مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

انتقال ژن به ذرت (*Zea mays* L.) با استفاده از آگروباکتریوم و مریستم راسی ساقه

خدیجه باقری .Ph.D[1*]، رؤیا تقی بیگلو .M.Sc[2]، بهرام ملکی زنجانی .Ph.D

۱ - دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، زنجان، ایران

۲– دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، زنجان، ایران

۳- دانشگاه زنجان، ، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، زنجان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲

چکیده

هدف: این تحقیق با هدف بررسی میزان کالوس‌زایی و باززایی ارقام مورد مطالعه ذرت و همچنین بررسی امکان انتقال ژن با استفاده از ریزنمونه جوانه کامل و مریستم راسی انجام شد.

مواد و روش‌ها: دو نوع ریزنمونه جوانه کامل و مریستم راسی ساقه ۶ رقم ذرت، در محیط MS حاوی ۵ mg/l 2,4-D کشت شدند. برای باززایی کالوس‌ها، از محیط MS حاوی ۱ mg/l Kinetin و۱۰mg/l BAP استفاده شد. با توجه به نتایج آزمایش کشت بافت، دو رقم SC703 و SC704 برای انتقال ژن انتخاب و تراریزش ریزنمونه‌ها با Agrobacterium tumefaciens سویه LBA4404 حاوی وکتور pBI121 انجام شد. برای بررسی تراریختگی نمونه‌ها از واکنش PCR و آزمون هیستوشیمیایی استفاده شد.

نتایج: کالوس‌ها در مدت ۳۰ تا ۴۰ روز ایجاد شدند و فراوانی القای کالوس در هر شش رقم و هر دو ریزنمونه، ۱۰۰ درصد و بیشترین میزان باززایی (۹۰ درصد) مربوط به ریزنمونه‌های مریستم راسی ساقه‌ی رقم SC 704 و جوانه کامل رقم SC 703 بود. نتایج PCR برای ژن NPTII و آزمون هیستوشیمیایی GUS نشان داد که انتقال ژن‌های مدنظر به کالوس‌ها صورت گرفته و ژن GUS نیز بیان می‌شود.

نتیجه گیری: نتایج، بهتر بودن رقم SC 704 را از نظر کالوس‌زایی، باززایی و انتقال ژن نشان داد.

واژگان کلیدی: مریستم راسی ، کالوس‌زایی، باززایی، آگروباکتریوم، ذرت

مقدمه

طبق گزارش انجمن بین‌المللی غلات، میزان تولید ذرت در دنیا در سال ۲۰۱۶ تقریبا برابر با ۱۰۰۰ میلیون تن بوده است که بیشترین تولید در بین غلات به این محصول اختصاص دارد. به‌علت اهمیت فوق‌العاده زیادی که ذرت در تامین غذای دام و طیور و مصارف دارویی و صنعتی دارد، اصلاح این محصول بسیار مورد توجه می‌باشد. از اواسط دهه ۱۹۹۰، مهندسی ژنتیک یک عرصه جدید برای اصلاح غلات با سرعت بیشتر و یا معرفی صفات زراعی مفید فراهم کرده است (۱،۲،۳). موفقیت در مهندسی ژنتیک نیز تا حد زیادی به‌وجود یک دستورالعمل مناسب برای باززایی و تولید گیاه تراریخت از طریق کشت بافت وابسته است. در بیشتر تحقیقات انتقال ژن به ذرت، از جنین‌های نارس به‌عنوان ریزنمونه استفاده شده است. محدودیت عمده استفاده از جنین‌های نارس به‌عنوان ریزنمونه این است که همبستگی شدیدی بین ژنوتیپ و تولید جنین‌های سوماتیکی وجود دارد و تعداد کمی از ژنوتیپ‌های ذرت قادر به تولید کالوس‌های جنین‌زا هستند. تنوع سوماکلونال (Somaclonal variation) ، ایجاد شیمر، فراوانی پایین القای کالوس و باززایی گیاه از مشکلات دیگر استفاده از جنین‌های نارس می‌باشد (۶، ۴،۵). قابل ذکر است که در اغلب موارد، تنوع سوماکلونال موجب بروز صفات منفی می‌شود. در مواردی هم که صفت مثبتی بروز می‌کند، پایدار نیست و ممکن است صفات دیگر به‌صورت منفی تحت تاثیر قرار گیرند (۷). در حالی‌که مریستم راسی ساقه انعطاف پذیری بیشتری داشته و امکان تولید جنین‌های سوماتیکی به‌صورت مستقل از ژنوتیپ در این نوع ریزنمونه وجود دارد (۸). میزان انتقال T-DNA به مریستم‌های ساقه ذرت در محیط کشت حاوی اکسین بالا است و نیازی به استفاده از سویه‌های با شدت بیماریزایی بالا آگروباکتریوم نمی‌باشد. علاوه بر این، این ریزنمونه‌ها را می‌توان به‌صورت موثر و کارآمد برای باززایی گیاهان از طریق جنین‌زایی سوماتیکی و حتی اندام‌زایی مستقیم مورد استفاده قرار داد و گیاهانی از نظر ژنتیکی یکسان با والدین تولید کرد (۹). محدودیت دیگر در استفاده از جنین‌های نارس به‌عنوان ریزنمونه این است که برای به‌دست آوردن جنین نارس بایستی گیاه ذرت رشد رویشی خود را تمام کرده و به مرحله زایشی و تشکیل جنین برسد که این مدت زمان طولانی و حدود ۳ ماه خواهد بود. در حالی‌که مریستم‌های راس ساقه، ریزنمونه‌هایی هستند که به‌راحتی با جوانه زدن بذور در محیط کشت طی ۴ تا ۷ روز آماده می‌شوند. غلات به‌طور طبیعی میزبان آگروباکتریوم نیستند و تا سال ۱۹۹۳ هیچ گزارشی از انتقال ژن به غلات با این روش وجود ندارد. انتقال ژن به غلات عمدتا با روش بیولیستیک انجام شده اما عیب عمده این روش این است که اغلب تعداد نسخه‌های ژن وارده شده، بالا بوده که می‌تواند منجر به خاموشی ژن و توارث ناپایدار در نسل‌های بعد شود (۱۰). انتقال ژن با آگروباکتریوم می‌تواند یک پیشنهاد بهتر نسبت به‌روش بیولیستیک برای غلات از جمله ذرت ارائه دهد. این سیستم انتقال ژن منجر به پایداری بیشتر و تعداد کم نسخه تراریخت‌ها نسبت به تفنگ زیست پرتابی می‌شود و کارآمدتر می‌باشد (۱۱).

در این تحقیق دو هدف مدنظر بوده است: ۱- بررسی میزان کالوس‌زایی و باززائی ارقام مورد مطالعه ذرت و ۲- بررسی امکان انتقال ژن به ذرت با استفاده از دو نوع ریزنمونه جوانه کامل و مریستم راسی ساقه.

مواد و روش‌ها

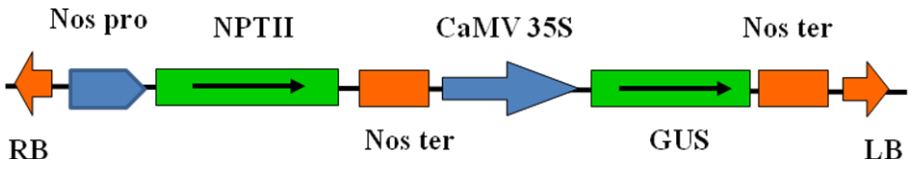
مواد گیاهی این تحقیق شامل بذر ۶ رقم ذرت هیبرید SC260، SC400، SC403، SC500، SC703 و SC704 از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده عبارت از جوانه کامل و مریستم راسی ساقه بودند. طرح مورد استفاده آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی و ۴ تکرار بود (فاکتور A: نوع رقم و فاکتور B: نوع ریزنمونه). تجزیه و تحلیل

آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار MSTAT-C، مقایسه میانگین با روش دانکن و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL انجام گرفت. تمامی مواد استفاده شده در کشت بافت از محصولات شرکت Merck بوده‌اند. آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین (Streptomycin) و سفوتاکسیم (Cefotaxime) از شرکت داروسازی جابربن حیان و کانامایسین (Kanamycin) از شرکت Sigma تهیه شد.

ضدعفونی بذور و تهیه ریزنمونه: برای ضدعفونی ابتدا، بذرها به‌مدت ۱۰ ثانیه در الکل اتانول ۹۰ درصد قرار گرفته و بعد با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس بذرها در داخل هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به اضافه ۰/۱ درصد توئین ۲۰ (Tween 20) به‌مدت ۲۵ الی ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و مجددا سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده به محیط کشت پایه MS جهت جوانه‌زنی منتقل و در اتاقک رشد به‌مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی، انتهای ساقه به طول ۳ تا ۴ میلی‌متر قطع و از آن‌ها به‌عنوان ریزنمونه جوانه کامل استفاده شد. برای تهیه ریزنمونه مریستم رأسی ساقه وقتی طول ساقه‌چه به ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسید با بررسی در زیر بینوکولار قسمت مریستم راسی ساقه که در قسمت انتهایی قرار دارد و طول آن به ۳ میلی‌متر می‌رسد جدا شد. قابل ذکر است که برای چند نمونه اول جهت مشخص شدن وضعیت مریستم راسی از بینوکولر استفاده شد (۱۲).

ریزنمونه‌های جوانه کامل و مریستم‌های ساقه برای القای کالوس‌ها روی محیط MS همراه با ۱۰۰ mg/l میواینوزیتول و ۴۰۰ mg/l تیامین-هیدروکلراید به اضافه ۵ mg/l 2,4-D کشت شدند. pH محیط روی ۵/۸ تنظیم شد. ریزنمونه‌ها به‌طور افقی کمی مایل، به‌طوری‌که انتهای آن‌ها داخل محیط کشت باشد قرار گرفتند. پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی منتقل شدند (۹). کالوس‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی شامل MS همراه با ۱۰۰ mg/l میواینوزیتول، ۱۰۰ mg/l گلایسین، ۱ mg/l کینتین و ۱۰ mg/l ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) منتقل شده و در دمای ۱± ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند (۹). برای جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها، در این مرحله به محیط کشت میزان ۱ g/l ذغال فعال اضافه شد. گیاه‌چه‌های سبز کوچک، ۳۰ تا ۴۰ روز پس از انتقال به محیط باززایی تمایز یافتند. نمونه‌ها معمولا هر ۱۵ روز یک‌بار واکشت می‌شدند. در طول این دوره تعداد کالوس‌های باززا شده، یادداشت برداری شدند.

انتقال ژن: به‌دلیل استفاده از روش انتقال ژن با آگروباکتریوم، لازم بود که پلاسمید گیاهی pBI121 (شرکت Novagen) حاوی ژن‌های GUS و NPTII به آگروباکتریوم وارد شد (شکل ۱). برای تراریختی آگروباکتریوم، از روش استاندارد ذوب و انجماد (Freeze and thaw) با استفاده از کلسیم کلرید ($CaCl_2$) ۲۰ میلی‌مولار و ازت مایع استفاده شد (۱۳).



شکل ۱: ناحیه T-DNA پلاسمید pBI121 حاوی ژن‌های GUS و NPTII که برای تراریزش ریزنمونه‌های ذرت. استفاده شده است

از آگروباکتریوم‌های سویه LBA4404 دارای ناقل pBI121 ، کشت شبانه در محیط LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و استرپتومایسین انجام شد و یک ساعت قبل از حصول OD600=۱-۱/۵، ۲۰۰ µM استوسیرینگون به آن اضافه شد. سپس، سلول‌ها در rpm ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از حذف روشناور، رسوب حاصل در محیط مایع آلوده‌سازی (۱/۲ نمک‌های MS، ۱ w/v درصد گلوکز و ۲۰۰ µM استوسیرینگون (شرکت Sigma) با pH=۵/۲) حل شد. به‌وسیله رقیق کردن با محیط آلوده‌سازی OD=۰/۸ دوباره تنظیم شد. ریزنمونه‌های جوانه کامل و مریستم راسی ساقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به‌مدت سه ساعت در سوسپانسیون سلولی آگروباکتریوم قرار گرفتند. سپس در محیط هم‌کشتی (۱/۲ نمک‌های MS ، ۲ w/v درصد گلوکز و ۸ g/l آگار) به‌مدت ۳ تا ۴ روز در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن، ریزنمونه‌ها به محیط القای کالوس همراه با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۲۵۰ mg/l) منتقل و در تاریکی قرار گرفتند (۹).

کالوس‌ها بعد از حدود ۴۰ روز به محیط باززایی بدون آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. برای جلوگیری از تولید ترکیبات فنولی و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها، به محیط کشت باززایی میزان ۱ g/l زغال فعال اضافه شد. کشت‌ها معمولا هر ۱۵ روز یک‌بار واکشت می‌شدند.

بررسی کالوس ها از نظر تراریختی: به‌منظور تایید انتقال ژن به کالوس‌ها، از PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن NPTII استفاده شد. ابتدا DNAی ژنومی از کالوس‌ها با روش دلاپورتا (۱۴) استخراج شد. در واکنش PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن NPTII با توالی (پرایمر پیشرو) 5'-ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCA G-3' و توالی (پرایمر پسرو) 5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATA G-3' استفاده شد. پرایمرها با نرم افزار Vector NTIطراحی شدند. واکنش PCR مطابق با جدول ۱ انجام شد.

جدول۱: برنامه PCR شامل زمان و دمای مورد نیاز برای تکثیر ژن NPTII

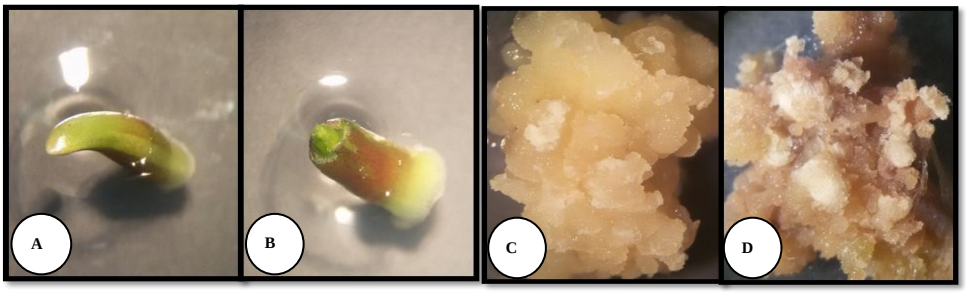
مرحله	دما و زمان
واسرشته سازی اولیه	′ ۵، ۹۵ درجه سانتی‌گراد
واسرشته سازی	″ ۳۰، ۹۵ درجه سانتی‌گراد
اتصال	″۳۰ ، ۵۸ درجه سانتی‌گراد
سنتز	″ ۳۰، ۷۲ درجه سانتی‌گراد
سنتز نهایی	′۴ ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد
تعداد سیکل‌ها	۳۰

آزمون هیستوشیمیایی نیز جهت تایید انتقال و بیان ژن GUS، بر روی کالوس‌های شاهد و تراریخت ذرت، با روش جفرسون و همکاران (۱۵) صورت گرفت.

نتایج

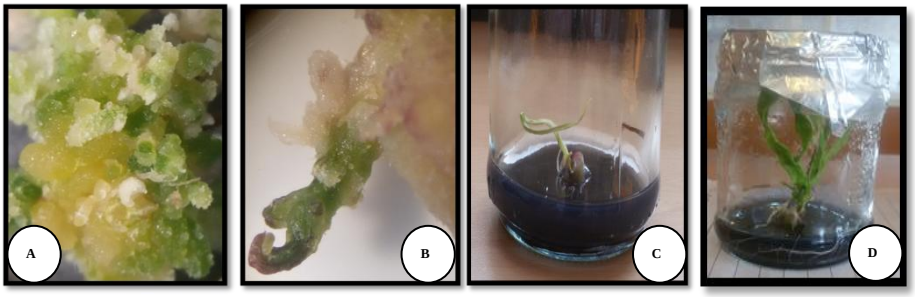
اندازه بذرهای جوانه زده بعد از ۴ تا ۵ روز مناسب برای تهیه ریزنمونه جوانه کامل بودند که برای تهیه آن انتهای ساقه که حدود ۳ تا ۴ میلی‌متر طول داشت، از بذر جدا شد. پس از حدود ۷ روز وقتی طول ساقه‌چه به ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسید با بررسی در زیر بینوکولر قسمت مریستم رأسی ساقه که در قسمت انتهایی با طولی حدود ۳ میلی‌متر قرار داشت، با دقت جدا شد. کالوس‌ها در مدت ۳۰ تا ۴۰ روز از قرار گرفتن در محیط کشت حاوی اکسین تشکیل شدند (شکل ۲C) در طی بررسی‌های انجام گرفته تفاوتی بین میزان کالوس‌زایی در ارقام و ریزنمونه‌های مختلف مشاهده نشد و نتایج حاصل نشان داد که میانگین القای کالوس در ۶ رقم ذرت و برای دو نوع ریزنمونه مشابه و ۱۰۰ درصد است. کالوس‌های تولیدشده از نظر بافت تفاوت‌هایی داشتند، تعدادی از آن‌ها نرم و آبکی بودند ولی اغلب آنها بافت سفت و محکم‌تری داشتند.

در محیط کالوس‌زایی برخی از کالوس‌ها بعد از مدتی به رنگ تیره و قهوه‌ای در می‌آمدند (شکل۲D) که با استفاده از ذغال فعال (۱ g/l) این مشکل تا حد زیادی برطرف شد.(در ۹۵٪ موارد تاثیر مثبت ذغال فعال مشاهده شد).



شکل ۲: مراحل مختلف کالوس‌زایی ذرت A) ریزنمونه جوانه کامل بر روی محیط کشت کالوس‌زایی، B) ریزنمونه مریستم رأسی ساقه بر روی محیط کشت کالوس‌زایی، C) کالوس ایجاد شده در محیط کالوس‌زایی، D) کالوس قهوه‌ای شده در اثر تولید ترکیبات فنولی

باززایی کالوس‌ها و ایجاد گیاهچه‌ها در طول ۳۰ تا ۴۰ روز پس از قرارگیری کالوس‌ها در محیط کشت حاوی BAP (۱۰ mg/l) و کینتین (۱ mg/l) اتفاق افتاد (شکل ۳).



شکل ۳: مراحل باززایی ذرت، A) کالوس‌های باززا شده، B) گیاهچه‌های باززا شده، C و D) گیاهچه‌های رشدکرده

نتایج جدول تجزیه واریانس درصد باززایی نشان داد که اثر رقم، ریزنمونه و اثر متقابل نوع رقم (فاکتور A) و نوع ریزنمونه (فاکتور B) بر میزان باززایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). با بررسی مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل مشخص شد که فراوانی باززایی ارقام مختلف بین ۳۷ و ۹۰ درصد است. بیشترین میزان باززایی (۹۰ درصد) مربوط به ریزنمونه‌های مریستم رأسی ساقه‌ی رقم SC 704 و کمترین میزان باززایی (۳۷/۵۰ درصد) مربوط به ریزنمونه‌های مریستم رأسی ساقه‌ی ارقام SC 400 و SC 403 می‌باشد (جدول ۳). با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل رقم و ریزنمونه بر باززایی، در برخی ارقام (SC704)، ریزنمونه مریستم راسی ساقه و در برخی ارقام (SC703) نیز ریزنمونه جوانه کامل مناسب‌تر بوده است.

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس درصد باززایی با دو نوع ریزنمونه و شش رقم ذرت

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
رقم (فاکتورA)	۵	۱۵۴۰/۰۶۰	۱۲/۴۲۷۳ **
ریزنمونه (فاکتور B)	۱	۵۳۶/۰۷۰	۴/۳۲۵۷ *
اثرمتقابل رقم × ریزنمونه (A × B)	۵	۵۳۴/۷۲۵	۴/۳۱۴۹ **
خطا	۳۶	۱۲۳/۹۲۶	

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد

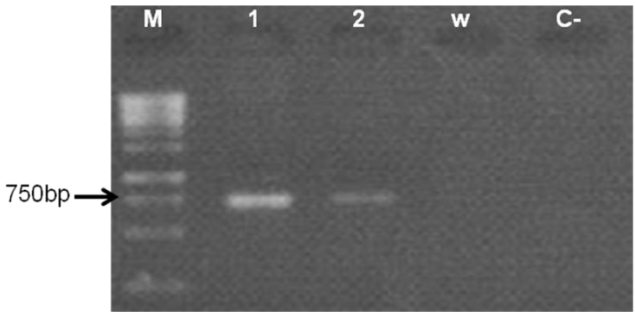
جدول ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و نوع رقم بر میزان باززایی در شش رقم ذرت

نوع ریزنمونه	رقم	درصد باززایی
جوانه کامل	Sc260	۵.۱ cd ± ۵۰
	Sc400	۱.۴۵ cd ±۵۰
	Sc403	۴.۰۶cd ± ۵۸.۳۳
	Sc500	۱.۴۵cd ±۵۸.۳۳
	Sc703	۱.۳۷ab ± ۸۲
	Sc704	۴bc ± ۶۶.۶۷
مریستم راسی ساقه	Sc260	۲.۳cd ± ۵۰
	Sc400	۲.۶d ± ۳۷.۵
	Sc403	۳.۳d ± ۳۷
	Sc500	۲.۵cd ± ۵۰
	Sc703	۳.۵۲bcd ± ۶۱
	Sc704	۳a ± ۸۹.۱۸

میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی داری ($\rho<0.01$) ندارند

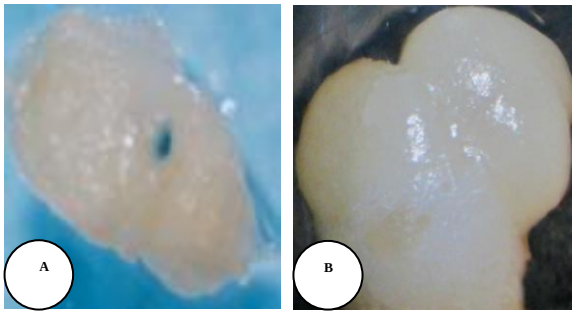
نتایج انتقال ژن

سازه ژنی وارد شده به ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین، به گونه‌ای است که با انجام PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر، می‌توان وجود این سازه را در گیاهان تراریخت اثبات نمود. واکنش PCR بر روی DNAی ژنومی استخراج شده از کالوس‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن NPTII انجام گرفت که در تعدادی از کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه مریستم راسی ساقه ارقام SC 703 و SC 704، قطعه تقریبا ۷۹۵ bp را نشان دادند که با اندازه مورد انتظار برای ژن NPTII همخوانی دارد. (قابل ذکر است که با توجه به نتایج کالوس‌زایی و باززائی، دو رقم SC703 و SC704 برای انتقال ژن انتخاب شده بودند). در کالوس‌های شاهد هیچ‌گونه قطعه‌ای مشاهده نشد. همچنین در کالوس‌های تولید شده از جوانه کامل نیز تکثیری انجام نشد (شکل ۴).



شکل ۴: تائید تراریختی کالوس‌ها با PCR برای ژن NPTII، L: مارکر ۱Kb، ۱ و ۲: محصول PCR تکثیر شده از DNA ژنومی کالوسهای حاصل از ریزنمونه مریستم راسی ساقه ارقام SC 703 و SC 704 ، W: محصول PCR کالوس شاهد، - C: کنترل منفی

کالوس‌های شاهد و تراریخت شده از دو رقم ذرت شامل SC 703 و SC 704 جهت تایید بیان ژن *GUS* و تولید آنزیم فعال بتا-گلوکورونیداز، تحت آزمون هیستوشیمیایی قرار گرفتند. پروتئین (آنزیم) تولید شده از ژن *GUS* باعث شکسته شدن ترکیب X-Gluc می‌گردد و تولید رنگ آبی می‌نماید (۱۵). در برخی از کالوس‌های تراریخت شده، رنگ آبی مشاهده شد که نشان‌دهنده بیان ژن *GUS* می‌باشد ولی در کالوس‌های شاهد هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نشد. کالوس‌هایی که دارای لکه آبی رنگ بودند مربوط به کالوس تشکیل یافته از ریزنمونه مریستم راسی ساقه دو رقم SC 703 و SC 704 بود که زیر بینوکولار لکه آبی مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵: آزمون هیستوشیمیایی کالوس تراریخت (A) و شاهد(B) ریزنمونه مریستم راسی ساقه رقم SC 703

بحث

برای انتقال موثر ژن به ریزنمونه‌های گیاهی چند پیش نیاز مهم و تعیین کننده باید وجود داشته باشد از جمله این پیش نیازها، قابلیت کالوس‌زایی و باززایی گیاه به اندازه کافی، تکثیر سریع در محیط کشت و همچنین ریزنمونه‌ای که قابلیت تراریخت شدن را داشته باشد (۱۶). القای کالوس با فراوانی ۱۰۰ درصد در تمام ارقام و ریزنمونه‌ها مشاهده شد که نتایج نشان می‌دهد تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده برای کالوس‌زایی این ارقام کاملا مناسب بودند. همچنین ارقام و ریزنمونه‌ها از نظر کالوس‌زایی مشابه بودند.

میزان باززایی بالا (حدود ۹۰ درصد) در دو رقم با ریزنمونه‌های مریستم راسی به‌دست آمد که این نتیجه نیز مناسب بودن مقدار تنظیم کننده‌های رشد و همچنین ریزنمونه مورد استفاده برای باززایی را نشان می‌دهد. از نظر مدت زمان لازم برای باززایی از کالوس‌ها، ریزنمونه‌های مریستم راسی بهتر بوده‌اند چرا که این مدت زمان در ارقام مورد مطالعه به طور متوسط ۳۵ روز بوده در حالی‌که برای باززایی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های جنین نارس به‌طور متوسط ۷۰ روز زمان لازم است (۹).

به‌غیر از میزان باززایی، از نظر نوع باززایی نیز در شش رقم ذرت تفاوت‌هایی مشاهده شد؛ از جمله این‌که در برخی ارقام مانند SC 403 به‌علت کم بودن میزان باززایی از هر کالوس، گیاهچه‌هایی به‌صورت منفرد ایجاد شدند که به‌راحتی قادر به رشد بودند اما در برخی ارقام دیگر مانند SC 703 و SC 704 که میزان باززایی بالاتر بود، کل کالوس باززا شده به‌صورت گیاهچه‌های کوچک و سبز به‌هم فشرده‌ای در می‌آمد که رشد آن‌ها به‌دلیل تعداد بالا و فشردگی با مشکل مواجه می‌شد. جهت افزایش رشد گیاهچه‌های به‌دست آمده از کالوس‌های باززا، از چند راه‌کار استفاده شد. از جمله این‌که از محیط‌های MS ساده به‌همراه ۱/۵ و ۱۰ برابر از ویتامین‌ها استفاده شد و از جیبرلین به میزان ۵ ppm در محیط کشت MS استفاده شد اما متاسفانه تاثیر مثبتی مشاهده نشد.

نتایج آزمایش انتقال ژن نیز، بهتر بودن ریزنمونه مریستم راسی را نسبت به ریزنمونه جوانه کامل نشان داد. کارآیی انتقال ژن در مریستم راسی حدود ۳۰ درصد بود در حالی‌که این میزان در جوانه کامل کمتر بود. تفاوت مریستم راسی با جوانه کامل در این است که در مریستم راسی بافت‌های احاطه‌کننده حتی المقدور حذف می‌شود. حذف بافت‌های احاطه کننده مریستم موجب می شود تا مریستم به‌طور مستقیم در معرض انتقال ژن قرار گیرد و همچنین در ریزنمونه زخم ایجاد شود (۱۷). ایجاد زخم در ریزنمونه باعث می‌شود اگروباکتریوم بافت‌ها را بهتر آلوده کند. از طرف دیگر ایجاد زخم موجب تحریک تقسیم سلولی شده و احتمال ورود T-DNA به ژنوم گیاه را افزایش می‌دهد (۱۱)

مناسب‌ترین ریزنمونه برای انتقال ژن، آن‌هایی هستند که قبل و بعد از مراحل تراریزش به کوتاه‌ترین دوره کشت بافت برای باززایی نیاز داشته باشند زیرا دوره‌های طولانی کشت بافت اغلب موجب بروز موتاسیون ژنتیکی می‌شود که بر روی گیاه باززا شده اثرات منفی شدیدی دارند (۱۸).

محققان مریستم راسی ساقه غلات را یک ریزنمونه مناسب در انتقال ژن می‌دانند به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله این‌که ناحیه مریستمی را به‌صورت نامحدود می‌توان به شکل بافت تمایز نیافته نگه داشت و یا این‌که به‌سمت تمایز به بافت آن را هدایت کرد. همچنین سلول‌های مریستمی این توانایی را دارند که ماهیت مریستمی خودشان را به سلول‌های دختری منتقل کنند (۱۷). این سلول‌ها نه تنها پتانسیل بالایی برای باززایی دارند بلکه کارآیی انتقال T-DNA نیز به آن‌ها بالا است (۹).

نتایج تحقیقات گذشته نیز نشان داده که سویه LBA4404 اگروباکتریوم کارایی بالایی برای انتقال ژن به مریستم راسی ذرت دارد (۱۱). در گزارش Sairam و همکاران (۹) میزان انتقال ژن با سویه LBA4404، ۸۶.۷٪ گزارش شده که نسبت به‌دو سویه دیگر (GV 3101 و EHA 105) ۲۰ درصد بالاتر بوده است، بنابراین در این تحقیق نیز از این سویه اگروباکتریوم استفاده شد. میزان انتقال ژن به مریستم راسی ذرت از ۶۰ تا ۸۷ درصد گزارش شده که در مقایسه با ریزنمونه‌های جنین نارس (کمتر از ۱۰ درصد) بسیار بالا است (۲۱،۱۳). در این تحقیق نیز درصد انتقال ژن به مریستم راسی حدود ۳۰ درصد بوده که اگرچه در مقایسه با نتایج Sairam و همکاران (۹) کمتر است اما در مقایسه با ریزنمونه جنین نارس بالا است.

نتیجه گیری

به‌طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان داد که میزان کالوس زایی، باززائی در ارقام SC 703 و SC 704 با مقدار تنظیم کننده های رشد استفاده شده، مناسب است. از بین دو ریزنمونه استفاده شده نیز مریستم راسی برای باززایی بهتر بود. در آزمایش انتقال ژن نیز بهتر بودن ریزنمونه مریستم راسی در دو رقم SC 703 و SC 704 مشاهده شد.

منابع

1. Repellin A, Baga M, Jauhar PP, Chibbar RN. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2001; 64(2): 159-183.

2. Jones HD. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. Journal of Cereal Science. 2005; 41(2): 137-147.

3 Goedeke S, Hensel G, Kapusi E, Gahrtz M, et al. Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. Transgenic Plant Journal. 2007; 1(1): 104-117.

4. Lu C, Vasil V, Vasil IK. Improved efficiency of somatic embryogenesis in tissue culture of maize (Zea mays L.). Theoretical and Applied Genetics. 1983; 66(3-4): 285-289.

5. Tomes DT, Smith OS. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (Zea mays L.) germplasm. Theoretical and Applied Genetics. 1985; 70(5): 505-509.

6. Vasil V, Vasil IK, Lu C. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (Zea mays L.). Protoplasma. 1985; 127(1-2): 1-8.

7. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica. 1995; 85(1-3): 295-302.

8. Cao SL, Masilamany P, Li WB, Pauls, KP. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of corn (Zea mays L.) multiple shoots. Agriculture and Environmental Biotechnology. 2014; 28(2): 208-216.

9. Sairam RV, Parani M, Franklin G, Lifeng Z, et al. Shoot meristem: an ideal explant for Zea mays L. transformation. Genome. 2003; 46(2): 323-329.

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

11. Takavar S, Rahnama H, Rahimian H, Kazemitabar K. Agrobacterium mediated transformation of maize (Zea mays L.). Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. 2010; 21(1): 21-29.

12. Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, et al. Transformation of Zea mays L. using agrobacterium tumefaciens and the shoot apex. Plant Physiology. 1991; 95(2): 426-434.

13. Sambrook J, Russell, DW. Molecular Cloning, A laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

14. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA minipreparation: version III. Plant Molecular Biology Reporter. 1983; 1: 19-21.

15. Jefferson RA, Kavanag TA, Bevan MW. Gus fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. The EMBO Journal. 1987; 6(3): 3901-3907.

16. Sairam RV, Wilber C, Franklin J, Smith B, et al. High-frequency callus induction and plant regeneration in Tripsacum dactyloides (L.) In Vitro Cellular and Developmantal Biology-Plant. 2002; 38(5): 435-440.

17. Sticklen MB, Oraby HF. Shoot apical meristem: a sustainable explants for genetic transformation of cereal crops. In Vitro Cellular and Developmantal Biology-Plant. 2005; 41(3): 187-200.

18. Christou P. Transformation technology. Trends in Plant Science. 1996; 1(12): 423-431.

19. Yu GR. Liu Y. Du WP. Song J. Lin M. Xu Y. Xiao FM. Liu YS. Optimization of agrobacterium tumefaciens-mediated immature embryo transformation system and transformation of glyphosate-resistant gene 2mG2-EPSPS in maize (Zea mays L.). Journal of Integrative Agriculture. 2013; 12: 2134-2142.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2018; 9(1)

Transformation of maize (*Zea mays* L.) by Agrobacterium Tumefaciens and shoot apical meristem explant

Bagheri Kh, Ph.D.[1]* Taghibeigloo R, M.Sc. [2], Maleki Zanjani B. Ph.D.[3]

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
2. Graduated Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
3. , Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

* Email corresponding author: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

Received: 18 Mar. 2018 Accepted: 24 Jul. 2018

Abstract

Aim: The aims of study were to investigate callogenesis and regeneration of the studied cultivars and also exploring the possibility of gene transfer into maize by using complete bud and stem apical meristem explants.

Material and methods: Complete bud and stem apical meristem of six cultivars were used as explants on MS medium + 5 mg.L-¹ 2,4-D. For regeneration, calluses were cultured in MS including 1 mg.L-¹ Kn and 10 mg.L-¹ BAP. According to the results of tissue culture, SC703 and SC704 cultivars were selected for gene transfer. Transformation of explants was done with LBA4404 strain of Agrobacterium tumefaciens containing pBI121 vector. To investigate the transgenic nature of the samples, PCR and histochemical assay were used.

Results: Callus induction was taking place after 30 to 40 days and the frequency of callus induction in six cultivars was 100%, in addition the highest rate of regeneration (90 %) was observed in stem apical meristem explants of SC704. In some cultivars, stem apical meristem explants were more suitable, although in other cultivars, complete bud explants were better. PCR results for NPTII gene and GUS histochemical assay showed that some calli are transgenic and GUS gene is expressed.

Conclusion: The results of callogenesis, regeneration and genetic transformation showed that SC 704 was better than the others.

Key words: Stem apical meristem, callogenesis, regeneration, Agrobacterium tumefaciens, Zea mays