

**Optimization of agrobacterium-mediated transformation in *Hyoscyamus niger***Roghayeh Ahmadpour^{ID}*, Bahram Maleki Zanjani^{ID}2, Ghasemali Garoosi^{ID}3, Raheem Haddad^{ID}4Reza Farjaminezhad^{ID}5

1*. Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

2. Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran-.

3. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

4. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

5. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article history Submitted: 2025-11-13 Revised: 2026-06-07 Accepted: 2026-07-14	Modern tissue culture and genetic transformation techniques play a significant role in manipulating biosynthetic pathways and enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants. Although a standardized method for the genetic transformation of <i>Hyoscyamus niger</i> has not yet been established, by optimizing factors influencing <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation—one of the most effective methods for genetic modification—it is possible to increase the frequency of regeneration and transformation in plant cells. In this study, with the aim of developing an efficient protocol to improve gene transfer efficiency in <i>H. niger</i> , three main factors were evaluated: the <i>A. tumefaciens</i> strain (EHA105, GV3101, and LBA4404), explant type (leaf and petiole), and transformation method (agroinoculation, agroinfection, agroinjection, and agrosonication). Optimization of gene transfer conditions revealed that petiole explants inoculated with the LBA4404 strain using agrosonication and agroinoculation methods exhibited the highest rates of callus and embryo formation, respectively. However, histochemical <i>gusA</i> staining indicated that among the hygromycin-resistant plantlets, only those derived from leaf explants inoculated with the LBA4404 strain carrying the pCAMBIA1304 vector via agroinfection showed positive X-gluc staining and contained blue pigments, achieving the highest transformation rate at 21.74%. The successful integration of <i>gusA</i> and <i>hptII</i> genes in putative transgenic plantlets was confirmed through PCR and RT-PCR analyses. Therefore, by investigating key factors affecting <i>A. tumefaciens</i> -mediated transformation, an efficient genetic transformation protocol for <i>H. niger</i> can be established.
KEYWORDS Agroinfection, gene transfer, <i>Hyoscyamus niger</i> , <i>gusA</i> gene.	

* Corresponding author: Roghayeh Ahmadpour

✉ E-mail: r.ahmadpour65@gmail.com



بهینه‌سازی تراریختی به واسطه آگروباکتریوم در بنگدانه (*Hyoscyamus niger*)

رقیه احمدپور^{۱*}، بهرام ملکی زنجان^{۲*}، قاسمعلی گروسی^۳، رحیم حداد^۴، رضا فرجامی نژاد^۵

۱. دکترای تخصصی، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. دکترای تخصصی، دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳. دکترای تخصصی، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۴. دکترای تخصصی، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۵. دکترای تخصصی، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۴-۰۸-۲۲

بازنگری: ۱۴۰۵-۰۳-۱۷

پذیرش: ۱۴۰۵-۰۴-۲۳

واژگان کلیدی:

اگرواینفکشن،
انتقال ژن، بذالینج،
ژن *gusA*.

چکیده: تکنیک‌های مدرن کشت بافت و تراریختی ژنتیکی نقش بسزایی در دست‌کاری مسیرهای بیوسنتزی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارد. با اینکه روشی بهینه برای تراریختی گیاه دارویی بنگدانه ارائه نشده است، اما با دست‌کاری عوامل مؤثر بر تراریختی مبتنی بر آگروباکتریوم تومفسینس که یکی از روش‌های مؤثر در تراریختی و اصلاح ژنتیکی است، می‌توان فراوانی باززایی و تراریختی سلول‌های گیاهی را افزایش داد. در این مطالعه، به‌منظور دستیابی به پروتکلی کارآمد برای بهبود کارایی انتقال ژن به گیاه بنگدانه، سه فاکتور اصلی سویه آگروباکتریوم تومفسینس (EHA105، GV3101 و LBA4404)، نوع ریزنمونه (برگ و دمبرگ) و روش تراریختی (اگرواینوکولیشن، اگرواینفکشن، اگرواینجکشن و اگروسونیکیشن) مورد بررسی قرار گرفت. با بهینه‌سازی شرایط مناسب برای انتقال ژن به بنگدانه مشخص شد که ریزنمونه‌های دمبرگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 به روش اگروسونیکیشن و اگرواینوکولیشن به‌ترتیب دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی بودند؛ اما نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی *gusA* نشان داد که از بین گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین، تنها گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 آگروباکتریوم تومفسینس حامل ناقل pCambia1304 به روش اگرواینفکشن، به رنگ‌آمیزی X-glue پاسخ مثبت دادند و حاوی رنگ‌دانه‌های آبی بودند و بیشترین درصد تراریختی با فراوانی ۲۱/۷۴ درصد را به خود اختصاص دادند. صحت انتقال ژن‌های *gusA* و *hptII* در گیاهچه‌های تراریخت احتمالی با استفاده از واکنش PCR و RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت؛ بنابراین، با بررسی عوامل مهم مؤثر بر تراریختی به‌واسطه آگروباکتریوم تومفسینس می‌توان به روشی کارآمد برای تراریختی ژنتیکی در گیاه بنگدانه دست یافت.

✉ E-mail: r.ahmadpour65@gmail.com

Journal homepage

*نویسنده مسئول: رقیه احمدپور



مقدمه

بنگدانه با نام علمی *Hyoscyamus niger* که با عنوان هنبان نیز شناخته می‌شود، یکی از گونه‌های مهم در خانواده سولاناسه است و در سراسر جهان، به‌ویژه آسیا، اروپا و شمال آفریقا، یافت می‌شود (Akbar, 2020). این گیاه به دلیل داشتن تروپان آلکالوئیدهای هیوسامین و اسکوپولامین، خواص دارویی گسترده‌ای دارد و به‌عنوان داروی سنتی در درمان اسپاسم معده، آسم، بی‌خوابی، دردهای عصبی، آرام‌بخش و بی‌حس‌کننده موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dereli et al., 2022). به دلیل اهمیت این ترکیبات، مطالعات وسیعی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه با دست‌کاری ژنتیکی و چشم‌اندازهای مرتبط با بیوسنتز ترکیبات مختلف برای فراهم کردن نیازهای صنعت کشاورزی صورت گرفته است (Morris et al., 2021).

تاکنون تکنیک‌های مختلفی برای تراریختی ژنتیکی با کارایی بالا شناسایی شده است که انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم یکی از روش‌های متداول در تولید گیاهان اصلاح‌شده ژنتیکی با ویژگی‌های مطلوب است. این تکنولوژی با استفاده از رویکردهای جدید مبتنی بر کشت بافت گیاهی و مهندسی ژنتیک امکان تولید متابولیت‌های ثانویه را در کیفیت و مقادیر بالا تضمین می‌کند (Erdem et al., 2023; Ozyigit et al., 2021; Uysal, 2021). تولید گیاه تراریخته به‌واسطه *Agrobacterium tumefaciens* اصول مکانیسم تراریختی طبیعی گیاه را تقلید می‌کند و به توانایی بیماری‌زایی باکتری در انتقال ژن‌های خارجی و طیف گسترده‌ای از عوامل در گیاه میزبان بستگی دارد (Pratiwi & Surya, 2020). در کل، تراریختی به‌واسطه آگروباکتریوم توم‌فسینس مکانیسمی پیچیده شامل (۱) تشخیص سیگنال حضور آگروباکتریوم توم‌فسینس توسط گیاه میزبان، (۲) پردازش T-DNA، (۳) انتقال T-DNA به سلول گیاه میزبان، (۴) ادغام T-DNA با ژنوم گیاه میزبان و (۵) بیان T-DNA در سلول گیاه میزبان است (Păcurar et al., 2011).

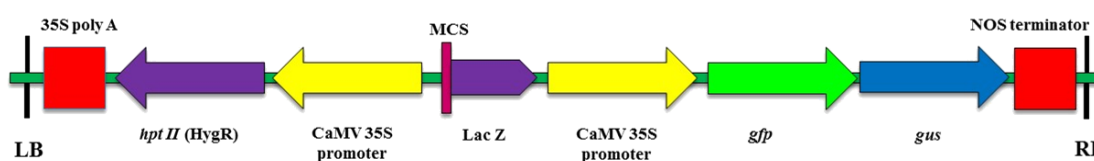
از زمان کشف آگروباکتریوم توم‌فسینس تا کاربرد گسترده آن در بیوتکنولوژی گیاهی، جنبه‌های متعددی از تعامل آن با گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. ساگارباریا و همکاران (۲۰۲۳) روشی کارآمد برای تراریختی ژنتیکی به‌واسطه آگروباکتریوم توم‌فسینس در رقم *Mistisa* گیاه *Solanum melongena* L. شناسایی کردند که راندمان بازایی برای ۵۸۵ ریزنمونه آلوده، ۱/۵ درصد بود. نتایج حاصل با بررسی مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیز مورد تأیید قرار گرفت (Sagarbarria et al., 2023)؛ علاوه بر این، گائو و همکاران (۲۰۲۳) در نتیجه استفاده از روش انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم برای تراریختی یونجه نشان دادند که ارقام *Qingshui* حداکثر میزان تراریختی (۷۲ درصد) را داشتند، در حالی که بازده تراریختی در ارقام *M. polymorpha* و *M. falcata* کمتر از ۶۴ درصد بود (Gao et al., 2023). رنگاسامی و همکاران (۲۰۲۴) نیز شرایط مناسب برای تراریختی برنج به‌واسطه آگروباکتریوم را در ارقام برنج با استفاده از فناوری ویرایش ژنوم CRISPR-Cas9 با حداکثر توانایی باززایی در کوتاه‌ترین زمان ممکن بهینه‌سازی کردند و نشان دادند که راندمان تراریختی حاصل بعد از ۷۶ روز در رقم *Japonica* بیشتر از رقم *Indica* (به‌ترتیب ۹۷ درصد و ۸۳ درصد) بود (Rengasamy et al., 2024). هو و همکاران (۲۰۲۴) با استفاده از تراریختی به‌واسطه آگروباکتریوم، عملکرد ژن‌های خانواده هوموباکس (WOX) در ژنوم تربچه را مورد بررسی قرار دادند و ۲۳ ژن *RsWOX* شناسایی کردند که در تقسیم و تمایز سلولی مراحل مختلف رشد گیاه، نقش ضروری دارند (Hu et al., 2024). پورحبیبیان و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی کالوس‌زایی و سنتز تروپان آلکالوئیدها در گیاه بنگدانه به این نتیجه رسیدند که محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، علاوه بر القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، منجر به افزایش معنی‌دار وزن تر و وزن خشک بعد از ۷ تا ۱۰ روز می‌شود؛ علاوه بر این، شرایط مذکور تأثیر مثبتی روی تولید آتروپین (۷۷/۱ درصد) و اسکوپولامین (۶۹/۲ درصد) داشت (Pourhabibian et al., 2023). از آنجایی که گیاهان مختلف در شرایط متفاوت کارایی تراریختی

تراریختی این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای بهینه‌سازی شد. به این منظور، از سه سویه آگروباکتریوم توم‌فسینس (EHA105، GV3101 و LBA4404) حامل ناقل پلاسمیدی pCambia1304 که حاوی ژن بتاگلوکورونیداز (*gusA*) به‌عنوان ژن گزارشگر و هیگرومایسین فسفوترانسفرز (*hptII*) به‌عنوان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین با پروموتور CaMV35S و پایان‌دهنده NOS بود، استفاده شد (شکل ۱).

متفاوتی از خود نشان می‌دهند، در این تحقیق سعی کردیم با انتخاب سویه باکتری آگروباکتریوم توم‌فسینس، روش تلقیح و ریزنمونه مناسب، به روشی مطلوب برای انتقال ژن به گیاه بنگدانه دست یابیم.

مواد و روش‌ها

بعد از به دست آوردن ترکیب محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب برای باززایی گیاه بنگدانه (Ahmadpour et al., 2023)، شرایط ایده‌آل برای



شکل ۱: ساختار خطی ناحیه T-DNA ناقل پلاسمیدی pCambia1304. ناحیه T-DNA حاوی کاست ژنی هیگرومایسین فسفوترانسفرز II (*hptII*) (پروموتور CaMV 35S و ترمیناتور NOS)، کاست بیان ژن *gus-gfp* (پروموتور CaMV 35S و ترمیناتور NOS).

در روش آگرواینوکولیشن، ابتدا ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ به قطعات ۱×۱ سانتی‌متری برش خوردند و روی محیط کشت مربوط به مدت ۷۲ ساعت پیش‌کشت شدند. در ادامه، سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه‌شده به‌طور جداگانه به پتری دیش‌های استریل منتقل و ریزنمونه‌های از قبل پیش‌کشت‌شده به مدت ۳۰ دقیقه با تکان دادن محتوای پتری هر ۱۰ دقیقه تلقیح داده شدند. در روش آگرواینفکشن، ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ به‌صورت کامل پیش‌کشت و بعد از ۷۲ ساعت توسط تیغ جراحی آلوده به باکتری به قطعات ۱×۱ سانتی‌متری برش داده شدند. در روش آگرواینجکشن، باکتری‌ها توسط سرنگ به رگبرگ ریزنمونه‌های از قبل برش‌خورده به قطعات ۱×۱ سانتی‌متری، تزریق شدند. در روش آگروسونیکیشن، ریزنمونه‌های برش‌خورده بعد از پیش‌کشت به محیط کشت تلقیح منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه تحت تیمار امواج فراصوت (۳۷ کیلوهرتز) قرار داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها در داخل سوسپانسیون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه با تکان دادن محتوای پتری هر ۱۰ دقیقه تلقیح داده شدند. شایان ذکر است که در هر چهار روش مورد استفاده برای تراریختی، محیط تلقیح حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون بود.

سلول‌های باکتریایی بعد از یک شب رشد در محیط LB مایع، حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین با دور ۳۰۰g، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند (Heidari Japelaghi et al., 2018). رسوب باکتریایی حاصل با OD600nm برابر ۰/۶ به محیط کشت پیش‌کشت مایع (MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) حاوی ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون منتقل شد. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ برش‌خورده بعد از ۷۲ ساعت پیش‌کشت روی محیط پیش‌کشت جامد (MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم توم‌فسینس تلقیح داده شدند. برای این منظور، از چهار روش مختلف به نام‌های آگرواینوکولیشن (غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتریایی)، آگرواینفکشن (آلوده‌سازی با تیغ جراحی آلوده به باکتری)، آگرواینجکشن (تزریق باکتری با سرنگ) و آگروسونیکیشن (تیمار ریزنمونه با امواج فراصوت و غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتری) استفاده شد.

$\times 100 \times (TShygR/TE)$
 $(TSTransformed/TShygR)$ = درصد فراوانی تراریختی
 در این معادله، TSTransformed تعداد گیاهچه‌های
 $TShygR, GUS+$ تعداد گیاهچه‌های مقاوم به
 هیگرومایسین و TE تعداد کل ریزنمونه‌ها است.

تأیید انتقال ژن

استخراج DNA ژنومی و PCR

بررسی تأیید انتقال ژن‌های *gusA* و *hptII* و تولید گیاهچه‌های تراریخت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) انجام شد. به منظور انجام PCR، ابتدا استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخت احتمالی و گیاهان شاهد به روش حیدری جابلقی و همکاران (۲۰۱۱) صورت گرفت (Japelaghi et al., 2011).

بعد از استخراج DNA ژنومی، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *gusA*، *hptII* و *virG* انجام شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای واسرشتگی اولیه و ۳۵ چرخه حرارتی، به صورت زیر برنامه‌ریزی شد. شرایط در هر چرخه برای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (W/V) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

منبع	توالی آغازگر (۵'→۳')	آغازگر
حیدری جابلقی و همکاران (۲۰۱۸)	<i>gusF</i> : ATACCGAAAGGTTGGGCAGG	<i>gusA</i>
	<i>gusR</i> : ATAACGGTTCAGGCACAGCA	
	<i>hptF</i> : CTATTCTTTGCCCTCGGAC	<i>hptII</i>
	<i>hptR</i> : AAGCCTGAACCTACCGCGAC	
	<i>virG</i> : CATTTTCGTCATCCGCGGTC	<i>virg</i>
	<i>virR</i> : CAGTTGAGGGCTTGACGGAT	

حل شد. سپس به مقدار ۰/۳ حجم آب مقطر، محلول لیتیم کلراید ۸ مولار اضافه و محتوای میکروتیوب به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محتوای میکروتیوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و پس از

ریزنمونه‌های تلقیح شده مجدداً روی همان محیط پیش-کشت به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شست‌وشو و به محیط کشت جامد گزینشی (MS) حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین منتقل شدند. کشت‌ها به مدت چهار هفته در محیط کشت گزینشی نگهداری و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. پس از چهار هفته، صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و درصد جنین‌زایی سوماتیکی یادداشت‌برداری شد. ریزنمونه‌های حاوی جنین-های سوماتیکی مقاوم به هیگرومایسین، برای باززایی به محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین منتقل شدند و به مدت چهار هفته در آن نگهداری و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. بعد از چهار هفته، صفات درصد ساقه‌زایی و تعداد گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین یادداشت‌برداری شد. سپس ساقه‌های مقاوم به هیگرومایسین به منظور ریشه‌زایی روی محیط کشت MS حاوی ۱/۶۳ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند و پس از چهار هفته درصد گیاهچه‌های $GUS+$ و فراوانی تراریختی با استفاده از معادله زیر به دست آمد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و RT-PCR

استخراج RNA بر اساس روش حیدری جابلقی و همکاران (۲۰۱۸) صورت گرفت. بعد از استخراج، رسوب RNA حاصل با اتانول شست‌وشو داده شد و در آب مقطر استریل

حذف محلول رویی مقدار ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به رسوب حاصل اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به آرامی حذف شد. رسوب RNA حاصل بعد از خشک شدن در هوای اتاق، با آب مقطر استریل حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور حذف DNA ژنومی موجود در نمونه‌های RNA استخراج‌شده، مخلوط RNA حاصل با آنزیم دئوکسی ریبونوکلاز I تیمار شد. برای این منظور، RNA اولیه (۱۰ میکروگرم در میکرولیتر) به همراه ۲ میکرولیتر بافر تیمار آنزیم DNase I (۱۰×)، ۵ میکرولیتر DNase I (۵۰۰ واحد) و آب مقطر استریل با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ترکیب و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۲۰ میکرولیتر کلروفرم (ایزوامیل الکل) به میکروتیوب اضافه و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید تا آنزیم DNase I غیرفعال شود. در نهایت، محلول رویی به تیوب جدید منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده، از نانودراپ و الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

سنتز cDNA با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق مراحل زیر صورت گرفت:

۱. مقدار ۳ میکروگرم در میکرولیتر RNA کل استخراج شد، به تیوبی ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل و مقدار مشخصی از آب مقطر استریل (بر اساس مقدار RNA کل) به آن اضافه گردید. سپس ۲ میکرولیتر آغازگر الیگو dT (۱) (واحد) به محتوای تیوب اضافه و مخلوط حاصل ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

۲. مقدار ۲ میکرولیتر dNTP (۲۰ میلی‌مولار) و ۴ میکرولیتر بافر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (۱×) به مخلوط واکنش اضافه و محتوای میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس تیوب بلافاصله روی یخ انتقال داده شد.

۳. مقدار ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (۲۰۰ واحد) به مخلوط واکنش اضافه و بعد از ترکیب، مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۴. برای توقف فعالیت آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۵. cDNA سنتز شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی نگهداری شد.

رشته cDNA سنتز شده توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و آغازگر الیگو dT، به عنوان رشته الگو در واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT-PCR مطابق واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن-های hptII، gusA و virG انجام شد (جدول ۱)؛ با این تفاوت که به جای DNA ژنومی از cDNA به عنوان رشته الگو استفاده شد. محصول حاصل از واکنش RT-PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (w/v) مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل هیستوشیمیایی GUS

آنالیز هیستوشیمیایی بیان ژن gusA در گیاهچه‌های تراریخت احتمالی طبق روش زیر انجام شد (Jefferson, 1987). برگ گیاهچه‌های تراریخت احتمالی و شاهد به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار NaPO₄ (pH ۷/۲)، ۲۰ میلی‌مولار EDTA (pH ۸/۰)، تریتون ۱۰۰-X ۰/۱ درصد، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندول-بتا-دی-کلرونیاز (X-gluc) و متانول ۲۰ درصد قرار داده شدند. پس از رنگ‌آمیزی X-gluc، به منظور حذف کلروفیل، برگ‌ها در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و بیان ژن GUS عکس‌برداری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل سویه‌های مختلف

باکتری (EHA105, LBA4404T و GV3101)، ریزنمونه (برگ و دم‌برگ) و روش تراریختی (اگرواینوکولیشن، اگرواینفکشن، اگرواینجکشن و اگروسونیکیشن) بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Ver.27 صورت گرفت. به‌منظور مقایسه معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

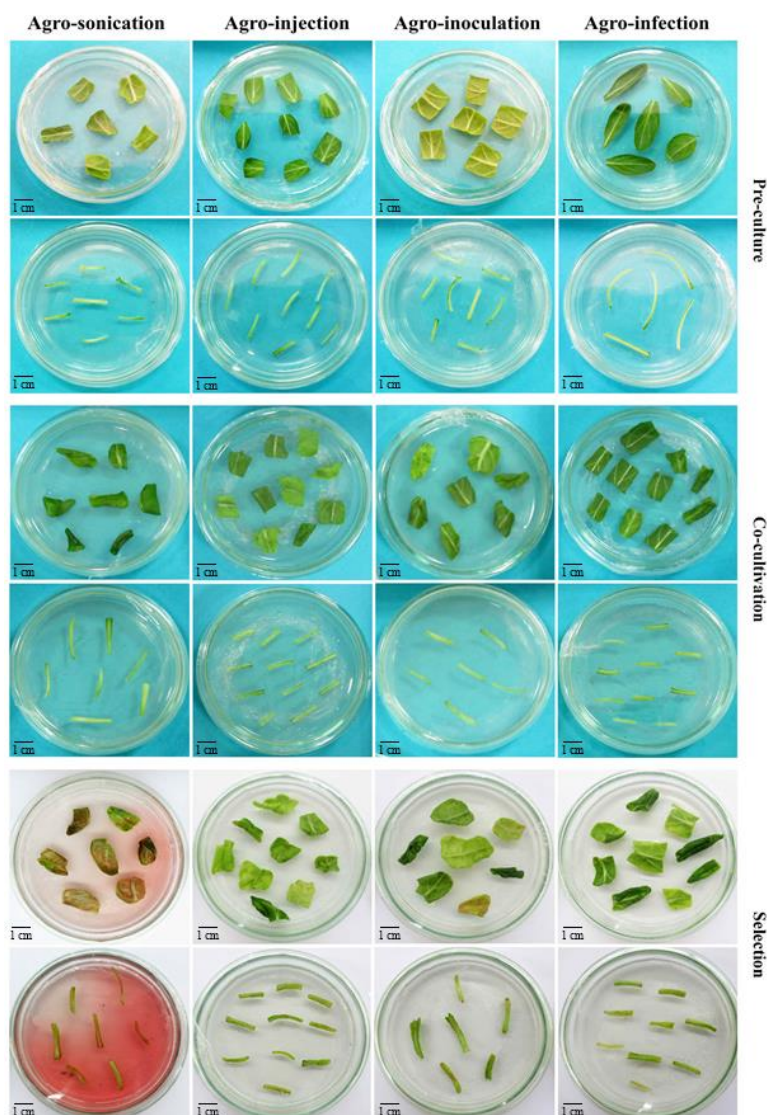
نتایج

به‌منظور بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه بنگدانه، ریزنمونه‌ها سه روز پس از پیش‌کشت با سویه‌های LBA4404, GV3101 و EHA105 آگروباکتریوم تومه‌فسینس به روش‌های اگرواینفکشن، اگرواینوکولیشن، اگرواینجکشن و اگروسونیکیشن تلقیح شدند. پس از سه روز، ریزنمونه‌ها به محیط کشت گزینشی MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین منتقل و هر دو هفته یک بار واکشت شدند و غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به‌مرور کاهش داده شد (شکل ۲).

تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی بر کالوس‌زایی

با بررسی تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش‌های مختلف تراریختی بر تولید گیاهچه تراریخت مشخص شد که در ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ تلقیح‌شده با سویه‌ها و روش‌های مختلف، تراریختی بعد از ۱۴ روز کالوس‌زایی با متورم شدن ریزنمونه‌ها آغاز گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی قرار گرفت. همچنین بین اثرات متقابل سویه باکتری × نوع ریزنمونه، سویه باکتری × روش تراریختی، نوع ریزنمونه × روش تراریختی و اثر متقابل سه‌جانبه بین سویه باکتری × نوع ریزنمونه × روش تراریختی، از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۲).

بهینه‌سازی تراریختی به واسطه آگروباکتریوم در بنگدانه/ احمدپور، رقیه؛ ملکی زنجانی، بهرام؛ گروسی، قاسمعلی؛ حداد، رحیم؛ فرجامی نژاد، رضا.



شکل ۲: مراحل انتقال ژن با استفاده از روش‌های مختلف تلقیح به ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ بنگدانه توسط سویه LBA4404 آگروباکتریوم.

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه، سویه باکتری و روش تراریختی بر کالوس‌زایی و باززایی بنگدانه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			درصد تغییر
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس	درصد جنین‌زایی	درصد ساقه‌زایی
سویه (S)	۲	۴۵۴۶/۱۳ **	۱۴۳۰۶۶۳/۵۴ **	۹۱۵۰/۰۴ **	۱۹۳۲/۳۵ **
ریزنمونه (E)	۱	۴۴۳/۴۸ **	۷۴۲۳۷۱/۱۲ **	۳۶۳/۰۰ **	۱۰/۱۲ *
روش تراریختی (T)	۳	۸/۰۳ *	۲۶۴۵۹۳/۴۶ **	۶۱۲/۳۸ **	۵۰/۴۹ **
E × S	۲	۲۳۳/۸۹ **	۴۷۷۰۱۱/۵۴ **	۳۶۳/۰۰ **	۱۰/۱۲ **
T × S	۶	۱۴۶/۲۲ **	۲۴۲۱۶۴/۹۹ **	۶۱۲/۳۸ **	۵۰/۴۹ **
T × E	۳	۶۲۶/۰۳ **	۲۴۹۶۹۰/۶۱ **	۱۲۸۲/۱۴ **	۴۳۱/۹۸ **
T × E × S	۶	۶۹۶/۰۵ **	۲۶۷۱۱۹/۳۵ **	۱۲۸۲/۱۴ **	۴۳۱/۹۸ **
خطا		۲/۶۵۰	۱۳۶۹/۴۵۵	۵/۰۱۵	۱/۴۴۴
ضریب تغییرات (/.)		۱۷/۲۷	۲۲/۳۴	۱۹/۸۶	۲۳/۱۹

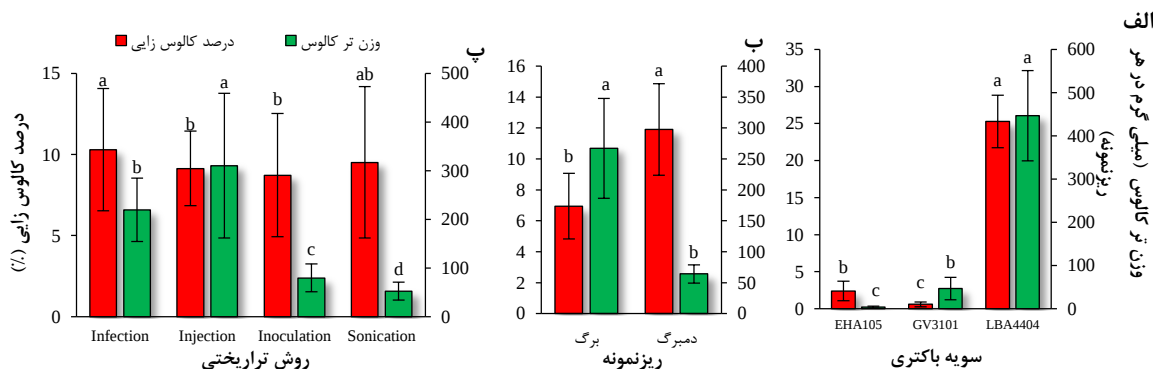
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

داده‌ها نشان داد با اینکه بیشترین مقدار کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه‌های دمبرگ (۱۱/۹۱ درصد) است، اما ریزنمونه‌های برگ به‌طور میانگین وزن تر کالوس بیشتری (۲۶۷/۱۷ میلی گرم در هر ریزنمونه) را به خود اختصاص دادند؛ علاوه بر این، تأثیر نوع روش تراریختی در ایجاد حداکثر و حداقل درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس نیز متفاوت بود؛ به‌طوری که ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با روش اگرواینفکشن بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰/۳۰ درصد) را نشان دادند؛ اما کالوس‌های حاصل بعد از استفاده از روش تراریختی اگرواینفکشن، بیشترین وزن تر کالوس (۳۱۰/۵۶ میلی گرم در هر ریزنمونه) را داشتند (شکل ۴).

مراحل کالوس‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاهچه تراریخت در شکل ۳ نشان داده شده است. با مقایسه میانگین سویه‌ها، ریزنمونه‌ها و روش‌های مختلف از نظر کالوس‌زایی مشخص شد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در سویه LBA4404، ریزنمونه دمبرگ و روش تراریختی اگرواینفکشن، به‌ترتیب با میانگین ۲۵/۲۸ درصد، ۱۱/۹۱ درصد و ۱۰/۳۰ درصد به دست آمد (شکل ۴). بیشترین و کمترین مقدار وزن تر کالوس نیز به‌ترتیب در سویه LBA4404 (۴۴۶/۴۶ میلی گرم در هر ریزنمونه) و GV3101 (۳/۷۵ میلی گرم در هر ریزنمونه) مشاهده شد. بررسی داده‌های حاصل از مقایسه میانگین



شکل ۳: کالوس‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاهچه تراریخت. الف) کالوس‌زایی ۲ هفته پس از تلقیح. ب) جنین‌زایی ۴ هفته پس از تلقیح. پ) باززایی ۶ هفته پس از تلقیح. ت) باززایی ۸ هفته پس از تلقیح و ث) گیاهچه تراریخت ۱۰ هفته پس از تلقیح.



شکل ۴: تأثیر سویه باکتری (الف)، نوع ریزنمونه (ب) و روش تراریختی (پ) بر کالوس‌زایی و وزن تر کالوس پندگانه.

تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی بر جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی

پس از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، جنین‌های سوماتیکی مقاوم به هیگرومیسین تشکیل شدند و تا باززایی کامل به رشد خود ادامه دادند. درصد کالوس‌های جنین‌زا و درصد باززایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی قرار گرفت؛

مقایسه میانگین اثرات متقابل بین سویه، نوع ریزنمونه و روش تلقیح نیز نشان داد که حداکثر درصد کالوس‌زایی در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های دمبرگ با سویه LBA4404 و روش اگروسونیکیشن با میانگین ۵۲/۳۸ و حداکثر وزن تر کالوس نیز در ریزنمونه‌های برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 و روش اگرواینفکشن با میانگین ۱۶۷۳/۳۳ میلی گرم در هر ریزنمونه به دست آمد (جدول ۳).

علاوه بر این، بین اثرات متقابل دوجانبه و سه جانبه سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی نیز از نظر درصد جنین‌زایی سوماتیکی و درصد باززایی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که جنین‌زایی سوماتیکی فقط در ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با سویه LBA4404 با میانگین ۳۳/۸۲ درصد مشاهده شد، در حالی که ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با دو سویه دیگر GV3101 و EHA105، هیچ جنین‌زایی نداشتند (شکل ۵ - الف).

با مقایسه میانگین ریزنمونه برگ و دم‌برگ از نظر درصد جنین‌زایی و ساقه‌زایی نیز مشخص شد با اینکه بیشترین درصد جنین‌زایی با میانگین ۱۳/۵۲ درصد در ریزنمونه‌های دم‌برگ ظاهر شد، اما جنین‌های سوماتیکی رشد کردند در ریزنمونه‌های برگ بیشتر به مرحله باززایی رسیدند و بیشترین درصد ساقه‌زایی (۵/۵۶ درصد) را به خود اختصاص دادند (شکل ۵ - ب). نوع روش تراریختی نیز در ایجاد حداکثر و حداقل درصد جنین‌زایی و ساقه‌زایی متفاوت بود. بیشترین درصد جنین‌زایی

سوماتیکی و ساقه‌زایی به ترتیب در نتیجه استفاده از روش تلقیح آگرواینوکولیشن با میانگین ۱۷/۲۲ و ۶/۶۷ درصد و کمترین درصد جنین‌زایی سوماتیکی و ساقه‌زایی در روش تلقیح آگرواینجکشن و آگرواینفکشن با میانگین ۵/۵۶ و ۲/۷۸ درصد به دست آمد (شکل ۵ - پ). با بررسی اثر متقابل سه جانبه نیز مشخص شد که ریزنمونه‌های دم‌برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 به روش آگرواینوکولیشن، بیشترین درصد جنین‌زایی (۸۶/۶۷ درصد) و ریزنمونه‌های دم‌برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 به روش آگروسونیکیشن، بیشترین درصد ساقه‌زایی (۳۴/۳۳ درصد) را داشتند (جدول ۳).

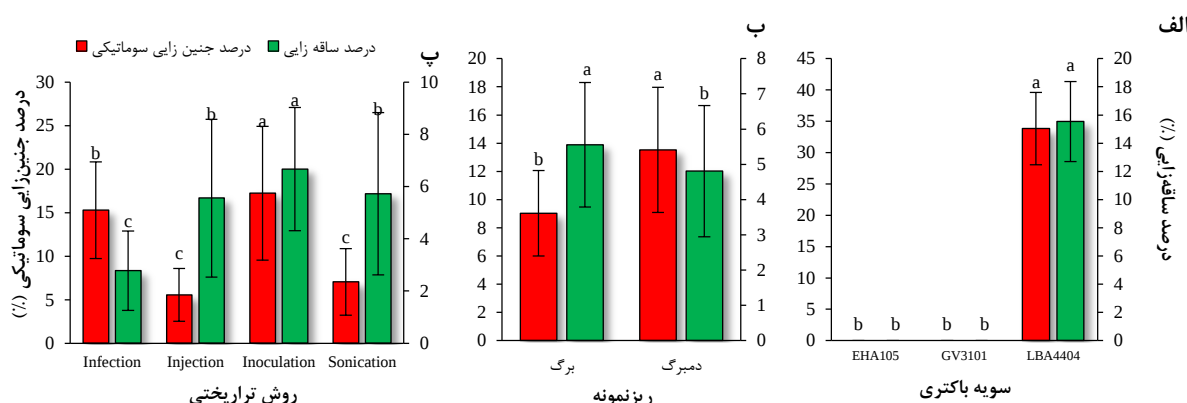
جدول ۳: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع ریزنمونه، سویه باکتری و روش تراریختی بر کالوس‌زایی و ساقه‌زایی بنگدانه

سویه باکتری	ریزنمو نه	روش تراریختی	کالوس‌زایی (%)	وزن تر کالوس (میلی گرم در هر ریزنمونه)	جنین‌زایی سوماتیکی (%)	ساقه‌زایی (%)
LBA4404	برگ	آگرواینفکشن	۴۲/۸۶ ± ۶/۲۳ ^b	۷۲۳/۳۳ ± ۱۱۰/۴۱ ^b	۵۸/۳۳ ± ۲/۸۹ ^b	۱۶/۶۷ ^a ± ۲/۸۹ ^c
		آگرواینوکولیشن	۹/۵۲ ± ۰/۸۲ ^e	۳۰۰/۰۰ ± ۲۵/۰۰ ^d	۱۶/۶۷ ± ۲/۸۹ ^e	۱۶/۶۷ ± ۲/۸۹ ^c
		آگرواینجکشن	۲۱/۴۳ ± ۳/۱۱ ^c	۱۶۷۳/۳۳ ± ۱۳۰/۵۱ ^a	۳۳/۳۳ ± ۷/۷۷ ^d	۳۳/۳۳ ± ۲/۸۹ ^a
		آگروسونیکیشن	۴/۷۳ ± ۰/۵۸ ^f	۱۳۶/۰۰ ± ۱/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
	دم‌برگ	آگرواینفکشن	۱۴/۱۹ ± ۰/۱۶ ^d	۲۲۱/۶۷ ± ۳۷/۵۳ ^e	۳۳/۳۳ ± ۵/۷۷ ^d	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگرواینوکولیشن	۴۲/۸۶ ± ۳/۲۴ ^b	۱۷۷/۳۳ ± ۱۳/۲۸ ^{ef}	۸۶/۶۷ ± ۵/۷۷ ^a	۲۳/۳۳ ± ۲/۸۹ ^b
		آگرواینجکشن	۱۴/۲۹ ± ۰/۰۰ ^d	۱۶۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰ ^{ef}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگروسونیکیشن	۵۲/۳۸ ± ۰/۸۲ ^a	۱۸۰/۰۰ ± ۳۴/۶۴ ^{ef}	۴۲/۲۲ ± ۱/۹۲ ^c	۳۴/۳۳ ± ۱/۱۵ ^a
EHA105	برگ	آگرواینفکشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگرواینوکولیشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگرواینجکشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگروسونیکیشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
	دم‌برگ	آگرواینفکشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگرواینوکولیشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگرواینجکشن	۱۹/۱۵ ± ۱/۷۴ ^c	۳۰/۰۰ ± ۵/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d
		آگروسونیکیشن	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^g	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^f	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^d

•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگروسونیکیشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	۳۷۳/۳۳ ± ۱۰/۴۱ ^c	۴/۷۶ ± ۰/۴۱ ^f	اگرواینفکشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگرواینوکولیشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگرواینجکشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگروسونیکیشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگرواینفکشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگرواینوکولیشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگرواینجکشن
•/•• ± •/•• ^d	•/•• ± •/•• ^f	•/•• ± •/•• ^g	•/•• ± •/•• ^g	اگروسونیکیشن

GV3101

دمبرگ



شکل ۵: تأثیر سویه باکتری (الف)، نوع ریزنمونه (ب) و روش تراریختی (پ) بر جنین‌زایی سوماتیکی و ساقه‌زایی بنگدانه.

گیاهچه‌های حاصل در تیمارهای حاوی گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین متفاوت بود؛ به‌طوری که بیشترین تعداد گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین با فراوانی ۱۱ گیاهچه از بین ۲۳ ریزنمونه مورد مطالعه در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه LBA4404 به روش اگرواینفکشن به دست آمد که با بررسی هیستوشیمیایی GUS+ آن‌ها مشخص شد که تنها ۵ گیاهچه مقاوم به هیگرومایسین حامل ژن GUS بودند و فراوانی تراریختی در آن‌ها ۲۱/۷۴ درصد بود (جدول ۴).

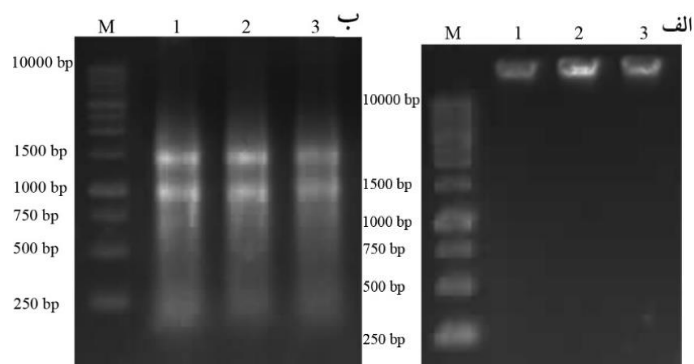
تأیید تراریختی گیاه بنگدانه

تأیید انتقال ژن‌های *gusA* و *hptII* به گیاهچه‌های تراریخت احتمالی با استفاده از PCR صورت گرفت. برای این منظور، از نمونه‌های برگ گیاهچه‌های رشد کرده در محیط انتخابی حاوی ۳۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین برای استخراج DNA، RNA و سنتز cDNA استفاده شد (شکل ۶).

تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی بر فراوانی تراریختی

منظور از گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین، گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین است که در نتیجه قرارگیری جنین‌های سوماتیکی روی محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین، تولید ساقه می‌کنند. با بررسی تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تلقیح مشخص شد که تنها ریزنمونه‌های برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 و روش‌های اگرواینفکشن، اگرواینوکولیشن و اگرواینجکشن و ریزنمونه‌های دمبرگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 با روش اگرواینوکولیشن و اگروسونیکیشن، گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین تولید کردند. در حالی که در بقیه تیمارها هیچ گیاهچه‌ای در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین مشاهده نشد (جدول ۳). تعداد

بهینه‌سازی تراریختی به‌واسطه آگروباکتریوم در بنگدانه/ احمدپور، رقیه؛ ملکی زنجانی، بهرام؛ گروسی، فاسمعلی؛ حداد، رحیم؛ فرجامی نژاد، رضا.



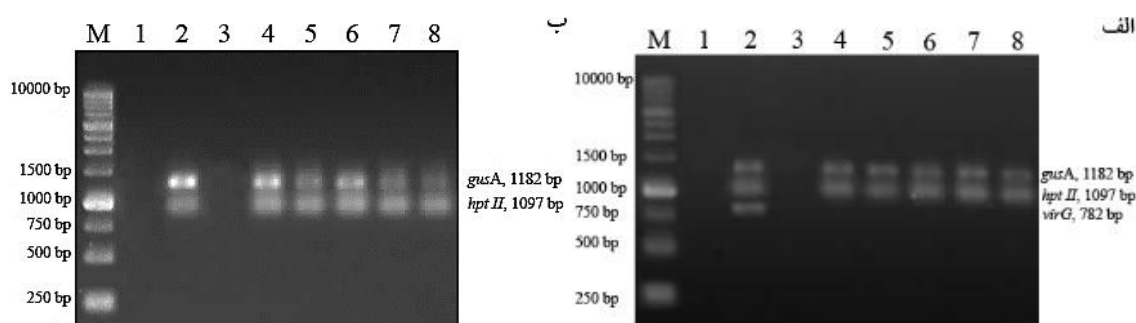
شکل ۶: ژل الکتروفورز DNA و RNA حاصل از گیاهچه‌های تراریخت. الف) الکتروفورز DNA گیاهچه‌های تراریخت و ب) الکتروفورز RNA گیاهچه‌های تراریخت، M) خط‌کش مولکولی ۱ کیلو باز و ۱، ۲ و ۳ DNA و RNA حاصل از گیاهچه‌های تراریخت.

جدول ۴: تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تراریختی بر تراریختی بنگدانه

سویه باکتری	ریزنمونه	روش تراریختی	تعداد ریزنمونه	تعداد گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین	تعداد گیاهچه‌های GUS ⁺	فراوانی تراریختی (%)
LBA4404	برگ	اگرواینفکشن	۲۳	۱۱	۵	۲۱/۷۴
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۱	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۳	۱	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
	دمبرگ	اگرواینفکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۴	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۶	۰	۰/۰۰
EHA105	برگ	اگرواینفکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
	دمبرگ	اگرواینفکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
GV3101	برگ	اگرواینفکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
	دمبرگ	اگرواینفکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینوکولیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگرواینجکشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰
		اگروسونیکیشن	۲۱	۰	۰	۰/۰۰

باندی برای ژن *virG* (۷۸۲ جفت باز) در گیاهچه‌های تراریخت احتمالی مشاهده نشد که این امر بیانگر انتقال و در نتیجه، تکثیر ژن‌های *gusA* و *hptII* و عدم آلودگی گیاهچه‌های تراریخت با آگروباکتریوم است. قطعات فوق نشان‌دهنده صحت انتقال ژن در گیاهچه‌های تراریخت بود، در حالی که در گیاهچه‌های غیرتراریخت برای قطعات فوق هیچ باندی مشاهده نشد. نتایج حاصل از صحت انتقال و بیان ژن به‌ترتیب در شکل ۷ - الف و ۷ - ب آورده شده است.

DNA کل و cDNA حاصل از نمونه‌های برگ بعد از بررسی کیفیت روی ژل آگارز، برای انجام واکنش PCR و RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی *gusA* و *hptII* مورد استفاده قرار گرفت. محصول حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دمای بهینه، روی ژل آگارز ۱/۵ مورد بررسی قرار گرفت. انتقال و بیان ژن‌های *gusA* و *hptII* به ژنوم گیاهچه‌های تراریخت احتمالی به‌ترتیب با حضور قطعه‌هایی به طول ۱۱۸۲ جفت باز و ۱۰۹۷ جفت باز تأیید شد (شکل ۷)، در حالی که هیچ



شکل ۷: ژل الکتروفورز محصول حاصل از PCR و RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *hpt*، *gusA* و *virG*. الف) الکتروفورز محصول حاصل از PCR و ب) الکتروفورز محصول حاصل از RT-PCR. خط کش مولکولی (۱ کیلو باز): ۱) کنترل منفی: بدون DNA الگو در واکنش PCR، ۲) کنترل مثبت: ناقل pCambia1304 در واکنش PCR، ۳) شاهد: گیاه تراریخت شده با آگروباکتریوم فاقد ناقل pCambia1304 و ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸) گیاه تراریخت شده با آگروباکتریوم حاوی ناقل pCambia1304.

آنالیز هیستوشیمیایی GUS

گیاهچه‌های رشد کرده روی محیط گزینشی حاوی هیگرومایسین به منظور بررسی بیان ژن *gusA* مورد بررسی هیستوشیمیایی قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگ بعد از رنگ‌آمیزی X-glue، برای حذف کلروفیل در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و بیان ژن GUS عکس برداری شد. نتایج حاصل نشان داد که از بین ۱۱ گیاهچه مقاوم به هیگرومایسین، تنها ۵ گیاهچه به رنگ‌آمیزی X-glue پاسخ مثبت دادند و حاوی رنگ-دانه‌های آبی بودند، در حالی که در گیاهان فاقد ناقل بیانی pCambia1304 به عنوان شاهد هیچ فعالیتی برای ژن GUS مشاهده نشد (شکل ۸). گیاهچه حاوی ژن GUS در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه LBA4404 به روش آگرواینفکشن حاصل شد.



شکل ۸: بررسی هیستوشیمیایی GUS+ در ریزنمونه‌های برگ گیاه بنگدانه. الف) ریزنمونه برگ شاهد، ب) ریزنمونه برگ غیرتراریخت، پ و ت) ریزنمونه‌های برگ تراریخت پس از رنگ-آمیزی با X-glue و حذف کلروفیل.

بحث

انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم به دلیل دسترسی آسان، بیان پایدار ژن، امکان ادغام و درج دقیق قطعه ژنی، امکان انتقال تعداد کمی و احتمال بروز خاموشی پایین، به‌عنوان تکنیکی رایج برای اصلاح ژنتیکی در اکثر گونه‌های گیاهی شناخته شده است (Hesami et al., 2023). در حقیقت، هیچ روش سازمان‌یافته‌ای برای تراریختی گیاهان دارویی به‌واسطه آگروباکتریوم تومه‌فسینس در دسترس نیست؛ اما با بررسی عوامل اصلی مؤثر بر تراریختی می‌توان پروتکل مناسبی برای تراریختی گیاهان با کارایی بالا معرفی کرد. عوامل زیادی نظیر نوع ریزنمونه، سویه باکتری، مدت زمان تلقیح، روش تلقیح، مدت زمان هم‌کشتی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غیره، بر بهبود کارایی تراریختی مؤثر هستند (Ebrahimzadegan & Maroufi, 2022). در کل، دست‌کاری ریزنمونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، قابلیت سلول‌های گیاهی برای دریافت T-DNA و در نتیجه، فراوانی باززایی و تراریختی، سلول‌های گیاهی را افزایش می‌دهد (Ziemienowicz, 2014).

در این مطالعه، تأثیر سویه باکتری، نوع ریزنمونه و روش تلقیح بر کارایی تراریختی گیاه بنگدانه به‌واسطه آگروباکتریوم تومه‌فسینس مورد بررسی قرار گرفت. سویه آگروباکتریوم تومه‌فسینس یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر قابلیت تراریختی است؛ به‌طوری که سویه‌های مختلف به دلیل توانایی بیماری‌زایی متفاوت، بسته به برهم‌کنش

بین سویه باکتری و گیاه میزبان، توانایی متفاوتی در تراریختی گیاه دارند (Zhang et al., 1997)؛ علاوه بر این، برهم‌کنش پروتئین‌های مختلف در خود گیاه نیز نقش مهمی در فرایند انتقال و ادغام T-DNA، هدف-گیری هسته‌ای، پایداری و بیان ژن و پاسخ دفاعی گیاه دارد (Ziemienowicz, 2014). در این مطالعه گیاهچه‌های تراریخت‌شده با سویه LBA4404 پاسخ رشدی بهتری نسبت به گیاهچه‌های تلقیح‌شده با سویه‌های EHA105 و GV3101 داشتند. در نتیجه، به نظر می‌رسد سویه LBA4404 بهترین سویه برای انتقال ژن به گیاه بنگدانه باشد. در مطالعه حیدری چاپللی و همکاران (۲۰۱۸) نیز مشخص شد که سویه LBA4404 آگروباکتریوم تومه‌فسینس مؤثرتر از سویه EHA105 و GV3101 عمل کرده و فراوانی تراریختی در این سویه به‌مراتب بیشتر از دو سویه دیگر بود (Heidari Japelaghi et al., 2018). در بسیاری از مطالعات نیز سویه LBA4404 با موفقیت برای تراریختی گونه‌های مختلف گیاهی استفاده و باعث افزایش فراوانی تراریختی شد (Bakhsh et al., 2014; Koetle et al., 2017).

از ریزنمونه‌های مختلفی برای باززایی و تراریختی استفاده می‌شود؛ اما کارایی باززایی و تراریختی در همه ریزنمونه‌ها یکسان نیست؛ بنابراین، منبع ریزنمونه مورد استفاده تأثیر چشمگیری بر بهبود کارایی باززایی گیاهچه‌های تراریخت خواهد داشت؛ به‌طوری که ریزنمونه‌های جوان در مقایسه با ریزنمونه‌های بالغ واکنش بهتری به تکنیک‌های کشت بافت نشان می‌دهند؛ چراکه سلول‌های تراریخت‌شده بایستی بتوانند شوک ناشی از تیمارهای تراریختی را بهبود دهند و به‌صورت گیاه بالغ باززایی شوند. از همین رو، بافت‌های مریستمی، کالوس‌ها، جنین‌های نارس، نوک ساقه‌ها و برگ‌های جوان، کارایی بیشتری در تراریختی گیاهان دارند (Sood et al., 2011). باززایی گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای با تغییرات خاصی در الگوی بیان ژن و تنظیم اپی‌نتیکی همراه است که در نهایت منجر به تغییرات فنوتیپی مختلفی نظیر شکل و اندازه برگ‌ها و قابلیت باززایی می‌شود (Zhang

(et al., 2020). علاوه بر سن ریزنمونه، موقعیت فیزیکی ریزنمونه نیز با تأثیر بر مقدار و ترکیب هورمون‌های درون‌زا، تا حدود زیادی پاسخ بافت به باززایی و تراریختی را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ بنابراین، منبع ریزنمونه مورد استفاده به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تراریختی در نظر گرفته می‌شود (Hesami et al., 2023). در این مطالعه نیز با مقایسه توانایی ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ در کالوس‌زایی و باززایی مشخص شد که ریزنمونه‌های دم‌برگ توانایی کالوس‌زایی بهتری نسبت به ریزنمونه‌های برگ دارند و اغلب کالوس‌ها به سمت تشکیل جنین سوماتیکی پیش رفته‌اند. این امر به دلیل فعال شدن سلول‌های تمایز نیافته در ریزنمونه‌ها است؛ چراکه برنامه‌های رشد ذاتی ریزنمونه در پاسخ به کشت بافت فعال می‌شوند و فاکتورهای رونویسی خاص با ارسال سیگنال مربوط سرنوشت سلولی را مجدداً برنامه‌ریزی می‌کنند (Ikeuchi et al., 2019; Kareem et al., 2015; Perez-Garcia & Moreno-Risueno, 2018; Sugimoto et al., 2019)؛ البته قابل ذکر است ریزنمونه‌های دم‌برگ با اینکه قابلیت کالوس‌زایی و جنین‌زایی بهتری نسبت به ریزنمونه‌های برگ داشتند، اما بعد از انتقال به محیط کشت باززایی، قابلیت رشد خود را از دست دادند. همین عامل باعث شد که ریزنمونه‌های دم‌برگ روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک به خوبی رشد نکنند و در مقایسه با ریزنمونه‌های برگ، گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین کمتری تولید کنند. در نتیجه، جنین‌های سوماتیکی حاصل از ریزنمونه‌های برگ، مراحل تکمیل رشد خود را بهتر طی کردند و باززا شدند، در حالی که هیچ گیاهچه تراریختی در نتیجه استفاده از ریزنمونه‌های دم‌برگ در گیاه مد نظر مشاهده نشد؛ بنابراین، می‌توان گفت در بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه بنگدانه، ریزنمونه‌های برگ بهتر از ریزنمونه‌های دم‌برگ عمل می‌کنند. لو و همکاران (۲۰۰۷) نیز در نتیجه استفاده از ریزنمونه‌های برگ به تراریختی موفقیت‌آمیزی در *Narcissus tazetta* دست یافتند (Lu et al., 2007).

تراریختی به واسطه آگروباکتریوم توم‌فسینس شامل روش‌های مختلفی نظیر اگرواینفکشن، نفوذ خلأ، امواج فراصوت و سایر تکنیک‌ها است (Indurker et al., 2010; Jan et al., 2016; Koetle et al., 2017). تیمار امواج فراصوت به‌عنوان تنش غیرزننده اثرات بیولوژیکی زیادی روی سلول دارد. قرار دادن ریزنمونه‌ها برای مدت کوتاه در معرض امواج فراصوت در حضور آگروباکتریوم، باعث ایجاد زخم‌های کوچک در بافت گیاهی می‌شود و با افزایش نفوذپذیری دیواره و غشای پلاسمایی، دسترسی و نفوذ آگروباکتریوم به عمق سلول‌های هدف را بهبود می‌بخشد (Koetle et al., 2017). توانایی امواج فراصوت برای انتقال ماکرومولکول‌ها و بیان ژن خارجی در شرایط درون‌شیشه‌ای منجر به تبدیل آن به‌عنوان روشی قدرتمند برای انتقال ژن شده است؛ به‌طوری که امروزه روش‌های تراریخت مبتنی بر آگروباکتریوم به کمک امواج فراصوت به‌طور گسترده برای انتقال ژن استفاده می‌شود (Huber & Pfisterer, 2000).

در مطالعه حاضر نیز از چهار روش تراریختی اگرواینوکولیشن، اگرواینجکشن، اگروسونیکیشن و اگرواینفکشن برای انتقال ژن به ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه بنگدانه استفاده شد. با بررسی تأثیر روش‌های فوق بر تراریختی مشخص شد ریزنمونه‌های تلقیح‌شده با آگروباکتریوم توسط هر چهار روش، کالوس‌زایی قابل قبولی داشتند؛ اما در برخی از تیمارها کالوس‌ها فاقد قابلیت جنین‌زایی و باززایی بودند و گیاهچه کاملی ایجاد نکردند؛ به‌طوری که بیشترین مقدار ساقه‌زایی به ترتیب با میانگین ۳۴/۳۳، ۳۳/۳۳ و ۲۳/۳۳ درصد در نتیجه استفاده از روش‌های اگروسونیکیشن، اگرواینجکشن و اگرواینوکولیشن مشاهده شد. با اینکه ساقه‌های ایجاد شده در نتیجه استفاده از روش‌های فوق به مراتب بیشتر از روش اگرواینفکشن (۱۶/۶۷ درصد) بود، اما گیاهچه‌های حاصل فاقد ژن بتاگلوکورونیداز (*gusA*) بودند و تنها گیاهچه‌های حاصل بعد از تلقیح به روش اگرواینفکشن طی رنگ‌آمیزی X-glue تولید رنگ‌دانه‌های آبی کردند؛ بنابراین، می‌توان گفت روش

اگر واینفکشن، روش مناسبی برای تراریختی گیاه بنگدانه در ریزنمونه‌های برگ تلقیح‌شده با سویه LBA4404 آگروباکتریوم است، در حالی که روش‌های دیگر کاربردی در تراریختی گیاه مد نظر با سویه‌ها و ریزنمونه‌های مورد استفاده ندارند.

برخلاف روش‌های اگرواینوکولیشن، اگرواینجکشن و اگروسونیکیشن، در روش اگرواینفکشن با اینکه آلوده‌سازی به لبه‌های ریزنمونه‌های برگ محدود می‌شود، اما تنها ریزنمونه‌های تلقیح‌شده به روش اگرواینفکشن گیاهچه‌های تراریخت تولید کردند. احتمالاً برش ریزنمونه‌ها طی پیش‌کشت در روش‌های اگرواینجکشن، اگرواینوکولیشن و اگروسونیکیشن باعث کاهش کارایی تراریختی در این روش‌ها شد. در روش اگرواینفکشن ریزنمونه‌ها به‌طور مستقیم با تیغ جراحی آلوده به باکتری برش داده می‌شوند. در نتیجه، باکتری‌ها به راحتی به سلول‌های زخمی نفوذ می‌کنند و عمل انتقال ژن صورت می‌گیرد. همچنین زخم‌های ایجاد شده در لبه‌های برش خورده باعث شروع تقسیم سلولی، بهبود اتصال آگروباکتریوم به دیواره سلولی محل زخم، تولید ترکیبات القاکننده Vir با سلول‌های فعال بیولوژیکی و در نهایت، افزایش فراوانی تراریختی می‌شود (Ziemienowicz, 2014). در مطالعه حیدری چاپلکی و همکاران (۲۰۱۸) نیز مشخص شد که تراریختی به روش اگرواینفکشن کارآمدتر از روش‌های اگرواینوکولیشن و اگرواینجکشن است و کارایی تراریختی ژنوتیپ‌های مختلف توتون در این روش بیشتر خواهد بود (Heidari Japelaghi et al., 2018). سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند موفقیت آلوده‌سازی گیاهان تلقیح‌شده با روش اگرواینفکشن بیشتر است (Yıldırım et al., 2022).

نتیجه‌گیری

با بررسی تأثیر سه سویه آگروباکتریوم تومه‌فسینس EHA105، GV3101 و LBA4404 حامل ناقل pCambia1304 حاوی ژن‌های *gusA* و *hptII* با استفاده از چهار روش تراریختی اگرواینوکولیشن، اگرواینفکشن، اگرواینجکشن و اگروسونیکیشن برای

بهینه‌سازی انتقال ژن به ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه بنگدانه، مشخص شد که در نتیجه تلقیح ریزنمونه‌های برگ با سویه LBA4404 به روش اگرواینفکشن، بیشترین تعداد گیاهچه مقاوم به هیگرومایسین به دست می‌آید. بررسی هیستوشیمیایی *GUS+* نیز نشان داد که از بین ۱۱ گیاهچه رشد کرده روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین، تنها ۵ گیاهچه حامل ژن *GUS* با فراوانی تراریختی ۲۱/۷۴ درصد بودند. نتایج حاصل از *PCR* و *RT-PCR* نیز صحت انتقال و بیان ژن مربوط را تأیید کرد.

منابع

- Heidari Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani Uliaie, E., & Jalali Javaran, M. (2018). High-efficiency agrobacterium-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Plant Molecular Breeding*, 6(2), 38-50 .
- Hesami, M., Adamek, K., Pepe, M., & Jones, A. M. P. (2023). Effect of explant source on phenotypic changes of in vitro grown cannabis plantlets over multiple subcultures. *Biology*, 12 .۴۴۳ , (۳) <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/3/443>
- Hu, Q., Dong, J., Ying, J., Wang, Y., Xu, L., Ma, Y., Wang, L., Li, J., & Liu, L. (2024). Functional analysis of RsWUSb with *Agrobacterium*-mediated in planta transformation in radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 323, 112504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112504>
- Huber, P., & Pfisterer, P. (2000). In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene therapy*, 7(17), 1516-1525 .
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual review of plant biology*, 70(1), 377-406 .
- Indurker, S., Misra, H. S & ,Eapen, S. (2010). *Agrobacterium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimisation of different factors. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16, 273-284 .
- Jan, S. A., Shinwari, Z. K., Shah ,S. H., Shahzad, A., Zia, M. A., & Ahmad, N. (2016). In-planta transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11085-11091 .
- Japelaghi, R. H., Haddad, R., & Garoosi, G.-A. (2011). Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Molecular*
- Ahmadpour, R., Maleki Zanjani, B., Garoosi, G.-a., Haddad, R., & Farjaminezhad, R. (2023). Prediction of the concentration of plant growth regulators for somatic embryogenesis and regeneration of *Hyoscyamus niger* using Box–Behnken design of response surface methodology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154(1), 55-71. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02510-w>
- Akbar, S. (2020). Handbook of 200 medicinal plants: a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications.
- Bakhsh, A., Anayol, E., & Ozcan, S. F. (2014). Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana Tabacum* L. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(3), 259 .
- Dereli, F. T. G., Ilhan, M., & Belwal, T . (۲۰۲۲) *Novel drug targets with traditional herbal medicines: Scientific and clinical evidence*. Springer Nature .
- Ebrahimzadegan, R., & Maroufi, A. (2022). In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Dragon's Head plant (*Lallemantia iberica*). *Scientific Reports*, 12(1), 1784. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05776-w>
- Erdem, M., & Uysal, H. (2021). Sentetik Tohum [Synthetic Seed]. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(2), 68-74. <https://doi.org/10.51753/flsrt.943981>
- Gao, Y., Zhang, Y., Wu, H.-Z., Min, X., Zhang, B., Kim, D.-S., Yan, X., & Zhang, C.-J. (2023). Optimization and establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using eGFP as a visual reporter. *Plant Cell ,Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02659-4>

- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C. & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmp.2011.06.004>
- Perez-Garcia, P., & Moreno-Risueno, M. A. (2018). Stem cells and plant regeneration. *Developmental biology*, 442(1), 3-12 .
- Pourhabibian, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Hassanpour, H., & Hekmat, A. (2023). Alteration in the callogenesis, tropane alkaloid formation, and gene expression in *Hyoscyamus niger* under clinorotation. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01894-y>
- Pratiwi, R. A., & Surya, M. I. (2020). *Agrobacterium*-mediated transformation. *Genetic Transformation in Crops* .
- Rengasamy, B., Manna, M., Jonwal, S., Sathiyabama, M., Thajuddin, N. B., & Sinha, A. K. (2024). A simplified and improved protocol of rice transformation to cater wide range of rice cultivars. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01925-8>
- Sagarbarria, M. G. S., Caraan, J. A. M., Lipio, P. G., Oloc-oloc, I. B. M., Watanabe, K. N., & Hautea, D. M. (2023). *Agrobacterium*-mediated Genetic transformation and plant regeneration from cotyledons in Philippine eggplant (*Solanum melongena* L.) Acc." PH 11424". *bioRxiv*, 2023.2007.2012.548781 .
- Sood, P., Bhattacharya, A., & Sood, A. (2011). Problems and possibilities of monocot transformation. *Biología plantarum*, 55(1), 1-15 .
- Sugimoto, K., Temman, H., Kadokura, S., & Matsunaga, S. (2019). To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 138-150 .
- Biotechnology*, 49(2), 129-137. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9384-8>
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387-405. <https://doi.org/10.1007/BF02667740>
- Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A. J., Trivedi, Z. B., Abhayadev, P. V., Pinon, V., Meyerowitz, E. M., & Scheres, B. (2015). PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Current Biology*, 25(8), 1017-1030 .
- Koetle, M., Baskaran, P., Finnie, J., Soos, V., Balázs, E., & Van Staden, J. (2017). Optimization of transient *GUS* expression of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Dierama erectum* Hilliard using sonication and *Agrobacterium*. *South African Journal of Botany*, 111, 307-312 .
- Lu, G., Zou, Q., Guo, D., Zhuang, X., Yu, X., Xiang, X., & Cao, J. (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Narcissus tazetta* var. chinensis. *Plant Cell Reports*, 26, 1585-1593 .
- Morris, P., Carter, E. B., Hauck, B., Hughes, J.-W., Allison, G., & Theodorou, M. K. (2021). Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 4: Root carbohydrate levels at defoliation and regrowth climatic conditions are major drivers of phenolic content and forage quality. *Planta*, 253(2), 38. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03523-x>
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>

- Yıldırım, K., Kavas, M., Kaya, R., Seçgin, Z., Can, C., Sevgen, I., Saraç, Ç. G., & Tahan, V. (2022). Genome-based identification of beet curly top Iran virus infecting sugar beet in Turkey and investigation of its pathogenicity by *Agroinfection*. *Journal of Virological Methods*, 300, 114380 .
- Zhang, Z., Coyne, D. P., & Mitra, A. (1997). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science* jashs, 122(3), 300-305. <https://doi.org/10.21273/jashs.122.3.300>
- Zhang, Z., Sun, Y., & Li, Y. (2020). Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms. *Plant Cell Reports*, 39(10), 1249-1262. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02577-1>
- Ziemienowicz, A. (2014). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.004>