Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of glufosinate gene transfer to safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through floral dipping in *Agrobacterium* suspension

Lida Soltani

M.Sc. Graduate, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: lidasoltani2010@gmail.com

Mojgan Shahriari

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biology, Albert Ludwigs University of Freiburg, Germany. Email: mojgan.shahriari@biologie.uni-freiburg.de

Farshad Roodbarkelari

Assistant Professor, Department of Biology, Albert Ludwigs University of Freiburg, Germany.Email: farshad.roodbarkelari@biologie.uni-freiburg.de

Ghasem Mohammadi Nejad

Professor, Genetics and Plant Breeding, Research & Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: mohammadinejad@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Among Iran's climate-well-adapted oily plants, safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is considered as a top-ranked plant since it is well-adapted to areas with water shortage. Safflower is known as a model crop with a variety of fatty acids with a relatively high tolerance to salinity and drought, and also due to its high nutritional value that is related to the composition of 90 percent unsaturated fatty acids in its oil content. It has always been considered as a desirable and valuable oilseed plant and can play an important role in expanding the area under planting of oilseeds in the country. Although, Iran with its diverse climate, is one of the richest regions in the world in terms of safflower genetic resources, safflower planting is not very common in our country. One of the main reasons is probably the lack of promotion and low grain yield of its cultivars. In this

study, For the first time the floral dipping was performed in *Agrobacterium* suspension in order that the glufosinate gene would be transferred to the safflower plant. Actually, the access to appropriate engineered cultivars will play a critical role in the development of safflower planting.

Materials and methods

Nine safflower lines were selected from a world-wide collection genotypes based on the different agronomic and phenotypic traits. They were submerged in *Agrobacterium* suspensions with optical density (OD600 nm) of 1 and in the presence of two different amounts of silwet-77.

Results

The genomic analysis of T_1 generations using glufosinate resistance gene primers indicated the success of glufosinate transfer in safflower plant through flower immersion.

Conclusions

Among 9 studied genotypes and 17 transformed plants using the floral dipping method, 3 transgenic plants were obtained with sequencing confirmation: one seedling belongs to Mahali Yazd genotype, one seedling belongs to the Mahali Kerman and one seedling belongs to the Paeize 12 genotype. All transgenic plants were inoculated with 40µl concentration of silwet-77.

Keywords: Gene transfer optimization, Genetic Engineering, Glufosinate, Oily plants.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Soltani L, Shahriari M, Roodbarkelari F, Mohammadi Nejad GH (2021) Evaluation of glufosinate gene transfer to safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through floral dipping in *Agrobacterium* suspension. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (2), 61-76.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 61-76. DOI: 10.22103/jab.2021.14155.1138

Received: April 03, 2021. Accepted: May 08, 2021.

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی انتقال ژن گلوفوزینات از طریق غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم به گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

لیدا سلطانی

دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: lidasoltani2010@gmail.com

مژگان شهریاری

* نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آلبرت لادویگ فرایبورگ، آلمان. رایانامه: mojgan.shahriari@biologie.uni-freiburg.de

فرشاد رودبارکلاری

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آلبرت لادویگ فرایبورگ، آلمان. رایانامه: farshad.roodbarkelari@biologie.uni-freiburg.de

قاسم محمدی نژاد

استاد، گروه ژنتیک و اصلاح‌نباتات، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. رایانامه: mohammadinejad@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۸

چکیده

هدف: از بین گیاهان روغنی سازگار با آب و هوای ایران، گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و سازگاری خوبی با مناطق کم آب دارد. گلرنگ به عنوان گیاه زراعی مدل با تنوع در اسیدهای چرب شناخته شده است. این گیاه با تحمل نسبتا بالایی که به شوری و خشکی از خود نشان می دهد و همچنین به علت دارا بودن روغنی مطلوب با بیش از ۹۰

درصد اسیدهای چرب غیراشباع، همواره به عنوان یک گیاه دانه روغنی مطلوب و با ارزش مطرح بوده است. از این‌رو گلرنگ می‌تواند نقش مهمی در گسترش سطح زیر کشت گیاهان روغنی در کشور داشته باشد. ایران با آب و هوای متنوع، یکی از غنی ترین مناطق جهان از لحاظ ذخایر ژنتیکی گلرنگ به شمار می‌رود. با این حال کشت گلرنگ در کشور رواج چندانی نداشته و دلایل عمده آن به احتمال زیاد، عدم ترویج و عملکرد پائین دانه‌ی ارقام آن است. در این پژوهش، به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه گلرنگ، برای اولین بار از روش غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم حامل ژن گلوفوزینات استفاده شده است. در حقیقت دسترسی به ارقام مهندسی شده می‌تواند نقش مهمی در توسعه کشت این گیاه داشته باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۹ لاین بومی و غیر بومی گلرنگ که بر اساس صفات مختلف زراعی و فنوتیپی انتخاب شده بودند به صورت مجزا با استفاده از ناقل بیان کننده ژن گلوفوزینات، با به کار گیری روش غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم با غلظت (OD600 nm) ۱ در حضور دو مقدار متفاوت از سیلوت-۷۷ مایه زنی شدند.

نتایج: بررسی‌های ژنومیک و توالی‌یابی سنگر برای نسل T_1 با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به گلوفوزینات نشان دهنده موفقیت انتقال ژن گلوفوزینات در گیاه گلرنگ از طریق غوطه‌ور سازی گل بود.

نتیجه‌گیری: از میان ۹ ژنوتیپ مورد مطالعه و ۱۷ گیاه ترنسفورم شده با استفاده از روش غوطه‌ور سازی در مطالعه حاضر، ۳ گیاه ترنسفورم شده با تائید توالی‌یابی به دست آمد که ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ محلی یزد، ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ محلی کرمان و ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ پائیزه۱۲ بود. هر سه گیاه با غلظت ۴۰ میکرولیتر از سیلوت-۷۷ تلقیح شده بودند.

کلیدواژه‌ها: بهینه سازی انتقال ژن، مهندسی ژنتیک، گلوفوزینات، گیاهان روغنی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: سلطانی لیدا، شهریاری مژگان، رودبارکلاری فرشاد، محمدی نژاد قاسم (۱۴۰۰) بررسی انتقال ژن گلوفوزینات از طریق غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم به گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۷۶-۶۱.

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

© the authors

مقدمه

گیاهان روغنی بعد از غلات و حبوبات در جایگاه سوم از نظر ارزش و تأمین منابع غذایی در جهان قرار گرفته اند. این گیاهان از اهمیت اقتصادی زیادی در کشاورزی برخوردارند و بیشترین روغن خوراکی بشر را تولید می‌کنند. از بین دانه‌های روغنی سازگار با آب و هوای کشور ایران، گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و سازگاری خوبی با مناطق کم‌آب دارد. گلرنگ به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع تک زنجیره و چند زنجیره، مورد توجه قرار گرفته است (Singh & Nimbkar 2006). از این رو، اصلاح این گیاه با استفاده از مهندسی ژن‌ها می تواند سبب بهبود برخی از صفات آن گردد (Sujatha 2002). امکان تغییرات ژنتیکی در گیاهان، استفاده از ژن‌های مفید به منظور بهبود صفات موجود در محصولات زراعی مهم را فراهم نموده است. انتقال ژن به گیاهان یک ابزار پژوهشی-بیولوژی گیاهی و یک ابزار عملی برای تو سعه گیاهان مهند سی شده با صفات مطلوب ا ست. در حال حا ضر انتقال ژن و باززایی گیاهان ترنسفورم شده مهم‌ترین عامل محدودکننده توسعه سیستم‌های انتقال ژن در بسیاری از گونه‌های گیاهی است. با این وجود گرایش پژوهشگران به بهینه‌سازی و یافتن سیستم‌های انتقال ژن با راندمان بسیار بالا نه تنها شامل بهبود بخشیدن به سیستم‌های موجود بلکه تلاش برای یافتن روش‌های نوین است. در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، انتقال ژن با اگروباکتریوم و بمباران ذره‌ای (Particle Bombardment) برای طیف وسیعی از گیاهان گزارش شده است (Birch 1997). بمباران ذره‌ای در تحقیقات گیاهی بیشترین کاربرد را در مطالعات بیان موقت ژن (Transient Gene Expression)، تولید گیاهان ترنس‌ژن (Transgenic Plants) و مایه‌زنی گیاهان با عوامل بیمارگر گیاهی دارد (Southgate 1995; Sanford 2000; Taylor & Fauquet 2002). ناقل‌هایی که برای انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارت‌اند از پلاسمیدهای آگروباکتریوم، ویروس ها و عناصر متحرک. برای انتقال ژن به گیاهان روش های مختلفی وجود دارد؛ اما تراریزش به کمک اگروباکتریوم علی‌رغم محدودیت‌های آن هنوز هم یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تولید گیاهان تراریخته به شمار می‌آید (Ji et al. 2013; Mrizova et al. 2014). انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان می‌باشد که کاربرد آن در سال ۱۹۸۳ میلادی، علائمی از برطرف شدن موانع در مهندسی ژنتیک گیاهی را نشان داده است. امروزه، *Agrobacterium tumefaciens* به عنوان مؤثرترین عامل در مهند سی ژنتیک گیاهی در طبیعت مطرح شده است. با ا ستفاده از باکتری مذکور به راحتی انتقال ژن به بسیاری از گونه‌های مهم زراعی و باغی انجام می‌پذیرد. برای این روش مزایای بی شماری از جمله قرارگیری ژن مورد نظر از طریق T-DNA باکتری در ژنوم گیاه مورد نظر، بیان پایدار ژن منتقل شونده و بازده بالا در انتقال ژن بدون کاهش چ شمگیر در میزان باززایی گیاهان را می‌توان ذکر نمود. ا ستفاده از این تکنیک در مورد گیاهانی که ک شت بافت آن‌ها ساده و دارای پروتکل‌های بهینه است برای انتقال ژن در اولویت قرار دارد (Glevin 2003). در فرآیند انتقال ژن، قطعه‌ای از DNA باکتری اگروباکتریوم به گیاه منتقل می شود. این قطعه را T-DNA و پلا سمید ناقل اهدا کننده T-DNA را، پلاسمید Ti می‌نامند (Glevin 2003). T-DNA یک محدوده‌ی ژنی از ژن‌های سرطان‌زا را حمل می‌کند که انتقال این

ناحیه‌ی ژنی به گیاه سبب رشد نامحدود بافت و تولید اوپین توسط آن می‌گردد (Zhu et al. 2000). در حوزه کشت بافت، برای انتقال ژن به گیاهان روش‌های مختلفی وجود دارد. در مورد انتقال ژن با وا سطه اگروباکتریوم به گیاه گلرنگ گزارش‌های اندکی وجود دارد. اولین گزارش در مورد انتقال ژن به گلرنگ با وا سطه *A.tumefaciens* در رقم آمریکایی Centennial منت شر شد. آن‌ها ســـویه اگروباکتریوم LBA4404 دارای پلاســـمید pBi121 و ژن nptII را به این رقم منتقل نمودند. از آن‌جایی که ژن گزارشـگر GUS بود، فعالیت این ژن در نیمی از کالوس‌های مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسـین نشـان داده شـد (Ying et al. 1992). در گزارش دیگری در سال ۱۹۹۹ تو سط سنکارا، انتقال ژن به دو کولتیوار هندی (A1, A300) از گیاه گلرنگ صورت گرفت (Sankara Rao & Rohini 1999; Rohini & Sankara Rao 2000). نتایج ن شان‌دهنده موفقیت حدود ۲۰-۳۰ درصـــد ریزنمونه باززایی شـــده، توســـط اگروباکتریوم بوده اســـت. نوع کولتیوار در کارایی تراریختگی نقش مهمی ایفا می‌نماید (Rohini & Sankara 2000).

ا ستفاده از روش‌های ک شت بافت، فرایند انتقال ژن به گیاهان را با م شکلات متعددی همچون صرف زمان و هزینه زیاد، نیاز به مهارت، تخصـص، تجربه و بروز تغییرات ژنتیکی ناشـی از تنوع سـوماتیکی مواجه سـاخته اسـت. از این رو در سـال‌های اخیر، پژوهشگران به ابداع روش‌های تسهیل شده انتقال ژن اهتمام ورزیده‌اند که بی‌نیاز از فرایند ک شت بافت بوده و پا سخ‌گوی نیازهای تحقیقات نوین بیولوژی مولکولی باشند. در این بین، روش غوطه‌ور سازی گل یا تعمیددهی گل (Floral Dipping of Flower Head) توجه زیادی را به خود معطوف کرده اسـت، مهم‌ترین اهمیت ذکر شـده برای این روش، فراغت از به کارگیری روش‌های ک شت بافت برای باززایی گیاه ا ست که کمک می‌کند زمان و هزینه کمتری صرف شود و همچنین فاقد نتایج نامطلوب نا شی از تنوع سوماکلونال در ک شت بافت گیاهان ا ست (Clough 1998). در این مطالعه به منظور بهینه سازی انتقال ژن به گیاه گلرنگ برای اولین بار تلاش شد تا ژن مقاومت به گلوفوزینات با ا ستفاده از تکنیک غوطه‌ور سازی گل در سو سپان سیون اگروباکتریوم به گیاه گلرنگ منتقل شود(Soltani 2018).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: ۹ ژنوتیپ مختلف گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) که از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان تامین شده بودند به عنوان ژرم‌پلاسم اولیه در نظر گرفته شدند (جدول ۱).

جدول ۱. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش

Table 1. Studied genotypes in this research

کد ژنوتیپ Genotype Code	نام ژنوتیپ Genotype Name	خاستگاه Origin
301	12پائیزه Winter 12	ایران Iran
381	PI198877	فرانسه France
681	HARTMAN	آمریکا USA
581	محلی یزد Yazd local	ایران Iran
561	محلی کرمان Kerman local	ایران Iran
241	گلدشت Goldasht	ایران Iran
701	7داراب Darab 7	ایران Iran
401	16پائیزه Winter 16	ایران Iran
271	سیریان Syrian	سوریه Syria

به منظور انتقال سازه ژنی به گلرنگ از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌ی C58C1 دارای ژن گزینش‌گر گلوفوزینات تحت پروموتور 35S و خاتمه‌دهنده NOS (Nopaline Synthase) استفاده شد. این سازه توسط الکتروپوریشن (Bio-Rad Gene Pulser XCell Electroporation System) به سویه ذکر شده اگروباکتریوم منتقل گردید. اگروباکتریوم بر روی محیط LB (Merck) جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تترامایسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کانامایسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۸°C کشت داده شد. سپس تک کلنی‌ها جدا و به محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده منتقل گردیدند و ۴۸ ساعت مجددا در ۲۸°C انکوبه شدند. سپس، استخراج پلاسمید با استفاده از (QIAGEN Plasmis Extraction Miniprep kit) انجام گرفت و تک کلن‌ها توسط هضم آنزیمی و PCR (Eppendorf AG 22331 Hamburg, Mastercycler Gradient) تائید شدند. همه‌ی ژنوتیپ‌های گلرنگ در بخش بیولوژی دانشگاه فرایبورگ آلمان در خاک حاوی ۲۰ درصد ورمیکولیت، شنی- لوم در گلخانه تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی با دمای روز ۲۱°C و دمای شب ۱۷°C کشت شدند، ۸۵ روز پس از کشت بذر، در مرحله‌ی ابتدایی باز شدن گل‌ها، عملیات غوطه‌ور سازی گل‌ها در سوسپانسیون اگروباکتریوم انجام گرفت.

انتقال ژن به گیاه: کلنی‌های تائید شده اگروباکتریوم به محیط کشت LB مایع (فاقد آگار) در حجم معین (۲۰۰ میلی‌لیتر) دارای غلظت ذکر شده از آنتی بیوتیک‌ها منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. در نهایت، غلظت باکتری با OD600: 1 (تعداد سلولهای باکتری $۱/۲ \times ۱۰^{۹}$ در هر سانتی متر مکعب از محیط کشت) جهت تراریختی استفاده گردید. بدین منظور محتویات محیط کشت مایع اگروباکتریوم موجود در دمای ۲۸°C ، پس از تعیین OD مناسب، به هود لامینار منتقل و به دو تیوب ۲۰۰ میلی‌لیتری در شرایط کاملا استریل منتقل شد. محتویات تیوب‌ها در دمای ۴°C و با سرعت ۳۶۵۰ rpm به مدت ۳۰

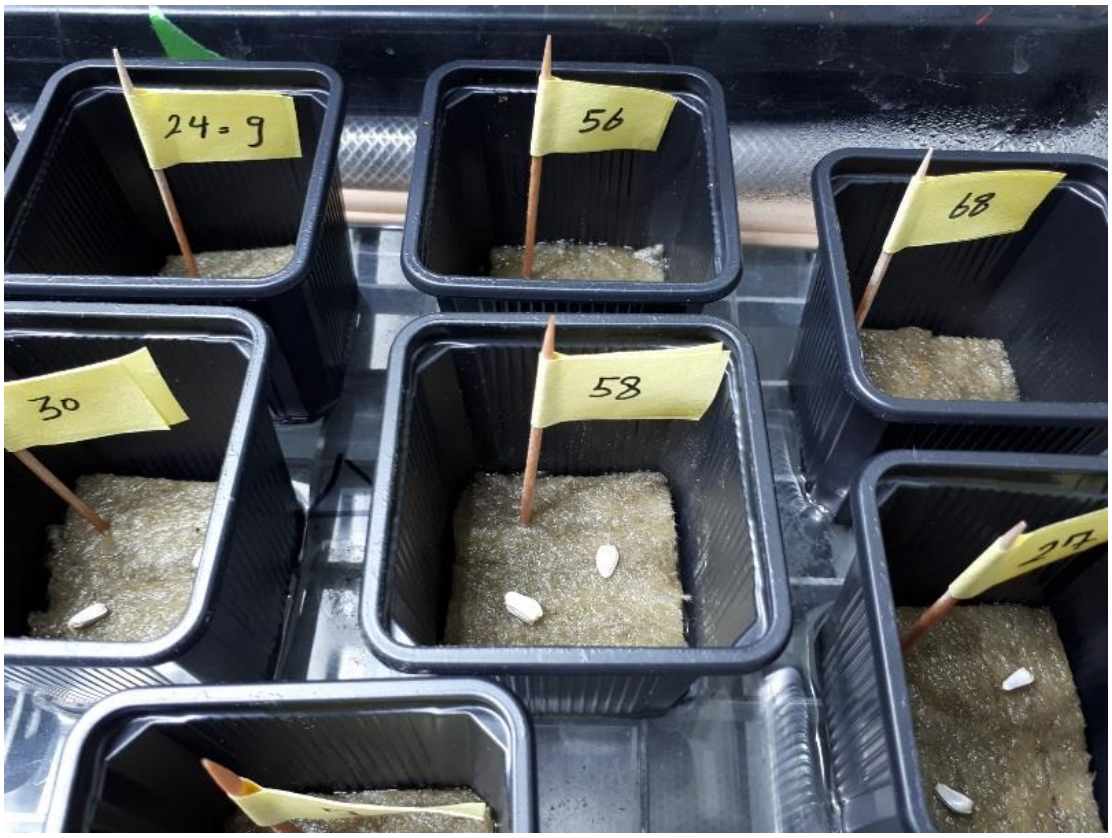
دقیقه با استفاده از دستگاه (Thermo Scientific, Multifuge 1SR Refrigerated Centrifuge) سانتریفیوژ شدند. پس از حذف روشناور، رسوب باقی‌مانده در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول آب استریل و ساکارز (۵ درصد) حل شد. به سوسپانسیون اگروباکتریوم در مرحله‌ی اول ۲۰ میکرولیتر از سیلوت ۷۷ اضافه شد و گل‌های گلرنگ به مدت ۱۵ ثانیه درون سوسپانسیون غوطه ور شدند. برای یک گروه مایه زنی با میزان ۲۰ میکرولیتر از سیلوت ۷۷ و برای گروه دیگر، مایه زنی با میزان ۴۰ میکرولیتر از سیلوت ۷۷ انجام شد. این کار برای تمام ژنوتیپ‌ها و تمام گل‌های هر ژنوتیپ فقط ۱ بار به صورت مجزا انجام گرفت. گل‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت با پوشش پلاستیکی به منظور جلوگیری از تبخیر سریع پوشانده شدند و اسم ژنوتیپ، تاریخ تلقیح و میزان سیلوت بر روی هر گل برچسب گذاری شد (شکل ۱).

شکل ۱. گل‌های گلرنگ در مرحله تیمار با روش غوطه‌ور سازی گل

Figure 1. Safflower floral head inoculated through floral dipping

بذرهای گلرنگ ۶۰ روز پس از مایه‌زنی جمع آوری شده و بررسی‌های ژنومیک جهت تعیین گیاهان ترنسفورم شده و اثبات حضور ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به گلوفوزینات (با ستا) انجام شد. بدین منظور بذرهای به دست آمده از گیاهان T_0 که انتقال ژن به آن‌ها صورت گرفته بود، جمع‌آوری و در گلدان‌های ۴ سانتی‌متری حاوی پوشش Grodan Rockwool کشت شدند. گرودان (Grodan)، یک سوبسترای مناسب برای کشت بذرهاست که امکان گزینش‌های سریع را فراهم می‌کند. برای آبیاری، از محیط MS مایع، (فاقد آگار) همراه با غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر از علف‌کش گلوفوزینات به منظور گزینش گیاهچه‌های حاوی ژن مورد نظر استفاده شد. برای جلوگیری از تبخیر، درب گلدان‌ها بسته و در اتاقک رشد با طول روز ۱۶ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت چهار روز، بذرهایی که در محیط حاوی علف‌کش گلوفوزینات جوانه زدند و تشکیل ساقه و ریشه‌چه دادند انتخاب، و بذرهایی که فاقد جوانه‌زنی بودند از محیط حذف شدند. در ابتدا، بستر گرودان با محیط MS مایع حاوی علف‌کش مذکور با غلظت ذکر شده آبیاری می شد. بعد از آن گیاهان انتخاب شده از مرحله اول، که دارای ریشه و ساقه‌ی بسیار جوان بودند به خاک منتقل شده و برای ۳ مرتبه در فواصل زمانی ۷ روزه توسط علف‌کش گلوفوزینات با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در

لیتر، اسپری شدند که در این مرحله برای آبیاری از آب مقطر استریل استفاده شد. در هر مرحله، فقط گیاهانی که مقاومت نشان دادند به مرحله‌ی بعد منتقل شدند. لازم به ذکر است که منظور از مقاومت، سرحال ماندن گیاه و عدم پژمردگی شدید و عدم ظهور علائم نکروز در برگ‌ها بود. نمایی از بذرهای کشت شده بر روی پوشش گرودان نشان داده شده است (شکل ۲).



شکل ۲. نمایی از بستر گرودان استفاده شده برای گزینش بذرهای T_1.

Figure 2. Selection of T_1 Seeds through Grodan-Rockwell substrate.

از گیاهان T_1 که در برابر علف‌کش گلوفوزینات مقاومت نشان داده بودند، نمونه برگ جدا و استخراج DNA به روش سقایی و همکاران (Saghai-Maroof et al. 1984) صورت گرفت. به منظور تکثیر ژن گلوفوزینات یا باستا (BA) در واکنش PCR، طراحی آغازگرها به گونه‌ای صورت گرفت که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها رونوشت مورد نظر به صورت اختصاصی تکثیر شود. طراحی آغازگرها توسط نرم‌افزار Vector NTI و با استفاده از توالی کامل ژن انجام گرفت و در نهایت یک آغازگر رو به جلو و یک آغازگر برگشتی طراحی شد که ناحیه‌ای به طول ۱۲۰۰ نوکلئوتید را تکثیر می‌کرد (جدول ۲). برای تمامی گیاهان، استخراج DNA در دو مرحله مجزا انجام گرفت و توسط آغازگرهای گلوفوزینات در واکنش PCR تکثیر شدند. در واکنش PCR واسرشت سازی اولیه و واسرشت سازی به ترتیب در مدت زمان‌های ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C صورت گرفتند، مرحله‌ی جفت شدن آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷°C و مرحله‌ی طویل شدن رشته در مدت زمان ۷۰ ثانیه در دمای ۷۲°C در ۳۵

چرخه انجام گرفت. همچنین، مرحله‌ی طویل شـدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C در نظر گرفته شـد. محصـول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شده و پس از الکتروفورز، چاهک‌هایی که دارای قطعه ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی بودند انتخاب شدند. سپس، قطعه ذکر شده از ژل جدا و توسط کیت استخراج محصول PCR (Thermo Scientific Gel Purification kit)، خالص‌سـازی شـدند و در مرحله نهایی برای توالی‌یابی مورد اسـتفاده قرار گرفتند. بدین منظور از توالی‌یابی سـنگر دانشـگاه آلبرت لادویگ آلمان استفاده شد.

جدول ۲. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن گلوفوزینات (باستا)

Table 2. Designed primers to amplification of Glufosinate gene (BASTA)

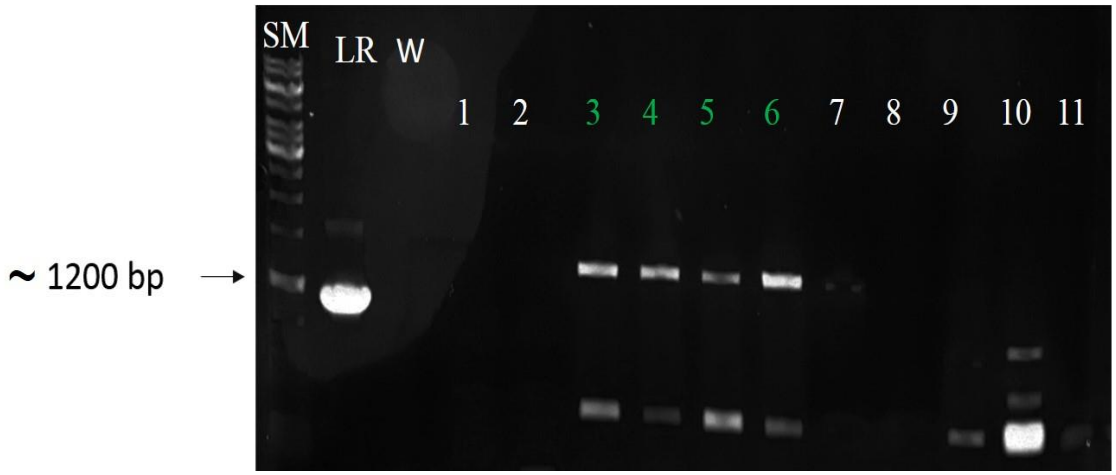
نام ژن (Gene Name)	توالی آغازگر (Primer sequence)		طول قطعه تکثیرشده Amplicon size (bp)
ژن مقاومت به گلوفوزینات Glufosinate Resistant gene	آغازگر رفت Sense Primer	5´-AAGCTTCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGA-3´	1200
	آغازگر برگشت Antisense Primer	5´-AAGCTTGTTCGGTACCCCTGGATTTTGGTT-3´	

نتایج و بحث

تائید گیاهان ترنسفورم شده، از طریق واکنش PCR برای تکثیر DNAی ژنومی گیاهان ترنسفورم‌شده نسل اول با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن گلوفوزینات (باستا) در دو تکرار مجزا برای ۱۷ گیاه تلقیح شده با اگروباکتریوم انجام گرفت. محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز منطبق بر محدوده ۱۲۰۰ جفت بازی برای برخی نمونه‌ها مشاهده گردید که نشان‌دهنده احتمال حضور توالی ژن گلوفوزینات (باستا) در ژنوم نسل T_1 بود (شکل ۳). این نتایج در مرحله بعد توسط توالی‌یابی برای برخی ژنوتیپ‌ها نیز تائید شدند.

لازم به ذکر است که به منظور انتقال ژن با استفاده از سوسپانسیون اگروباکتریوم از روشی به نام Vaccum Infiltration استفاده می‌شد که بطور موفقیت آمیزی در در آرابیدوپسیس گزارش شده است .(Bechtold et al. 1993). در سال ۱۹۹۸، کلاف این روش انتقال ژن به گل را پر زحمت دانسته و برخی مراحل آن را حذف و پروتکل کوتاه‌تری را ارائه داد. در روش بچتولد و همکاران، انتقال ژن از طریق اگروباکتریوم شامل چند مرحله به ترتیب: کاشتن گیاه، گلدهی، از ریشه در آوردن گیاهان، مایه‌زنی با

اگروباکتریوم، کاشتن دوباره گیاهان در خاک، جمع‌آوری بذر و گزینش با آنتی‌بیوتیک بود که کلاف در گزارش خود دو مرحله‌ی اساسی، همچنین به طور کلی استفاده از هورمون BAP و تنظیمpH را بی اثر دانست و بر حضور ساکاروز و سورفاکتانت سیلوت برای انتقال اگروباکتریوم به گل تاکید نمود. در حقیقت، بازدهی بیشتر روش غوطه‌ور سازی تمرکز را بر بهینه سازی این روش افزیش داد و در نهایت گزارش شد که روش پر زحمت Vaccum infiltration در سایه توجه به روش ساده فروبردن گل (غوطه‌ور سازی گل) در سوسپانسیون اگروباکتریوم با ۵ درصد ساکارز و سورفاکتانت سیلوت–۷۷ می‌تواند جایگزین شود.



شـــکل ۳. قطعه‌ی تکثیر یافته‌ی تقریبی منطبق بر محدوده‌ی ۱۲۰۰ جفت بازی در واکنش PCR برای DNAی ژنومی نسل T_1 با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به گلوفوزینات. از سمت چپ به ترتیب، SM: مارکر DNA در اندازه‌ی 1kb، LR: ناقل بیان گلوفوزینات که به عنوان کنترل مثبت ، W: کنترل منفی (آب). حضور قطعه مورد انتظار در چاهک‌های ۳، ٤ ،٥ و ٦ و عدم حضور قطعه در چاهک‌های ۱، ۲، ۷، ۸ ، ۹، ۱۰ و ۱۱

Figure 3. Amplification of the 1200 bp DNA fragment by PCR for confirmation of the genomic T_1 DNA using Glufosinate resistant gene primers. Respectively: SM: DNA marker (1kb). LR: Glufosinate expression vector (Positive control). W: Negative control (Water). Lane 3, 4, 5 and 6 contain the expected fragment and Lane 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11 were negative

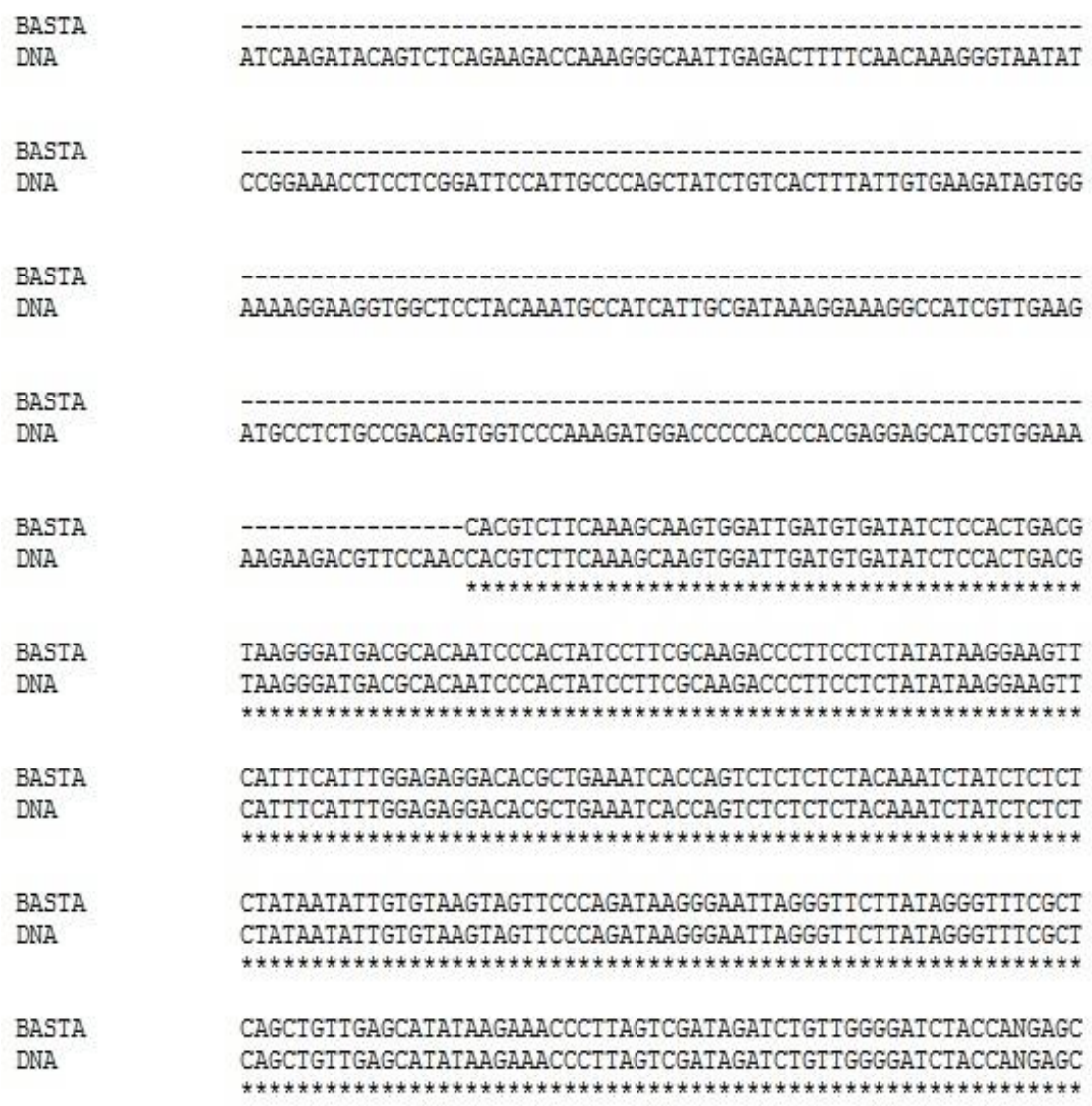
در روش تغییر یافته کلاف به محض اینکه تعدادی از جوانه‌های گل نابالغ ظهور می‌کنند، توسط سوسپانسیون اگروباکتریوم مایه‌زنی می‌شوند. این روش که Floral dipping نامیده شد، نه تنها مشکلات ناشی از کشت بافت گیاهی، تعدیل pH، تنوع سوماکلونال و غیره را نداشت بلکه با روشی بسیار ساده‌تر و راحت‌تر نسبت به Vaccum Infiltration برای انتقال ژن به گل انجام

می‌گرفت. در حقیقت این تکنیک نیازی به متخصص نداشته و با راندمان بسیار بالا قابل انجام است. اگروباکتریوم استفاده شده برای این روش بایستی دارای محدوده خاصی از تراکم سلولی باشد تا کارایی انتقال ژن افزایش یابد. کارائی این روش وابسته به سن مناسب گل‌ها برای مایه‌زنی، غلظت اگروباکتریوم و جلوگیری از تبخیر سریع سوسپانسیون پس از مایه‌زنی می‌باشد (Clough 1998).

در حوزه تحقیقات مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاه گلرنگ با استفاده از روش‌های کشت بافت، معتمدی و همکاران انتقال ژن جهش‌یافته *aroA* باکتریایی به گیاه گلرنگ را از طریق اگروباکتریوم و بهینه‌سازی شرایط کشت بافت انجام دادند و نشان دادند که بالاترین درصد باززایی گیاهچه‌های تراریخته در محیط انتخابی کانامایسین مربوط به رقم Dincer و سویه LBA4404 به میزان ۲۰/۶۱ درصد بوده در حالی‌که بررسی مولکولی PCR گیاهان تررایخته، فراوانی تراریختگی در رقم Dincer را ۱۰ درصد نشان داده بود (Motamedi et al. 2012). در گزارش دیگری تاثیر سویه‌های اگروباکتریوم، EHA105 و LBA4404 که به ترتیب حامل پلاسمید p35GUSInt و pBI121 بودند، همچنین نوع آنتی‌بیوتیک و هورمون‌های تنظیم کننده رشد را بر روی باززایی و کارایی تراریختگی گلرنگ بررسی کردند. شمارش تراریخته‌های بیان‌کننده آنزیم بتاگلوکرونیداز نشان دهنده آن بود که سویه EHA105/ p35GUSInt موثرتر از سویه LBA4404/ pBI121 عمل کرده است (Orlikowska et al. 1995). تا کنون گزارش‌های زیادی مبنی بر موفقیت انتقال ژن به کالوس‌های گلرنگ وجود دارد؛ اما هیچ گزارش موفقی در زمینه باززایی کامل ریشه از بافت‌های ترنسفورم شده وجود ندارد و تمامی گزارش‌ها، باززایی کامل را امری دشوار بیان کرده‌اند (Ying et al. 1992; Rao et al. 1999) در سال ۲۰۱۱ بلیده و همکاران امکان انتقال ژن *GFP* با واسطه اگروباکتریوم به کوتیلدون‌های گیاه گلرنگ را با استفاده از آنالیزهای PCR، Southern blot و Western blot در دو ژنوتیپ S-317 (دارای اولئیک اسید بالا–حدود ۷۰ درصد) و WT (تیپ وحشی، دارای لینولئیک اسید بالا) به ترتیب ۴/۸ و ۳/۱ درصد گزارش کردند. اما از آن‌جایی که تشکیل ریشه گلرنگ در شرایط آزمایشگاهی بسیار ضعیف است برای غلبه بر این مورد از پیوند ساقه باززا شده بر روی گیاه کامل استفاده کردند که پیوند ۵۰ درصد ساقه‌های باززایی شده را با موفقیت نتیجه گرفتند (Belide et al. 2011). به همین دلیل استفاده از روش‌های کشت بافت برای انتقال ژن به کالوس و بافت‌های گیاهی برای گیاه گلرنگ امکان پذیر است اما امکان تولید گیاهان ترنسفورم شده با توانایی تولید بذر و پایداری کامل وجود ندارد. این در حالی است که استفاده از روش غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم نه تنها بسیار ساده تر است بلکه گیاه ترنسفورم شده دارای پایداری کامل بوده و همچنین توانایی تولید بذر را نیز دارا می‌باشد.

در این پژوهش برای اثبات موفقیت انتقال ژن گلوفوزینات از طریق غوطه‌ور سازی در سوسپانسیون اگروباکتریوم، توالی‌های تکثیر شده در واکنش PCR پس از استخراج از ژل، با توالی‌یابی سنگر نیز تائید شدند. بدین صورت که نتایج توالی‌یابی نشان‌دهنده آن بود که از ۴ گیاهچه‌ی جوان تلقیح شده با ژن گلوفوزینات که تست PCR مثبت داشتند، وجود ژن گلوفوزینات در ۳ گیاهچه تایید گردید (شکل ۴). استفاد از اگروباکتریوم تومه فاشینس در مهندسی ژنتیک برای انتقال ژن یکی از پرکاربردترین روش‌ها می‌باشد.

انتخاب روش انتقال مساله پراهمیتی است که بیشتر به خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی گیاه وابسته است. عموما سیستم‌های کشت بافت برای این امر در نظر گرفته می شوند اما نکته‌ی حائز اهمیت این ا ست که ا ستفاده از این تکنیک‌ها زمانی می سر می شود که گیاهان ترنسفورم شده نه تنها توانایی باززایی داشته باشند بلکه پروتکل‌های بهینه برای باززایی نیز وجود داشته و در دسترس باشند.



شکل ٤. نتایج توالی‌یابی برای DNAی نسل T_1، نشان دهنده حضور ژن مقاومت به گلوفوزینات (باستا) در ژنوم

Figure 4. Sequencing result for T_1 DNA that revealed the presence of glufosinate resistant gene in genome

در مورد گیاه گلرنگ گزارشات متعدد حاکی از آن است که باززایی ریشه‌ی گیاه گلرنگ نه تنها بسیار سخت بلکه وابسته به ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است. در زمینه‌ی کشت بافت گلرنگ تنها بر روی ارقامی که عمدتا محدود به: Bhima، Grina، Manjira، S-144، HUS-305، centennial، A1 و A300 هستند گزارش‌هایی وجود دارد که اکثر آن‌ها بومی کشور هندوستان می‌باشند (Singh & Nimbkar, 2006; Orlikowska, 1995). اما روش انتقال از طریق غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم مزایای زیادی از جمله: فراغت از روش‌های پیچیده‌ی کشت بافت و اثرات نامطلوب تنوع سوماکلونال را دارد. اگرچه استفاده از این روش برای گیاهان زیادی با موفقیت همراه بوده و گزارش شده است اما گیاهان متعددی نیز هستند که امکان تراریختی آن‌ها از این طریق وجود ندارد. تا کنون گزارش‌هایی در زمینه‌ی انتقال ژن به گیاه گلرنگ منتشر شده است. در پژوهش حاضر برای اولین بار نشان داده شد که انتقال ژن با روش غوطه‌ور سازی گل در سوسپانسیون اگروباکتریوم با کارایی بالایی برای گیاه گلرنگ قابل استفاده می‌باشد (Soltani 2018).

نتیجه‌گیری: از ۱۷ گیاه ترنسفورم شده با روش غوطه‌ور سازی گل در مطالعه‌ی حاضر، ۳ گیاه ترنسفورم شده با تائید توالی‌یابی به دست آمد که ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ محلی یزد، ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ محلی کرمان و ۱ گیاهچه متعلق به ژنوتیپ پائیزه ۱۲ بود. هر سه گیاه با غلظت ۴۰ میکرولیتر از سیلوت–۷۷ تلقیح شده بودند. غوطه‌ور سازی گل یکی از ساده‌ترین و سریع‌ترین روش‌ها برای انتقال اگروباکتریوم به گیاه است که پژوهش حاضر تائید می‌کند با موفقیت در گیاه گلرنگ قابل انجام و تکرار است. لذا، برای طیف وسیعی از جنبه‌های مهندسی ژنتیک برای این گیاه می‌توان از این روش استفاده کرد. با توجه به عدم دسترسی به پروتکل‌های بهینه برای باززایی کامل ارقام ایرانی و همچنین سخت و زمان‌بر بودن پروسه باززایی گیاه کامل از کالوس‌های ترنسفورم‌شده، غوطه‌ور سازی گل بسیار ساده‌تر و کم هزینه‌تر از روش‌های کشت بافت گزارش می‌شود، از میان ۹ ژنوتیپ مورد مطالعه، ژنوتیپ محلی یزد، محلی کرمان و پائیزه ۱۲ بهترین ژنوتیپ‌ها برای انتقال ژن معرفی می‌گردند.

سپاسگزاری: از ریاست محترم پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان و همچنین تمام اعضای تیم تحقیقاتی آزمایشگاه پروفسور Klause Palme و تیم تحقیقاتی آزمایشگاه پروفسور Andreas Hiltbrunner در انستیتوی بیولوژی دانشگاه فرایبورگ آلمان به خاطر حمایت مالی، حمایت معنوی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر و همچنین از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

معتمدی جواد، زبرجدی علیرضا، کهریزی دانیال؛ سلمانیان علی‌هاتف (۱۳۹۱) انتقال ژن جهش یافته *aroA* باکتریایی به کمک *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه گلرنگ. ژنتیک نوین ۷، ۶۳ – ۵۷.

سلطانی لیدا (۱۳۹۷) خاموشی ژن FAD2-1 با استفاده از سیستم CRISPR-CAS 9 به منظور افزایش اولئیک اسید در گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*). رساله کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

References

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. proceedings of the French Academy of Sciences: Life Science 316, 1194–1199.

Belide S, Hac L, Singh SP et al. (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of safflower and the efficient recovery of transgenic plants via grafting. Plant Methods **7**,12.

Birch, RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical Application. Annual Review of plant Physiology and Plant molecular biology 48, 297-326.

Clough SJ (1998) Floral dip, a simple method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant journal 16, 735-743.

Glevin, SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, 16-37.

Ji Q, Xu X, Wang K (2013) Genetic transformation of major cereal crops. The International Journal of Developmental Biology 57, 495-508.

Mrizova K, Holaskova E, Tufan M et al. (2014) Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. Biotechnology Advances 32, 137-157.

Motamedi J, Zabarjadi AR, Kahrizi D, Salmanian AH (2012) Transfer of bacterial aroA mutant gene by Agrobacterium tumefaciens to Safflower. Modern Genet 7, 57-63 (In Persian).

Orlikowska TK, Cranston HJ, Dyer WE (1995) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar centennial. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40, 85–91.

Rao SK, Rohini VK (1999) Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using Agrobacterium tumefaciens.Plant Biotechnology16:201-206.

Rohini VK, Sankara Rao K (2000) Embryo transformation, a practical approach for realizing transgenic plants of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Annals of Botany 86, 1043-1049.

Saghai-Maroof MA, Soliman,KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83, 1757-1761.

Sanford JC (2000) The development of the biolistic process. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 36, 303-308.

Sankara Rao K, Rohini VK (1999) Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology 16, 201-206.

Singh V, Nimbkar N (2006) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. Oil Seed Crops, Chapter 6, 167-194.

Soltani L (2018) Extinction of FAD2-1 gene using CRISPR-CAS 9 system to increase oleic acid in safflower (Carthamus tinctorius). MSc Thesis, Shahid Bahonar University of Kerman (In Persian).

Southgate EM, Davey MR, Power JB, Marchant R (1995) Factors affecting the enetic engineering of plants by Microprojectile bombardment Biotechnology Advances 13, 631-651.

Sujatha M (2002) Current status and future prospects of in vitro techniques and biotechnology in safflower breeding. Sesame and safflower Newsletter 17, 92-97.

Taylor NJ, Fauquet, CM (2002) Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. DNA and Cell Biology 21, 963-977.

Ying M, Dyer WE, Bergman JW (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv. 'Centennial'. Plant cell Reports 11, 581–585.
Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B et al. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. Journal of Bacteriology 182, 3885 3895.