مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۸-۹

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[٤]
Neda Mirakhorli[1*], Afsane Heydari Reyhani[2], Behrooz Shiran[3] and Sa'dollah Hooshmand[4]

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
٤- 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 لازمه‌ی صرف وقت و هزینه است، بهینه‌سازی عوامل مختلف اثر گذار در تراریزش گیاهان، مورد توجه قرار می‌گیرد. بیان موقت ژن با استفاده از اگروباکتریوم (اگرواینفیلتریشن) 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 اگروباکتریوم در برگ‌های بادام، جهت پیش‌بینی سریع عملکرد سیستم‌های تظاهر و پروتئین نوترکیب در بادام انجام شد. ژن گزارشگر لیکیناز برای ارزیابی عواملی که سطح بیان موقت را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌کاربرده‌شد. 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 اگروباکتریوم LBA4404 و GV3501 با استفاده از سرنگ بدون سوزن به برگ‌های رقم‌های مامایی و شاهرود ۱۲ بادام انتقال داده‌شد. 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

اگرواینفیلتریشن
اگروباکتریوم
بادام
بیان موقت
سیستم تظاهر

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

مقدمه

گیاه بادام (*Prunus dulcis*) متعلق بـه تیـره گلسـرخیان و جـنس *Prunus* و زیـر جـنس *amygdalus*، در بیابـان‌هـا و شـیب‌هـای مرکزی و جنوب غربی آسیا رشد می‌کند (Jalilimarandi., 2009). سالیان درازی است که درخت بادام به‌عنوان یک گیاه با ارزش در دنیا شناخته‌شده‌است. مهمترین عوامل محدود کننده‌ی رشد، که از اهداف اصلاحی این گیاه محسوب می‌شود عبارتند از: حساسـیت به سرما در گل‌هـا، توسـعه زود هنگـام میـوه‌هـا و خـودبـاروری (Imani and MahammadKhani, 2011). بهبود ژنتیکی در گونه-های درختی و درختان میوه به‌وسیله روش‌های اصلاح سنتی یـک فرآیند سخت و وقت‌گیر است که در طی فرآینـد تولیـد و زایـش طولانی مدت این گیاهان حاصل می‌شود (Miguel and Olivera, 1997). با توجه به مشـکلات روش‌هـای سـنتی اصـلاح نباتـات، تولید گیاهان تراریخته مورد توجه قرار می‌گیرد و برای بهینه‌سازی شـرایط انتقـال ژن، روش‌هـای بیـان موقـت پیشـنهاد مـی‌شـود. آزمـون‌هـای موقـت بـا اسـتفاده از آلـودگی بـا اگروبـاکتریوم، اگروانیفیلتریشن نام دارد. این روش یک روش بیان موقـت اسـت که به‌تازگی توسعه یافته و روشـی سـاده و سـریع اسـت و بـرای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های بیگانه، واکنش‌های فـوق حساسـیت، خاموش‌سازی ژن، بررسی فعالیت پرومـوتر و شناسـایی ژن‌هـای مقاومت به بیمـاری بـه کـار مـی‌رود (Wu gong and Xue Bao, 2002). توسعه یک روش انتقال ژن کارآمد برای گونه‌ها به مقـدار زیادی به بهینه‌کـردن فاکتورهـای مـؤثر بـر بیـان ژن بسـتگی دارد (Canli and Tian, 2009) که با بیـان موقـت امکـان بهینـه‌سـازی بعضی از عوامل مؤثر در انتقال دایم در مدت زمان کوتاه‌تری میسر می‌شود. ازجمله این عوامـل مـی‌تـوان بـه نـوع پلاسـمید، سـویه اگروباکتریوم، رقم گیاهی، مدت زمان تلقیح و فاکتورهای محیطـی اشاره کرد (Urtibia *et al*., 2008; Tian *et al*., 2008, Song and Sink, 2005). بررسی و بهینه‌سازی این عوامل احتمال دارد باعث افزایش کارآیی دستورالعمل‌های رایج در گونه‌هـای مـورد علاقـه شود (Gill *et al*., 2004).

ازآنجاکه یک ژن می‌تواند در سیستم‌هـای گونـاگونی بیـان شـود، بنابراین تعیین سیستمی با بیشـترین بـازده تولیـد پـروتئین امـری ضروری است. جهت توسـعه سیسـتمی بـا کـارآیی بـالا در بیـان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته به عناصر تنظـیم کننـده بیان ژن نیاز است که علاوه بر کنترل رونویسی و ترجمه، جایگـاه ساخت پروتئین نوترکیب در سلول نیز، کنترل شود (Mozafari *et al*., 2013). از این‌رو بهینه‌سازی سازهٔ حامـل ژن‌هـای هـدف، بـه منظور افـزایش سـطح رونویسـی و جمـع‌آوری محصـول انجـام می‌شود (Sheludko, 2008) . عامل مؤثر دیگـر سـویه باکتریـایی است. ازآنجاکه متغیرهای بسیاری باعث تفاوت در توانـایی پیونـد باکتری به سلول گیاهی می‌شوند یا بر سازوکار انتقال T-DNA اثر می‌گذارند، بعضی سویه‌های اگروباکتریوم نسبت به سایر سویه‌هـا بیماری‌زایی بیشتری دارند که بسته به گونه گیاهی متفاوت هسـتند (Nam et; Yanofsky *et al*., 1985).از این‌رو کـاربرد سـویه‌هـای مختلف نتایج متفاوتی را در میزان بیان ایجـاد خواهـد کـرد. بـین ارقام گیاهی مورد استفاده نیز ممکن اسـت بـه علـت اخـتلاف در تلفیق پایدار تفاوت در میزان بیان مشاهده شود. ازآنجاکه در روش بیان موقـت دو موجـود زنـده شرکت دارند، کارآیی تراریـزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. بـه‌طـوری کـه برخـی گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به سـویه‌هـای خاص باکتری حساسیت کمتر یا بیشتری نشان می‌دهند (Sheludko, 2008).

در این پژوهش، به منظور دستیابی به شرایط بهینه‌ی انتقال موقـت ژن در گیاه بادام و تولید پروتئین نوترکیب در برگ این گیـاه، اثـر عوامل مختلف بر میزان بیان ژن *licBM2* تحت سه سیستم تظـاهر بررسـی شـد. ژن *licBM2* بـه‌عنـوان نسل جدیدی از گزارشگرها مـورد اسـتفاده قـرار گرفتـه اسـت. این گزارشگر بر اساس آنزیم متحمل به حرارت لیکیناز (β-1,3- 1,4- gluconase) بـــاکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* بـه‌دست آمده است که پیوندهای مجاور ۱،۳ - β و ۱،٤ -β را در پلی‌گلوکان‌ها تجزیه مـــی‌کنـــد. در اثر تجزیه مواد پلی‌ساکاریدی مثل لیکینان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می‌شوند که میزان آن‌هـا را مـی‌توان به‌طور کمی و کیفی به کمک مواد رنگـی اندازه‌گیری و مشخص کـرد (Komakhin *et al*., 2005). در ایـن پـژوهش ژن *licBM2* داخـل ناقل pBISN1-IN (accession number EU886197) (Abdeev*et al*., 2008) که تحت کنترل عناصر تنظیم کننده مختلف قرار دارد، با اسـتفاده از دو سـویه GV3501 و LBA4404 اگروبـاکتریوم از طریق اگروانیفیلتریشن به برگ‌های دو رقم مامایی و شـاهرود ۱۲

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

گیاه بادام انتقال یافت و میزان پروتئین فعال حاصل از بیان موقت ژن اندازه‌گیری و به‌عنوان 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 ۱۲و مامایی که از ارقام متداول کشت در منطقه هستند و از نظر ژنتیکی به‌طورکامل 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 سه‌هفته‌ای استفاده‌شد 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 کنندهٔ 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) به‌دست آمده از گیاه لوبیا باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. در سیستم شماره دو به‌دلیل وجود توالی رهبری که از گیاه هویج گرفته‌شده است (Abdeev *et al*., 2003) پروتئین به آپوپلاست ترشح می‌شود و اما در سیستم سوم از هیچ توالی رهبری استفاده‌نشده، بنابراین پروتئین د رسیتوزول باقی می‌ماند (شکل ۱).

باکتری‌های مورد استفاده

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

سلول مستعد سویه‌های اگروباکتریوم به روش الکتروپوریشن بر اساس روش ویجل و گلازبروک (۲۰۰۲) تهیه شد و با سه ساختار پلاسمیدی مختلف تراریخته شدند. پس ازسه – چهار روز کلونی‌های نوترکیب، از طریق واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ژن *LicBM2* مورد تأیید قرار گرفتند. اندازه باند مورد انتظار ۷۰۰ جفت باز بود (شکل ۲).

اگرواینفیلتریشن

در این روش سوسپانسیونی از اگروباکتریوم تهیه شد و از روزنه‌های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن، تنها با ایجاد فشار و انتشار سلول‌های اگروباکتریوم از طریق مایع میان بافتی به درون برگ تزریق شد (Wroblewski *et al*., 2005). جهت تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری، کشت شبانه اگروباکتریوم به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و ریفامپیسن (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) حاوی هر کدام از کانسترکت‌های ژن مورد نظر به‌صورت جداگانه، به‌مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه انجام شد. فالکون‌های حاوی کشت شبانه پس از این مدت سانتریفیوژ شدند. رسوب اگروباکتریوم حاصل در محلول Infiltration medium (10 mM MES 10 mM MgSO4, pH معادل ۵/٦) حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین به مدت پنج- شش ساعت کشت مجدد شد. سپس در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت 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 mMMgSO4, 10 mM MES pH) معادل ۵/٦ حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد تا زمانی که OD600=0.4 به‌دست آمد (Lee M.W. and yang *et al*., 2006) و در نهایت به برگ سه‌هفته‌ای گیاه بادام درحالی‌که به گیاه مادری متصل بودند تزریق شد. بعد از سه روز که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، استخراج پروتئین از برگ انجام‌شد.

استخراج آر.ان.اِ و تأیید رونویسی ژن

به‌منظور ارزیابی بیان ژن، آر.ان.اِی 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 هرکدام از سه ساختار پلاسمیدی به این منظور مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از ۲٤ ساعت که گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

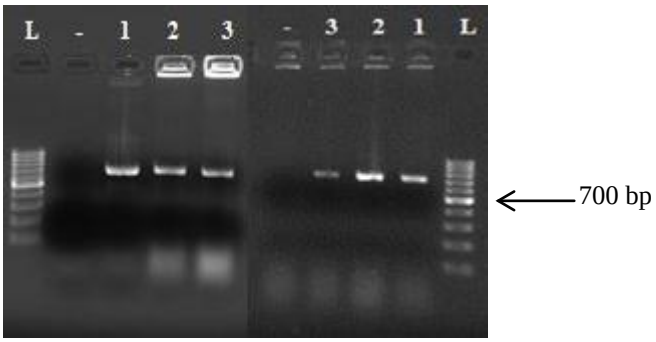
گرفتند، حدود۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده و به پودر نرم و یکنواختی تبدیل شد. استخراج آر.ان.اِ با روش روبیوپینا و زاپاتاپرزا (۲۰۱۱) انجام شد (Rubio-Piña J.A and Zapata-Pérez O, 2011). سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت (Produced code: RTPL12) vivantis انجام گرفت. با توجه به‌این‌که 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 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 ۱٤٦ جفت بازی با استفاده از RT-PCR و ٤٠ سیکل حرارتی ۹٤ ، ۵۷ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و از آغازگرهای ژن *LicBM2* برای تکثیر قطعه ۱٤٦ جفت بازی استفاده شد.

ساختار پلاسمیدی ۱	LB	pnos	*nptII*	nos	P35s	LeB4	*LicBM2*	KDEL	PA	RB
ساختار پلاسمیدی ۲	LB	pnos	*nptII*	nos	P35s	LS	*LicBM2*		PA	RB
ساختار پلاسمیدی ۳	LB	pnos	*nptII*	nos	P35s		*LicBM2*		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 پلی‌آدنیلاسیون؛ Pnos: پیشبر ژنnos؛ *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 apoplestic region, PA: polyadenylation signal, Pnos: nos gene promoter, *nptII*: kanamysin 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 نوترکیب *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 سویهGV3501 ؛ -: 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.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای قطعه ۱٤٦ جفت بازی از ژن *LicBM2*

Table 2- designed Primers forthe146bp gene fragment of *LicBM2*

آغازگر برگشت	آغازگر رفت	اندازه محصول پی.سی.آر (جفت باز)
ACAGGACCTTCGGACAACAA	TCCTGGGAAGCATCGAATCC	۱٤٦ جفت باز

استخراج پروتئین

هرکدام از گلدان‌های 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 به‌صورت جداگانه در میکروتیوب‌های حاوی هرکدام از برگ‌های پودر شده ریخته‌شد و سپس ورتکس شد (میزان بافر استخراج ۱/۲حجم 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. محلول‌رویی رسوب که حاوی شیره گیاه است به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و در نهایت میکروتیوب‌های حاوی شیره گیاه به فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (Fido *et al.*, 2004).

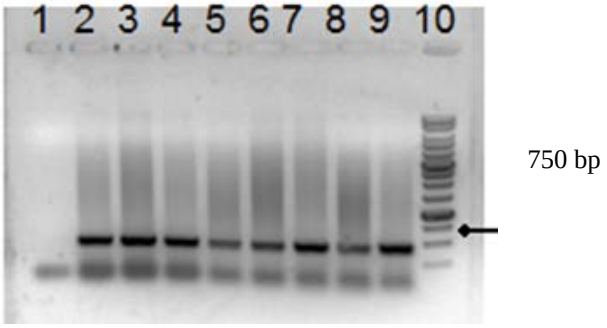
ارزیابی پروتئین

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 ٤ 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 به‌دست آورد. در این پژوهش با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به‌دست 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*) به‌وجود آمده است.

نتایج و بحث

پس از انتقال پلاسمیدها به اگروباکتریوم تأیید ترایخته بودن کلونی‌های ظاهر شده از طریق واکنش پی.سی.آر کلونی انجام گرفت. به‌نحوی‌که حضور باند ۷۰۰ جفت بازی ترایخته بودن کلونی‌ها را تایید کرد (شکل دو). همچنین حضور ژن در گیاه نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل۳).



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

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

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

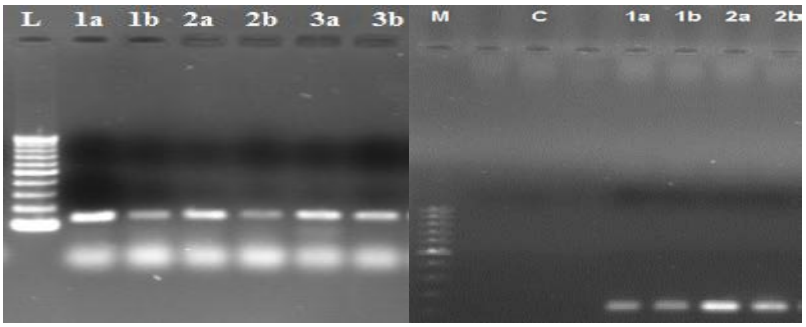
تأیید رونویسی از ژن

سنتز cDNAی مربوط به آر.ان.اِهای استخراج شده از نمونه برگ‌های بادام رقم مامایی پس از ۲٤ ساعت از زمان تزریق انجام شد و سپس به‌منظور تأیید رونویسی از ژن *LicBM2*، پی.سی.آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده برای قطعه‌ای ۱٤٦ بازی انجام شد. محصول پی.سی.آر بر روی ژل آگارز سه درصد بارگذاری شد. وجود باند ۱٤٦ جفت بازی در نمونه‌های برگی تأیید کننده رونویسی از ژن *LicBM2* بود (شکل ٤).

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 به‌دست آمده بود به‌صورت 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 معنی‌دار نشان داد. اما اثرهای متقابل فاکتورهای مورد استفاده معنی‌دار 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 نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی می‌شود.



شکل ٤- الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل ۳ درصد، M &L: نشانگر ۱۰۰جفت بازی؛ ستون (1a و 1b): نمونه برگی تزریق شده با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید۱؛ ستون (2a و 2b): نمونه برگی برگی تزریق شده با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید ۲. ستون (3aو3b): نمونه برگی تزریق شده با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید3. 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)

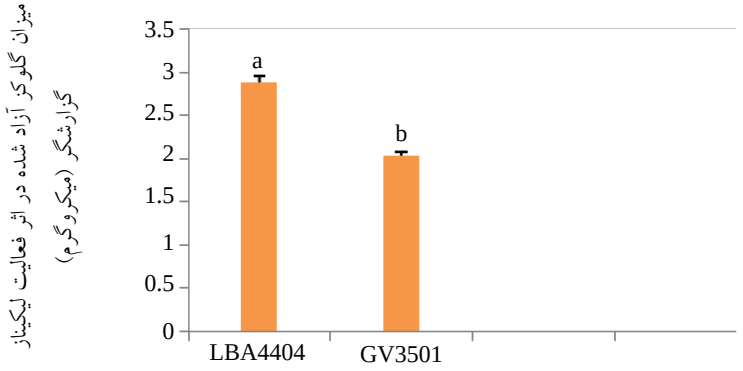
Table 2- Variance analysis of enzyme activation (microgram per microliter)

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

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]



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

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

اگرچه ازهدف‌گیری پروتئین بیشتر به‌عنوان 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 پروتئازها در شبکه آندوپلاسمی است که باعث می‌شود پروتئین هضم نشود. به نظر می‌رسد که شبکه‌ی آندوپلاسمی با ایجاد یک محیط حفاظت کننده 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 مشاهده‌نشد که دلیل این امر، مدت زمان کوتاه تظاهر ژن در این تکنیک (۷۲ ساعت) است. زیرا زمان کافی جهت مشخص شدن اختلاف بین 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 به‌دست 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 اگروباکتریوم 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 کارآیی بالای انتقال ژن از طریق اگروباکتریوم 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

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

نسبت به رقم شاهرود ۱۲ بیشتر بوده است (نمودار ۳).

نوع رقم نیز به‌عنوان یک فاکتور مؤثر بر بیان موقت می‌تواند مورد ارزیابی قرارگیرد. ازآنجاکه در آزمون‌های بیان موقت دو موجود زنده شرکت دارند، کارآیی تراریزش به سازگاری بین گیاه و باکتری بستگی دارد. به‌طوری‌که 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 اگروباکتریوم که واکنش‌های فوق حساسیت را به‌دنبال دارد ایجاد شود (Nam *et al*., 1997). در پژوهش انجام‌شده رقم مامایی بادام نسبت به رقم شاهرود ۱۲ سطح بالاتری از بیان را نشان داد. در پژوهش Ysasmin and Debener (2010) به منظور انتخاب ژنوتیپ برتر برای بیان ژن در گل با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن از کالتیوارهای هیبرید 5-100&91، هیبرید دیپلوئید 46-124&88، parischarme، enzauber Heck و Marvel استفاده کردند. نتایج بیان موقت نشان داد گل‌های کالتیوار Marvel و parischarme 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 به‌کار برده شده در این پژوهش در بادام به‌دست آورد.

در این بررسی ژن گزارشگر *LicBM2* مورد استفاده قرار گرفت. *LicBM2* می‌تواند به‌عنوان 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 تاجایی‌که امکان دارد از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان نشانگر استفاده نشود و به جای آن از ژن‌های متابولیکی به‌عنوان 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 نوترکیب در گیاهان تراریخته‌ی بادام باشد. گیاهان تراریخته‌ای که جهت رفع مشکلات باغداری بادام از جمله حساسیت به سرما، بیماری‌ها و خودناباروری (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, Musiychuk 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 s salicina* Lindl. European Journal Horticultural

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

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.Azarbayjangharbi, 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. Facrors Affecting *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation of Artemisia absinyhium 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, Matthysse 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 J.A, Zapata-Pérez O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. Electronic Journal of Biotechnology 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 eukaryoteprokaryote cells. Modern genetic 2(2) 17-27.(In farsi with English abstract).

Salehijozani GHR, Tohidfar M, Sadeghi A.2010. Biosafetyof 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.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]

Song GQ, Sink KC. 2005. Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for *agrobacterium tumefaciens* transformation of sour cherry (*prunus cerasus*) cultivar Montmorency. Scienta 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, Michelmore 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.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2]