نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و پنجم، شماره دوم، ۱۳۹۷
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2018.12960.2166

اثر زمان‌های مایه‌کوبی و غلظت‌های استوسیرینگون بر کارآیی انتقال ژن بتا گلوکورونیداز (GUS) با میانجیگری آگروباکتریوم در گل ژاله (ژربرا) [*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink]

*فرزاد نظری[1]، مرتضی خوشخوی[2]، پژمان آزادی[3] و ایکیو ناکامورا[4]

[1]دانش‌آموخته دکتری گیاهان زینتی، دانشگاه شیراز و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه کردستان، [2]استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، [3]عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRI)، کرج، [4]استاد آزمایشگاه فن‌آوری سلول گیاهی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه چیبا، ژاپن

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۰۸

چکیده

سابقه و هدف: گل ژاله (ژربرا) یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی در جهان است و در صنعت گلکاری رتبه چهارم را در بین ده گل بریدنی برتر دارد. امروزه در گل ژاله روش‌های انتقال ژن قابل اعمال، برای وارد کردن صفات جدید به ژنوتیپ‌های برگزیده بدون تغییر در ویژگی‌های خوب آن، ضرورت دارد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر غلظت‌های استوسیرینگون و نیز زمان‌های مایه‌کوبی بر انتقال ژن بتاگلوکورونیداز (GUS) در گل ژاله با استفاده از آگروباکتریوم انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در سه آزمایش جداگانه انجام شد. ابتدا اثر غلظت‌های متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای تعیین غلظت کشنده آن در گیاهک‌های غیرتراریخت ژاله رقم 'Royal Soft Pink' ارزیابی شد. سپس در آزمایش دوم، اثر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین بر میزان باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک بررسی گردید. در نهایت در آزمایش سوم اثر مدت زمان‌های مایه‌کوبی (۱۰ و ۲۰ دقیقه) و غلظت‌های استوسیرینگون (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) بر کارآیی انتقال ژن بتاگلوکورونیداز (GUS) با میانجیگری آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) و از طریق هم‌کشتی ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک، ارزیابی شد. پس از هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم به‌مدت دو تا ۳ روز، به محیط کشت انگیزش مستقیم شاخساره انتقال یافتند. در ادامه، شاخساره‌های تراریخت احتمالی، از ریزنمونه‌ها جدا گردید و افزونگری آن‌ها انجام شد. در پایان، به‌منظور تأیید گیاهان تراریخت، از آزمون بافت‌شیمیایی و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین برای گزینش شاخساره‌های تراریخت مناسب بوده و باید پس از باززایی اولیه استفاده شود. بیش‌ترین میزان باززایی (۳۸ درصد) شاخساره‌های تراریخت احتمالی از ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک، در تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون به‌دست آمد. همچنین کم‌ترین میزان باززایی (۲۵/۲۵ درصد) شاخساره‌های تراریخت احتمالی، در تیمار ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۵۰ میکرومول استوسیرینگون مشاهده شد. نتایج آزمون بافت‌شیمیایی و تجزیه PCR گیاهک‌های تراریخت، نشان داد که بیش‌ترین شمار رگه مستقل (۲۷ شاخساره) و کارآیی انتقال ژن (۱۱ درصد) به‌ازای هر ۱۰۰ ریزنمونه دمبرگ، مربوط به تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون می‌باشد.

* مسئول مکاتبه: f.nazari433@gmail.com

نتیجه‌گیری: افزودن هیگرومایسین به محیط کشت، سبب کاهش باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک می‌شود. عواملی مانند مدت زمان مایه‌کوبی و غلظت استوسیرینگون اثر چشم‌گیری بر کارایی و موفقیت تراریختی در ژاله دارند. استوسیرینگون به‌عنوان یک انگیزاننده فنولی ژن‌های *Vir* و انتقال‌دهنده T-DNA در آگروباکتریوم در نظر گرفته شده است و سبب افزایش کارآیی تراریختی می‌شود. بنابراین بهترین تیمار برای تولید گیاهان تراریخت در گل ژاله رقم 'Royal Soft Pink' با انتقال ژن GUS، مایه‌کوبی ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک با آگروباکتریوم به‌مدت ۱۰ دقیقه و استفاده از استوسیرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومول می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آزمون بافت‌شیمیایی، باززایی مستقیم شاخساره، ژاله، ژن GUS، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

مقدمه

گل ژاله (ژربرا) با نام علمی *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hooker. F. از تیره کلاهپرک‌سانان[1] با تنوع رنگ بالا (۱۹،۲۳)، یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی در جهان می‌باشد و در صنعت گلکاری پس از رز (ورد)، داوودی و سوسن، رتبه چهارم در بین ده گل بریدنی برتر در حراجی‌های گل کشور هلند در سال ۲۰۱٤ میلادی داشته است (۵). به‌دلیل هتروزیگوسی بالای گل ژاله، هنوز امکان ترکیب یک‌سری از ویژگی‌های موردپسند تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان وجود ندارد و نیز انجام این مهم، با روش‌های سنتی بسیار وقت‌گیر است. بنابراین، استفاده از روش‌های به‌نژادی نوین مانند انتقال ژن با آگروباکتریوم به‌منظور انتقال سریع ژن‌های مسئول ویژگی‌های جدید به ژنوتیپ‌های برگزیده، بدون تغییر در ویژگی‌های مناسب کنونی ضرورت دارد (۱۲). در فرآیند تراریختی، ژن خارجی به درون بافت که دارای هزاران یاخته است، انتقال داده می‌شود و تنها تعداد محدودی از این یاخته‌ها تراریخت‌شده و یا این‌که ژن خارجی به‌صورت پایدار در ژنوم آن‌ها تلفیق می‌شود. بنابراین باید این یاخته‌های تراریخت از غیرترایخت‌ها با استفاده از یک نشانگر انتخابی، جدا شوند (۲۹). نشانگر انتخابی به یاخته‌های تراریخت‌شده اجازه رشد و تکثیر در حضور عامل انتخابی را می‌دهد، در حالی‌که رشد یاخته‌های غیرتراریخت در حضور چنین ترکیباتی، متوقف یا کند می‌شود. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا علف‌کش‌ها، از معمول‌ترین ژن‌های نشانگر انتخابی هستند که در فرایند انتقال ژن استفاده می‌شوند. ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز[2] (*hpt*) یکی از نشانگرهای انتخابی است که سبب افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین می‌شود (۲۱).

افزون بر این، در زمان انتقال ژن باید غلظت عامل انتخابی با دقت انتخاب شود زیرا در غلظت‌های پایین ممکن است تعداد غیرتراریخت‌ها[3] و یا گیاهان بافت ناهمسان (شیمر) را افزایش دهد و یا این‌که در غلظت بالا ممکن است گیاهان تراریخت‌شده با مقاومت متوسط به عامل انتخابی، از بین بروند. گزینش شدید در مراحل اولیه تراریختی ممکن است تعداد شاخساره‌های زنده را کاهش دهد، در حالی‌که گزینش با تاخیر ممکن است تعداد غیرتراریخت‌ها را افزایش دهد (۲۹).آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین به‌عنوان یکی از این عوامل انتخابی، با غلظت زیاد نه تنها سبب از بین رفتن شاخساره‌های غیرتراریخت می‌شود، بلکه سبب کاهش میزان باززایی شاخساره خواهد شد. سان و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که افزودن هیگرومایسین به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت، سبب کاهش باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ یک

1- Asteraceae

2- Hygromycin phosphotransferase (*hpt*)

3- Escapes

گونه درخت سیب[1] خواهد شد (۳٦). همچنین کاستا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند چنان‌چه ریزنمونه‌های محور رویلپه[2] گریپ‌فروت[3] روی محیط کشت دارای ۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین کشت شود، هیچ‌گونه باززایی شاخساره نخواهند داشت (۸). همین پژوهشگران در مقایسه دو آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین و کانامایسین بر میزان باززایی شاخساره در انتقال ژن بتاگلوکورونیداز[4] (GUS) به گریپ‌فروت، دریافتند که هیگرومایسین در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با کانامایسین با غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به‌شدت سبب کاهش باززایی و کاهش تعداد شاخساره‌های با آزمون مثبت GUS خواهد شد (۸). در واقع هیگرومایسین در مقایسه با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کانامایسین، در گزینش یاخته‌های تراریخت خیلی مؤثرتر می‌باشد و یک آنتی‌بیوتیک آمینوسیکلیتول[5] است که با اخلال در فرآیند ترجمه و جابجایی پروتئین‌ها، مانع سنتز پروتئین‌ها می‌شود (١٤). بنابراین با جلوگیری از سنتز پروتئین در بافت‌های گیاهی، سبب زردشدن (کلروزیس) و نیز مانع رشد آن‌ها خواهد شد (۲۱).

با این‌که اثرات عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، محیط کشت، نژاد آگروباکتریوم و نوع پلاسمید، افزودن استوسیرینگون به محیط مایه‌کوبی[6] و هم‌کشتی[7] بر کارآیی تراریختی با میانجیگری آگروباکتریوم در گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۱ و ۲)، اما تاکنون در گل ژاله اثر هر کدام از این عوامل به صورت مشخص، بررسی نشده است. از دیگر عوامل مهم در کارآیی انتقال ژن، مدت زمان مایه‌کوبی می‌باشد. گزارش شده که مدت زمان مایه‌کوبی با اثر بر نحوه آلودگی ریزنمونه‌ها با باکتری و نیز رشد و باززایی ریزنمونه‌ها، کارآیی تراریختی در گیاهان را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۳۵). به‌طور معمول مدت زمان مایه‌کوبی، در بین گونه‌های مختلف گیاهی و نوع بافت مورد استفاده بسیار متغیر است و بسته به گونه گیاهی و عوامل دیگر، اثرات آن بر کارآیی تراریختی متفاوت است. دویر و همکاران (۲۰۱۵) بیش‌ترین کارآیی تراریختی (۸۵ درصد) ژن GUS در یک گونه کوردیلین[8] با مایه‌کوبی ریزنمونه‌های قطعه‌های برگ با آگروباکتریوم در چگالی چشمی[9] (OD) ۰/۸ به‌مدت ٤۰ دقیقه به‌دست آوردند و به‌تدریج با افزایش زمان مایه‌کوبی به ٦۰ دقیقه (۷۰ درصد) و ۹۰ دقیقه (٤۰ درصد)، میزان کارآیی تراریختی کاهش یافت (۱۰). همچنین در پژوهشی دیگر، گزارش شده که مدت زمان مایه‌کوبی یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر کارآیی تراریختی بوده و با افزایش زمان مایه‌کوبی، درصد زنده ماندن ریزنمونه‌ها در زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم کاهش می‌یابد (۱۷). در همین راستا، چاکراوارتی و وانگ- پروسکی (۲۰۱۰) دریافتند با این‌که افزایش زمان مایه‌کوبی و هم‌کشتی سبب کارآیی بیش‌تر تراریختی در سیب زمینی شد، اما آسیب یاخته‌ای و نکروزه شدن آن‌ها و نیز از بین رفتن بافت‌ها هم افزایش یافت (۷).

افزون بر زمان مایه‌کوبی، استوسیرینگون که یکی از ترکیبات فنولی ترشح‌شده از محل زخم‌های موجود در بافت‌های گیاهی است با تحریک فعالیت ژن‌های *Vir A* و *Vir G* در آگروباکتریوم، سبب تسریع در فرآیند تراریختی گیاهان می‌شود (۱۱ و ۲۸). واکنش و پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها به استوسیرینگون، می‌تواند به ژنوتیپ ریزنمونه و شرایط محیط کشت هم‌کشتی بستگی داشته باشد (۲). سوجاتا و همکاران (۲۰۱۲)

1- *Malus baccata*
2- Epicotyl
3- *Citrus paradisi*
4- Beta-glucuronidase
5- Aminocyclitol
6- Inoculation
7- Co-cultivation
8- *Cordyline fruticosa*
9- Optical density

دریافتند که افزودن استوسیرینگون به محیط هم‌کشتی، بر میزان تراریختی ریزنمونه‌های لپه در آفتابگردان اثر دارد و بیش‌ترین میزان تراریختی (۵۱ درصد) در گزینش اول با غلظت ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون به‌دست آوردند (۳۵). پژوهشگران دیگری اثر مثبت استوسیرینگون بر کارآیی تراریختی در گیاهان مختلفی مانند سویا و گل میمون (۱۳)، ذرت (۳۵)، توتون (۳۹)، گریپ‌فروت[1] (٤۰)، کلزا (۳۰)، آفتابگردان (۲۵ و ۳۲) و داوودی (۳۱) گزارش نموده‌اند. همچنین در پژوهشی، استوسیرینگون با افزایش تعداد رخدادهای تراریختی پایدار به‌ازای هر ریزنمونه، سبب افزایش ۲ تا ٤ برابری کارآیی تراریختی در چهار رقم پنبه شده است (۳۸).

البته در مواردی وجود استوسیرینگون نه تنها تأثیر مثبتی بر تراریختی نداشته، بلکه اثر منفی نیز داشته است. به‌عنوان مثال، آلمیدا و همکاران (۲۰۰۳) از قطعه‌های محور رولپه دانهال‌های پرتقال[2] و لیمو ترش ایتالیایی[3]، به‌عنوان ریزنمونه جهت انتقال ژن GUS استفاده کردند. این پژوهشگران در مقایسه محیط‌های هم‌کشتی داری غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون، بهترین نتیجه انتقال ژن GUS را در عدم حضور استوسیرینگون به‌دست آوردند. در واقع اعتقاد داشتند که رها شدن ترکیبات فنولی توسط ریزنمونه‌ها، ممکن است برای آلوده شدن آن‌ها توسط آگروباکتریوم کافی باشد (۲).

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر غلظت‌های استوسیرینگون و نیز زمان‌های مایه‌کوبی بر انتقال ژن بتا گلوکورونیداز (GUS) در گل ژاله رقم 'Royal Soft Pink' با استفاده از آگروباکتریوم انجام شد.

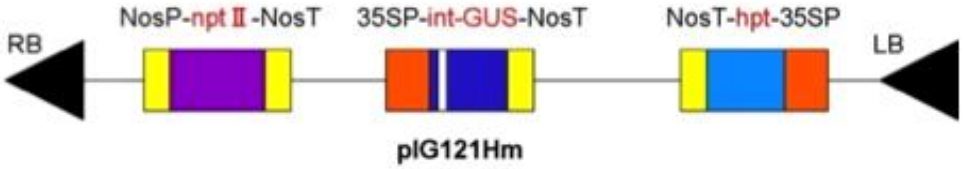
1- *Citrus paradisi*
2- *Citrus sinensis* L.
3- *Citrus limonia*

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دانشگاه چیبا در کشور ژاپن انجام شد. برای انتقال ژن GUS از آگروباکتریوم (*A. tumefaciens*) نژاد *EHA101*، دارای پلاسمید pBI121-Hm (۲٦) با ژن گزارشگر GUS در کنترل پیشبر ویروس موزائیک کلم‌گل (CaMV35S) و ژن‌های نشانگر انتخابی *hpt* و نئومایسین فسفوترانسفراز[4] (*npt II*) استفاده شد (شکل ۱). این پژوهش در سه آزمایش جداگانه انجام شده است. در آزمایش اول، اثر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در قالب طرح کاملاً تصادفی (با ٦ تکرار و هر تکرار یک شیشه کشت با ۲ گیاهک بود) برای تعیین غلظت کشنده آن در گیاهک‌های غیرتراریخت به‌دست آمده از گیاهان درون‌شیشه‌ای دوماهه، پس از چهار هفته ارزیابی شد. در آزمایش دوم، اثر غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین بر درصد باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک[5]، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار (بدون استفاده از هیگرومایسین، استفاده از هیگرومایسین در باززایی دوم و نیز افزودن بی‌درنگ هیگرومایسین به محیط کشت باززایی) در ٦ تکرار (هر تکرار یک پتری‌دیش ۱۰ سانتی‌متری با ۱۰ ریزنمونه بود) انجام شد. همچنین در آزمایش سوم، اثر غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون و نیز دو زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی، بر کارآیی انتقال ژن GUS بررسی شد.

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل (غلظت استوسیرینگون و زمان مایه‌کوبی) و ٦ تکرار که در آن هر تکرار شامل یک پتری‌دیش ۱۰ سانتی‌متری با ۱۰ ریزنمونه دمبرگ دارای پهنک بود، به‌صورت زیر انجام شد.

4- Neomycin phosphotransferase
5- Leafy petiole explants



شکل ۱- پلاسمید دوگانه pIG121-Hm حامل ژن‌های GUS و *hpt* و *nptII* (۲٤).

Figure 1. Binary pIG121-Hm plasmid carrying *GUS*, *hpt* and *nptII* genes.

آماده‌سازی ریزنمونه‌ها، آگروباکتریوم، مایه‌کوبی و هم‌کشتی ریزنمونه‌ها: در این آزمایش از گیاهان درون‌شیشه‌ای (۲ ماهه) تکثیر شده با ریزنمونه نوک شاخساره (۲٤) که در حال پرآوری روی محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) بودند، برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. در زیر هود لامینار، ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک (با طول تقریبی ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی‌متر) از این گیاهان تهیه و با آگروباکتریوم دارای ژن GUS که چگالی چشمی (OD) آن در محلول مایه‌کوبی حدود ۰/۵ تا ۰/٦ بود، تلقیح شدند. محلول مایه‌کوبی شامل محیط کشت مایع MS دارای ۱۰۰ یا ۲۰۰ میکرومول استوسیرینگون، ۱۰ میلی‌مول بافر ۲-(ان-مورفولینو) اتان سولفونیک اسید (MES)[1]، ٤ میلی‌گرم در لیتر BA، یک میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) بود. شیوه انجام مایه‌کوبی بدین گونه بود که ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک را به‌مدت ۱۰ یا ۲۰ دقیقه در محلول مایه‌کوبی فرو برده و در شرایط تاریکی و در دمای اتاق تکان داده شدند. سپس، ریزنمونه‌ها با کاغذ صافی اتوکلاو شده خشک شدند و به‌صورت افقی روی سطح محیط کشت هم‌کشتی (همسان با محیط کشت مایه‌کوبی ولی دارای ۸ گرم در لیتر آگار) به‌مدت ۲ تا ۳ روز و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها از روی محیط کشت جدا کرده و سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده، شسته شدند.

محیط کشت باززایی، گزینش و افزونگری شاخساره‌ها: بر اساس پژوهش پیشین (۲۲)، از محیط کشت MS دارای ٤ میلی‌گرم در لیتر BA، ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA برای باززایی مستقیم شاخساره از انتهای دمبرگ ژاله استفاده شد. بنابراین پس از شستن ریزنمونه‌ها، آن‌ها را به محیط کشت انگیزش و باززایی که افزون بر تنظیم‌کننده‌های رشد یاد شده، دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم‌تری‌هیدرات[2] برای خنثی‌کردن رشد آگروباکتریوم بود، به‌مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در شرایط تاریکی منتقل شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت مشابه با محیط کشت باززایی، ولی دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک گزینشی هیگرومایسین به‌مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در شرایط روشنایی به‌منظور ادامه انگیزش و تشکیل شاخساره و نیز جلوگیری از رشد شاخساره‌های غیرتراریخت انتقال یافتند. در ادامه، شاخساره‌های تراریخت احتمالی[3]، را از انتهای ریزنمونه‌های دمبرگ جدا کرده و افزونگری آن‌ها در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مروپنم تری‌هیدرات در شرایط روشنایی انجام شد.

1- 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid= MES

2- Meropenem trihydrate

3- Putative transgenic shoots

تأیید شاخساره‌های تراریخت: پس از تولید شاخساره‌های تراریخت احتمالی در ریزنمونه‌های تراریخت‌شده با ژن GUS، وجود این ژن در ژنوم آن‌ها با آزمون بافت‌شیمیایی[1] قطعه‌های برگ و نیز تجزیه PCR بررسی شد. آزمون بافت‌شیمیایی مشابه روش جفرسون و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد (۱٦). ابتدا قطعه‌های برگ در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر سنجش GUS که دارای ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۵-برومو-٤-کلرو-۳-ایندولیل بتا-دی-گلوکورونید[2] (X-Gluc)، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات، ۰/۱ درصد تریتون X-100 و ۲۰ درصد متانول با pH=۸ بود، قرار داده شدند. سپس با نگهداری نمونه‌ها در انکوباتور و در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت یک شب، نمونه‌ها با اتانول ۹۸ درصد شسته شدند و از لکه‌های آبی رنگ که توسط فعالیت آنزیم GUS ایجاد شده بودند با میکروسکوپ دوچشم عکس گرفته شد (۱٦).

استخراج DNA برای انجام آزمون PCR با استفاده از روش برندزن و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد (٦). برای تأیید انتقال و تلفیق قطعه ژن GUS، PCR در واکنش‌هایی با حجم ۲۵ میکرولیتری در دستگاه Peltier Thermal Cycler مدل MJ Research PTC-200 انجام شد. مواد مورد نیاز برای انجام یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR: دو میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای ۱۰ میکرومولار رو به جلو: ´ GGT GGG AAA-5´GCG CGT TAC AAG-3 و برگشتی: ´ GTT-5´TAC GCG TTG CTT CCG CCA-3، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، یک تا ۲ میکرولیتر DNA (۲۰-۵۰ ng/µl)، ۱۷/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase تهیه شده از شرکت Takara Shuzo کشور ژاپن بود. واکنش در ۳٦ چرخه‌ای با تنظیمات دمایی ذیل انجام شد: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس و به‌مدت ۳ دقیقه، مرحله واشرسته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس و به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال در دمای ٦۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و مرحله بسط نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مقدار ٦ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر رنگ که شامل ترکیبات ۳۰ درصد گلیسرول، ۰/۲۵ درصد برومو فنول بلو و ۰/۲۵ درصد زایلن سیانول بود، آمیخته و در چاهک‌های ژل ریخته شد و سپس الکتروفورز انجام گردید. پس از پایان الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه Light capture مدل Cooled CCD camera عکس‌برداری انجام شد و با کمک Ladder اندازه DNA (ϕX174/HaeIII و λ/HindIII) اندازه قطعه افزایش یافته، تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در همه آزمایش‌ها برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری MSTAT-C استفاده شد و میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چنددامنه‌ای جدید دانکن مقایسه شدند.

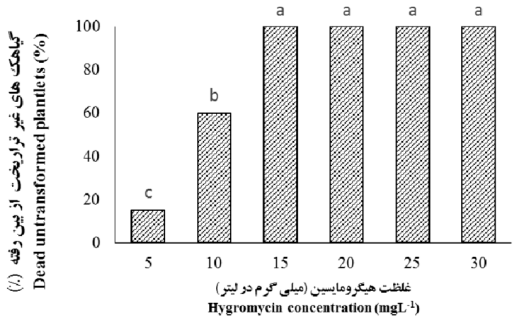
نتایج و بحث

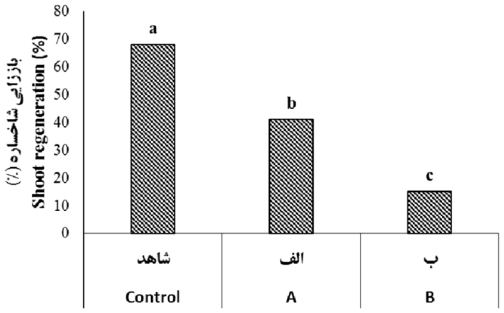
تعیین غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در گیاهک‌های غیرتراریخت: بررسی اثر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای تعیین غلظت کشنده آن در گیاهک‌های غیرتراریخت پس از ٤ هفته از کشت آن‌ها، نشان داد که ۸۵ درصد گیاهک‌های کشت‌شده

1- Histochemical assay
2- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide (X-Gluc)

در محیط کشت MS دارای ۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین سالم ماندند، ولی این میزان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر حدود ٤٠ درصد بود. در غلظت‌های ۱۵ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر همه گیاهک‌های غیرتراریخت از بین رفتند. بنابراین با توجه به این‌که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر حدود ٦٠ درصد شاخساره‌های غیرتراریخت از بین رفتند از این غلظت برای گزینش گیاهان تراریخت از غیرتراریخت، استفاده شد (شکل ۲).

اثر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین بر درصد باززایی شاخساره: با توجه به این که در سازه‌های ژنی GUS و رنگ گل ژن مقاومت به هیگرومایسین وجود داشت، از این آنتی‌بیوتیک با هدف از بین بردن شاخساره‌های غیرتراریخت و جلوگیری از باززایی استفاده شد. نتایج بررسی اثر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین بر میزان باززایی شاخساره نشان داد چنان‌چه پس از هم‌کشتی، بی‌درنگ از آنتی‌بیوتیک در محیط باززایی استفاده شود با نسبت شدیدی مانع باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های دمبرگ شده، ولی چنان‌چه پس از باززایی اولیه و در حدود ۱۲ روز پس از هم‌کشتی استفاده شود، اثر زیان آن کم‌تر می‌شود (شکل ۲). نمونه‌هایی که تراریخت نبودند در محیط کشت باززایی حاوی هیگرومایسین، پس از گذشت چند هفته به رنگ قهوه‌ای در آمدند و از بین رفتند. بنابراین در انتقال ژن‌های GUS از آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱۲ روز پس از باززایی اولیه شاخساره‌ها استفاده شد.





شکل ۲- راست: اثر غلظت‌های مختلف هیگرومایسین بر میزان از بین رفتن گیاهک‌های غیرتراریخت گل ژاله رقم 'Royal Soft Pink' و چپ: اثر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین (الف: استفاده از هیگرومایسین در باززایی دوم و ب: افزودن بی‌درنگ هیگرومایسین به محیط کشت باززایی) همراه با تیمار شاهد (بدون هیگرومایسین) بر میزان باززایی شاخساره‌های تراریخت احتمالی از ریزنمونه‌های دمبرگ در ژاله رقم 'Royal Soft Pink' (حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن است).

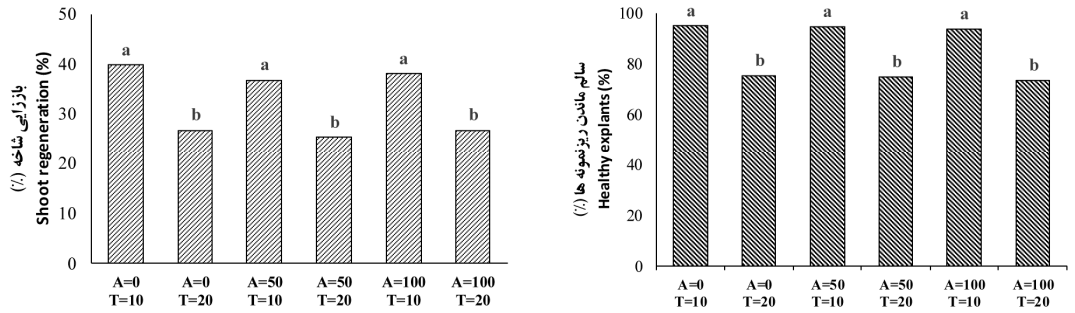
Figure 2. Right: the effect of different concentrations of hygromycin on the amount dying of untransformed plantlets of gerbera cv. Royal Soft Pink and left: the effect of 10 mgL^{-1} concentration of hygromycin (A: the use of hygromycin in second regeneration and B: add immediately of hygromycin to regeneration medium) with control (without hygromycin) treatment on regeneration of putative transgenic shoots from petiole explants in gerbera cv. Royal Soft Pink (different letters indicate significant differences at P<0.05 among all treatments as determined by Duncan's multiple range test.).

هم‌چنان که در پژوهش‌های پیشین آمده است، آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای گیاهان بسیار سمی است و با اخلال در ساخت پروتئین‌ها بر میتوکندری و کلروپلاست بافت‌ها اثر می‌گذارد و سبب کلروزیس (زردی) و نیز جلوگیری از رشد آن‌ها می‌شود. آنزیم هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*) سبب تجزیه هیگرومایسین شده و بنابراین گیاهان تراریخت با وجود هیگرومایسین در محیط کشت سالم می‌مانند (۳۷). همسو با نتایج پژوهش حاضر، آسوات و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که گل داوودی به‌میزان زیادی به هیگرومایسین حساس است و افزودن آن به غلظت ۵ میلی‌گرم در محیط کشت سبب جلوگیری از باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های دمبرگ می‌شود (٤). همچنین در پژوهشی نشان داده شده که هیگرومایسین سبب کاهش و نیز جلوگیری از رشد جوانه‌های سیکلامن ایرانی[1] شده است (٤١). افزون بر این، دای و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که در گل نرگس[2] تمایزیابی ریزنمونه‌ها در محیط کشت دارای هیگرومایسین، خیلی دشوار است (۹).

اثر زمان‌های مایه‌کوبی و غلظت‌های استوسیرینگون بر کارآیی انتقال ژن GUS: نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که اثر برهمکنش مدت زمان تیمار ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم (زمان‌های ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و غلظت استوسیرینگون (غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) بر همه صفات مورد بررسی برای انتقال ژن GUS معنی‌دار بود، بنابراین اثر متقابل آن‌ها بحث خواهد شد و از آوردن اثر ساده این دو تیمار خودداری شد. هم‌چنان که در شکل ۳ آمده است، بیش‌ترین درصد سالم‌ماندن ریزنمونه‌های دمبرگ (۹۵ درصد) پس از مایه‌کوبی با آگروباکتریوم در تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی و بدون استفاده از استوسیرینگون به‌دست آمد، هر چند که با دیگر تیمارهای ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی در برهمکنش با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون معنی‌دار نبود. کم‌ترین میزان سالم ماندن ریزنمونه‌ها، در تیمار ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون مشاهده شد (شکل ۳). بررسی میزان باززایی شاخساره ریزنمونه‌های دمبرگ مایه‌کوبی شده نشان داد که، ریزنمونه‌ها در تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون دارای بیش‌ترین میزان باززایی شاخساره (۳۸ درصد) هستند ولی تنها با تیمارهای ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی معنی‌دار بود. کم‌ترین میزان باززایی شاخساره (۲۵/۲۵ درصد) در تیمار برهمکنش ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی و ۵۰ میکرومول استوسیرینگون به‌دست آمد و با دو تیمار دیگر ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی معنی‌دار نبود (شکل ۳).

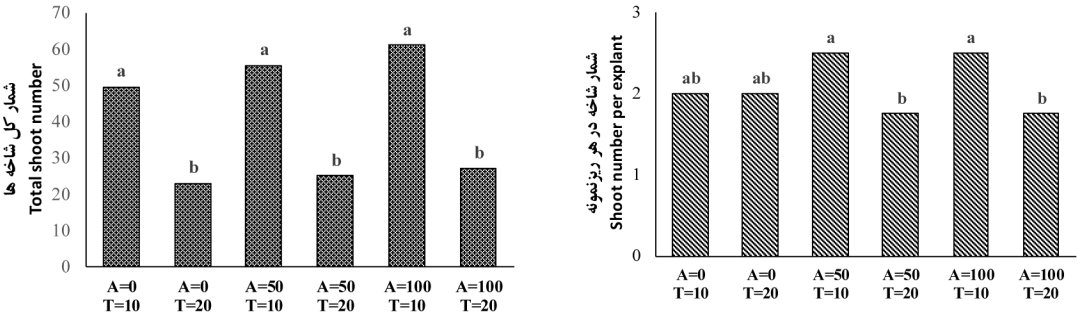
نتایج این پژوهش نشان داد که برهمکنش بین مدت زمان تیمار ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و غلظت استوسیرینگون بر شمار شاخساره تولید شده به‌ازای هر ریزنمونه و نیز شمار کل شاخساره‌ها (رگه‌های مستقل و غیرمستقل) معنی‌دار است. بیش‌ترین شمار شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه دمبرگ (۲/۵ شاخساره)، در تیمارهای ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی در برهمکنش با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرمول استوسیرینگون به‌دست آمد، هر چند که با تیمارهای شاهد معنی‌دار نبود (شکل ٤). همچنین کم‌ترین شمار شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه دمبرگ (۱/۵۷ شاخساره) در تیمارهای ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی در برهمکنش با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرول استوسیرینگون به‌دست آمد. شمار کل شاخساره‌های به‌دست آمده در تیمار ۱۰۰ ریزنمونه دمبرگ به‌مدت ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم و با استفاده از ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون دارای بیش‌ترین مقدار بود، هر چند که با دیگر تیمارهای ۱۰ دقیقه معنی‌دار نبود (شکل ٤). شایان ذکر است که در پژوهش پیشین و در بخش ریزافزایی بیش از ۱۲ شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه دمبرگ دارای پهنک به‌دست آمده است (۲۱).

1- *Cyclamen persicum*
2- *Narcissus tazetta* var. *chinensis*



شکل ۳- اثر برهمکنش استوسیرینگون (A= غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) و تیمارهای مایه‌کوبی (T= ۱۰ و ۲۰ دقیقه) با آگروباکتریوم حامل ژن GUS بر درصد سالم ماندن ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک (راست) و میزان باززایی شاخساره (چپ) ژاله رقم 'Royal Soft Pink' (حروف متفاوت در بالای ستون‌ها، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن است).

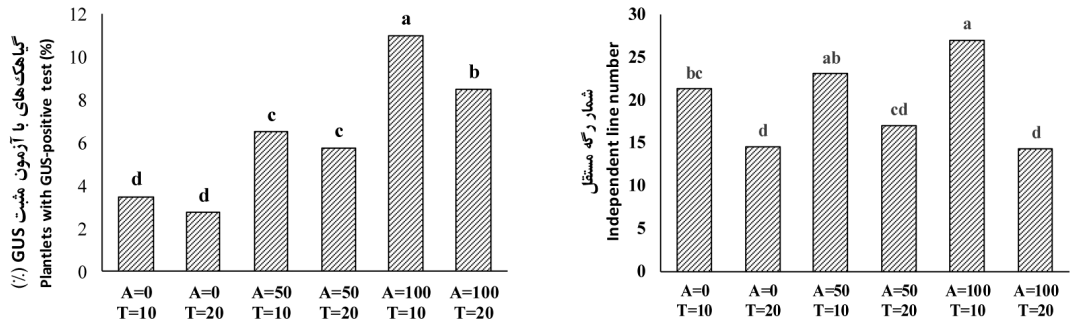
Figure 3. The interaction effects of acetosyringone (A=0, 50 and 100 µmol) and inoculation treatments (T=10 and 20 min) with agrobacterium carrying GUS gene on staying healthy percentage of leafy petiole explants (right) and shoot regeneration (left) of gerbera cv. Royal Soft Pink (different letters indicate significant differences at P<0.05 among all treatments as determined by Duncan's multiple range test).



شکل ٤- اثر برهمکنش استوسیرینگون (A= غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) و تیمارهای مایه‌کوبی (T= ۱۰ و ۲۰ دقیقه) با آگروباکتریوم حامل ژن GUS بر شمار شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه (راست) و شمار کل شاخساره‌ها (چپ) در ژاله رقم 'Royal Soft Pink' (حروف متفاوت در بالای ستون‌ها، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن است).

Figure 4. The interaction effects of acetosyringone (A=0, 50 and 100 µmol) and inoculation treatments (T=10 and 20 min) with *Agrobacterium* carrying GUS gene on the shoot number per explant (right) and total shoot number (left) of gerbera cv. Royal Soft Pink (different letters indicate significant differences at P<0.05 among all treatments as determined by Duncan's multiple range test).

هم‌چنان که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین شمار رگه مستقل (۲۷ شاخساره) و نیز بیش‌ترین میزان بیان ژن GUS (۱۱ درصد) به‌ازای هر ۱۰۰ ریزنمونه دمبرگ در برهمکنش ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و غلظت ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون به‌دست آمدند. در مورد رگه مستقل، این تیمار تنها با تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی و غلظت ۵۰ میکرومول استوسیرینگون معنی‌دار نبود، در صورتی‌که در میزان بیان ژن GUS این تیمار با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. شمار رگه‌های مستقل در ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی با و بدون استوسیرینگون بیش‌تر از مدت زمان ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی بود (شکل ۵). همچنین، کم‌ترین شمار رگه مستقل (۱٤/۵ شاخساره به‌ازای هر ۱۰۰ ریزنمونه) و نیز کم‌ترین فعالیت ژن GUS (۲/۷۵ درصد) در تیمار ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی بدون استفاده از استوسیرینگون مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- اثر برهمکنش استوسیرینگون (A= غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) و تیمارهای مایه‌کوبی (T= ۱۰ و ۲۰ دقیقه) با آگروباکتریوم حامل ژن GUS بر شمار رگه مستقل (راست) و گیاهک‌های با آزمون مثبت GUS (چپ) در ژاله رقم 'Royal Soft Pink' (حروف متفاوت در بالای ستون‌ها، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن است).

Figure 5. The interaction effects of acetosyringone (A=0, 50 and 100 µmol) and inoculation treatments (T=10 and 20 min) with agrobacterium carrying GUS gene on the independent line number (right) and percentage of plantlets with GUS positive test (left) of gerbera cv. Royal Soft Pink (different letters indicate significant differences at P<0.05 among all treatments as determined by Duncan's multiple range test).

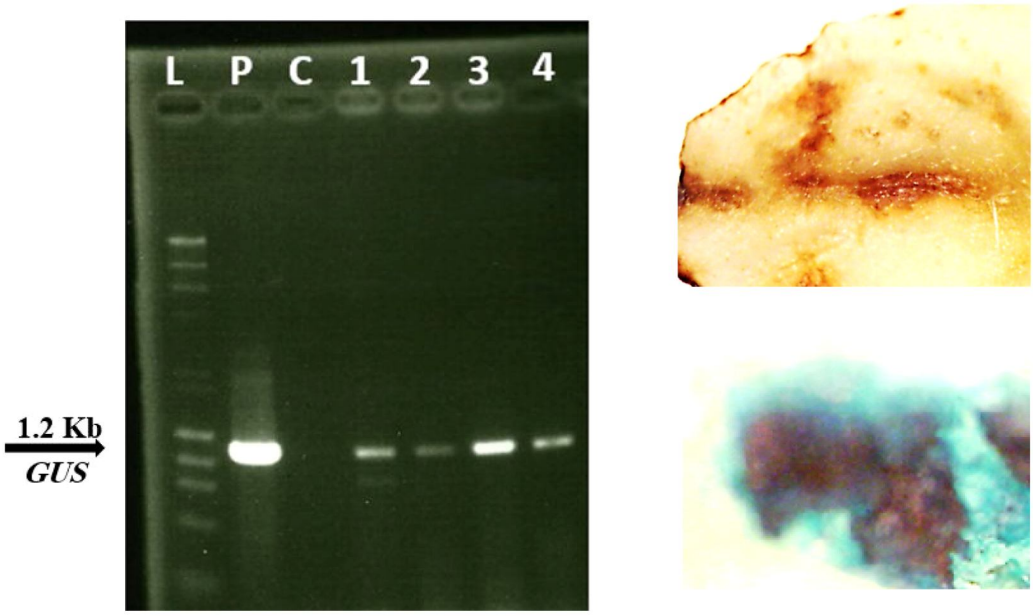
در آزمایش‌های مرتبط به انتقال ژن، عواملی مانند مدت زمان تیمار ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و غلظت استوسیرینگون اثر چشمگیری بر راندمان و موفقیت آن دارند. به همین دلیل در این پژوهش تلاش شد که با بهینه کردن این دو عامل، اثر آن‌ها بر افزایش کارآیی تولید گیاهان تراریخت در ژن GUS بررسی شود. مدت زمان تیمار ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم یکی از عواملی بود که در این پژوهش بر سالم ماندن ریزنمونه‌ها، باززایی شاخساره، تعداد شاخساره در هر ریزنمونه و کارآیی انتقال ژن اثرگذار بود که در تمامی ویژگی ها تیمار ۱۰ دقیقه مناسب تر بود. در تیمار ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی برخی از ریزنمونه‌ها حالت پلاسیده پیدا کرده و از بین رفتند. با توجه به این‌که ساختار دمبرگ در برگ ژاله بافتی حساس با منافذ زیادی می‌باشد، بنابراین چنان‌چه ریزنمونه‌ها در مدت بیش از ۱۰ دقیقه با آگروباکتریوم تلقیح شوند، آسیب جدی می‌بینند. مشابه چنین موضوعی در زمان تیمار گندزدایی ریزنمونه‌های دمبرگ در کشت بافت ژاله مشاهده شد، که با افزایش زمان تیمار گندزدایی حتی در آب مقطر بدون هیچ‌گونه مواد شوینده ریزنمونه‌ها به‌دلیل منافذ زیاد، آب زیادی جذب کرده و این سبب آسیب‌دیدگی آن‌ها می‌شد. همچنین در بخش ریزافزایی، بارها مشاهده شد که ریزنمونه‌هایی که از گیاهان خارج از شیشه گرفته شده و برای کشت گندزدایی می‌شدند، میزان باززایی شاخساره در آن‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای، خیلی کم‌تر بود، که این نشان‌دهنده حساس بودن ساختار دمبرگ ژاله می‌باشد. افزون بر این، به احتمال با افزایش زمان تیمار با آگروباکتریوم و حضور تعداد بیش‌تری از یاخته‌های باکتری، سبب افزایش تعداد رخدادهای تراریختی[1] و نیز واکنش بافت به تنش زیستی[2] شود و نیز میزان بهبود یاخته‌ها برای باززایی شاخساره کاهش می‌یابد (۱٤). همسو با نتایج این آزمایش، کوندو و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که مدت مایه‌کوبی آگروباکتریوم در کارآیی انتقال T-DNA به درون یاخته‌های گیاه سیر[3] مؤثر است و افزایش مدت آن

1- Transformation events
2- Biotic stress
3- *Allium sativum*

سبب اثر منفی بر نسبت زنده‌مانی ریزنمونه‌ها دارد (۱۸). به‌طور معمول، مدت زمان مایه‌کوبی ریزنمونه‌ها در بیش‌تر گیاهان حدود ۱۵ تا ۳۰ دقیقه است (۲۷). ولی هم‌چنان که در بخش نتایج مشاهده شد، بیش‌ترین بیان ژن GUS با زمان مایه‌کوبی ۱۰ دقیقه به‌دست آمد و در زمان ۲۰ دقیقه مایه‌کوبی میزان آن کاهش یافت، که به احتمال زیاد دلیل آن می‌تواند کاهش زیوایی یاخته‌های گیاهی باشد (۳). همچنین احتمال دارد با افزایش زمان تیمار با باکتری، میزان تماس ریزنمونه‌ها با باکتری افزایش یافته و این امر موجب بروز تنش به ریزنمونه شده و در نتیجه کاهش توانایی باززایی و ایجاد شاخساره می‌شود. به‌نظر می‌رسد این نتایج سبب ایجاد فرضیه‌ای شود که در آن گفته می‌شود که هر یاخته گیاهی می‌تواند به‌شمار محدودی آگروباکتریوم بچسبد (۱۵).

دیگر عوامل مؤثر بر انتقال ژن با آگروباکتریوم در ژاله استفاده از استوسیرینگون در محیط مایه‌کوبی و هم‌کشتی می‌باشد. استوسیرینگون یکی از آمیخته‌های ترشح شده از محل زخم‌های موجود در بافت‌های گیاهی است که به‌عنوان یک انگیزاننده توانمند ژن‌های *Vir* آگروباکتریوم شناخته می‌شود و سبب افزایش کارآیی تراریختی در برخی از گیاهان دولپه شده است (۱۳، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۸، ۳۹ و ٤۰). این مسأله نشان‌دهنده این است که، گیاهان در انتقال ژن به این ماده واکنش نشان می‌دهند. استفاده از استوسیرینگون در محیط کشت‌های مایه‌کوبی و هم‌کشتی برای افزایش فراوانی انتقال ژن توسط آگروباکتریوم اثبات شده است (۳۳) و نیز سبب افزایش کارآیی تراریختی شده است (۳۹). همسو با این گزارش‌ها، در بخش نتایج این پژوهش مشاهده شد که بیش‌ترین میزان بیان موقت ژن GUS در ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون در مقایسه با غلظت ۵۰ میکرومول آن و نیز تیمار بدون استوسیرینگون به‌دست آمد. در بررسی اثر برهمکنش مدت زمان مایه‌کوبی با آگروباکتریوم و نیز میزان استوسیرینگون، در تیمار ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی با ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون بیش‌ترین میزان بیان موقت ژن GUS (۱۱ درصد) مشاهده شد.

بررسی تراریختی شاخساره‌ها با آزمون بافت‌شیمیایی و PCR: از آن‌جا که ژن GUS در قسمت T-DNA باکتری قرار دارد بر این اساس می‌توان ماهیت تراریختی شاخساره‌های باززایی یافته را اثبات کرد. آزمون بافت‌شیمیایی قطعه‌های برگ گیاهگ‌های بازایی شده نشان داد که شاخساره‌ها از نظر فعالیت GUS مثبت بودند که این امر نشان می‌دهد این ژن در ژنوم گل ژاله تلفیق یافته و در کنترل پیشبر S۳۵ ویروس موزائیک کلم گل (P35S) بیان می‌شود (شکل ٦). همچنین ردیابی ژن انتقالی GUS در ژنوم گیاهان تراریخت احتمالی به روش واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده برای ابتدا و انتهای ژن منتقل شده بررسی شدند. تجزیه و تحلیل نتایج PCR وجود باند ۱/۲ کیلو جفت بازی را در گیاهان تراریخت ژاله (راهک‌های ۱ تا ٤ در شکل ٦) وجود ژن GUS را ثابت کرد. هیچ نواری در نمونه گیاه غیرتراریخت (شاهد) مشاهده نشد.



شکل ٦- راست: سنجش بافت‌شیمیایی قطعه برگ ژاله رقم 'Royal Soft Pink'، غیرتراریخت (بالا) و تراریخت (پایین) با ژن GUS و چپ: آنالیز PCR، DNA برگ گیاهک‌های ژاله تراریخت‌شده با ژن GUS (L: Lader اندازه DNA (λ/HindIII, ϕX174/HaeIII)، P: پلاسمید کنترل مثبت (pIG121-Hm)، C: گیاهک‌های غیرتراریخت (شاهد منفی) و ۱ تا ٤ نمونه‌های تراریخت ژاله رقم 'Royal Soft Pink').

Figure 6. Right: Histochemical assay of leaf segment of untransformed (up) and transformed (low) gerbera with GUS gene and left: PCR analysis of leaf DNA from transformed plantlets gerbera by GUS gene (L: size DNA ladder, P: positive control plasmid and C: untransformed plantlets and 1 to 4 examples of transgenic gerberas).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، یک روش ساده و کارآمد با استفاده از باززایی مستقیم شاخساره در ریزنمونه‌های دمبرگ دارای پهنک برای انتقال ژن GUS به ژاله ارائه شد و بیش‌ترین کارآیی تراریختی در مدت زمان ۱۰ دقیقه مایه‌کوبی با آگروباکتریوم و نیز استفاده از ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون به‌دست آمد.

منابع

1.Ahmadpour, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Sheikhzadeh, P. 2015. Enhancement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in immature embryo of *Triticum aestivum* cv. Arya. Irn. J. Genet. Plant Breed. 4: 45-53.

2.Almeida, W.A.B., Filho, F.A.A.M., Mendes, B.M.J., Pavan, A. and Rodriguez, A.P.M. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. Sci. Agri. 60: 23-29.

3.Amoah, B.K., Wu, H., Sparks, C. and Jones, H.D. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uid*A in wheat inflorescence tissue. J. Exp. Bot. 52: 1135-1142.

4.Aswath, C.R., Mo, S.Y., Kim, S.H. and Kim, D.H. 2004. IbMADS4 regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura). Plant Sci. 166: 847-854.

5.Azadi, P., Bagheri, H., Nalousi, A.M., Nazari, F. and Chandler, S.F. 2016. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. Biotechnol. Adv. 34: 1073-1090.

6.Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I.E. and Ülker, B. 2005. A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. Plant Meth.4: 1-15.
7.Chakravarty, B. and Wang-Pruski, G. 2010. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation. Adv. Biosci. Biotechnol. 1: 409-416.
8.Costa, M.G.C., Otoni, W.C. and Moore, G.A. 2002. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. Plant Cell Rep. 21: 365-373.
9.Dai, Y.M., Lin, J.B., Wang, W.Y., Zou, H., Wu, S.J. and Lin, Y.X. 2010. Transformation of blue gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Agri. Biotechnol. 18: 231-238.
10.Dewir, Y.H., El-Mahrouk, M.E. and El-Banna, A.N. 2015. In vitro propagation and preliminary results of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Cordyline fruticosa.* S. Afr. J. Bot. 98: 45-51.
11.Dutt, M. and Grosser, J.W. 2009. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 98: 331-340.
12.Elomaa, P. and Teeri, T.H. 2001. Transgenic gerbera. In: Biotechnol. Agri. Forest. 48: Transgenic Crops III (Bajaj, Y.P.S., Ed.), Springer-Verlag, Berlin. Pp: 139-154.
13.Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B. and Newbury, H.J. 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Rep. 9: 671-675.
14.Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J. and Schindles, D. 1987. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. Biochim. Biophys. Acta – Nucleic Acids Protein Synth. 521: 459-469.
15.Gutlitz, R.G.H., Lamb, P.W. and Matthsse, A.G. 1987. Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 83: 564.
16.Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: β-glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO J. 6: 3901-3907.
17.Kalawong, S., Srichuay, W. and Te-chato, S. 2014. The effect of *Agrobacterium* densities and inoculation times on gene transformation efficiency in rubber tree. Afr. J. Biotechnol. 13: 2321-2329.
18.Kondo, T., Hasegawa, H. and Suzuki, M. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Rpt. 19: 989-993.
19.Koushesh Saba, M. and Nazari, F. 2017. Vase life of gerbera cut flower cv. Pink Power affected by different treatments of plant essential oils and silver nanoparticles. J. Plant Prod. Res. 2: 43-59.
20.Mathews, H., Bhararhan, N., Litz, R.E., Narayanan, P.S. and Bharia, C.R. 1990. The promotion of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Atropa belladona* L. by acetosyringone. J. Plant Physiol. 136: 404-409.
21.Miki, B. and McHugh, S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotechnol. 107: 193-232.
22.Nazari, F., Khosh-Khui, M. and Azadi, P. 2016. A simple and efficient direct shoot organogenesis method using leafy petiole explants in *Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink. Int. J. Hort. Sci. Technol. 3: 51-58.
23.Nazari, F., Khosh-Khui, M. and Azadi, P. 2017. Production of delphinidin anthocyanin in petals of gerbera flower by agroinfiltration of flower color gene constructs. J. Plant Prod. Res. 23: 145-164.
24.Nazari, F., Khosh-Khui, M., Azadi, P., Salehi, H. and Niazi, A. 2014. Growth regulators affected in vitro propagation of pot gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink). Int. J. Agri. Biosci. 3: 185-189.

25.Neskorodov, Y.B., Rakitin, A.L., Kamionskaya, A.M. and Skryabin, K.G. 2010) Developing phosphinothricin-resistant transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 100: 65-71.
26.Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. 1990. Construction and expression in tobacco of a β-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequences. Plant Cell Physiol. 31: 805-813.
27.Pandey, V., Misra, P., Chaturvedi, P., Misra, M.K., Trivedi, P.K. and Tull, R. 2010. *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation of Withania somnifera (L.) Dunal: An important medicinal plant. Plant Cell Rpt. 29: 133-141.
28.Park, S.H., Perison, S.R.M. and Smith, R.H. 1996. T- DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. Plant Mol. Biol. 32: 1135-1148.
29.Parveez, G.K.A., Majid, N.A., Zainal, A. and Rasid, O.A. 2007. Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for selecting transformed immature embryos of oil palm. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. 15: 133-146.
30.Ramzan Khan, M., Rashid, H., Ansar, M. and Chaudry, Z. 2003. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 75: 223.
31.Sánchez-Velázquez, J.U., Puc, G.L., Ramos-Díaz, A.L., Cano-Sosa, J.S., Buenfil, I.M.R., García-Velasco, R. and Varguez, A.U. 2016. Main factors affecting the genetic transformation of chrysanthemum var. Micromargara. Plant Omics J. 9: 121-125.
32.Sawahel, W. and Hagran, A. 2006. Generation of white mold disease resistant sunflower plants expressing human lysozyme gene. Biol. Plant. 50: 683-687.
33.Sheikholeslam, S.N. and Weeks, D.P. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. 8: 291-298.
34.Shen, W.H., Escudero, J., Schlappi, M., Ramos, C., Hoha, B. and Koukolikova-Nicola, Z. 1993. TDNA transfer to maize cells: histochemical invbestigation of β-glucuronidase activity in maize tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 1488-1492.
35.Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Reddy, P.V. and Rao, S.C. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 110: 275-287.
36.Sun, C.Y., Wang, Y., Xu, X.F., Sun, Y., Zhu, L.H. and Han, Z.H. 2008. Regeneration from leaf segments of *in vitro*-grown shoots of *Malus baccata*. New Zeal. J. Crop Hort. Sci. 36: 233-238.
37.Sundar, I.K. and Sakthivel, N. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. J. Plant Physiol. 165: 1698-1716.
38.Sunilkumar, G. and Rathore, K.S. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration. Mol. Breed. 8: 37-52.
39.Sunilkumar, G., Vijaychandra, K. and Veluthambi, K. 1999. Pre-incubation of tobacco leaf explant promotes *Agrobacterium* mediated transformation by increasing *vir* gene induction. Plant Sci. 141: 51-58.
40.Yang, Z., Ingrelbrecht, N., Louzada, I.L., Skaria, E. and Mirkov, T.E. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). Plant Cell Rep. 11: 1203-1211.
41.Zhu, Y.L. and Ma, F.W. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Cyclamen persicum*. Acta Agri. Boreali-occidentalis Sinica. 18: 240-244.