباکتریوم تومه‌فاشینس در تراکم نوری ۰/۸ و در شرایط خلأ، ریزنمونه‌ها در محیط هم‌کشتی کشت، و پس از ۴۸ ساعت به محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم انتقال داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل، و بعد از این دوره بر روی محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین کشت گردیدند. پس از گذشت



شرايط تراریزش

شکل ۸- مقایسه میانگین فراوانی ریزنمونه‌های تراریخته در دو شرایط خلأ و بدون خلأ

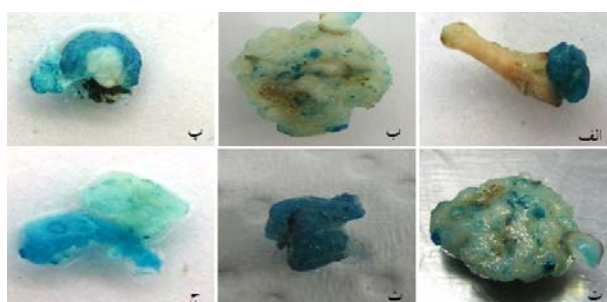


تراکم نوری ۶۰۰

شکل ۹- مقایسه میانگین تأثیر تراکم‌های مختلف سویه AGL1 آگروباکتریوم بر فراوانی ریزنمونه‌های تراریخته



شکل ۱۰- تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی گیاهچه‌های تراریخته در حضور سوبسترای X-Gluc. الف- گیاهچه‌های تراریخت شده با سویه C58C1 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ؛ پ- گیاهچه‌های تراریخت شده با سویه EHA105 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ؛ ت- گیاهچه‌های تراریخت شده با سویه AGL1 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ

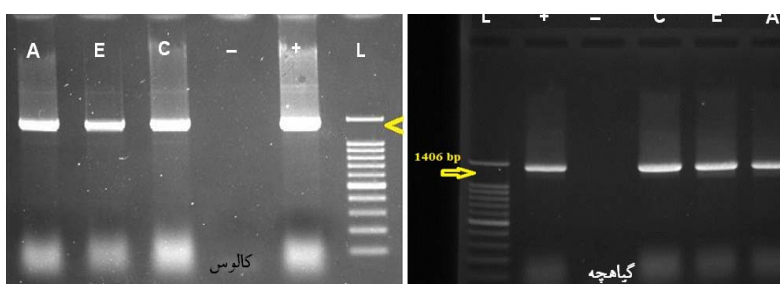


شکل ۱۱- فعالیت پروتئین آنزیمی در کالوس القاء شده از گیاهچه‌های تراریخت در حضور سوبسترای X-Gluc. الف- ب) با استفاده از سویه C58C1 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ؛ پ- ت) با استفاده از سویه EHA105 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ؛ ت- ج) با استفاده از سویه AGL1 به ترتیب در شرایط خلأ و غیرخلأ

تراریخته و کالوس القاء شده از آنها از طریق تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن  $\beta$ -گلوکورونیداز انجام شد. با توجه به اندازه قطعه هدف تکثیر اختصاصی آغازگرها، یک قطعه تقریباً ۱۴۰۶ جفت‌بازی تکثیر شد. شکل ۱۲ نوار حاصل از این تکثیر را پس از الکتروفورز محصول PCR و آشکارسازی از طریق رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد.

### تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخته

برای تأیید حضور ژن *gus* در ژنوم گیاهچه‌های حاصل از رشد ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های مختلف باکتریایی، آنالیز هیستوشیمیایی این گیاهچه‌ها (شکل ۱۰) و کالوس‌های حاصل از آنها (شکل ۱۱) در حضور سوبسترای آنزیم  $\beta$ -گلوکورونیداز یعنی X-Gluc انجام شد. علاوه بر تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی، تأیید مولکولی حضور ژن *gus* پس از استخراج DNA از گیاهچه‌های



شکل ۱۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *gus* از DNA گیاهچه تراریخته شده و کالوس حاصل از آن؛ L: نشانگر اندازه ۱/۵ کیلوبازی؛ +: کنترل مثبت (محصول PCR از پلاسمید ناقل ژن *gus*)؛ -: کنترل منفی (بافت غیر تراریخته)؛ C, E, و A: به ترتیب نوار تکثیر شده ژن *gus* از DNA بافت تراریخته شده با سویه *EHA105*, *C58C1* و *AGL1*

### بحث

میکرومول ثبت شد. در این مطالعه، با افزایش غلظت 2,4-D به بیشتر از ۹/۱ میکرومول درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه کاهش یافت. عقیده بر این است که کاهش کالوس‌زایی در غلظت‌های بالای این تنظیم‌کننده رشد می‌تواند ناشی از خاصیت علف‌کشی آن باشد (Lim et al., 2009). مقایسه درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه در محیط‌های کشت نشان داد که ریزنمونه‌های کوتیلدون با تفاوت معنی‌داری نسبت به ریزنمونه‌های ساقه کالوس‌زایی بیشتری داشتند (جدول ۱). در ارتباط با وزن کالوس‌ها نیز، بر اساس نتایج این تحقیق کالوس‌های حاصل از ریزنمونه کوتیلدون با تفاوت معنی‌داری نسبت به کالوس‌های حاصل از ساقه از وزن بیشتری برخوردار بودند (جدول ۱)، به طوری که بیشترین وزن، در کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های کوتیلدونی و در حضور ۲۲/۴ میکرومول 2,4-D مشاهده شد (جدول ۱).

نتایج تجزیه و آریانس داده‌های القاء کالوس از ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه برگرفته از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای نشان داد که تأثیر نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده و همچنین اثر متقابل آنها بر القاء کالوس و وزن کالوس‌های القاء شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). در مورد تأثیر غلظت اکسین‌های مورد استفاده در القاء کالوس، نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های مساوی، در حضور NAA کمتر از 2,4-D بود (جدول ۲). در محیط‌های کشت دارای اکسین NAA بیشترین فراوانی کالوس‌زایی (۱۷/۵ درصد) در محیط دارای ۲۱/۶ میکرومول مشاهده شد. در مقابل، در تمامی غلظت‌های 2,4-D کالوس‌زایی مشاهده شد، در این تنظیم‌کننده رشد بیشترین درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت دارای ۹/۱ میکرومول و از ریزنمونه‌های کوتیلدون در حضور ۲۲/۴

در تراریزش دو سویه AGL1 و EHA105 آگروباکتریوم تومه فاشینس تأثیر روش تراریزش (کلرید کلسیم و تریس) بر فراوانی کلنی‌های تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های حاصل از استفاده از تریس به طور معنی‌داری بیشتر از روش کلرید کلسیم بود (شکل ۴). از تریس برای تراریزش و تولید سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شده است (Hofgen *et al.*, 1988). تأثیر متفاوت تریس و کلرید کلسیم بر نفوذپذیری دیواره سلولی سویه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است (Chen *et al.*, 1994).

در هر فرایند تراریختی ضروری است تا غلظت مناسب عامل انتخابی برای گزینش سلول‌ها و بافت‌های تراریخته تعیین شود (Li *et al.*, 2007). در این مطالعه توان زنده‌مانی ریزنمونه‌های تراریخت نشده ارغوان با غلظت‌های مختلف کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین (عامل انتخابی) برای توقف رشد و مرگ سلول‌های غیرتراریخت کافیست. بدین ترتیب، می‌توان گفت که مقاومت سلول‌های ارغوان نسبت به کانامایسین بالا بود. مقاومت بالا به کانامایسین در بیشتر گونه‌های چوبی به خصوص گونه‌های خانواده لگومینوزه و *Fabaceae* مشاهده شده است؛ به‌عنوان مثال، برای انتخاب تراریخت‌ها افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این آنتی‌بیوتیک در برخی گونه‌ها همانند *Robinia pseudoacacia* و *Acacia mangium* گزارش شده است (Igasaki *et al.*, 2000; Xie & Hang, 2001). این در حالیست که سلول‌های بسیاری از گونه‌ها همانند *Platanus acerifolia* توانایی باززایی خود را در غلظت‌های بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین از دست می‌دهند (Li *et al.*, 2007).

در رابطه با تأثیر نوع سویه باکتری بر میزان تراریزش ریزنمونه‌های ارغوان، نتایج نشان داد که کارآمدی تراریزش سویه C58C1 در ریزنمونه‌های جنین و زایگوتی کالوس با اختلاف معنی‌داری کمتر از دو سویه AGL1 و EHA105 بود (شکل ۷). با وجود این، تفاوت اثرگذاری دو سویه در تراریزش بر روش تراریزش (کلرید کلسیم و تریس) بر فراوانی کلنی‌های تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های حاصل از استفاده از تریس به طور معنی‌داری بیشتر از روش کلرید کلسیم بود (شکل ۴). از تریس برای تراریزش و تولید سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شده است (Hofgen *et al.*, 1988). تأثیر متفاوت تریس و کلرید کلسیم بر نفوذپذیری دیواره سلولی سویه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است (Chen *et al.*, 1994).

در هر فرایند تراریختی ضروری است تا غلظت مناسب عامل انتخابی برای گزینش سلول‌ها و بافت‌های تراریخته تعیین شود (Li *et al.*, 2007). در این مطالعه توان زنده‌مانی ریزنمونه‌های تراریخت نشده ارغوان با غلظت‌های مختلف کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین (عامل انتخابی) برای توقف رشد و مرگ سلول‌های غیرتراریخت کافیست. بدین ترتیب، می‌توان گفت که مقاومت سلول‌های ارغوان نسبت به کانامایسین بالا بود. مقاومت بالا به کانامایسین در بیشتر گونه‌های چوبی به خصوص گونه‌های خانواده لگومینوزه و *Fabaceae* مشاهده شده است؛ به‌عنوان مثال، برای انتخاب تراریخت‌ها افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این آنتی‌بیوتیک در برخی گونه‌ها همانند *Robinia pseudoacacia* و *Acacia mangium* گزارش شده است (Igasaki *et al.*, 2000; Xie & Hang, 2001). این در حالیست که سلول‌های بسیاری از گونه‌ها همانند *Platanus acerifolia* توانایی باززایی خود را در غلظت‌های بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین از دست می‌دهند (Li *et al.*, 2007).

در رابطه با تأثیر نوع سویه باکتری بر میزان تراریزش ریزنمونه‌های ارغوان، نتایج نشان داد که کارآمدی تراریزش سویه C58C1 در ریزنمونه‌های جنین و زایگوتی کالوس با اختلاف معنی‌داری کمتر از دو سویه AGL1 و EHA105 بود (شکل ۷). با وجود این، تفاوت اثرگذاری دو سویه در تراریزش بر روش تراریزش (کلرید کلسیم و تریس) بر فراوانی کلنی‌های تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های حاصل از استفاده از تریس به طور معنی‌داری بیشتر از روش کلرید کلسیم بود (شکل ۴). از تریس برای تراریزش و تولید سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شده است (Hofgen *et al.*, 1988). تأثیر متفاوت تریس و کلرید کلسیم بر نفوذپذیری دیواره سلولی سویه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است (Chen *et al.*, 1994).

در تراریزش دو سویه AGL1 و EHA105 آگروباکتریوم تومه فاشینس تأثیر روش تراریزش (کلرید کلسیم و تریس) بر فراوانی کلنی‌های تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های حاصل از استفاده از تریس به طور معنی‌داری بیشتر از روش کلرید کلسیم بود (شکل ۴). از تریس برای تراریزش و تولید سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شده است (Hofgen *et al.*, 1988). تأثیر متفاوت تریس و کلرید کلسیم بر نفوذپذیری دیواره سلولی سویه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است (Chen *et al.*, 1994).

در هر فرایند تراریختی ضروری است تا غلظت مناسب عامل انتخابی برای گزینش سلول‌ها و بافت‌های تراریخته تعیین شود (Li *et al.*, 2007). در این مطالعه توان زنده‌مانی ریزنمونه‌های تراریخت نشده ارغوان با غلظت‌های مختلف کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین (عامل انتخابی) برای توقف رشد و مرگ سلول‌های غیرتراریخت کافیست. بدین ترتیب، می‌توان گفت که مقاومت سلول‌های ارغوان نسبت به کانامایسین بالا بود. مقاومت بالا به کانامایسین در بیشتر گونه‌های چوبی به خصوص گونه‌های خانواده لگومینوزه و *Fabaceae* مشاهده شده است؛ به‌عنوان مثال، برای انتخاب تراریخت‌ها افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این آنتی‌بیوتیک در برخی گونه‌ها همانند *Robinia pseudoacacia* و *Acacia mangium* گزارش شده است (Igasaki *et al.*, 2000; Xie & Hang, 2001). این در حالیست که سلول‌های بسیاری از گونه‌ها همانند *Platanus acerifolia* توانایی باززایی خود را در غلظت‌های بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین از دست می‌دهند (Li *et al.*, 2007).

در رابطه با تأثیر نوع سویه باکتری بر میزان تراریزش ریزنمونه‌های ارغوان، نتایج نشان داد که کارآمدی تراریزش سویه C58C1 در ریزنمونه‌های جنین و زایگوتی کالوس با اختلاف معنی‌داری کمتر از دو سویه AGL1 و EHA105 بود (شکل ۷). با وجود این، تفاوت اثرگذاری دو سویه در تراریزش بر روش تراریزش (کلرید کلسیم و تریس) بر فراوانی کلنی‌های تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های حاصل از استفاده از تریس به طور معنی‌داری بیشتر از روش کلرید کلسیم بود (شکل ۴). از تریس برای تراریزش و تولید سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شده است (Hofgen *et al.*, 1988). تأثیر متفاوت تریس و کلرید کلسیم بر نفوذپذیری دیواره سلولی سویه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است (Chen *et al.*, 1994).

آگروباکتریومی برای تغییر صفات در این گونه به لحاظ تکنیکی امکان پذیر است.

### منابع مورد استفاده

- Chen, H., Nelson, R.S., Serwood, J.L., 1994. Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques*, 16: 664-670.
- Cheong, E., Pooler, M.R., 2003. Micropropagation of chinese redbud (*Cercis yunnanensis*) through axillary bud breaking and induction of adventitious shoots from leaf pieces. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 39: 455-458.
- Dai, S.H., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S.P., Tian, W.Z., Chen, S.Y., Beachy, R.N., Fauquet, C., 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7:25-33.
- Distabanjong, K.; Geneve, R.L., 1997. Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of eastern redbud. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 247-254.
- Down, R.E., Ford, L., Bedford, S.J., Gatehouse, L.N., Newell, C., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., 2001. Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance. *Transgenic Researches*, 10:223-236.
- Du, N., Pijut, P.M., 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 28: 915-923.
- Gelvin, S.B., 2009. *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiology*, 150:1665-1676.
- GU, X.F., Meng, H.Q.G., Zhang, J.R., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94: 23-32.
- Hofgen, R., Willmitzan, L., 1988. Storage of competent cell for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 6: 9877.
- Igasaki, T., Shinohara, K., Ichikawa, H., Mohri, T., 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell Reports*, 19: 448-453.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., 1987. gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- کارایی تراریزش سلول‌های گیاهی قبلاً گزارش شده است (Gu et al., 2008; Suzuki & Nakano, 2002).
- با استفاده از پارامترهای بهینه شده نوع سویه و تراکم نوری آن، ریزنمونه‌های کالوس و جنین زایگوتی *C. griffitii* در شرایط خلأ با بهره‌گیری از پایش بیان ژن gus با سویه AGL1 تلقیح شدند و بعد در محیط کشت انتخابی دارای کانامایسین قرار داده شدند. غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای متوقف کردن رشد سلول‌های غیرتراریخته مؤثر بود. حضور ژن  $\beta$ -گلوکورونیداز در ژنوم سلول‌های شاخساره‌های حاصل از رشد جنین‌های تراریخته و قطعات کالوس القاء شده از این شاخساره‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن در واکنش تکثیر PCR تأیید شد.
- همچنین ژن گزارشگر gus، به‌عنوان بخشی از قطعه T-DNA، در این بافت‌ها بیان شد. با وجود این، پخش‌شدگی رنگ هیستوشیمیایی در سرتاسر بافت‌های ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با هر یک از سویه‌ها یکدست و یکنواخت نبود؛ افزون بر این، این توزیع در ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با یک سویه با توزیع آن در دیگر سویه‌ها متفاوت بود. با وجود این، به‌طور کلی عقیده بر این است که راه‌انداز بیانی CaMV 35S که بیان ژن گزارشگر gus را در ناحیه T-DNA کنترل می‌کند، به‌صورت فراگیر در همه‌جای بافت‌های تراریخته بیان می‌شود. بنابراین، غیریکنواختی بیان ژن گزارشگر gus در سلول‌های بافت تراریخته ممکن است بیانگر شیمیری شدن بافت تشکیل شده از ریزنمونه تلقیح شده با آگروباکتریوم از طریق سلول‌های چندگانه شرکت‌کننده در تشکیل شاخساره و کالوس، و یا عدم پایداری ژنتیکی قطعه T-DNA در سلول‌های هدف باشد (Down et al., 2001).
- بنابراین در این مطالعه برخی پارامترهای دخیل در تراریزش موفق سلول‌های *C. griffitii* به‌کمک آگروباکتریوم تومیفاشینس بهینه شدند. اگرچه نویسندگان این گزارش موفق به باززایی گیاه کامل از کالوس تراریخته نشدند، اما این نتایج نشان داد که بکارگیری سیستم تراریزش

- Shuerman, P.L., Dandekar, A.M., 1993. Transformation of temperate woody crops: progress and potentials. *Scientia Horticulturae*, 55:101-124.
- Strauss, S.H., Rottmann, W.H., Brunner, A.M., Sheppard, L.A., 1995. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Molecular Breeding*, 1: 5-26.
- Suzuki, S., Nakano, M., 2002. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. *Plant Cell Reports*, 20: 835-841.
- Takeshi, M., Yuzuru, M., Kenji, S., 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphyla* var. japonica). *Plant Science*, 127:53-60.
- Travella, S., Ross, S.M., Harden, J., Everett, C., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23:780-789.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M., 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular Genomes and Genetics*, 220:245-250.
- Xie, D., Hong, Y., 2001. In vitro regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66:167-173.
- Yang, A.F., Duan, X.G., Gu, X.F., Gao, F., Zhang J.R., 2005. Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 83:259-270.
- Jube, S., Borthakur, D., 2009. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the tree-legume *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96: 325-333.
- Keblians, M., Gonzales, G., Chl-Manzanero, B., Infante, D., 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 299-299.
- Li, D.D., Shi, W., Deng, X.X., 2003. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA29-barnase gene. *Tree Physiology*, 23: 1209-1215.
- Li, Z.N., Fang, F., Liu, G.F., Bao, M.Z., 2007. Stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Reports*, 26: 641-650.
- Lim, W., Park, J., Park, S., 2009. Re-evaluation of the effects of growth regulators on callus induction and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated 6-transformation of lettuce. *Acta Physiologia Plantarum*, 10.1007/s11738-010-0699-z.
- Liu, Z.C., Park, B.J., Kanno, A., Kameya, T., 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Molecular Breeding*, 16: 189-197.
- Mannan, A., Syed, T.N., Mirza, B., 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium*. *L. Pakistan Journal of Botany*, 41: 3239-3246.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Schopmeyer, C.S., 1974. Seeds of woody plants in the United States. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook, 450. Washington, DC. 883 p.

## Callus induction and *Agrobacterium tumefaciens*- mediated genetic transformation in redbud (*Cercis griffithii* Boiss.)

N. Shabanian<sup>1</sup>, M. Nasri<sup>2</sup>, and M.-S. Rahmani<sup>3\*</sup>

1- Assoc. Prof., Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, I.R.Iran.

2- M.Sc. Graduate, Forest Ecology and Silviculture, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, I.R.Iran.

3\* - Corresponding author: M.Sc. in Plant Biotechnology, Forest Biology Laboratory, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, I.R.Iran. E-mail: m.rahmani@uok.ac.ir

Received: 02.03.2014

Accepted: 05.17.2014

### Abstract

Redbud (*Cercis* spp.), has a great importance in urban forestry and landscape architect, due to its ornamental values. But its use is hampered by some unfavorable traits that can be improved by genetic engineering. *In vitro* grown of cotyledons and stem explants of redbud were cultured on MS basal medium supplemented with different concentrations of growth regulators for callus induction. EHA105 and AGL1 strains of *Agrobacterium tumefaciens* were transformed with pCAMBIA2301 binary vector, harboring *nptII* and *gus* genes conferring kanamycin (Kan) resistance and reporter enzymatic protein of  $\beta$ -glucuronidase activity, respectively, using calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) and Tris. Calli and zygotic embryo cells were infected with different densities of *Agrobacterium* strains under vacuum and normal conditions. Addition of 22.4 and 9.1  $\mu$ M of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) to medium resulted in the highest 92 and 97% callus induction in cotyledon and stem explants, respectively. Optimum concentration of Kan for selecting of transformed shoot and callus was also detected. The results showed that the highest transformation level can be obtained by OD<sub>600</sub> = 0.8 of AGL1 strain in vacuum condition. Histochemical analysis of reporter gene, and polymerase chain reaction (PCR) analysis confirmed transferring of the transgene from agrobacterium to embryo-derived plantlets and callus induced from regenerated shoots. The *Agrobacterium tumefaciens*-transformation procedure described here for the first time may pave an efficient way for generating transgenic *C. griffithii* trees using zygotic embryos as explants.

**Keywords:** *In vitro* culture, *agrobacterium tumefaciens*, *gus* expression, kanamycin.