

بهینه‌سازی بیان موقت ژن به واسطه آگروباکتریوم در بادام

Optimization of transient expression by Agrobacterium in almond

ندا میرآخورلی^{۱*}، افسانه حیدری ریحانی^۲، بهروز شیران^۳ و سعدالله هوشمند^۴
Neda Mirakhorli^{1*}, Afsane Heydari Reyhani², Behrooz Shiran³ and Sa'dollah
Hooshmand⁴

- ۱- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۳- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
- ۴- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

- 1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 2- MS.c of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
- 4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nedamirakhorli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

از آنجاکه انتقال دایم ژن و تولید گیاه تراریخته به‌ویژه در گیاهان چندساله مانند بادام لازمی صرف وقت و هزینه است، بهینه‌سازی عوامل مختلف اثر گذار در تراریزش گیاهان، مورد توجه قرار می‌گیرد. بیان موقت ژن با استفاده از آگروباکتریوم (آگرواینفیلتریشن) یک راهکار مفید برای بررسی عملکرد ژن در سیستم‌های بیانی متفاوت است. از آنجاکه بهینه‌کردن فاکتورهای مؤثر در روش‌های تراریزش لازمه برنامه‌های انتقال ژن است، این پژوهش با هدف توسعه یک سیستم کارآمد برای بیان موقت به‌واسطه آگروباکتریوم در برگ‌های بادام، جهت پیش‌بینی سریع عملکرد سیستم‌های تظاهر و پروتئین نو ترکیب در بادام انجام شد. ژن گزارشگر لیکیناز برای ارزیابی عواملی که سطح بیان موقت را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌کاربرده شد. مزیت اصلی استفاده از این ژن، سادگی کار، حساسیت بالا و ایمنی زیستی آن است. سه سیستم تظاهر مختلف حامل ژن لیکیناز، که تحت تأثیر عناصر تنظیمی متفاوت قرار داشتند به‌واسطه دو سویه آگروباکتریوم LBA4404 و GV3501 با استفاده از سرنگ بدون سوزن به برگ‌های رقم‌های مامایی و شاهرود ۱۲ بادام انتقال داده شد. بعد از سه روز میزان پروتئین فعال اندازه‌گیری شد. آزمون‌های آماری نشان داد که بیشترین میزان تولید پروتئین در برگ‌های رقم مامایی با استفاده از سیستم تظاهری که موجب تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود، با کاربرد سویه LBA4404 به‌دست می‌آید. از این‌رو سیستم تظاهر مربوطه و سویه باکتری LBA4404 و رقم مامایی بادام جهت دستیابی به بادام تراریخته پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آگرواینفیلتریشن
آگروباکتریوم
بادام
بیان موقت
سیستم تظاهر

مقدمه

گیاه بادام (*Prunus dulcis*) متعلق به تیره گلسرخیان و جنس *Prunus* و زیر جنس *amygdalus* در بیابان‌ها و شیب‌های مرکزی و جنوب غربی آسیا رشد می‌کند (Jalilimarandi, 2009). سالیان درازی است که درخت بادام به‌عنوان یک گیاه با ارزش در دنیا شناخته شده است. مهمترین عوامل محدود کننده‌ی رشد، که از اهداف اصلاحی این گیاه محسوب می‌شود عبارتند از: حساسیت به سرما در گل‌ها، توسعه زود هنگام میوه‌ها و خودباروری (Imani and MahammadKhani, 2011). بهبود ژنتیکی در گونه‌های درختی و درختان میوه به وسیله روش‌های اصلاح سنتی یک فرآیند سخت و وقت‌گیر است که در طی فرآیند تولید و زایش طولانی مدت این گیاهان حاصل می‌شود (Miguel and Olivera, 1997). با توجه به مشکلات روش‌های سنتی اصلاح نباتات، تولید گیاهان تراریخته مورد توجه قرار می‌گیرد و برای بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن، روش‌های بیان موقت پیشنهاد می‌شود. آزمون‌های موقت با استفاده از آلودگی با آگروباکتریوم، آگرواینفیلتریشن نام دارد. این روش یک روش بیان موقت است که به تازگی توسعه یافته و روشی ساده و سریع است و برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های بیگانه، واکنش‌های فوق حساسیت، خاموش‌سازی ژن، بررسی فعالیت پروموتور و شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری به کار می‌رود (Wu gong and Xue Bao, 2002). توسعه یک روش انتقال ژن کارآمد برای گونه‌ها به مقدار زیادی به بهینه‌کردن فاکتورهای مؤثر بر بیان ژن بستگی دارد (Canli and Tian, 2009) که با بیان موقت امکان بهینه‌سازی بعضی از عوامل مؤثر در انتقال دایم در مدت زمان کوتاه‌تری میسر می‌شود. از جمله این عوامل می‌توان به نوع پلاسمید، سویه آگروباکتریوم، رقم گیاهی، مدت زمان تلقیح و فاکتورهای محیطی اشاره کرد (Urtibia et al., 2008; Tian et al., 2008, Song and Sink, 2005). بررسی و بهینه‌سازی این عوامل احتمال دارد باعث افزایش کارایی دستورالعمل‌های رایج در گونه‌های مورد علاقه شود (Gill et al., 2004). از آنجاکه یک ژن می‌تواند در سیستم‌های گوناگونی بیان شود، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین امری ضروری است. جهت توسعه سیستمی با کارایی بالا در بیان

پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان تراریخته به عناصر تنظیم کننده بیان ژن نیاز است که علاوه بر کنترل رونویسی و ترجمه، جایگاه ساخت پروتئین نو ترکیب در سلول نیز، کنترل شود (Mozafari et al., 2013). از این رو بهینه‌سازی سازه حامل ژن‌های هدف، به منظور افزایش سطح رونویسی و جمع‌آوری محصول انجام می‌شود (Sheludko, 2008). عامل مؤثر دیگر سویه باکتریایی است. از آنجاکه متغیرهای بسیاری باعث تفاوت در توانایی پیوند باکتری به سلول گیاهی می‌شوند یا بر سازوکار انتقال T-DNA اثر می‌گذارند، بعضی سویه‌های آگروباکتریوم نسبت به سایر سویه‌ها بیماری‌زایی بیشتری دارند که بسته به گونه گیاهی متفاوت هستند (Nam et; Yanofsky et al., 1985). از این رو کاربرد سویه‌های مختلف نتایج متفاوتی را در میزان بیان ایجاد خواهد کرد. بین ارقام گیاهی مورد استفاده نیز ممکن است به علت اختلاف در تلفیق پایدار تفاوت در میزان بیان مشاهده شود. از آنجاکه در روش بیان موقت دو موجود زنده شرکت دارند، کارایی تراریزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. به‌طوری که برخی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به سویه‌های خاص باکتری حساسیت کمتر یا بیشتری نشان می‌دهند (Sheludko, 2008).

در این پژوهش، به منظور دستیابی به شرایط بهینه‌ی انتقال موقت ژن در گیاه بادام و تولید پروتئین نو ترکیب در برگ این گیاه، اثر عوامل مختلف بر میزان بیان ژن *licBM2* تحت سه سیستم تظاهر بررسی شد. ژن *licBM2* به‌عنوان نسل جدیدی از گزارشگرها مورد استفاده قرار گرفته است. این گزارشگر بر اساس آنزیم متحمل به حرارت لیکیناز (β -1,3-1,4-gluconase) باکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* به‌دست آمده است که پیوندهای مجاور β -۱,۳ و β -۱,۴ را در پلی‌گلوکان‌ها تجزیه می‌کند. در اثر تجزیه مواد پلی ساکاریدی مثل لیکینان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می‌شوند که میزان آن‌ها را می‌توان به‌طور کمی و کیفی به کمک مواد رنگی اندازه‌گیری و مشخص کرد (Komakhin et al., 2005). در این پژوهش ژن *licBM2* داخل ناقل pBISN1-IN (accession number EU886197) (Abdeev et al., 2008) که تحت کنترل عناصر تنظیم کننده مختلف قرار دارد، با استفاده از دو سویه GV3501 و LBA4404 آگروباکتریوم از طریق آگرواینفیلتریشن به برگ‌های دو رقم مامایی و شاهرود ۱۲

روز کلونی‌های نو ترکیب، از طریق واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ژن *LicBM2* مورد تأیید قرار گرفتند. اندازه باند مورد انتظار ۷۰۰ جفت باز بود (شکل ۲).

اگر واینفیلتریشن

در این روش سوسپانسیون از آگروباکتریوم تهیه شد و از روزنه‌های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن، تنها با ایجاد فشار و انتشار سلول‌های آگروباکتریوم از طریق مایع میان بافتی به درون برگ تزریق شد (Wroblewski et al., 2005). جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، کشت شبانه آگروباکتریوم به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن (۵۰ میلی گرم در لیتر) و ریفامپیسین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) حاوی هر کدام از کانسترکتهای ژن مورد نظر به صورت جداگانه، به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه انجام شد. فاکتورهای حاوی کشت شبانه پس از این مدت سانتریفیوژ شدند. رسوب آگروباکتریوم حاصل در محلول Infiltration medium (10 mM MES, 10 mM MgSO₄, pH 5.6) حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن و ریفامپیسین به مدت پنج-شش ساعت کشت مجدد شد. سپس در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در محلول Induction medium: (10.5 g/L K₂HPO₄, 4.5g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L NaCitrate, 1g/L glucose, 1 g/L fructose, 4 g/L glycerol, 10 mM MgSO₄, 10 mM MES pH) معادل ۵/۶ حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد تا زمانی که OD₆₀₀=0.4 به دست آمد (Lee M.W. and yang et al., 2006) و در نهایت به برگ سه هفته‌ای گیاه بادام درحالی که به گیاه مادری متصل بودند تزریق شد. بعد از سه روز که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، استخراج پروتئین از برگ انجام شد.

استخراج آر.ان.ا و تأیید رونویسی ژن

به منظور ارزیابی بیان ژن، آر.ان.ای برگ‌های تزریق شده رقم مامایی که با سویه LBA4404 تراریخته شده بودند استخراج شد و از نظر کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. هشت برگ برای هر کدام از سه ساختار پلاسمیدی به این منظور مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار

گیاه بادام انتقال یافت و میزان پروتئین فعال حاصل از بیان موقت ژن اندازه‌گیری و به عنوان معیار انتخاب بهترین تیمار برای دستیابی به بیشترین میزان بیان ژن در بادام تراریخته استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعدادی نهال بادام گونه *Prunus dulcis* (Mill) رقم شاه‌رود ۱۲ و مامایی که از ارقام متداول کشت در منطقه هستند و از نظر ژنتیکی به طور کامل یکسان، سالم و ثبت شده بودند، از مرکز تحقیقات شهرکرد در گلدان‌های ده کیلوگرمی حاوی نسبت مساوی خاک، کود، شن کشت و در گلخانه نگهداری شدند. به منظور تزریق از برگ‌های جوان در حدود سه هفته‌ای استفاده شد و برای هر تیمار (رقم گیاه، سویه باکتری، سیستم تظاهر) هفت تکرار در نظر گرفته شد.

ترکیبات پلاسمیدی

ژن *LicBM2* تحت سه سیستم تظاهر مختلف در پلاسمید *pBISN1-IN* (Abdeev et al., 2008) به بادام منتقل شد. وجود عناصر کنترل کننده مختلف تظاهر ژن در این سه سیستم باعث تجمع پروتئین در مناطق مختلف سلولی می‌شوند. اولین سیستم به دلیل داشتن توالی KDEL (Munro and Pelham, 1987) و توالی رهبر LeB4 (Baumlein et al., 1986) به دست آمده از گیاه لوبیا باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. در سیستم شماره دو به دلیل وجود توالی رهبری که از گیاه هویج گرفته شده است (Abdeev et al., 2003) پروتئین به آپوپلاست ترشح می‌شود و اما در سیستم سوم از هیچ توالی رهبری استفاده نشده، بنابراین پروتئین در ریتوزول باقی می‌ماند (شکل ۱).

باکتری‌های مورد استفاده

سویه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* مورد استفاده جهت انتقال ژن هدف به برگ‌های بادام از طریق روش اگر واینفیلتریشن، سویه‌های LBA4404 (Hoekema et al., 1983) و GV3501 (Koncz and Schell, 1986) بودند.

سلول مستعد سویه‌های آگروباکتریوم به روش الکتروپوریشن بر اساس روش ویجل و گلازبروک (۲۰۰۲) تهیه شد و با سه ساختار پلاسمیدی مختلف تراریخته شدند. پس از سه - چهار

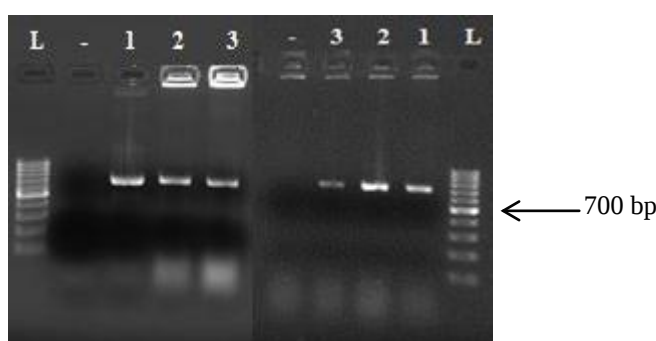
انجام شود تا با تکثیر این قطعه در واکنش پی.سی.آر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده امکان تایید حضور ژن *LicBM2* فراهم شود. به منظور طراحی آغازگر از سایت Primer 3 با آدرس <http://primer3.wi.mit.edu> استفاده شد (جدول ۱).
تأیید حضور قطعه ۱۴۶ جفت بازی با استفاده از RT-PCR و ۴۰ سیکل حرارتی ۹۴، ۵۷ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و از آغازگرهای ژن *LicBM2* برای تکثیر قطعه ۱۴۶ جفت بازی استفاده شد.

گرفتند، حدود ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگ‌ی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده و به پودر نرم و یکنواختی تبدیل شد. استخراج آر.ان.ا. با روش روبیوپینا و زاپاتا-پیرزا (۲۰۱۱) انجام شد (Rubio-Piña J.A and Zapata-Pérez O, 2011). سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت (Produced code: RTPL12) *vivantis* انجام گرفت. با توجه به این‌که سایز رشته اول cDNA ژن *LicBM2* برای تکثیر در واکنش پی.سی.آر بزرگ است، لازم بود تا برای قطعه‌ای کوچک از توالی ژن *LicBM2* طراحی آغازگر

ساختر پلاسمیدی ۱	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s	LeB4	<i>LicBM2</i>	KDEL	PA	RB
ساختر پلاسمیدی ۲	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s	LS	<i>LicBM2</i>		PA	RB
ساختر پلاسمیدی ۳	LB	pnos	<i>nptII</i>	nos	P35s		<i>LicBM2</i>		PA	RB

شکل ۱- شکل شماتیک ناحیه T-DNA در سه ترکیب پلاسمیدی: P35 s پیشبر 35 s ویروس موزاییک گل‌کلم (CaMV35s)؛ LeB4: پپتید رهبر ژن لگومین B گیاه لوبیا که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود؛ KDEL: توالی هدایت‌گر پروتئین به شبکه آندوپلاسمی؛ LS: توالی کد کننده پپتید رهبر گیاه هویج که باعث ترشح پروتئین در منطقه آپوپلاستی می‌شود؛ PA: سیگنال پلی‌آدنیلایسون؛ Pnos: پیشبر ژن *nptII*؛ ژن مقاومت به کانامایسین؛ nos: پایانبر مربوط به ژن *nos*؛ ترکیب پلاسمیدی ۱: باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود؛ ترکیب پلاسمیدی ۲: باعث تجمع پروتئین در آپوپلاست می‌شود؛ ترکیب پلاسمیدی ۳: باعث تجمع پروتئین در سیتوپلاسم می‌شود (Mirakhorli et al, 2010).

Figure 1- schematic figure of T-DNA region in three plasmid construct; P35 s: The constitutive *Cauliflower Mosaic Virus* 35S promoter, LeB4: leader peptide from bean that caused protein accumulation in endoplasmic reticulum, KDEL: leader sequence that leads protein into endoplasmic reticulum, LS: leader peptide coding sequence from carrot that caused protein discharge into apoplastic region, PA: polyadenylation signal, Pnos: nos gene promoter, *nptII*: kanamycin resistance gene, nos: nos gene terminator; plasmid 1: construct causes accumulation protein in endoplasmic reticulum, plasmid 2: construct causes accumulation protein in apoplast, plasmid 3: construct causes accumulation protein in cytoplasm.



شکل ۲- تایید کلونی‌های نو ترکیب *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و GV3501 به روش PCR colony: سمت چپ: L: سایز نشانگر؛ ۱، ۲ و ۳ به ترتیب پلاسمید ۱، ۲ و ۳ انتقال داده شده به سویه LBA4404؛ -: کنترل منفی. سمت راست: L: سایز نشانگر؛ ۱، ۲ و ۳ به ترتیب پلاسمید ۱، ۲ و ۳ انتقال داده شده به سویه GV3501؛ -: کنترل منفی

Figure 2- PCR colony gel of recombinant *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and GV3501 strains; left side: L: size marker, 1, 2, And 3: LBA4404 strain transformed by plasmid 1, 2, And 3, -: negative control. Right side: L: size marker 1, 2, And 3: GV3501 strain transformed by plasmid 1, 2, And 3, -: negative control.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای قطعه ۱۴۶ جفت بازی از ژن *LicBM2*Table 2- designed Primers for the 146bp gene fragment of *LicBM2*

آغازگر برگشت	آغازگر رفت	اندازه محصول پی.سی.آر (جفت باز)
ACAGGACCTTCGGACAACAA	TCCTGGGAAGCATCGAATCC	۱۴۶ جفت باز

استخراج پروتئین

هرکدام از گلدهای حاوی برگ‌های تزریق شده، پس از سه روز به آزمایشگاه منتقل شدند، برگ‌های تزریق شده از گیاه جدا شدند و برای استخراج پروتئین با کمک ازت مایع در هاون چینی پودر شدند. ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج Tris-HCl ۱۵۰ میلی‌مولار با pH معادل هشت به صورت جداگانه در میکروتیوب‌های حاوی هرکدام از برگ‌های پودر شده ریخته شد و سپس ورتکس شد (میزان بافر استخراج ۱/۲ حجم هرکدام از برگ‌ها بود). نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ گرم در سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شد. محلول رویی رسوب که حاوی شیر گیاه است به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و در نهایت میکروتیوب‌های حاوی شیر گیاه به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (Fido et al., 2004).

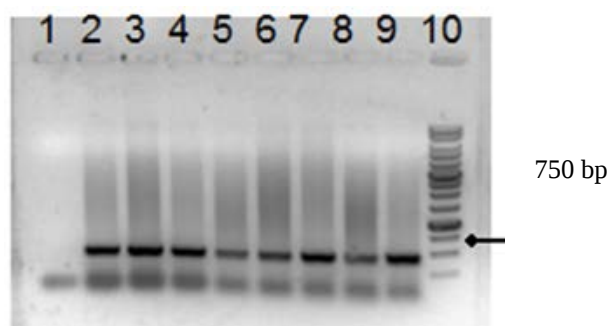
ارزیابی پروتئین

به منظور بررسی میزان دقیق تظاهر ژن *LicBM2* میزان پروتئین فعال به روش کاهش گلوکز (Miller, 1959) اندازه‌گیری شد. آنزیم لیکیناز محصول ژن *LicBM2* خاصیت آنزیمی دارد و

پلی‌ساکاریدهای حاوی پیوندهای ۱ و ۳، ۱ و ۴ بتا گلوکان‌ها را می‌شکند و قندهای احیاکننده آزاد می‌کند که میزان آن را با استفاده از مواد رنگی (دی.ان.اس) می‌توان اندازه گرفت و به این ترتیب می‌توان سطح بیان ژن را تخمین زد و مقدار پروتئین فعال را به دست آورد. در این پژوهش با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به دست آمده از برگ‌های تزریق شده، آزمون کاهش گلوکز انجام گرفت و از آنجاکه طی مراحل آزمایش اثر گلوکز خود گیاه در مقایسه با نمونه‌ی شاهد صفر شده بود، بنابراین گلوکز تولیدی در اثر فعالیت آنزیم لیکیناز (*licBM2*) به وجود آمده است.

نتایج و بحث

پس از انتقال پلاسمیدها به آگروباکتریوم تأیید ترایخته بودن کلونی‌های ظاهر شده از طریق واکنش پی.سی.آر کلونی انجام گرفت. به نحوی که حضور باند ۷۰۰ جفت بازی ترایخته بودن کلونی‌ها را تأیید کرد (شکل دو). همچنین حضور ژن در گیاه نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۳).



شکل ۳- ژل پی.سی.آر ژنومی: تأیید حضور ژن *licBM2* در برگ‌های تزریق شده؛ ستون ۱: شاهد منفی، برگ تزریق نشده، ستون ۲-۸: ژنوم برگ تزریق شده، ستون ۹: آگروباکتریوم ترایخته شاهد مثبت، ستون ۱۰: نشانگر

Figure 3- Agarose gel electrophoresis of genomic DNA PCR reactions: 1: not transformed leaf as – control, 2-8: transformed leaves, 9: transformed *Agrobacterium* as + control, 10: DNA ladder.

تأیید رونویسی از ژن

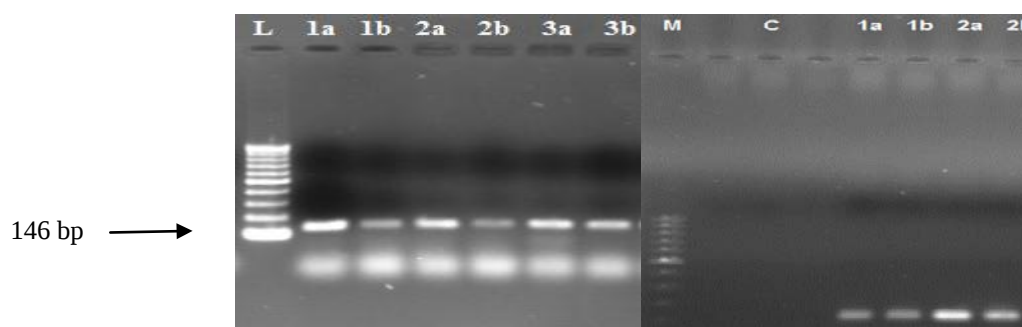
سنتز cDNA مربوط به آر.ان.ای‌های استخراج شده از نمونه برگ‌های بادام رقم مامایی پس از ۲۴ ساعت از زمان تزریق انجام شد و سپس به منظور تأیید رونویسی از ژن *LicBM2*، پی.سی.آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای قطعه‌ای ۱۴۶ بازی انجام شد. محصول پی.سی.آر بر روی ژل آگارز سه درصد بارگذاری شد. وجود باند ۱۴۶ جفت بازی در نمونه‌های برگ‌ی تأیید کننده رونویسی از ژن *LicBM2* بود (شکل ۴).

استخراج و ارزیابی پروتئین فعال

پس از استخراج پروتئین محلول نمونه‌ها (Fido et al., 2004)، پروتئین فعال در برگ‌های هر دو رقم گیاه که از انتقال سه ترکیب مختلف پلاسمیدی از طریق دو سویه LBA4404 و GV3501 به سلول‌های گیاه به دست آمده بود به صورت جداگانه مورد بررسی

قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با طرح فاکتوریل در قالب طرحی به طور کامل تصادفی با هفت تکرار برای هر تیمار با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس بین فاکتورهای مورد استفاده در این آزمایش در سطح یک درصد اختلاف معنی دار نشان داد. اما اثرهای متقابل فاکتورهای مورد استفاده معنی دار نشد. این امر نشان می‌دهد که هرکدام از فاکتورها به طور مستقل عمل کرده و بر سایر فاکتورها اثری ندارد.

آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را بین ترکیب پلاسمیدی یک با دو ترکیب پلاسمیدی دیگر نشان داد (نمودار ۱). این ترکیب پلاسمیدی موجب تجمع پروتئین نو ترکیب در شبکه آندوپلاسمی می‌شود.



شکل ۴- الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل ۳ درصد، M & L: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون (1a و 1b): نمونه برگ‌ی تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۱؛ ستون (2a و 2b): نمونه برگ‌ی تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۲. ستون (3a و 3b): نمونه برگ‌ی تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۳. C: کنترل منفی.

Figure 4- Electrophoresis of RT-PCR products on 3% agarose gel, M&L: size marker, 1a, 1b: leaf sample transformed by plasmid1, 2a, 2b: leaf sample transformed by plasmid2, 3a, 3b: leaf sample transformed by plasmid3. C: negative control.

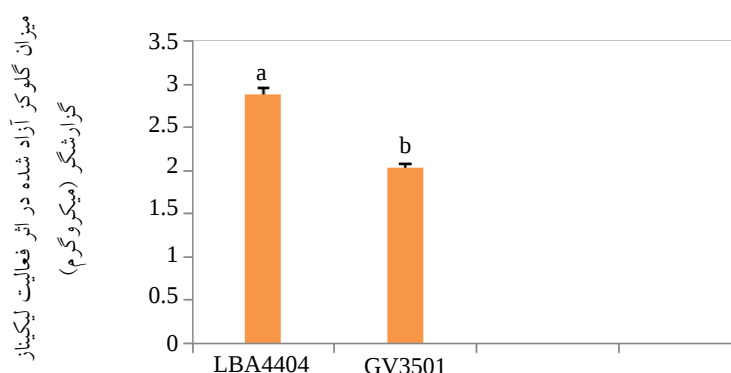
جدول ۲- تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم لیکیناز (میکروگرم در میکرولیتر)

Table 2- Variance analysis of enzyme activation (microgram per microliter)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
رقم	1	0.91**
پلاسمید	2	1.41**
سویه	1	1.50**
پلاسمید × رقم	2	0.28 ns
رقم × سویه	1	0.14 ns
پلاسمید × سویه	2	0.21ns
پلاسمید × رقم × سویه	2	0.09ns
خطا	72	0.11

۱. * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌دار

2. *and ** respectively Significant at the 5and1percent levels, and ns not statistically significant



نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم لیکیناز (میکروگرم) در برگ با استفاده از ترکیب‌های پلاسمیدی مختلف

Diagram 1- glucose level mean comparison (µg/µl) in leaves by different plasmids

این دو سیستم وجود نداشته است (Jha *et al.*, 2012) نیز در پژوهش خود تجمع بالایی از پروتئین نوترکیب بازدارنده آلفا- پروتئیناز را در استفاده از سیگنال پپتید شبکه آندوپلاسمی در مقایسه با سیگنال پپتیدهای آپوپلاست و واکوئل به دست آوردند و نتیجه گرفتند شبکه آندوپلاسمی مکان مناسب‌تری برای تولید پروتئین نوترکیب است.

عامل دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت سویه‌های باکتریایی بود. نتیجه‌های ارایه شده در نمودار دو نشان می‌دهد که میزان گلوکز آزاد شده در نتیجه استفاده از سویه LBA4404 بیشتر بوده است.

زمینه ژنتیکی سویه‌های آگروباکتریوم به طور قابل ملاحظه سطح بیان موقت را تحت اثر قرار می‌دهد (Gill *et al.*, 2004). سویه LBA4404 که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت یکی از سویه‌هایی است که به طور گسترده در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود و در گونه‌های *prunus* به طور موفقیت آمیز نتیجه داده است (Machado, 1992). (Bhatnagar *et al.*, 2004) نیز برای ارزیابی پارامترهای مؤثر بر کارایی بالای انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم در توت سیاه پس ارزیابی بیان موقت حاصل از به‌کارگیری سویه‌های A281، LBA4404 و GV2260 نتیجه گرفتند سویه LBA4404 نسبت به سایر سویه‌ها کارآمدتر بوده است.

سومین فاکتور مورد بررسی رقم بادام مورد استفاده بود. نتایج ارایه شده در نمودار سه بیانگر این است که بیان ژن در رقم مامایی

اگرچه از هدف‌گیری پروتئین بیشتر به عنوان تسهیل‌کننده تخلیص پروتئین‌های نوترکیب یاد می‌شود، اما روش هدف‌گیری پروتئین نوترکیب می‌تواند برای افزایش عملکرد پروتئین‌های نوترکیب هم استفاده شود. در این روش با ذخیره شدن پروتئین نوترکیب در اجزای سلولی فرآیندهای بسته‌بندی، سر هم شدن و تغییرهای پس از ترجمه آن‌ها هم تحت اثر قرار می‌گیرد که در نهایت همه این فاکتورها پایداری پروتئین و در نتیجه عملکرد را تحت اثر قرار می‌دهد (Jha *et al.*, 2012). در پژوهش ما نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان گلوکز آزاد شده که در واقع میزان بیان ژن گزارشگر را نشان می‌داد، نشان داد که سیستم بیانی که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود، بیشترین میزان گلوکز و در نتیجه بالاترین میزان بیان ژن گزارشگر را دارد که دلیل آن عدم وجود پروتئینازها در شبکه آندوپلاسمی است که باعث می‌شود پروتئین هضم نشود. به نظر می‌رسد که شبکه‌ی آندوپلاسمی با ایجاد یک محیط حفاظت‌کننده در مقابل اکسیداسیون و حضور چاپرون‌ها برای تا خوردگی صحیح پروتئین‌ها و دارا بودن فضای بزرگ برای تجمع پروتئین مکان مناسبی برای هدف‌گیری پروتئین‌های نوترکیب باشد (Jha *et al.*, 2012). بین سیستم تظاهری که باعث ترشح پروتئین به آپوپلاست شده است و سیستمی که باعث باقی ماندن پروتئین در سیتوزول شده است اختلاف معنی‌داری از نظر میزان گلوکز مشاهده‌نشده که دلیل این امر، مدت زمان کوتاه تظاهر ژن در این تکنیک (۷۲ ساعت) است. زیرا زمان کافی جهت مشخص شدن اختلاف بین

نسبت به رقم شاهرود ۱۲ بیشتر بوده است (نمودار ۳). نوع رقم نیز به عنوان یک فاکتور مؤثر بر بیان موقت می‌تواند مورد ارزیابی قرار گیرد. از آنجاکه در آزمون‌های بیان موقت دو موجود زنده شرکت دارند، کارآیی تراریزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. به طوری که برخی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به سویه‌های خاص باکتری حساسیت کمتر یا بیشتری نشان می‌دهند. چنین اختلافی ممکن است به دلیل تفاوت در توانایی سویه‌های باکتری در آلوده کردن گیاه میزبان، تفاوت در ساختار ناقل T-DNA باکتریایی، عدم سازگاری بین گیاه و آگروباکتریوم که واکنش‌های فوق حساسیت را به دنبال دارد ایجاد شود (Nam et al., 1997). در پژوهش انجام شده رقم مامایی بادام نسبت به رقم شاهرود ۱۲ سطح بالاتری از بیان را نشان داد. در پژوهش (Yasmin and Debener, 2010) به منظور انتخاب ژنوتیپ برتر برای بیان ژن در گل با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن از کالتیوارهای هیبرید 91&100-5، هیبرید دیپلوئید 88&124-46، Heck enzauber, parisercharme و Marvel استفاده کردند. نتایج بیان موقت نشان داد گل‌های کالتیوار Marvel و parisercharme بیشترین میزان بیان را داشتند. با بررسی فاکتورهای مورد استفاده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت در صورت استفاده از ساختار پلاسمیدی شماره ۱ در ترکیب با سویه LBA4404 و رقم مامایی می‌توان سطح بالایی از بیان موقت را در مقایسه با سایر تیمارهای به کار برده شده در این پژوهش در بادام به دست آورد. در این بررسی ژن گزارشگر *LicBM2* مورد استفاده قرار گرفت. *LicBM2* می‌تواند به عنوان یک ژن گزارشگر با حساسیت بالا و

کار آسان برای انتخاب تراریخته‌ها و بررسی بیان ژن انتقال یافته مورد استفاده قرار گیرد (Salehijozani et al., 2007). مزیت این گزارشگر به دلیل ایمنی زیستی محصولات تراریخته است. زیرا با توجه به ملاحظات ابراز شده در مورد مقاومت به آنتی‌بیوتیک، پیشنهاد شده است که تاجایی که امکان دارد از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان نشانگر استفاده نشود و به جای آن از ژن‌های متابولیکی به عنوان نشانگر انتخاب‌گر لاین‌های تراریخته استفاده شود. ژن‌هایی که در فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارند تفاوت عمده‌ای با سیستم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند زیرا در این سیستم از پیش ماده‌هایی استفاده می‌شود که پس از ورود به سلول، به مولکول‌هایی تبدیل می‌شوند که باعث مزیت رشدی سلول‌های تراریخته می‌شوند. این روش چنان‌که به نظر می‌آید فراوانی تراریزش بیشتری داشته و به نظر می‌رسد که در بین گونه‌های گیاهی قابلیت استفاده گسترده‌ای داشته باشد (Salehijozani et al., 2010). نتایج نشان می‌دهد بیان موقت ژن نشانگر *LicBM2* در گیاه بادام با موفقیت انجام شد. بنابراین استفاده از ژن نشانگر *LicBM2* می‌تواند روش جدیدی برای بررسی میزان بیان ژن‌های نو ترکیب در گیاهان تراریخته‌ی بادام باشد. گیاهان تراریخته‌ای که جهت رفع مشکلات باغداری بادام از جمله حساسیت به سرما، بیماری‌ها و خود ناباروری (Imani and MahammadKhani, 2011) می‌توانند تولید شوند و شناسایی سیستم تظاهر موفق در این گیاه می‌تواند هزینه و زمان مصرفی در جهت تولید بادام تراریخته را در این گیاه درختی کاهش بدهد. مزیت اصلی استفاده از ژن نشانگر *LicBM2* ایمنی زیستی، دقت و حساسیت بالا، سادگی کار و قابل اطمینان بودن آن است.

منابع

- Abdeev RM, Goldenkova IV, Musiyshuk KA, Piruzian ES. 2003. Expression of a thermostable bacterial cellulase in transgenic tobacco plants. Russian Journal of Genetics 39:300-305.
- Baumlein H, Wobus U, Pustell J, Kafatos FC. 1986. The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. Nucleic acids research 14:2707-2720.

- Bhatnagar S, Khurana P. 2004. Evaluation of parameters for high efficiency gene transfer via *Agrobacterium tumefaciens* and production of transformants in Indian Mulberry, *Morusindica* ev.k2.plant biotechnology 21(1): 1-8.
- Canli FA, Tian L. 2009. Assessment of regeneration and transient expression factors for agrobacterium-mediated transformation of *Prunu salicina* Lindl. European Journal Horticultural

Science 74 (2). S. 66–72.

Fido RJ, Mills ENC, Rigby NM, Shewry PR. 2004. Protein extraction from plant tissues. Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa 244:21-28.

Gill ISM, Singh Z, Agres V. 2004. Factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation in fruit and nut crops– An overview. Food Agriculture Environment Journal 2: 327–347.

Jalilimarandi M. 2009. Cultivation of temperate fruits. Entesharat jahad Daneshgahi, 2th.ED. Azarbayjangeharbi, Iran (In Farsi with English abstract).

JhaS, Agarwal S, Sanyala I, Jain GK, Amlaa DV. 2012. Differential subcellular targeting of recombinant human α_1 -proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants. Plant Science 196: 53–66.

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179–180.

Imani A, MahamadKhani Y. 2011. Characteristics of almond selections in relation to Late Frost Spring. International Journal of Nuts and Related Sciences 2(2): 77-80.

Komakhin RA, Abdeeva IA, Salehijozani GR, Goldenkova IV, Zhuchenko AA. 2005. Thermostable lichenase as a translational reporter. Russian Journal of Genetics 41:23-31.

Koncz C, Schell J. 1986. The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Molecular Genetics and Genomics Journal 204: 383–396.

Lee MW, Yang Y. 2006. Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. Methods in Molecular Biology Clifton Then Totowa 323:225-229.

Machado M. 1992. The use of transgenic approach to improve resistance in perennial fruit crops. International Association of Peacekeeping Training Centres News letter 67:5–16.

Mannan A, Noor Seyyed T, Mirza B. 2009.

Factors Affecting *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L. Pak. J. Bot 41(6): 3239-3246.

Miguel CM, Olivera MM. 1997. Transgenic almond (*prunus dulcis* Mill). Plants obtained by agrobacterium-mediated transformation of leaf explants. Plant cell reports 18: 387-393.

Miller GL. 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31:420-428.

Mirakhorli N, Abdeeva I. 2010. New Expression system for transient assay of gene function in lettuce. 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Bologna, Italy, 24-27 April 2010, p.107.

Mozafari M, Mirakhorli N, Shiran B, Khoddambashi M. 2013. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating gene expression systems in common bean. Modern genetic. 8(3): 273-284 (In Farsi with English abstract).

Munro S, Pelham HRB. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48:899-907.

Nam J, Matthyse AG, Gelvin SB. 1997. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in TDNA integration. The Plant Cell Online 9:317-333.

Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. Electronic Journal of Biotechnology 15:1-8.

Salehijozani GHR, Sefinezhad A, Goldenkova IV, Piruzian ES. 2007. Lichenase new reporter protein for studying modify and wild cry3a genes expression in and eukaryote prokaryote cells. Modern genetic 2(2) 17-27. (In farsi with English abstract).

Salehijozani GHR, Tohidfar M, Sadeghi A. 2010. Biosafety of genetically Modified Plants. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract).

Sheludko YV. 2008. Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. Recent Patents on Biotechnology 2:198-208.

Song GQ, Sink KC. 2005. Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for *agrobacterium tumefaciens* transformation of sour cherry (*prunus cerasus*) cultivar Montmorency. *Scientia horticulture* 106: 60-69.

Tian L, Canli FA, Meerja F, Sibbald S, LAC J. 2008. Improvement of European Plum (*Prunus domestica* L.) Genetic transformation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*. Biol. doi: 10.1007/s11626-008-9108-y

Urtibia C, Devia J, Castro A, Zamora P, Aguirre C, Tapia E, Barba P, Dell'Orto P, Moynihan MR, Petri C, Scorza RR, Prieto H. 2008. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Prunus salicina*. *Plant Cell Reports* 27: 1333–1340.

Weigel D, Glazebrook J. 2002. Arabidopsis: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory

Pr.

Wroblewski T, Tomczak A, Micheltore R 2005. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato, and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 3:259–273.

Wu gong SH, XueBao CH 2002. Agroinfiltration, a useful technique in plant molecular biology research. *Institute of microbiology* 18 (4): 411-4.

Yanofsky M, Lowe B, Montoya A, Rubin R, Krul W, Gordon M, Nester E. 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics* 201:237–246.

Yasmin A, Debener T. 2010. Transient gene expression in rose petals via Agrobacterium infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102:245-250.