

Factors influencing the efficiency of an agroinjection-mediated SCMV-based systemic heterologous gene expression system in maize

Mahdieh Sadeghian 

PhD Candidate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Mahdie.Sadeghi@gmail.com

Mahmood Solouki 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Mahmood.Solouki@gmail.com

Jafar Zolala 

Associate professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: j.zolala@uk.ac.ir

Abbasali Emamjomeh 

Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Aliimamjomeh@uoz.ac.ir

Georg Jander 

Professor, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York 14853, USA. Email: gj32@cornell.edu

Abstract

Objective

Maize (*Zea mays* L.) is a key cereal crop throughout the world and important model for plant genetics and biology. Establishment of an efficient transient gene expression system in maize facilitates plant functional genomics projects using gene silencing or heterologous protein overexpression strategies. The present study was aimed at optimizing an Agroinjection-mediated SCMV-based systemic heterologous gene expression system in maize.

Materials and methods

Recombinant DNA encoding sugarcane mosaic virus (SCMV) containing the coding sequence of green fluorescent protein between the protein 1 (P1) and helper component-proteinase (HC-Pro)

cistrons, in-frame with the viral open reading frame, was introduced into the meristematic tissue, above the coleoptilar node, of maize seedlings via a direct Agroinoculation procedure. The efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA105 and GV3101 in delivering the recombinant vector into three and seven-day old seedlings of three maize varieties, including sweet corn (Iochief and Golden Bantam varieties) and dent corn (inbred line B73), was examined. Expression of GFP transgene in symptomatic Agroinoculated plants was assessed by confocal fluorescent microscopy and RT-PCR in comparison with controls.

Results

Results of RT-PCR and confocal fluorescent microscopy revealed that: 1) *A. tumefaciens* GV3101 is significantly more successful in delivering the recombinant SCMV-based vector into maize plants than EHA105, 2) the percentage of GFP-expressing Golden Bantam plants is significantly higher than two other maize varieties, and 3) The effectiveness of growth stage of maize seedlings on the percentage of GFP expressing Agroinjected plants depends upon the interactions between *Agrobacterium* strain and maize genotype.

Conclusions

In conclusion, a combination of the Golden Bantam maize variety and *A. tumefaciens* strain GV3101 for direct Agroinjection of the SCMV-based vector into seedlings at the early two-leaf stage could be a fast and efficient system for investigating gene functions in maize.

Keywords: Green Fluorescent Protein, Agroinjection, *In-planta* expression system, Viral vectors.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Sadeghian M, Solouki M, Zolala J, Emamjomeh A (2021) Factors influencing the efficiency of an agroinjection-mediated SCMV-based systemic heterologous gene expression system in maize. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 159-182.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 159-182.

DOI:10.22103/jab.2021.17957.1333

Received: November 06, 2021.

Accepted: December 04, 2021.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

فاکتورهای تاثیرگذار بر کارایی روش آگرواینجکشن برای بیان سیستمیک ژن خارجی در گیاه ذرت به واسطه ویروس موزائیک نیشکر

مهديه صادقیان بهنوئی 


دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Mahdie.Sadeghi@gmail.com

محمود سلوکی 


*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Mahmood.Solouki@gmail.com

جعفر ذوالعلی 

دانشیار، گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی: ۷۶۱۶۹۱۳۴۳۹، کرمان، ایران. رایانامه: j.zolala@uk.ac.ir

عباسعلی امام جمعه 

دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Aliimamjomeh@uoz.ac.ir

جورج جندر 

استاد، موسسه تحقیقات گیاهی بویس- تامپسون، کد پستی: ۱۴۸۵۳، ایتاکا، نیویورک، ایالات متحده آمریکا. رایانامه: gj32@cornell.edu

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۵

چکیده

هدف: ذرت (*Zea mays* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی در سرا سر دنیا و از گیاهان مدل خانواده غلات است. استقرار و بهینه سازی یک سیستم بیان موقت ژن موفق در ذرت علاوه بر قابلیت استفاده در پروژه‌های خاموشی ژن یا تولید پروتئین‌های نوترکیب، می‌تواند موجب تسهیل مطالعات عملکرد ژن در این گیاه شود. پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی سیستم بیان سیستمیک ژن به واسطه آگروباکتريوم در گیاه ذرت با استفاده از یک ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: برای این منظور از ژنوم ویروس سی نوترکیب که در آن توالی رمزکننده پروتئین فلور سنت سبز (GFP)، در امتداد چهارچوب قرائت آزاد ویروس و در ناحیه بین توالی P1 و HC-Pro ویروس درج شده بود، استفاده شد. برای انتقال ژنوم ویروس نوترکیب به گیاهان ذرت، از روش تزریق مستقیم آگروباکتریومی (آگرواینجکشن) به نواحی مریستمی گره کولتوپتیلی گیاهچه استفاده شد. کارایی دو سویه EHA105 و GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در انتقال ژنوم نوترکیب ویروس به سه واریته ذرت Golden Bantam Jochief (ذرت شیرین) و B73 (ذرت دندان اسبی) در دو مرحله رشدی (گیاهچه‌های سه و هفت روزه) مورد مقایسه قرار گرفت. پس از ظهور علائم موزائیک ویروسی در گیاهان تلقیح شده، بیان ژن خارجی GFP با استفاده از میکروسکوپ فلور سنت کانفوکال و همچنین RT-PCR در این گیاهان در مقایسه با گیاهان شاهد ارزیابی شد.

نتایج: نتایج حاصل از RT-PCR و میکروسکوپ فلورسنت کانفوکال، نشان داد که سویه GV3101 در مقایسه با سویه EHA105 به لحاظ آماری عملکرد بالاتری در انتقال ناقل نوترکیب به گیاهان ذرت دارد. همچنین در مقایسه واریته‌های مختلف ذرت، این روش در بیان پروتئین فلور سنت سبز در ذرت واریته گلدن بانتام به‌طور بسیار معنی‌داری موفق عمل نمود. اگرچه در مورد سویه EHA105 در صد گیاهچه‌های سه روزه ذرت شیرین گلدن بانتام که به‌طور موفق ناقل محتوی ژن خارجی را دریافت و بیان نمودند بالاتر بود، اما در مورد سویه GV3101 تفاوت معنی‌داری میان گیاهچه‌های سه و هفت روزه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: ذرت رقم گلدن بانتام و آگروباکتریوم سویه GV3101 در مراحل پیش از دوبرگی به‌عنوان یک سیستم مدل بهینه، سریع و کارآمد برای پروژه‌های تحقیقاتی بررسی عملکرد ژن و حوزه‌های پژوهشی مرتبط پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: پروتئین فلورسنت سبز، تزریق آگروباکتریومی، سیستم بیان درون گیاهی، ناقل‌های ویروسی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صادقیان مهدیه، سلوکی محمود، ذوالعی جعفر، امام‌جمعه عباسعلی، جندر جورج (۱۴۰۰) فاکتورهای تاثیرگذار بر کارایی روش آگرواینجکشن برای بیان سیستمیک ژن خارجی در گیاه ذرت به‌واسطه ویروس موزائیک نیشکر. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۲-۱۵۹.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

پیشرفت در تکنولوژی‌های توالی‌یابی ژنوم و ترنسکریپتوم منجر به فهرست طولی از ژن‌های کاندید شده است که شناسایی عملکرد این ژن‌ها یک چالش اساسی است (Arafa et al. 2017, Edwards and Batley 2010; Unamba et al. 2015). تاریخچه پایدار گیاهان که برای بیان ژن دلخواه و شناسایی عملکرد آن یک روش متداول به‌ویژه در موجودات مدل است، در گیاهان غیر مدل، خصوصاً در بسیاری از گونه‌های تک لپه که اغلب اندازه ژنوم بزرگ، راندمان تاریختی پایین و چرخه زندگی طولانی دارند می‌تواند در بهترین حالت پرزحمت و وقت‌گیر و در بدترین حالت، غیرعملی باشد (Lee et al. 2015). در بسیاری از گیاهان ممکن است ماه‌ها طول بکشد تا بتوان گیاهان تاریخته را برای حضور ژن درج شده مورد ارزیابی قرار داد. همچنین زمان بیشتری نیاز است تا مواد گیاهی را به میزان کافی تکثیر نمود که بتوان در آزمون‌های زیستی مورد ارزیابی قرار داد (Kawazu 2012). به‌علاوه، رخدادهای تاریخته معمولاً به‌دلیل تاثیر محل درج ژن و تعداد کپی ژن درج شده می‌توانند از نظر بیان ژن متغیر باشند (Wroblewski et al. 2005). حتی در گیاهان تک لپه‌ای مانند گندم و جو نیز که برای آن‌ها تاریختی پایدار به یک تکنیک نسبتاً متداول تبدیل شده است، پروتکل‌های انتقال ژن تنها برای تعداد انگشت شماری از وارته‌های زراعی بهینه‌سازی شده‌اند. به دنبال چنین اشکالاتی، علاقه روزافزونی به سیستم‌های بیان موقت درون گیاهی به وجود آمده است که امکان غربالگری اولیه سریع ژن‌های کاندید برای صفات یا پاسخ‌های سلولی ویژه را فراهم می‌آورند (Lawrence and Novak 2001; Lee et al. 2015).

گیاهان تک‌لپه به‌ویژه غلات منابع اصلی غذا و سوخت‌های زیستی برای انسان هستند. چهار غله مهم زراعی شامل ذرت، برنج، گندم و نی‌شکر هستند که محصولات غذایی اصلی را تشکیل می‌دهند. ذرت (*Zea mays* L.) دومین محصول زراعی از نقطه نظر سطح زیر کشت در سراسر جهان است (FAOSTAT, 2019). این محصول برای تغذیه دام استفاده و به محصولات غذایی و صنعتی فراوانی از جمله نشاسته، شیرین‌کننده‌ها، روغن ذرت، الکل، و اتانول سوختی فرآوری می‌شود (Mei et al. 2019b; Mei et al. 2016).

علاوه بر اهمیت زراعی، ذرت طی قرن به‌عنوان یک سیستم مدل برای تحقیقات بنیادی استفاده شده است. به‌گونه‌ای که در میان غلات، ذرت به‌عنوان یک سیستم ژنتیکی، موضوع گسترده‌ترین و جامع‌ترین مطالعات بوده است. ویژگی‌هایی از جمله مجموعه گسترده ذخایر جهش یافته، کروموزم‌های بزرگ هتروکروماتیک، تنوع نوکلئوتیدی وسیع و همخطی ژنی با غلات خویشاوند، این گونه را به‌عنوان جزء اساسی برای مطالعات ژنتیکی، سیتوژنتیکی و ژنومی، در کانون توجه قرار داده است. به‌عنوان یک گیاه مدل، ذرت موضوع بررسی‌های بیولوژیکی گسترده‌ای از جمله اهلی‌سازی گیاهی، تکامل ژنوم، فیزیولوژی نمو، اپی‌ژنتیک، مقاومت به آفات، هتروزیس، توارث کمی و ژنومیکس مقایسه‌ای بوده و هست. این مطالعات با توالی‌یابی و حاشیه‌نویسی ژنوم ذرت پیشرفت‌های چشمگیری داشته است (Lawrence et al. 2008; Nannas and Dawe 2015).

ناقل‌های بیان مبتنی بر ویروس به‌طور گسترده‌ای برای بیان پروتئین‌های خارجی متنوعی در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kushwaha and Chakraborty 2017; Cody et al. 2017; Mor et al. 2003; Lindbo 2007; Zhang et al. 2020). حداقل شش ناقل ویروسی برای بیان ژن‌های خارجی در گیاهان تک لپه گزارش شده است (Shen and Hohn 1994; Lee et al. 2012; Cheuk and Houde 2018; Bouton et al. 2018; Gao et al. 2019; Mei et al. 2019a,b). جدیدترین گزارش مربوط به یک ناقل ویروسی مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر^۱ (SCMV) است که برای بیان ژن در ذرت تولید شده است (Mei et al. 2019a). ویروس SCMV متعلق به جنس پوتی‌ویروس است و دارای یک ویریون رشته‌ای انعطاف‌پذیر است که یک ژنوم RNA تک رشته‌ای سنس مثبت (+ssRNA) را که در انتهای ۳' پلی آدنیله شده است در بردارد. توانایی احتمالی SCMV در آلوده کردن گونه‌های مختلف غلات از جمله ذرت می‌تواند آن را به یک جزء بالقوه از یک سیستم بیان درون گیاهی و آنالیز عملکرد ژن کارآمد میدل سازد (Rosenkranz 1978; Rosenkranz 1983; Gao et al. 2000; Trzmiel 2009).

همانگونه که سازه‌های ویروسی توسعه می‌یابند، توسعه روش‌های آلوده‌سازی موفق بافت‌های گیاهی به این ویروس‌های تغییر یافته نیز بایستی در نظر گرفته شود. روش‌های رایج برای استقرار این آلودگی‌های ویروسی در گیاهان شامل بمباران ذره‌ای، تلقیح مکانیکی رونوشت‌های RNA یا کلون‌های DNA، تلقیح با روش پانچ آوندی^۲ و یا به‌واسطه تلقیح *Agrobacterium tumefaciens* (Agroinoculation) است (Redinbaugh et al 2001; Seo et al. 2009; Vaghchhipawala et al. 2011). روش‌هایی تزریقی (Agroinjection) یا اینفیلتراسیون نژادهای آگروباکتریوم حامل سازه‌های دوگانه T-DNA که برای تحویل ویروس‌های نو ترکیب طراحی شده‌اند دارای ارجحیت هستند، زیرا ساده و ارزان هستند. در سال ۱۹۸۸، آگروباکتریومی که محتوی ژنوم ویروس رگه‌ای ذرت^۳ (MSV) بود با استفاده از تزریق، به گیاهچه‌های ذرت وارد شد و نشان داد که روش‌های تلقیح مبتنی بر آگروباکتریوم برای تک‌لپه‌ها نیز قابلیت کاربرد دارند (Grimsley et al. 1988). سپس این روش برای انتقال ویروس پیسک زرد ذرت^۴ (MCMV) جهت مطالعه بیشتر این ویروس مورد استفاده قرار گرفت (Wang et al. 2017). به‌تازگی پروتکل تزریق برای وارد نمودن سویه GV3101 آگروباکتریوم محتوی ناقل‌های ویروسی نو ترکیب مبتنی بر ویروس‌های موزائیک ارزنی سبز و موزائیک نیشکر به گیاهچه‌های ذرت نیز به‌طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است (Beernink et al. 2021). هدف این پژوهش، بهینه‌سازی سیستم بیان سیستمیک ژن خارجی با استفاده از ناقل ویروسی نوظهور SCMV با به کارگیری روش تزریق آگروباکتریوم در گیاه ذرت است. برای این منظور از دو سویه GV3101 و سویه ابریمارگر EHA105

¹ Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)

² Vascular puncture inoculation (VPI)

³ Maize Streak Virus, MSV

⁴ Maize Chlorotic Mottle Virus (MNMV)

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* برای انتقال ناقل ویروسی SCMV محتوی ژن مولد پروتئین فلورسنت سبز^۱ (GFP) به گیاهچه‌های سه و هفت روزه دو رقم ذرت شیرین و یک رقم ذرت دانه‌ای استفاده شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای ذرت، سویه‌های باکتریایی و ناقل‌های ویروسی: بذرهای ذرت شیرین ارقام گلدن بانتام و آیوچف از کمپانی برپی (Burpee, Pennsylvania, USA) و بذر ذرت دندان اسبی رقم B37 از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه کرنل (ایالات متحده آمریکا، ایتاکا) تهیه شد. سویه‌های باکتریایی *A. tumefaciens* GV3101 و EHA105 از کلکسیون موسسه تحقیقات گیاهی بويس تامپسون واقع در دانشگاه کرنل (Boyce-Thompson Institute, BTI, Cornell University, Ithaca, USA) پروفیسور استیون ویتام از دانشگاه آیوا (Department of Plant Pathology and Microbiology, Iowa State University) تهیه شد. کلیه پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) طراحی و توسط نرم‌افزار OligoAnalyzer (DNA Technologies Inc., Iowa, USA) ارزیابی شد.

کاشت بذر و تهیه گیاهچه‌های ذرت: بذرهای ذرت پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل در پتری‌های استریل روی دستمال مرطوب قرار داده شده و جهت جوانه‌زنی در ژرمیناتور با دمای ۲۵°C انکوبه شدند. برای اجرای آزمایش تزریق آگروباکتریومی، تعدادی از بذرهای پس از جوانه‌زنی به مدت سه روز در ژرمیناتور با دمای ۲۵°C و تحت ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شد. طول اندام هوایی آن‌ها در این مرحله کمتر از سه سانتیمتر بود. سایر بذرهای پس از جوانه زنی به سینی‌های نشاء منتقل شد و تا زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ظهور برگ‌های ابتدائی (هفت روزه) رسیدند در اتاقک رشد با دمای ۲۵°C و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شد. از گیاهچه‌های ذرت سه و هفت روزه حاصل برای تزریق آگروباکتریومی استفاده شد.

ساخت سازه دربردارنده توالی رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز pSCMV-CS3-GFP: توالی ۷۱۷ جفت‌بازی mEGFP (Zacharias et al. 2002) رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز، با استفاده از جفت پرایمر GFP-Psp (-5' ATTAGGGCCCATGGTGAGCAAGGG-3') و GFP-SbfI (-5' ATTACCTGCAGGCCTTGTACAGCTCGT-3') از ناقل pSCMV-CS2 محتوی آن (Mei et al. 2019) طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط آنزیم دی‌ان‌آ-پلی‌مراز SuperFiTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) تکثیر شد.

¹ Green Fluorescent Protein (GFP)

محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *Psp*OMI و *Sbf*I هضم و پس از خالص سازی از روی ژل آگارز، درون ناقل pSCMV-CS3 که با آنزیم‌های مشابه هضم شده بود، درج شد. ناقل بیانی pSCMV-CS3 مورد استفاده در این پژوهش، از ناقل pSCMV-CS2 مشتق شده است که در آن توالی رمزکننده ژنوم ویروس SCMV در ناحیه T-DNA ناقل دوگانه pCambia1380 درج شده است (Chung et al. 2021). شایان ذکر است که توالی GFP در جایگاه چندگانه همسانه‌سازی (CS3) بین نواحی رمزکننده پروتئین P1 و توالی HCPro و در امتداد چهارچوب قرائت آزاد ویروسی درج شد. توالی رمزکننده پلی‌پروتئین ویروسی تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) و خاتمه دهنده نوپالین سنتاز (NOS) قرار داشت (شکل ۱). ناقل pSCMV-CS3 فاقد توالی درجی به‌عنوان شاهد در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. کلیه آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه توسط شرکت IDT ساخته شد (Integrated DNA Technologies Inc., Iowa, USA).



شکل ۱. استفاده از یک ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر برای بیان موقت GFP در ذرت؛ شمای کلی ناقل SCMV-CS3. یک جایگاه چندگانه همسانه‌سازی (CS3) بین ژن‌های P1 و HC-Pro ویروس موزائیک نیشکر درج شده است. 35S: پیشبر ویروس موزائیک گل کلم؛ T: خاتمه‌دهنده نوپالین سینتاز.

Figure 1. Use of a sugarcane mosaic virus (SCMV) to transiently express GFP in maize. Schematic diagram of the SCMV-CS3 cloning vector; A multiple cloning site (MCS) was introduced between P1 and HC-Pro genes of SCMV. 35S: cauliflower mosaic virus 35S promoter; T: NOS terminator.

همسانه‌سازی و انتقال سازه‌های SCMV به باکتری *Agrobacterium* پس از همسانه‌سازی سازه‌های ژنی تهیه شده در باکتری *Escherichia coli* DH5 α با استفاده از روش شوک حرارتی (Chang et al. 2017)، استخراج پلاسمید با استفاد از کیت PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) انجام گرفت. سپس، سویه‌های GV3101 و EHA105 باکتری *A. tumefaciens* به‌طور جداگانه با پلاسمیدهای دربردارنده سازه‌های pSCMV-CS3-GFP و pSCMV-CS3 فاقد توالی درجی (به‌عنوان کنترل) با استفاده از روش انجماد-ذوب ترانسفورم گردید (Beernink

(et al. 2021). پس از کشت روی محیط انتخابی لوریا-برتانی (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین ($30 \mu\text{g/ml}$)، آنتی‌بیوتیک انتخابی سویه GV3101، ریفامپیسین ($50 \mu\text{g/ml}$) و کانامایسین ($50 \mu\text{g/ml}$) کلنی‌های ترانسفورم شده با استفاده از کلنی-پی سی آر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GFP و نیز پرایمرهای اختصاصی نواحی احاطه کننده محل درج آن در ناقل (VecF: 5'-GAGGAAAGACATAGCCATTGGGC-3' و VecR: 5'-GCCCTATTGTTCCGCAACTTGCC-3') تکثیر و از طریق توالی‌یابی به روش سانگر شناسایی شد (Cornell Institute of Biotechnology, Ithaca, USA). این کلنی‌ها جهت نگه‌داری طولانی مدت در محیط کشت LB حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در فریزر 8°C - انکوبه شد.

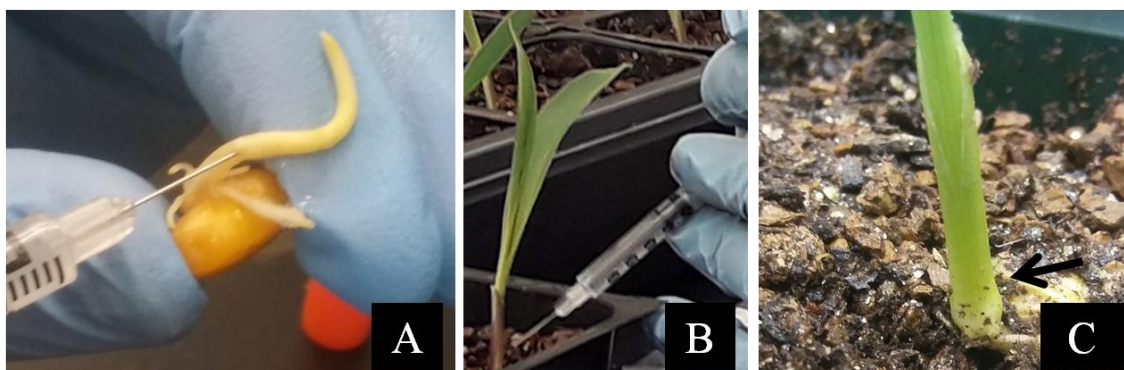
انتقال سازه‌های SCMV به گیاهان ذرت به واسطه آگروباکتریوم: باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت

LB انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت زمانی که جذب نوری کشت مایع در طول موج 600nm برابر با یک بود، سوسپانسیون سلولی به روشی که در ادامه می‌آید تهیه شد. سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $1254 \times g$ رسوب‌گذاری و با آب دیونیزه استریل شستشو داده شد. پس از تکرار این مرحله، رسوب باکتری در بافر (10mM MES, 10mM MgSO₄, 200 μM Acetosyringone, 0.02% Silwet L-77) سوسپانسیون شد به طوری که جذب نوری آن در طول موج 600nm برابر با یک شد. سوسپانسیون حاصل به مدت سه ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر رفت و برگشتی به آرامی هم زده شد. سپس سوسپانسیون حاصل با استفاده از سرنگ‌های انسولین 0.2ml در فاصله دو میلی‌متر بالاتر از گره کلئوپتیلی به گیاهچه‌های ذرت سه و هفت روزه تزریق شد (شکل ۲). سپس گیاهان به اتاقک رشد با دمای 25°C ، تحت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل و نگه‌داری شدند. بروز علائم موزائیک و ویروسی طی ۲-۴ هفته پس از تزریق ردیابی شد. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد و برای هر تیمار در هر آزمایش بین ۱۵ تا ۴۵ گیاه به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد (Beernink et al. 2021; Wang et al. 2017; Cao et al. 2014).

بررسی‌های میکروسکوپی بیان پروتئین فلورسنت سبز: در صورت مشاهده علائم موزائیک در فاصله ۲-۴ هفته

پس از تزریق روی گیاهان، بیان پروتئین فلورسنت سبز در برگ‌های گیاهان محتوی سازه pSCMV-CS3-GFP در مقایسه با گیاهان محتوی سازه pSCMV-CS3-EV با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت کانفوکال (Leica confocal laser-scanning microscope, SP5 TCS, Leica, Germany) موجود در مرکز تصویربرداری سلولی گیاهی (PCIC) موسسه تحقیقاتی BTI (Ithaca, Cornell University, BTI, Plant Cell Imaging Center) بررسی شد. طی دوره رشد گیاه، نمونه‌های برگ با سنین مختلف جمع‌آوری شده از گیاهان دارا و فاقد علائم ویروسی در طول موج 488nm مشاهده و سیگنال فلورسنت در دامنه 505nm - 545nm ردیابی شد. برای تأیید اینکه سیگنال مشاهده شده ناشی از GFP و نه فلورسنت خود گیاه است

از گزینه اسکن لامبدا (در بازه طول موج‌های ۴۸۰-۵۸۰ nm؛ ۲۰ مرحله) برای تولید نمودار و پروفایل‌های طیف نشر استفاده شد. تصاویر و نتایج اسکن لامبدا با استفاده از نرم‌افزار LAS-AF (V 2.6.0) آنالیز شد.



شکل ۲. تزریق مستقیم سوسپانسیون آگروباکتریومی دربردارنده ناقل ویروسی نو ترکیب pSCMV به ناحیه کلئوپتیلی گیاهچه‌های (A) سه روزه و (B و C) هفت روزه ذرت؛ تزریق با استفاده از سرنگ‌های انسولین ۰.۲ ml، دو میلی‌متر بالاتر از کره کلئوپتیلی انجام گرفت.

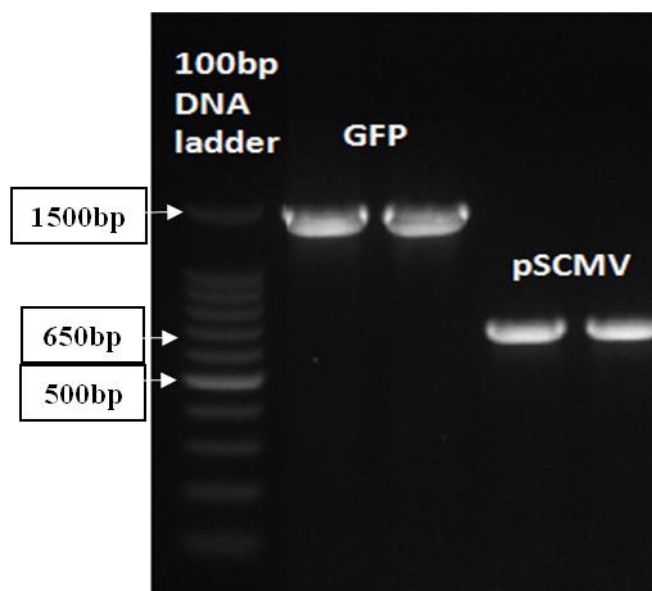
Figure 2. Direct injection of *Agrobacterium* cells harboring pSCMV vector into maize stems 2mm above the coleoptilar node in; A) Three-day old seedlings, B and C) Seven-day old seedlings by using 0.2ml fine syringes.

آنالیز بیان سازه‌های نو ترکیب با استفاده از RT-PCR: RNA کل از برگ‌های گیاهان تلقیح شده و شاهد با استفاده از کیت استخراج RNA استخراج (SV Total RNA Isolation System, Promega, Madison, WI, USA) و سپس جهت حذف هرگونه آلودگی به DNA ژنومی، با آنزیم RQ1 RNase-free DNaseI (Promega, Madison, WI, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شد. DNA مکمل با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany) و پرایمرهای OligodT طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. برای هر نمونه، واکنش کنترل منفی فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس در نظر گرفته شد. سپس پرایمرهای اختصاصی GFP-Psp و GFP-SbfI و CPF (5'-) و (3'-TCGGGAAGTGTGATGCGGG) و (5'-CTAGTGGTGCTGCTGCACTC-3') به ترتیب برای ردیابی حضور ژن‌های خارجی GFP و پروتئین پوششی ویروس (CP) در ناقل‌های pSCMV-CS3-GFP و pSCMV-CS3-EV استفاده شد. در مورد گیاهان محتوی سازه SCMV-EV از پرایمرهای اختصاصی جهت ردیابی پروتئین پوششی ویروس استفاده شد. تعداد گیاهانی که حضور ژن خارجی در آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت، ثبت شد.

آنالیز آماری: داده‌های حاصل که شامل تعداد گیاهان مثبت برای هر یک از تیمارها بود، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل و سه تکرار با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار SAS (9.2) مورد بررسی قرار گرفت. اثرات اصلی و متقابل هر یک از فاکتورها بررسی و در ادامه، جهت تعیین سطوح معنی‌داری، میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

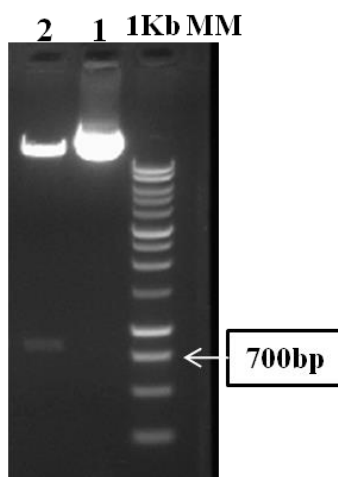
نتایج

درج توالی رمزکننده GFP در ناقل pSCMV-CS3: نتایج حاصل از کلنی‌پی‌سی‌آر و نیز توالی‌یابی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی GFP و نیز پرایمرهای نواحی احاطه کننده محل درج GFP در ناقل نشان دهنده درج صحیح توالی رمزکننده GFP و حضور پلاسمید در بردارنده ناقل ویروسی در کلنی‌های ترانسفورم شده *Agrobacterium* بود (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳. نتایج حاصل از کلنی‌پی‌سی‌آر کلنی‌های آگروباکتریوم ترانسفورم شده با ناقل ویروسی pSCMV-CS3 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از نواحی احاطه کننده محل درج ژن خارجی، قطعه ۱۳۶۷bp تکثیر شده در کلنی‌های محتوی ناقل pSCMV-CS3-GFP در مقایسه با تکثیر قطعه ۶۵۰bp در کلنی‌های ترانسفورم شده با ناقل فاقد توالی درجی pSCMV-CS3-EV.

Figure 3. Polymerase chain reaction of transformed *Agrobacterium* colonies (Colony-PCR) containing pSCMV-CS3 vectors using primers flanking the transgene insertion site; Amplification of 1367bp sequence in transformed colonies harboring pSCMV-CS3-GFP in comparison with 650bp amplicon in colonies transformed with empty pSCMV vector (pSCMV-CS3-EV).

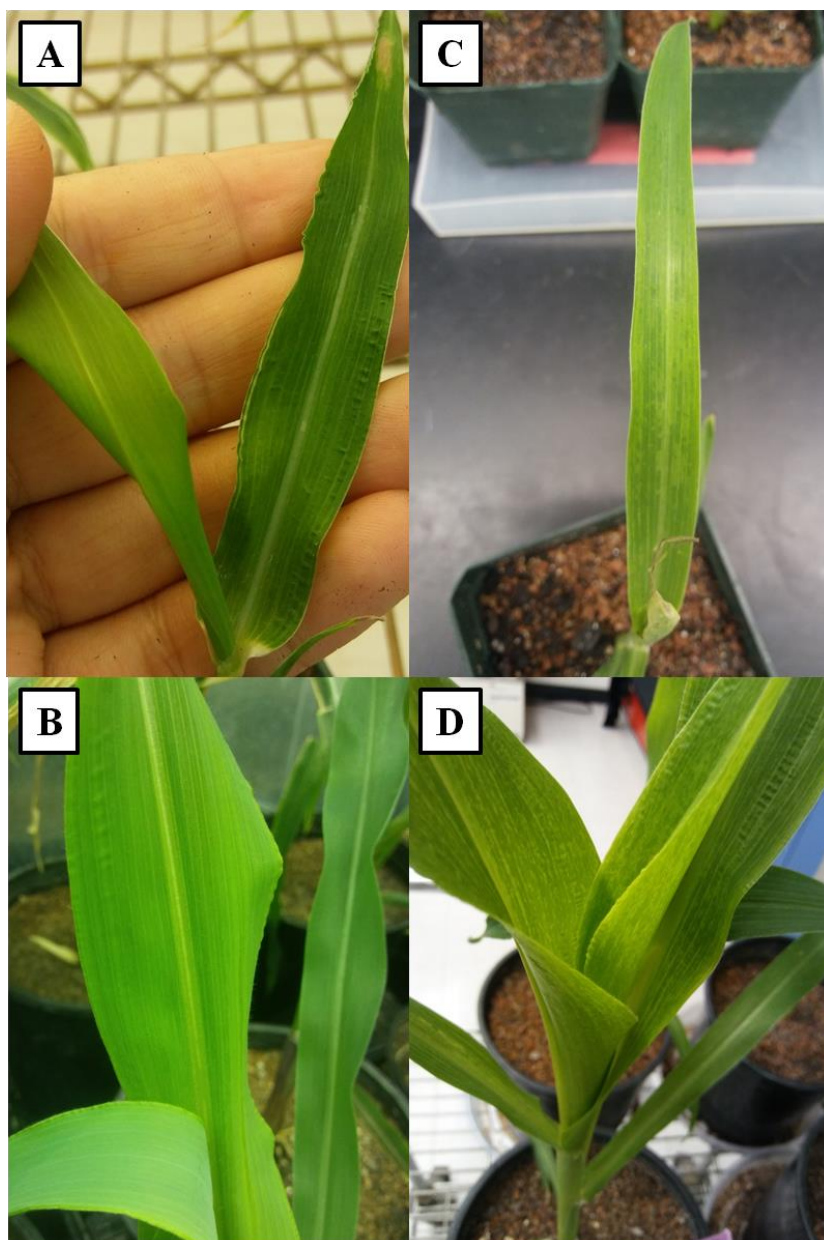


شکل ۴. نتایج حاصل از هضم پلاسمیدهای نو ترکیب محتوی ناقل ویروسی مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر با استفاده از آنزیم‌های برشی *PspOMI* و *SbfI*؛ چاهک ۱: ناقل pSCMV-CS3-EV فاقد توالی درجی در مقایسه با چاهک ۲: ناقل pSCMV-CS3-GFP دربردارنده توالی رمزکننده ژن خارجی GFP.

Figure 4. Digestion of recombinant SCMV-based vectors by *PspOMI* and *SbfI* restriction enzymes; empty pSCMV-CS3-EV vector (Lane11) in comparison with pSCMV-CS3-GFP containing GFP coding sequence (Lane 2).

انتقال سازه‌های ویروسی به گیاهان ذرت: طی ۲-۴ هفته پس از تزریق سازه‌های ویروسی نو ترکیب به واسطه آگروباکتریوم به گیاهچه‌های ذرت، علائم و الگوهای موزائیکی بر روی برگ‌های برخی گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل بدون ژن خارجی (pSCMV-CS3-EV) و نیز ناقل دربردارنده توالی رمزکننده پروتئین فلورسنت سبز (pSCMV-CS3-GFP) ظاهر شد. علائم به صورت الگوهای سبز تیره و روشن بوده و همزمان با رشد گیاه در برگ‌های تازه ظهور یافته گیاه نیز به‌طور سیستمیک گسترش یافت. در هیچ یک از گیاهان شاهد چنین علائمی ظهور و بروز پیدا نکرد (شکل ۵).

بررسی میکروسکوپی بیان پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال: بررسی‌های میکروسکوپی تحت طول موج‌های مورد نظر و اسکن لامبدا در دامنه‌ای از طول موج‌ها نشان‌دهنده بیان سیستمیک و آشکار پروتئین فلورسنت سبز در سلول‌های مزوفیل کلیه برگ‌های گیاهان دارای علائم ویروسی، حتی برگ‌های نوظهور بود. این نتایج نشان می‌دهد که بیان GFP به واسطه SCMV پایا و قوی است. در گیاهان فاقد علائم و گیاهان شاهد دارای ناقل بدون GFP، هیچگونه سیگنال فلورسنت مرتبط با GFP ردیابی نشد (شکل ۶).

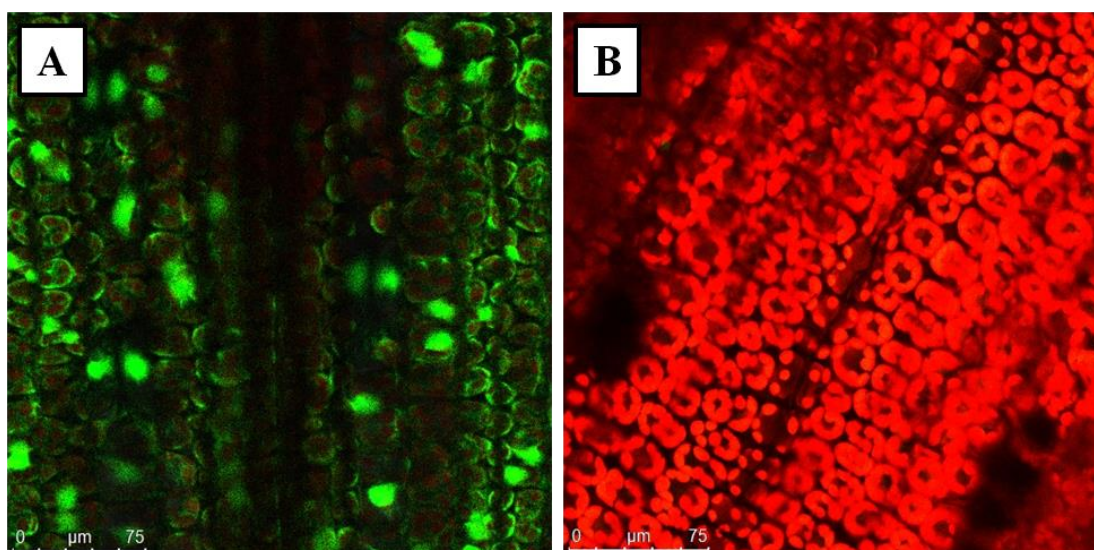


شکل ۵. بروز علائم موزائیک سیستمیک در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل ویروسی pSCMV (C و D) طی ۲-۴ هفته پس از تزریق آگروباکتریومی ناقل در مقایسه با گیاهان شاهد فاقد علائم (A و B).

Figure 5. Appearance of systemic viral mosaic patterns in maize plants 2-4 weeks after direct Agroinjection of pSCMV vector (C and D) in comparison with asymptomatic control ones (A and B).

ردیابی بیان سازه‌های نو ترکیب در گیاهان تلقیح شده با استفاده از RT-PCR: داده‌های حاصل از RT-PCR گیاهان دارای علائم موزائیک، وجود رونوشت‌های ناقل ویروسی و ژن رمزکننده GFP را در گیاهان محتوی سازه‌های pSCMV-CS3-GFP و ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس SCMV را در گیاهان تلقیح شده با سازه‌های pSCMV-

CS3-EV تائید نمود (شکل‌های ۷ و ۸). در گیاهان شاهد فاقد علائم و همچنین کنترل منفی واکنش سنتز cDNA که فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس بود، هیچ‌گونه نسخه‌ای از این رونوشت‌ها ردیابی نشد.



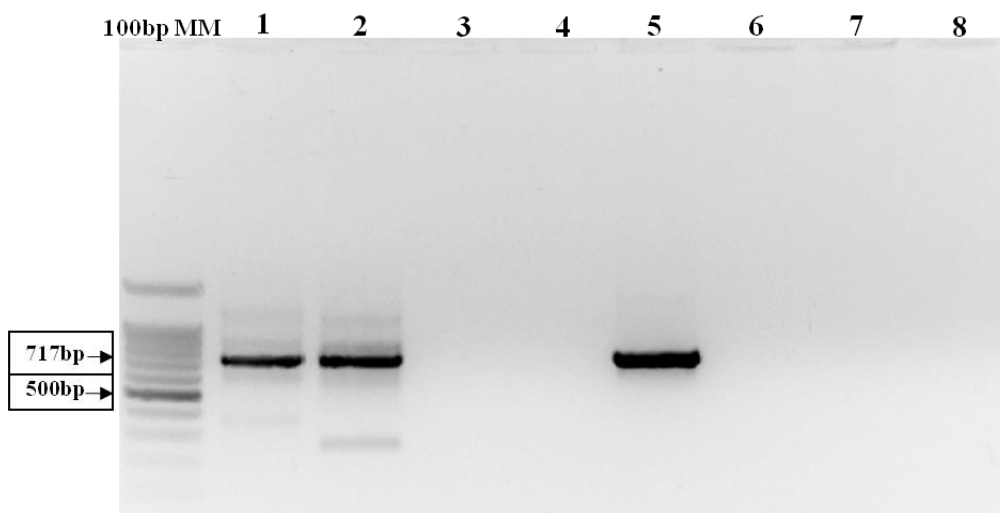
شکل ۶. ارزیابی میکروسکوپی برگ گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل ویروسی pSCMV-CS3، ۲۰ روز پس از تزریق آگروباکتریومی تحت میکروسکوپ کانفوکال Leica TCS-SP5 با بزرگنمایی ۴۰X؛ (A) فلورسنس ناشی از بیان پروتئین GFP توسط ناقل ویروسی pSCMV-CS3-GFP در مقایسه با (B) فلورسنس ناشی از کلروفیل در گیاهان ذرت شاهد تلقیح شده با ناقل pSCMV-EV فاقد ژن خارجی؛ رنگ قرمز نشان دهنده فلورسنس ناشی از کلروفیل گیاه و رنگ سبز نشان دهنده فلورسنس ناشی از بیان GFP است.

Figure 6. Microscopic examination of maize plants, 20 days after direct Agoinjection of pSCMV-CS3 vectors into stems, under confocal Leica TCS-SP5 microscope (40X); A) fluorescence emission in plants expressing pSCMV-CS3-GFP in comparison with B) Chlorophyll fluorescence emission in control plants inoculated with empty pSCMV vector; Red is indicative of plant chlorophyll autofluorescence and green is related to GFP expression in plant mesophyll cells.

مقایسه اثر سویه‌های آگروباکتریوم، ژنوتیپ و سن گیاهچه‌های ذرت: تجزیه واریانس (جدول ۱) و مقایسه

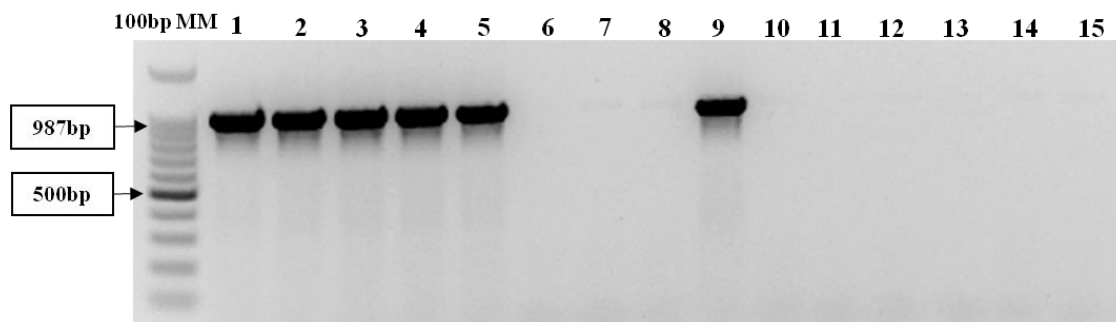
میانگین تیمارها (شکل ۹) نشان داد که در مقایسه میان واریته‌های ذرت مورد استفاده، درصد گیاهان ذرت شیرین رقم گلدن بانتام که با استفاده از ناقل ویروسی مبتنی بر SCMV و به واسطه تلقیح مستقیم آگروباکتریومی قادر به بیان ژن خارجی GFP بودند، به‌طور بسیار معنی‌داری نسبت به دیگر رقم ذرت شیرین یعنی آیوچف و نیز لاین خالص دندان اسبی B73 که از ارقام اصلی و رایج

در سراسر دنیا است، بالاتر بود. به طوری که درصد کلی گیاهان محتوی ناقل ویروسی با تأیید بیان پروتئین پوششی ویروس یا GFP، به ترتیب در ارقام گلدن بانتام و آیوچف ۳۶/۷۶ و ۸/۶۵ درصد بود درحالی که صرف نظر از سویه آگروباکتریوم مورد استفاده، هیچ گیاه آلوده به SCMV در رقم B73 مشاهده نشد. شایان ذکر است که علائم موزائیک در گیاهان رقم گلدن بانتام سریع تر از رقم آیوچف و ظرف ۱۰ روز تا دو هفته پس از تزریق ظهور یافت در حالی که در گیاهان آیوچف ظهور علائم آلودگی ویروسی ۳-۴ هفته پس از تزریق مشاهده شد.



شکل ۷. تأیید حضور رونوشت‌های GFP در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-GFP پس از تأیید میکروسکوپی بیان ژن خارجی؛ تکثیر قطعه ۷۱۷bp مربوط به ژن خارجی GFP (چاهک‌های ۱ و ۲)، در مقایسه با گیاهان شاهد فاقد علائم تلقیح نشده یا تلقیح شده با بافر (چاهک‌های ۳ و ۴)، پلاسمید pSCMV-CS3-GFP به‌عنوان کنترل مثبت واکنش PCR (چاهک ۵)، کنترل فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (چاهک‌های ۶ و ۷) و کنترل فاقد DNA الگو (چاهک ۸).

Figure 7. RT-PCR analysis of plants inoculated with pSCMV-CS3-GFP after microscopic confirmation of GFP expression; Amplification of 717bp GFP coding sequence (1 and 2), in comparison with asymptomatic uninoculated or buffer-inoculated plants (3 and 4), pSCMV-CS3-GFP as positive PCR control (5), no reverse transcriptase control (NRT) (6 and 7) and no template control (NTC) (8).



شکل ۸. تأیید حضور رونوشت‌های ژن پروتئین پوششی ویروس (CP) در گیاهان ذرت دارای علائم موزائیک تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-EV؛ تکثیر قطعه ۹۸۷bp مربوط به ژن CP (چاهک‌های ۱-۵) در مقایسه با گیاهان شاهد فاقد علائم تلقیح نشده یا تلقیح شده با بافر (چاهک‌های ۶-۸)، پلاسمید کنترل مثبت محتوی ناقل pSCMV-CS3-EV (چاهک ۹)، کنترل فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (چاهک‌های ۱۰-۱۴) و کنترل فاقد DNA الگو (چاهک ۱۵).

Figure 8. RT-PCR analysis of plants inoculated with pSCMV-CS3-EV; Amplification of 987bp viral CP coding sequence (1-5), in comparison with asymptomatic uninoculated or buffer-inoculated plants (6-8), pSCMV-CS3-EV as positive PCR control (9), no reverse transcriptase control (NRT) (10-14) and no template control (NTC) (15).

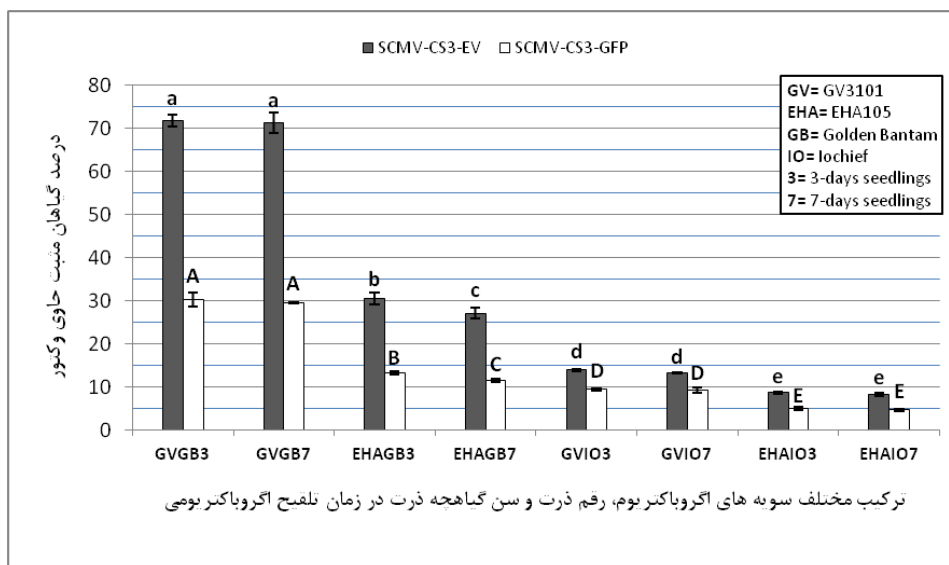
از میان دو سویه مختلف آگروباکتریوم مورد استفاده، سویه GV3101 با اختلاف تقریباً ۵۰ درصدی نسبت به سویه EHA105 راندمان بالاتری را در انتقال ناقل ویروسی از خود نشان داد. به گونه‌ای که راندمان انتقال سازه‌های مبتنی بر SCMV به‌طور میانگین در مورد سویه GV3101 در ارقام ذرت شیرین ۲۹/۹۵ در صد و در مورد سویه EHA105 برابر با ۱۵/۴۶ در صد بود. در مورد تأثیر مرحله رشدی ذرت بر راندمان انتقال ناقل ویروسی، در مورد سویه GV3101 تفاوت معنی‌داری از نظر راندمان انتقال و بیان ژن خارجی میان گیاهان گل‌دندان‌تمام که در مرحله سه روزه تلقیح شدند با گیاهچه‌های هفت روزه مشاهده نشد اما بدشکلی ناشی از آسیب احتمالی به بخش‌های مرستمی از جمله کوتوله شدن و کندی رشد، پارگی برگ‌ها و منشعب شدن ساقه در گیاهان سه روزه بیشتر بود. در حالی که در مورد سویه EHA105 موفقیت انتقال و بیان ناقل و ژن خارجی در گیاهچه‌های سه روزه نسبت به گیاهچه‌های هفت روزه به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) بالاتر بود. همچنین گیاهچه‌های سه و هفت روزه رقم آیوچف، برای هیچ‌یک از دو سویه آگروباکتریوم مورد استفاده، تفاوت معنی‌داری از نظر راندمان انتقال و بیان ناقل ویروسی نشان ندادند. شایان ذکر است که در مقایسه میان تیمارهای مختلف مشاهده شد که ناقل SCMV فاقد ژن خارجی در مقایسه با ناقل حاوی ژن خارجی GFP با راندمان بالاتری (تقریباً دو برابر) به گیاهان ذرت منتقل شد به نحوی که درصد گیاهان مثبت در

مورد سازه pSCMV-CS3-EV به‌طور میانگین ۳۰/۲۵ در صد و در مورد سازه CS3-GFP-SCMV برابر با ۱۵/۱۶ در صد بود (شکل ۹).

جدول ۱. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی عملکرد ناقل pSCMV-CS3 مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر در انتقال و بیان ژن خارجی GFP تحت تاثیر سه فاکتور سویه آگروباکتریوم، رقم ذرت و سن گیاهچه‌های ذرت در هنگام تزریق آگروباکتریومی ناقل. * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد.

Table 1. Efficiency of pSCMV-CS3 vector to deliver and express GFP transgene into maize plants under the effects of different *Agrobacterium* strains, maize varieties and growth stage of seedlings at the time of direct Agroinjection. * and ** Significant at probability level 5% and 1%, respectively.

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (DF)	منبع تغییر Source
725.59**	310.497848	2173.484933	7	تیمارها (Treatments)
1699.65**	727.320600	727.320600	1	سویه آگروباکتریوم <i>Agrobacterium</i> strain
2762.56**	1182.168067	1182.168067	1	رقم ذرت Maize variety
2.21	0.944067	0.944067	1	سن گیاهچه ذرت Age of maize seedling
602.15**	257.677067	257.677067	1	سویه آگروباکتریوم*رقم ذرت Maize variety* <i>Agrobacterium</i> strain
7.34*	3.139267	3.139267	1	سویه آگروباکتریوم*سن گیاهچه ذرت Age of maize * <i>Agrobacterium</i> strain seedling
0.34	0.147267	0.147267	1	رقم ذرت*سن گیاهچه ذرت Age of maize seedling*Maize variety
4.88*	2.088600	2.088600	1	سویه آگروباکتریوم*رقم ذرت*سن گیاهچه ذرت <i>Agrobacterium</i> strain*Maize variety*Age of maize seedling
	0.427925	6.846800	16	خطا
		2180.331733	23	کل



شکل ۹. درصد انتقال و بیان ناقل ویروسی مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر (سازهای pSCMV-CS3-GFP و pSCMV-CS3-EV) با استفاده از دو سویه آگروباکتریوم GV3101 و EHA105 در گیاهچه‌های سه و پنج روزه دو رقم ذرت گلدن بانتام و آیوچف با استفاده از روش تزریق آگروباکتریومی؛ ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون چنددامنه‌ای دانکن). نتایج حاکی از کاهش تقریباً ۵۰ درصدی در کارایی انتقال ناقل در حالت درج ژن خارجی در مقایسه با ناقل فاقد ژن خارجی دارد.

Figure 9. Efficiency of two *Agrobacterium* strains, GV3101 and EHA105, to deliver and express SCMV-based vectors (pSCMV-CS3-GFP and pSCMV-CS3-EV) into three and seven-day old Golden Bantam and Iochief sweet corn seedlings via direct Agroinjection procedure; Different letters indicate significant differences (Duncan's multiple range test). Results indicate a reduction by 50% in transgene-containing vector in comparison with empty one.

بحث

ذرت با کاربردهای گسترده غذایی و صنعتی از غلات اصلی است که به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان کشت می‌شود. این سیستم مدل کلاسیک، با ژنومی که به‌طور کامل توالی‌یابی شده است، در حرکت رو به جلوی حوزه پساژنوم، همچنان در پیشانی مطالعات بنیادین زیست‌شناسی قرار خواهد داشت (Strable and Scanlon 2009; Liu et al. 2020). آنالیز ژنوم مرجع ذرت B73 (B73 RefGen_v4) ۳۹۴۹۸ ژن رمزکننده و ۶۷۷۴ توالی غیررمزکننده را پیش‌بینی نموده است (Schnable et al. 2009) که بررسی عملکرد سریع این ژن‌ها می‌تواند با استفاده از ابزارهای جدید از جمله ناقل‌های ویروسی خاموشی ژن یا بیان پروتئین تسهیل شود. به‌تازگی ناقل‌های مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر به جعبه ابزار مورد استفاده برای ارزیابی عملکرد ژن‌ها در

ذرت اضافه شده است (Mei et al. 2019b; Chung et al. 2021). این ناقل قادر به آلوده‌سازی لاین‌های خالص مختلفی از ذرت شیرین و دندان اسبی است و دامنه میزبانی بالقوه آن شامل سایر گیاهان تک لپه حائز اهمیت زراعی از جمله سورگوم، برنج، جو، چچم و غیره است (Pirone 1972). بنابراین می‌تواند برای تحقیق پیرامون سایر گونه‌های گیاهی اقتصادی مهم نیز مفید واقع شود. روش تزریق آگروباکتیریومی برای تحویل ژنوم‌های ویروسی به گیاه ذرت برای ویروس رگه‌ای ذرت، ویروس پیسک زرد ذرت (Maize Chlorotic Mottle Virus, MCMV) و همچنین به‌تازگی برای ناقل‌های بیان ویروسی FoMV و SCMV به‌طور موفقیت‌آمیز استفاده شده است (Wang et al. 2017; Grimsley et al. 1988; Beernink et al. 2021). در این پژوهش، ما با هدف بهینه‌سازی این روش، راندمان انتقال ناقل ویروسی مبتنی بر SCMV را به‌عنوان ناقل بیان پروتئین GFP در گیاه ذرت با در نظر گرفتن سه فاکتور شامل سویه آگروباکتیریوم مورد استفاده، سن گیاهچه‌های ذرت در زمان تزریق ناقل و ارقام مختلف ذرت شیرین و دندان اسبی مورد بررسی قرار دادیم. همچنین جهت افزایش احتمالی راندمان انتقال، از سورفکتانت‌هایی که در تحقیقات پیشین تاثیر مثبت آن‌ها بر افزایش راندمان تراریخته‌سازی ذرت با استفاده از آگروباکتیریوم مشخص شده بود، استفاده شد. اگرچه در گزارش‌های ابتدائی این ناقل، آلودگی وارسته‌های مختلف ذرت به تیپ وحشی ویروس SCMV و همچنین انتقال ناقل نو ترکیب در بردارنده GFP به روش خراشدهی برگ با عصاره گیاهان آلوده (Rub-inoculation) به ژنوتیپ‌های مختلف ذرت از جمله ذرت دندان اسبی B73 موفقیت‌آمیز بوده است (Mei et al. 2019b; Beernink et al. 2021). اما بر مبنای نتایج حاصل از این پژوهش، پاسخ ارقام ذرت مختلف مورد بررسی به انتقال ناقل ویروسی SCMV با روش آگرواینجکشن بسیار متفاوت بود به طوری که برخلاف عدم موفقیت این روش در انتقال و بیان ناقل SCMV حاوی ژن خارجی در رقم B73، در مورد ارقام ذرت شیرین گل‌دندان‌باتام و آیوچف، وجود گیاهان مثبت بیان‌کننده GFP تأیید شد. به نحوی که در مورد رقم گل‌دندان‌باتام که در سایر پژوهش‌های پیرامون ناقل SCMV بر آن متمرکز بوده است (Mei et al. 2019b; Chung et al. 2021; Beernink et al. 2021)، راندمان انتقال برای ناقل محتوی توالی ۷۱۷ جفت بازی GFP برابر با ۲۱/۱۸ درصد و برای ناقل فاقد توالی خارجی ۵۰/۱۸ درصد بود. این تفاوت را می‌توان به مقاومت نسبی متفاوت ژنوتیپ‌های مختلف ذرت به ویروس موزائیک نیشکر نسبت داد. چنانچه تحقیقات مختلف، میزان حساسیت متفاوتی را در ژنوتیپ‌های مختلف ذرت و ارتباط آن را به وجود جایگاه‌های کروموزومی مقاومت به این ویروس اثبات نموده‌اند (Tao et al. 2013; Jones et al. 2007). از سوی دیگر، در اکثر گزارش‌های موجود، حضور و شیوع ویروس برای اولین بار در مزارع ذرت شیرین از جمله رقم گل‌دندان‌باتام گزارش شده است که این امر می‌تواند نشان‌دهنده سازگاری تکاملی بیشتر ویروس برای آلوده‌سازی این ارقام در مقایسه با ژنوتیپ‌های دندان اسبی باشد. همچنین بر مبنای نتایج یک پژوهش، پاسخ ارقام مختلف ذرت به روش‌های مختلف انتقال وکتور ویروسی SCMV از جمله اینفیلتراسیون برگ و بذر، پانچ بذر و ... متفاوت است (Mohr et al. 2019).

در پژوهش Beernink et al. (2021) راندمان روش تزریق را برای انتقال ناقل SCMV محتوی ژن خارجی GFP با استفاده از سویه GV3101 به گیاهان رقم گل‌دندان‌باتام ۸ درصد گزارش کردند در حالی که پژوهش حاضر در شرایط یکسان،

راندمان ۲۹/۹ درصدی را به دست آورد. به نظر می‌رسد این افزایش در راندمان انتقال می‌تواند با تاثیر سورفکتانت Silwet-L77 مرتبط باشد. پژوهش‌های مختلفی تاثیر مثبت اضافه نمودن سورفکتانت‌هایی از جمله Silwet-L77 را بر راندمان تراریخته‌سازی و بیان موقت ژن به واسطه آگروباکتریوم در محصولات زراعی مختلف مانند گندم، آرابیدوپسیس، سویا و ... نشان داده‌اند (Li et al. 2009; Wu et al. 2003; King 2013). به نظر می‌رسد این ترکیب با کاهش کشش سطحی محیط و شاید از میان برداشتن مواد مشخصی که اتصال سلولی را مهار می‌کنند قدرت مهاجمی باکتری و نهایتاً تحویل T-DNA را به گیاه هدف افزایش می‌دهند (Yang et al. 2006).

ناقل نوترکیب pSCMV-CS3-GFP که توالی درجی ۷۱۷bp را حمل می‌نمود نرخ آلودگی و انتقال پائین تری (کاهش حدود ۵۰ درصد) را در مقایسه با گیاهانی که با ناقل تهی (pSCMV-CS3-EV) تلقیح شده بودند داشت. به عبارت دیگر درج ژن خارجی در ناقل می‌تواند کارایی آن را در انتقال به گیاه ذرت به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. این موضوع احتمالاً به دلیل تاثیر منفی افزایش مقدار محتوای ژنتیکی بیگانه در ژنوم ویروس بر سازواری آن است. همانگونه که برخی مطالعات نشان داده‌اند که پایداری توالی درج شده در ناقل‌های ویروسی گیاهی به میزان بالایی به اندازه و توالی ژن درج شده وابسته است (Avesani et al. 2007; Mei et al. 2016; Mei et al. 2019; Beernink et al. 2021).

آنچه از نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌ها به روشنی استنباط می‌شود این است که سویه آگروباکتریوم مورد استفاده فاکتور مهمی است که راندمان انتقال سازه‌های نوترکیب را به گیاهان ذرت تحت تاثیر قرار می‌دهد. اگرچه در پژوهش‌های مختلف، سویه EHA105 در مقایسه با سویه GV3101 و دیگر سویه‌های رایج از جمله LBA4404 به‌عنوان موفق‌ترین سویه در روند انتقال ژن به ذرت گزارش شده است (Yu et al. 2013; Huang and Wei 2005; Cao et al. 2014). اما تاکنون تنها از سویه GV3101 یا سویه مادری آن یعنی C58 برای انتقال ناقل‌های ویروسی از جمله SCMV به ذرت استفاده شده است (Grimsley et al. 1988; Beernink et al. 2021; Mei et al. 2019a,b). نتایج حاصل از مقایسه میان دو سویه EHA105 و GV3101 در این مطالعه نشان داد که راندمان سویه GV3101 در انتقال ناقل ویروسی نوترکیب با استفاده از روش تزریق مستقیم به گیاهان ذرت کمی بیش از دو برابر سویه EHA105 است. لذا به نظر می‌رسد یکی از فاکتورهای مهم اثرگذار بر راندمان این روش نیز، سویه آگروباکتریوم مورد استفاده باشد.

پژوهش‌های متعدد نشان داده است، گونه‌های گیاهی مختلف و حتی درون یک گونه، ارقام یا اکوتیپ‌های مختلف ممکن است درجات بسیار متفاوتی از حساسیت به آلودگی توسط یک سویه ویژه آگروباکتریوم نشان دهند. توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم برای تراریخته‌سازی سلول‌های گیاهی نتیجه همکاری ژنوم کروموزومی و پلاسمیدی آن‌ها است که همه اجزای موردنیاز برای اتصال و انتقال DNA را کد می‌کنند. گیاهان مختلف ملکول‌های القاگر مختلفی را با توانایی القاکنندگی و غلظت سلولی متفاوت تولید می‌کنند. این تنوع موجب اختلاف در سطوح بیان ژن *vir* در میزبان‌های مختلف و به موجب آن، تاثیر بر حساسیت

آن‌ها نسبت به آلودگی با *Agrobacterium* می‌شود (Karami 2008). چنانکه پیش از این در ذرت نشان داده شده است که بیان موقت ژن خارجی بتا-گلوکورونیداز (GUS) تحت تاثیر سویه آگروباکتریوم، ژنوتیپ ذرت و بافت گیاهی مورد استفاده و نیز برهمکنش‌های میان این عوامل قرار داشت (Ritchie et al. 1993).

بر مبنای یافته‌های این پژوهش، تاثیر مرحله رشدی گیاهچه‌های ذرت بر راندمان انتقال و بیان موفق ژن خارجی GFP به برهمکنش متقابل سویه آگروباکتریوم و ژنوتیپ ذرت بستگی دارد. به طوری که راندمان روش تزریق مستقیم آگروباکتریومی برای گیاهان سه و هفت روزه ذرت زمانی که از سویه GV3101 جهت انتقال آگروباکتریومی ناقل استفاده شد اختلاف معنی‌داری نداشت. اما در سویه EHA105 راندمان انتقال ناقل به گیاهان سه روزه در مقایسه با گیاهان هفت روزه بالاتر بود ($p \leq 0.05$). این نتایج را می‌توان به پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های ذرت به آلودگی با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم نسبت داد. به طور کلی، با توجه به اینکه بروز بدشکلی‌های مورفولوژیکی و کندرشدی‌ها در گیاهان سه روزه ذرت شیرین بیشتر مشاهده شد، لذا به نظر می‌رسد در ذرت شیرین استفاده از گیاهان هفت روزه و سویه GV3101 جهت دستیابی به حداکثر راندمان از یک سو و دستیابی به گیاهان دارای ویژگی‌های رشدی برتر، از سوی دیگر، ارجح باشد.

یکی از مهم‌ترین مزیت‌های ناقل مبتنی بر SCMV، توانایی این ناقل در بیان سیستمیک و پایای پروتئین خارجی در گیاه ذرت است (Mei et al. 2019a). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز، در زمینه ردیابی بیان GFP در گیاهان ذرت تلقیح شده با pSCMV-CS3-GFP این امر را تأیید می‌نماید. اگرچه بیان سیستمیک پروتئین‌های هترولوگ با استفاده از تعداد انگشت شماری از ناقلین ویروسی در غلات گزارش شده است اما پایایی و دوام این بیان در ناقل SCMV به میزان قابل توجهی بالاتر است. به طور مثال، ناقل نوظهور مبتنی بر ویروس موزائیک ارزنی سبز (FoMV) تنها تا ظهور برگ هفتم قادر به بیان سیستمیک GFP در گیاهان ذرت بوده و پس از آن، بیان GFP در برگ‌های بالاتر ردیابی نشده است (Bouton et al. 2018).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان ترکیب ناقل ویروسی بیانی SCMV، ذرت شیرین رقم گلدن‌بانام و باکتری GV3101 را در تلفیق با روش تزریق مستقیم آگروباکتریومی به گیاهچه‌های هفت روزه ذرت، به عنوان یک سیستم مدل کارآمد برای بیان سریع و کارآمد و سیستمیک پروتئین در پروژه‌های مختلفی از جمله بررسی‌های عملکردهای ناشناخته ژنی، تولید پروتئین‌های نو ترکیب دلخواه، غربالگری سریع ژن‌های موثر در مدیریت تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی از منابع متعدد و متنوع موجود در خانواده مهم غلات و به ویژه در گیاه مدل و محصول استراتژیک ذرت معرفی نمود. همچنین بررسی کارایی این ناقل و روش در سایر گیاهان میزبان از جمله گیاه مدل ارزنی، گیاه صنعتی نیشکر و گیاه مهم علوفه‌ای سورگوم و همچنین استقرار و بهینه‌سازی این سیستم بیان موقت سریع و کارآمد در این گیاهان می‌تواند کمک شایانی به صرفه‌جویی در هزینه و زمان پروژه‌های ژنتیکی مرتبط با بهبود صفات این محصولات حائز اهمیت زراعی نماید.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل و همچنین همکاران موسسه تحقیقات گیاهی بویس-تامپسون به خاطر حمایت مالی و معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از پروفسور استیون ویتام از دانشگاه آیوا (Department of Plant Pathology and Microbiology, Iowa State University) جهت تامین ناقل‌های SCMV-CS2-GFP و SCMV-CS3-EV قدردانی نمایند. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

References

- Arafa RA, Rakha MT, Soliman NEK, Moussa OM et al. (2017) Rapid identification of candidate genes for resistance to tomato late blight disease using next-generation sequencing technologies. *PloS one* 12(12), e0189951.
- Avesani L, Marconi G, Morandini F et al. (2007) Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* 16(5), 587-597.
- Beernink BM, Holan KL, Lappe RR, Whitham SA (2021) Direct agroinoculation of maize seedlings by injection with recombinant foxtail mosaic virus and sugarcane mosaic virus infectious clones. *J Visualized Exp* 168, e62277.
- Bouton C, King RC, Chen H, Azhakanandam K et al. (2018) Foxtail mosaic virus: A viral vector for protein expression in cereals. *Plant Physiol* 177(4), 1352-1367.
- Cao SL, Masilamany P, Li WB, Pauls KP (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of corn (*Zea mays* L.) multiple shoots. *Biotechnol Biotechnol Equip* 28(2), 208-216.
- Chang AY, Chau VW, Landas JA, Pang Y (2017) Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods* 1, 22-25.
- Cheuk A, Houde M (2018) A new barley stripe mosaic virus allows large protein overexpression for rapid function analysis. *Plant Physiol* 176(3), 1919-1931.
- Chung SH, Bigham M, Lappe RR et al. (2021) A sugarcane mosaic virus vector for rapid in planta screening of proteins that inhibit the growth of insect herbivores. *Plant Biotechnol J*. [https://doi: 10.1111/pbi.13585](https://doi.org/10.1111/pbi.13585) [Epub ahead of print] PMID: 33763921.
- Cody WB, Scholthof HB, Mirkov TE (2017) Multiplexed gene editing and protein overexpression using a tobacco mosaic virus viral vector. *Plant Physiol* 175(1), 23-35.
- Edwards D, Batley J (2010) Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant biotechnol J* 8(1), 2-9.
- FAO (2019) *World Food and Agriculture— Statistical pocketbook 2019*. Rome.
- Gao Q, Xu WY, Yan T et al. (2019) Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. *New Phytologist* 223(4), 2120-2133.
- Grimsley NH, Ramos C, Hein T, Hohn B (1988) Meristematic tissues of maize plants are most susceptible to agroinfection with maize streak virus. *Biotechnol* 6(2), 185-189.
- Jones MW, Redinbaugh MG, Louie R (2007) The Mdm1 locus and maize resistance to Maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis* 91(2), 185-190.
- Karami O (2008) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Transgenic Plant J* 2(2), 127-137.
- Kawazu K, Wasano N, Konno K et al. (2012) Evaluation of anti-herbivory genes using an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Biotechnol* 29 (5), 495-499.
- King JL (2013) The development of an efficient method of *Agrobacterium*-mediated transient expression in soybean (*Glycine max*). PhD thesis, Ohio State University. pp. 19-21.

- Kushwaha NK, Chakraborty S (2017) Chilli leaf curl virus-based vector for phloem-specific silencing of endogenous genes and overexpression of foreign genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(5), 2121-2129.
- Lawrence CJ, Harper LC, Schaeffer ML et al. (2008) MaizeGDB: the maize model organism database for basic, translational, and applied research. *Int J Plant Genom* 2008, 496957.
- Lawrence SD, Novak NG (2001) A rapid method for the production and characterization of recombinant insecticidal proteins in plants. *Mol Breed* 8(2), 139-146.
- Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2012) Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. *Plant physiol* 160(2), 582-590.
- Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2015) In planta transient expression systems for monocots. In: *Recent advancements in gene expression and enabling technologies in crop plants*. Springer, New York, USA. pp. 391-422.
- Li JF, Park E, von Arnim AG, Nebenführ A (2009) The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant Methods* 5(1), 1-15.
- Lindbo J.A (2007) TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol* 145(4), 1232-1240.
- Liu J, Fernie AR, Yan J (2020) The past, present, and future of maize improvement: domestication, genomics, and functional genomic routes toward crop enhancement. *Plant Commun* 1(1), 100010.
- Mei Y, Beernink BM, Ellison EE et al. (2019a) Protein expression and gene editing in monocots using foxtail mosaic virus vectors. *Plant Direct* 3(11), e00181.
- Mei Y, Liu G, Zhang C et al. (2019b) A sugarcane mosaic virus vector for gene expression in maize. *Plant Direct* 3(8), e00158.
- Mei Y, Zhang C, Kernodle BM et al. (2016) A Foxtail mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in maize. *Plant Physiol* 171(2), 760-772.
- Mohr I (2019) Examination of Cucumber Mosaic Virus and Sugarcane Mosaic Virus as VIGS and VOX vectors in *Zea mays*, MSc thesis, University of California, Davis. pp. 18-39.
- Mor TS, Moon YS, Palmer KE, Mason HS (2003) Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol Bioeng* 81(4), 430-437.
- Nannas NJ, Dawe RK (2015) Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genet* 199(3), 655-669.
- Pirone T P (1972) Sugarcane mosaic virus. In: *CMI/AAB descriptions of plant viruses*. Gibbs AJ, Harrison BD, Murrant AF (Eds), No. 88, Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England.
- Redinbaugh MG, Louie R, Ngwira P et al. (2001) Transmission of viral RNA and DNA to maize kernels by vascular puncture inoculation. *J Virol methods* 98(2), 135-143.
- Ritchie SW, Lui CN, Sellmer JC, Kononowicz H, Hodges TK, Gelvin SB (1993) Agrobacterium tumefaciens-mediated expression of gusA in maize tissues. *Transgenic Res* 2(5), 252-265.
- Rosenkranz E (1978) Grasses native or adventives to the United States as new hosts of maize dwarf mosaic and sugarcane mosaic viruses. *Phytopathol* 68, 175-179.
- Rosenkranz E (1983) Susceptibility of representative native Mississippi grasses in six subfamilies to maize dwarf mosaic virus strains A and B and sugarcane mosaic virus strain B. *Phytopathol*, 73(9), 1314-1321.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS et al. (2009) The B73 maize genome: Complexity, diversity and dynamics. *Sci* 326, 1112–1115.
- Seo JK, Lee HG, Kim KH (2009) Systemic gene delivery into soybean by simple rub-inoculation with plasmid DNA of a Soybean mosaic virus-based vector. *Arch Virol* 154(1), 87.
- Shen WH, Hohn B (1994) Amplification and expression of the β -glucuronidase gene in maize plants by vectors based on maize streak virus. *The Plant J* 5(2), 227-236.
- Strable J, Scanlon MJ (2009) Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb Protocol* 2009(10), pdb-emo132.

- Tao Y, Jiang L, Liu Q et al. (2013) Combined linkage and association mapping reveals candidates for Scmv1, a major locus involved in resistance to sugarcane mosaic virus (SCMV) in maize. *BMC Plant Biol* 13(1), 1-13.
- Trzmiel K (2009) First report of Sugarcane mosaic virus infecting maize in Poland. *Plant Dis* 93(10), 1078-1078.
- Unamba CI, Nag A, Sharma RK (2015) Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Front Plant Sci* 6, 1074.
- Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS (2011) Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. In: *Plant Reverse Genetics*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 65-76.
- Wang Q, Zhang C, Wang C et al. (2017) Further characterization of Maize chlorotic mottle virus and its synergistic interaction with Sugarcane mosaic virus in maize. *Sci Rep* 7(1), 1-10.
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* 3(2), 259-273.
- Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD (2003) Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep* 21(7), 659-668.
- Yang, A, He C, Zhang K (2006) Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic calluses from maize elite inbred lines. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42(3), 215-219.
- Yu GR, Yan LIU, Du WP et al. (2013) Optimization of Agrobacterium tumefaciens-mediated immature embryo transformation system and transformation of glyphosate-resistant gene 2mG2-EPSPS in maize (*Zea mays* L.). *J Integr Agric* 12(12), 2134-2142.
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Sci* 296(5569), 913-916.
- Zhang X, Ding X, Li Z, Wang, S (2020) Development of Tomato bushy stunt virus-based vectors for fusion and non-fusion expression of heterologous proteins in an alternative host *Nicotiana excelsiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(19), 8413-8425.