Archive of SID
doi: 10.22124/c.2019.12934.1481

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره نهم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۸ (۸۱-۷۱)

بهینه‌سازی بیان موقت ژن به‌واسطه آگروباکتریوم (Agroinfiltration) در برگ و جوانه گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.)

کسری اصفهانی[۱*]، متین عادل[۲] و تهمینه لهراسبی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۹

چکیده

جو (*Hordeum vulgare* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در دنیا است و به‌عنوان یک سامانه تولید پروتئین‌های نوترکیب نیز در بیوتکنولوژی کشاورزی اهمیت یافته است. در گیاهانی مانند غلات که باززایی و تراریختی آن‌ها مشکل است، در برخی موارد بیان موقت یا گذرای ژن به‌عنوان جایگزینی برای روش پایدار در نظر گرفته می‌شود. بیان موقت ژن توسط آگروباکتریوم (Agroinfiltration)، روشی ارزان و سریع برای بررسی عملکرد ژن‌ها و بررسی عملکرد عناصر موثر بر بیان ژن (نواحی ترجمه نشونده، اینترون‌ها، عوامل رونویسی و پروموترها) است. با استفاده از این روش، بررسی نحوه کارکرد سازه ژنی فقط با گذشت چند روز و بدون پشت سر گذاردن مراحل وقت‌گیر باززایی گیاه امکان‌پذیر است. به‌منظور بهینه‌سازی این روش در گیاه جو، اثر تیمارهای مختلف مانند نوع بافت، سن گیاه، محل برگ، غلظت استوسیرینگون، زمان بررسی پس از تلقیح، سویه آگروباکتریوم، غلظت (OD) محیط القا، نوع روش، مدت زمان فعالیت پمپ خلا و تعداد آن و نیز ژنوتیپ بر بیان موقت ژن گزارشگر *ß-glucuronidase* در برگ گیاه جو در این تحقیق بررسی شد. علاوه بر آن، اثر محیط القا، سویه آگروباکتریوم و ژنوتیپ بر بیان موقت ژن گزارشگر در جوانه گیاه جو نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بیان موقت ژن *ß-glucuronidase* در تمامی نمونه‌های جوانه رقم بهمن و ژنوتیپ EC-82-6 گیاه جو که با سویه GV3301 آگروباکتریوم واجد این سازه در محیط القا با غلظت استوسیرینگون ۲۰۰ میکرومولار به‌وسیله سوزن انسولین تلقیح شده بودند، مشاهده شد. بر اساس نتایج این تحقیق، یک روشی کارا و ارزان قیمت برای بیان موقت در گیاه جو با استفاده از آگروباکتریوم معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، ژن گزارشگر، عوامل رونویسی

۱- استادیار، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: kasra13@nigeb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) گیاهی از خانواده گندمیان و یک‌ساله است و بعد از گندم، رتبه دوم سطح زیر کشت در ایران را دارد. نیاز آبی کم و مقاومت به شوری از ویژگی‌های این گیاه است. جو در نواحی سردسیر و خشک منبع غذایی مهمی به‌شمار می‌رود، اگرچه امروزه کشت جو عمدتاً برای خوراک دام و تهیه فرآورده‌های تخمیری از این گیاه صورت می‌گیرد (Mrízová *et al.*, 2014). جو از هزاران سال قبل در تولید فرآیندهای تخمیری که بخش مهمی از صنایع مبتنی بر زیست‌فناوری می‌باشد، استفاده شده است ولی با اهمیت یافتن سامانه‌های تولید مواد ارزشمند و دارویی بر پایه گیاه و آشکار شدن ویژگی‌های فیزیولوژیک و ژنتیکی گیاه جو، این گیاه از جنبه دیگری نیز اهمیت یافت و گیاه جو توسط شرکت‌های فعال در حوزه کشاورزی مولکولی (Molecular farming) مثل ORF Genetics (Reykjavik, Iceland) و Maltagen Forschung GmbH (Andernach, Germany) برای تولید پروتئین‌های ارزشمند دارویی و صنعتی مثل لیزوزیم انسانی (Human lysozyme)، فاکتورهای رشد (Growth factors) و سیتوکین‌ها (Cytokines) استفاده شده است (Mrízová *et al.*, 2014, Goedeke *et al.*, 2007). جو در حال حاضر به‌عنوان یک سامانه مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بالا پذیرفته شده است و از لحاظ تکنیکی، این گیاه توانایی تولید پروتئین‌های دارویی پیچیده مثل پروتئین‌های سرم انسانی، تنظیم کننده‌های رشد، انواع آنتی‌بادی، واکسن‌ها، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها و آنزیم‌های مختلف را دارد (Mrízová *et al.*, 2014).

در سال‌های اخیر، تقاضا برای مولکول‌های ارزشمند به‌ویژه پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان در حال افزایش است، چون هزینه‌های بالای تولید این مواد در سامانه‌های معمول، باعث قیمت بالای آن‌ها می‌شود و این موضوع عامل مهمی در عدم دسترسی عمومی به این داروها است، در حالی‌که گیاهان پتانسیل بالایی در تبدیل شدن به کارخانه‌های تولید مواد ارزشمند زیستی را دارند و هزینه تولید در آن‌ها به نسبت سایر سامانه‌ها بسیار کم‌تر است. در عین حال، احتمال انتقال عوامل بیماری‌زا در سامانه‌های گیاهی در مقایسه با سامانه‌های مبتنی بر سلول‌های جانوری نیز وجود ندارد و تغییرات پس از ترجمه در گیاهان باعث شکل‌گیری و در پی آن ساختار و عملکرد درست پروتئین‌ها در مقایسه با تولید در سامانه‌های میکروبی می‌باشد (Fischer and Schillberg, 2004).

تا کنون روش‌های مختلفی برای انتقال ژن به گیاهان معرفی شده‌اند و به‌خوبی توسعه یافته‌اند، اما استفاده از این روش‌ها در بیش‌تر ارقام جو چندان موفقیت‌آمیز نبوده (Goedeke *et al.*, 2007, Hinchliffe and Harwood, 2019) و به‌همین دلیل از ظرفیت این گیاه برای تولید محصولات ارزشمند به‌خوبی استفاده نشده است. بمباران ذره‌ای، انتقال ژن به پروتوپلاست و روش‌های زیستی مبتنی بر ویروس‌ها و باکتری‌ها، پرکاربردترین روش‌هایی هستند که جهت انتقال سازه بیانی به سلول‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Zamani, 2018). با استفاده از تمامی این روش‌ها می‌توان بیان پایدار یا بیان موقت (Transient expression) سازه مورد نظر را در سلول مورد مطالعه قرار داد.

بیان پایدار در گیاهانی که انتقال ژن و باززایی آن‌ها به‌سهولت انجام می‌شود، روشی کارآمد و مفید است، اما در گیاهانی مانند غلات و درختان که باززایی و تراریختی آن‌ها مشکل است، بیان ژن موقت یا گذرا به‌عنوان جایگزینی برای روش پایدار در نظر گرفته می‌شود (Gao and Nielsen 2013). در عین حال، بیان گذرا روش مناسبی برای بررسی عملکرد ژن‌ها با بیش‌بیان و خاموشی، شناسایی مسیرهای بیوسنتزی و بررسی عملکرد عناصر موثر بر بیان ژن (نواحی ترجمه نشونده، اینترون‌ها، فاکتورهای رونویسی و پروموترها) است. برای مثال، از این روش برای بررسی اثر توالی‌های 3′UTR در توتون (Rosenthal *et al.*, 2018) و بررسی اثر پروموترهای مختلف و اینترون داخل ژن همراه با تیمارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی برای بهینه‌سازی یک دستورالعمل بیانی در گیاه استفاده شده است (Norkunas *et al.*, 2018). همچنین با توجه به تولید انبوهی از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ژنومی، با اینکه ابزارهای بیوانفورماتیکی توانایی پیش‌بینی خوبی دارند، اما نهایتاً باید برای تایید نهایی در گیاه بررسی شوند که انتقال ژن پایدار برای انجام این‌گونه پژوهش‌ها بسیار طولانی و انتقال ژن موقت راه حل جایگزین مناسبی است (Zamani, 2018).

با استفاده از بیان موقت ژن خارجی در سلول‌های گیاهی، انجام مراحل آزمایش در سطح بافت بدون باززایی گیاه تراریخت ممکن است و بررسی نحوه کارکرد سازه ژنی تنها با گذشت چند روز و بدون پشت سر گذاردن مراحل

www.SID.ir

Archive of SID

وقت‌گیر باززایی گیاه انجام می‌پذیرد. فراوانی تراریختی بیان موقت در مقایسه با تعداد سلول‌هایی که بیان پایدار دارند نیز بسیار بالا است. با این روش، بسیاری از آزمایش‌های بررسی سازه‌ها در میزبان گیاهی به‌سرعت قابل اجرا است و این روش به‌فراوانی در این زمینه استفاده شده است (Sheludko, 2008; Bond *et al.*, 2016).

برای بیان موقت، ابتدا می‌بایست یکی از روش‌های معمول انتقال ژن را برگزید. روش بمباران ژن با اینکه روشی مناسب برای گیاهان سرسخت (Recalcitrant) مثل جو است، اما تعداد کم سلول‌های تراریخت حاصل، آسیب‌های مکانیکی و هزینه بالا، مانع استفاده عمومی از آن می‌شود (Canto, 2016). همچنین، ابزار انتقال ژن با این روش در تمامی آزمایشگاه‌ها مهیا نیست. انتقال ژن با استفاده از ویروس‌های گیاهی نیز کاملاً توسعه نیافته و همه جا در دسترس نیست. در این روش، محدودیت اندازه سازه انتقالی نیز وجود دارد و در برخی موارد لازم است از روش‌های کمکی مثل آگروباکتریوم نیز استفاده شود (Baltes *et al.*, 2014; Mortimer *et al.*, 2015).

در این بین یکی از پرکاربردترین و ارزان‌ترین روش‌های انتقال ژن به سلول‌های گیاهی، استفاده از آگروباکتریوم است. بیان موقت ژن با استفاده از آگروباکتریوم (Agroinfiltration)، به سهولت و با استفاده از یک سویه مناسب این باکتری و یکی از ناقلین دوتایی متعدد معرفی شده، در هر آزمایشگاهی امکان‌پذیر است (Norkunas *et al.*, 2018). در بیان موقت، بیش‌ترین میزان بیان دو تا چهار روز پس از تلقیح مشاهده می‌شود، در حالی‌که در انتقال ژن پایدار، بیان ۱۰ تا ۱۴ روز پس از تلقیح مشاهده می‌شود. همچنین، بیان موقت بر خلاف بیان دائم، قابلیت توارث به نسل‌های بعدی را ندارد (Canto, 2016).

بر این اساس و به‌منظور بهینه‌سازی بیان موقت ژن با استفاده از آگروباکتریوم (Agroinfiltration) در گیاه جو، در این تحقیق اثر تیمارهای مختلف در دو بافت مختلف (برگ و جوانه) مورد بررسی قرار گرفت. در برگ جو، اثر تیمارهای سن گیاه، محل برگ، غلظت استوسیرینگون (Acetosyringone)، زمان بررسی پس از تلقیح، سویه آگروباکتریوم، غلظت (OD) باکتری، مدت زمان فعالیت پمپ خلا و دفعات آن و ژنوتیپ و در جوانه جو، اثر تیمارهای محیط القا، سویه آگروباکتریوم و ژنوتیپ بر بیان موقت ژن گزارشگر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ساخت ناقل بیانی

در این مطالعه، از ناقل دارای ژن گزارشگر واجد اینترون استفاده شد. بدین منظور ژن *ß-glucuronidase* واجد اینترون اول ژن *cat1* از پلاسمید pCAMBIA3301 با آغازگرهای واجد جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی *Sma*I و *Sac*I از ناقل pCAMBIA3301 (Cambia) (FGUS-int/ RGUS-int) و با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA Polymerase شرکت Thermo Fisher Scientific تکثیر و در ناقل pBI121$^{Gus\text{-}6}$ همسانه‌سازی شد (Mohammadhassan *et al.*, 2018). بر این اساس، دو آغازگر بر اساس توالی‌های ابتدا و انتهای ژن *ß-glucuronidase* و واجد جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی *Sma*I و *Sac*I، با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 (پس از بررسی Tm، ΔG، احتمال اتصال غیراختصاصی و تشکیل پیوند بین جفت بازها-درون مولکولی و بین آغازگرها) طراحی و برای ساخت به شرکت *TAG* Copenhagen ارسال شد. توالی این آغازگرها به‌صورت زیر بود:

FGUS-int:
CCCCGGGATGGTAGATCTGAGGGTAAAT
RGUS-int:
CGAGCTCTCAGCTAGCTTGTTTGCCTC

پس از تکثیر قطعه واجد ژن از روی ناقل pCAMBIA3301، محصول PCR و ناقل با آنزیم‌های *Sma*I و *Sac*I هضم و محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز جداسازی و قطعه و بدنه ناقل با استفاده از کیت استخراج (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) از روی ژل خالص‌سازی شد. واکنش اتصال با استفاده از آنزیم T4-DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) انجام و محصول الحاق با روش شوک حرارتی به درون میزبان *E. coli* سویه DH5α منتقل شد (Sambrook and Russell, 2001). کلونی‌های حاصل با استفاده از روش Colony PCR با آغازگرهای ذکر شده بررسی و نمونه‌های مثبت، مجدداً در محیط مایع LB کشت شد و پس از استخراج پلاسمید (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche)، بررسی تکمیلی صحت همسانه‌سازی آن‌ها با هضم آنزیمی و تعیین توالی (شرکت فزاپژوه) انجام شد. پلاسمیدهای خالص‌شده با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I و نیز *Hin*dlll و *Eco*Rl هضم و نتیجه واکنش هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

کاشت بذرهای جو

بذرهای ژنوتیپ EC-82-6 و رقم بهمن از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد. بذرها پس از استریل‌شدن درون پلیت روی کاغذ صافی خیس قرار گرفتند و در دمای اتاق نگهداری شدند. بذرهای جوانه‌دار در عمق نیم تا یک سانتی‌متری خاک قرار داده شدند. گیاهان در شرایط دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به رشد خود ادامه دادند.

Agroinfiltration برگ جو

در مرحله اول، با استفاده از پمپ خلا، سوسپانسیون سویه مورد نظر آگروباکتریوم وارد فضای میان‌سلولی برگ شد و برگ‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. شرایط تیمار پایه بیان ژن، به‌صورت سویه GV3301 *آگروباکتریوم تومفاشینس*، برگ دوم، گیاه ۱۴ روزه، غلظت استوسیرینگون ۲۰۰ میکرومولار، OD=0.6، استفاده از پمپ خلا دو بار ۱۰ دقیقه و سنجش بیان سه روز پس از تلقیح در نظر گرفته شد. جهت بهینه‌سازی روش، تیمارهایی با تغییر یکی از شرایط تیمار پایه بررسی شدند:

۱- تیمار سن گیاه: برگ گیاهان ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روزه.

۲- تیمار محل برگ: برگ‌های اول، دوم و سوم.

۳- تیمار غلظت استوسیرینگون: غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار.

۴- تیمار تعداد روز پس از تلقیح: دو، سه و چهار روز.

۵- تیمار سویه آگروباکتریوم: GV3301 و LBA4404.

۶- تیمار محیط القا: محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) و محیط القای آگروباکتریوم (Lee and Yang, 2006) (جدول ۱).

۷- تیمارهای غلظت (OD) آگروباکتریوم: محلول‌های القا واجد آگروباکتریوم با مقادیر OD_{600} متفاوت شامل ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ و ۱.

۸- تیمار نوع تلقیح برگ: تزریق به‌وسیله سوزن انسولین و استفاده از پمپ خلا.

- در تیمار پمپ خلا، تیمار زمان در دسیکاتور با فشار خلا دو تا سه میلی‌بار، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و تیمار تعداد دفعات قرار گرفتن در شرایط خلا، یک، دو و سه بار بررسی شد.

۹- تیمار ژنوتیپ جو: رقم بهمن به‌عنوان رقم با عملکرد بالا و لاین EC-82-6 به‌عنوان ژنوتیپ با پروتئین بالا.

Agroinfiltration جوانه جو

بیان موقت در جوانه‌های جو نیز در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی تیمارها، شرایط پایه OD_{600}=1.0، استفاده از محیط القا، سویه GV3301، ژنوتیپ EC-82-6 جو، تلقیح به‌وسیله سوزن انسولین و غلظت استوسیرینگون ۲۰۰ میکرومولار در نظر گرفته شد و برای بهینه‌سازی روش در آزمایش‌های مجزا، تغییرات یکی از شرایط این تیمار پایه به‌صورت زیر بررسی شد:

۱- تیمار محیط القا: محیط MS و محیط القای آگروباکتریوم (Lee and Yang, 2006) (جدول ۱).

۲- تیمار سویه آگروباکتریوم: GV3301 و LBA4404.

۳- تیمار ژنوتیپ جو: ژنوتیپ EC-82-6 و رقم بهمن.

سنجش هیستوشیمیایی GUS

سنجش فعالیت GUS با روش هیستوشیمیایی ارایه شده توسط جفرسن (Jefferson, 1987) با برخی تغییرات انجام شد. بدین منظور، بخشی از برگ تیمارشده، ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی (جدول ۲) نگهداری و سپس نمونه‌ها طی ۷۲ ساعت، ده بار با اتانول ۷۰ درجه کلروفیل‌زدایی شدند. سپس برای بررسی فعالیت GUS و رنگ آبی، نمونه‌ها مشاهده و عکس‌برداری شدند.

جدول ۱- محیط القای آگروباکتریوم (pH=5.6) (Lee and Yang, 2006)

Table 1. Induction Medium of *Agrobacterium* (pH=5.6) (Lee and Yang, 2006)

Component	Concentration
K_2HPO_4	10.5 g/L
KH_2PO_4	4.5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/L
NaCitrate	0.5 g/L
Glucose	1 g/L
Glycerol	4 g/L
$MgSO_4$	1 mM
2-(N-Morpholino) Ethane Sulfonic acid (MES)	10 mM
Sucrose	1.9 g/L

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ - محلول رنگ‌آمیزی GUS (Jefferson, 1987)

Table 2. Gus staining solution (Jefferson, 1987)

Component	Stock concentration	Volume
Sodium phosphate buffer, pH=7	250 mM	400 µl (100mM)
EDTA, pH=8	0.5 M	20 µl (10mM)
Triton	20 %	5 µl (0.01%)
2-Mercaptoethanol	-	0.7 µl (10mM)
Ferrocyanide	5 mM	10 µl
Ferricyanide	5 mM	10 µl
X-gluc	20 mg/ml	50 µl (1mM)
H2O	-	504.3 µl

نتایج و بحث

ساخت سازه و انتقال به آگروباکتریوم

ژن گزارشگر واجد اینترون در ناقل تغییریافته $pBI121^{Gus\text{-}6}$ همسانه‌سازی شد. پس از تایید صحت ساخت ناقل با آزمون PCR، هضم آنزیمی (شکل ۱) و نهایتاً توالی‌یابی، این سازه پلاسمیدی با نام $pBI121^{Gus\text{-}int}$ به سویه‌های LBA4404 و GV3301 *آگروباکتریوم تومفاشینس* با روش شیمیایی منتقل شد. کلونی‌های رشد کرده در محیط واجد آنتی‌بیوتیک با روش Colony PCR بررسی شدند (شکل ۲).

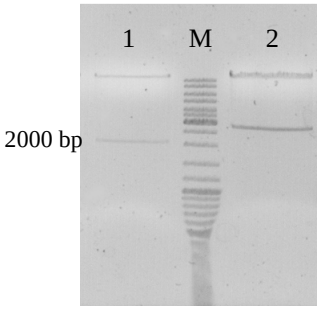
بررسی عدم فعالیت گلوکورونیدازی در برگ گیاهان دست‌ورزی نشده

برای مشخص کردن وجود و یا عدم وجود فعالیت گلوکورونیدازی در برگ ارقام جو مورد مطالعه، برگ‌های گیاه دست‌ورزی نشده جو رنگ‌آمیزی شد و مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳).

عدم بروز رنگ آبی در برگ‌ها نشان‌دهنده عدم وجود و یا اندک بودن فعالیت گلوکورونیدازی در برگ گیاهان جو دست‌ورزی نشده (شاهد) است.

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف در کارآیی Agroinfiltration برگ‌های جو

بررسی اولیه تراریختی موقت در شرایط پیش‌بینی شده تیمار اولیه (سویه آگروباکتریوم GV3301 واجد $pBI121^{Gus\text{-}int}$، برگ دوم، گیاه ۱۴ روزه، غلظت استوسیرینگون ۲۰۰ میکرومولار، OD=0.6، قراردهی در پمپ خلا دو بار ۱۰ دقیقه و سنجش بیان سه روز پس از تلقیح) صورت گرفت. در مرحله اول، برگ‌های اینفیلتریت شده با گذشت سه روز از زمان تلقیح، در محلول رنگ‌آمیزی غوطه‌ور شدند و پس از گذشت زمان کافی، فرآیند رنگ‌بری آن‌ها انجام شد (شکل ۴).

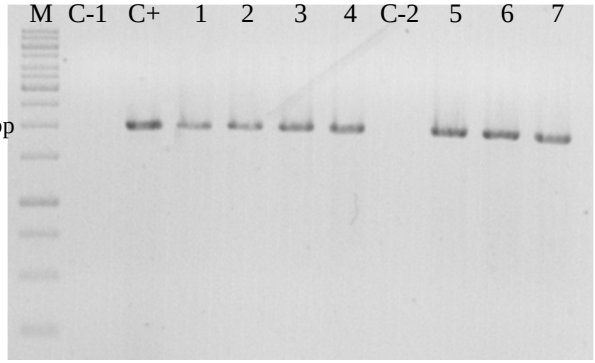


شکل ۱- بررسی هضم آنزیمی ناقل $pBI121^{Gus\text{-}int}$. ۱) هضم ناقل $pBI121^{Gus\text{-}int}$ با آنزیم‌های *Sma*I و *Sac*I و جدا شدن قطعه واجد ژن *gus* واجد اینترون به اندازه تقریبی ۲۰۰۰ جفت باز از ناقل، ۲) هضم ناقل $pBI121^{Gus\text{-}int}$ با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hin*dIII و جدا شدن قطعه به اندازه تقریبی ۳۰۰۰bp از ناقل، M) نشانگر وزن مولکولی GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

Figure 1. Digestion pattern analysis of $pBI121^{Gus\text{-}int}$ vector. 1) Digestion of $pBI121Gus^{-int}$ vector with *Sma*I and *Sac*I and about 2000 bp fragment of *gus* gene with intron was isolated, 2) Digestion of $pBI121Gus^{-int}$ vector with *Hin*dIII and *Eco*RI and about 3000 bp fragment of *gus* gene with intron was isolated, M) GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

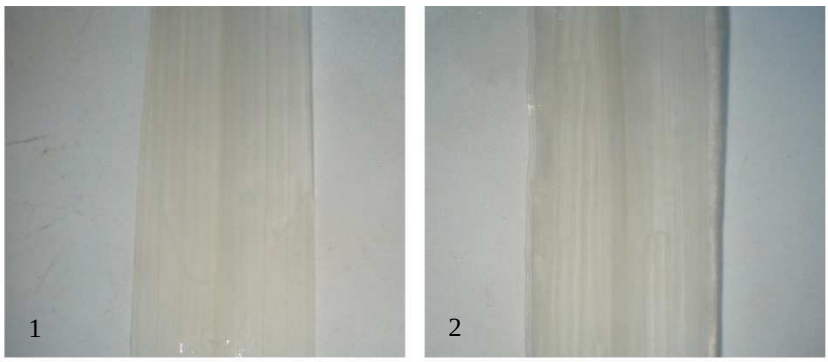
www.SID.ir

Archive of SID



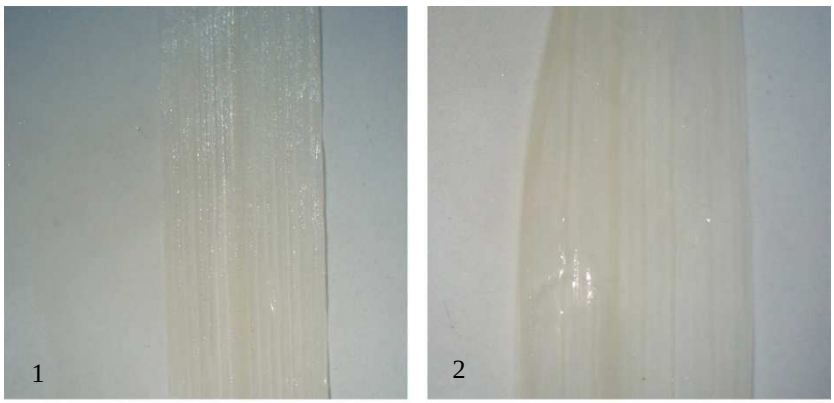
شکل ۲ – نتایج Colony PCR کلونی‌های آگروباکتریوم واجد پلاسمید $pBI121^{Gus-int}$ با آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن گزارشگر (انتظار مشاهده قطعه‌ای با اندازه حدود ۲۰۰۰ جفت باز در صورت وجود ناقلین). M) نشانگر وزن مولکولی GeneRuler 1 kb DNA (Thermo Fisher Scientific)، C-1) آگروباکتریوم وحشی سویه GV3301، +C) پلاسمید $pBI121^{Gus-int}$، ۱-۴) کلونی‌های *آگروباکتریوم تومفاشینس* سویه GV3301 واجد سازه، C-2) آگروباکتریوم وحشی سویه LBA4404، ۵-۷) کلونی‌های *آگروباکتریوم تومفاشینس* سویه LBA4404 واجد سازه.

Figure 2. Colony PCR of *Agrobacterium* colonies harboring $pBI121^{Gus-int}$ with reporter gene primers. M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), C-1) Wild *Agrobacterium* strain GV3301, C+) $pBI121^{Gus-int}$ plasmid, 1-4) *Agrobacterium* strain GV3301 colonies harboring construct, C-2) Wild *A.* strain LBA4404, 5-7) *A. tumefaciens* strain LBA4404 colonies harboring construct.



شکل ۳ - سنجش فعالیت گلوکورونیدازی در برگ‌های جو دست‌ورزی نشده. ۱) رقم بهمن، ۲) ژنوتیپ EC-82-6.

Figure 3. β-Glucuronidase activity assay in non-transgenic barley leaves. 1) Bahman cultivar, 2) EC-82-6 genotype.



شکل ۴- بررسی فعالیت گلوکورونیدازی تیمار پایه. ۱) رقم بهمن، ۲) ژنوتیپ EC-82-6.

Figure 4. β-Glucuronidase activity assay of basic treatment. 1) Bahman cultivar, 2) EC-82-6 genotype.

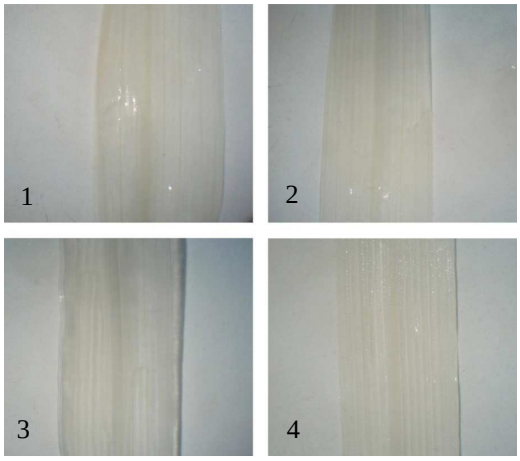
www.SID.ir

Archive of SID

با رنگ‌بری کامل و عدم تشخیص فعالیت GUS در بافت برگی در هر دو رقم جو و تحت شرایط تیمار پایه، تیمارهای متعددی برای حصول نتیجه و بهینه‌سازی بیان موقت ژن گزارشگر انجام شد که نتایج برخی از آن‌ها ارایه شده است.

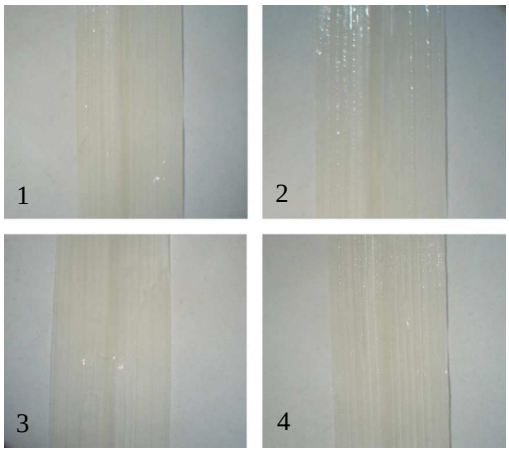
یکی از عوامل مهم موثر در بیان موقت، محل قرار گرفتن برگ مورد بررسی در گیاه می‌باشد. به‌طور معمول، برگ‌های خیلی جوان و قدیمی برای بیان موقت مناسب نیستند و به همین دلیل برگ‌های میانی کارایی بالاتری در بیان دارند. با عدم تشخیص بیان موقت در برگ دوم، دیگر برگ‌ها نیز در شرایط تخمینی مورد سنجش قرار گرفتند. رنگ‌بری از برگ‌های تیمار شده، نشان از عدم فعالیت گلوکورونیدازی قابل تشخیص در این برگ‌ها و عدم تاثیر محل برگ بر بیان موقت ژن گزارشگر داشت (شکل ۵).

در مرحله بعد اثر سویه‌های آگروباکتریوم واجد ناقل $pBI121^{Gus\text{-}int}$ و محیط‌های مورد استفاده در بیان موقت ژن گزارشگر مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های آگروباکتریوم GV3301 و LBA4404 در دو محیط MS و محیط القا (جدول ۱) به‌عنوان تیمار در نظر گرفته شدند. هیچ نوع فعالیت گلوکورونیدازی پس از رنگ‌بری برگ‌ها در تیمارهای مختلف (محیط‌های تلقیح و سویه‌های متفاوت) مشاهده نشد (شکل ۶).



شکل ۵- بررسی فعالیت گلوکورونیدازی برگ‌های اول و سوم گیاه جو. ۱) برگ اول رقم بهمن، ۲) برگ سوم رقم بهمن، ۳) برگ اول ژنوتیپ EC-82-6، ۴) برگ سوم ژنوتیپ EC-82-6.

Figure 5. β-Glucuronidase activity assay of first and third leaves of barley. 1) First leaf of Bahman cultivar, 2) Third leaf of Bahman cultivar, 3) First leaf of EC-82-6 genotype, 4) Third leaf of EC-82-6 genotype.



شکل ۶ - بررسی فعالیت گلوکورونیدازی محیط‌های تلقیح و سویه‌های مختلف آگروباکتریوم. ۱) سویه LBA4404 در محیط MS، ۲) سویه LBA4404 در محیط القا، ۳) سویه GV3301 در محیط MS، ۴) سویه GV3301 در محیط القا.

Figure 6. β-Glucuronidase activity assay of different *Agrobacterium* strains and induction media. 1) LBA4404 strain in MS medium, 2) LBA4404 strain in induction medium, 3) GV3301 strain in MS medium, 4) GV3301 strain in induction medium.

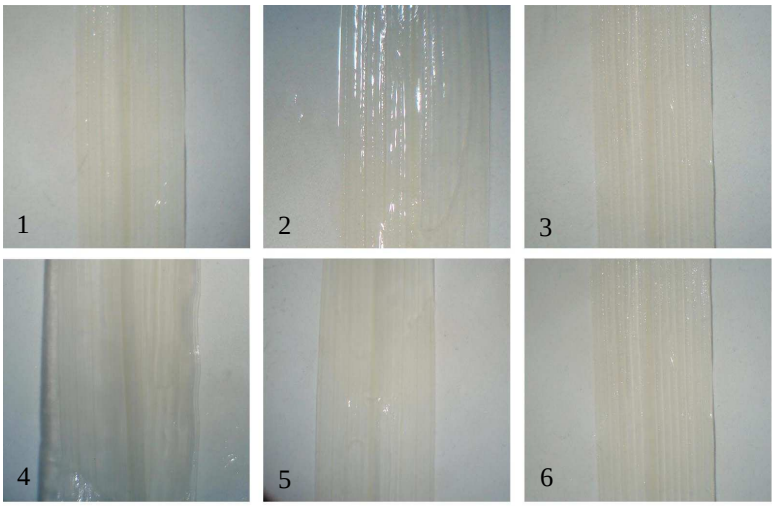
www.SID.ir

Archive of SID

در مرحله بعد، اثر غلظت‌های مختلف هر دو سویه آگروباکتریوم در محیط القا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده عدم بیان ژن گزارشگر در برگ‌های جو با استفاده از هر دو سویه GV3301 و LBA4404 در رقم بهمن و ژنوتیپ EC-82-6 در غلظت‌های مختلف سویه‌ها در محیط القا بود (شکل ۷). سایر تیمارهای مورد بررسی روی برگ این دو رقم جو، نتایج مشابهی در سنجش فعالیت گلوکورونیدازی در بیان موقت نشان دادند. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که استفاده از برگ در این روش، کارآیی لازم را ندارد و به این دلیل بررسی فعالیت گلوکورونیدازی روی بافت‌های دیگر گیاه جو صورت گرفت.

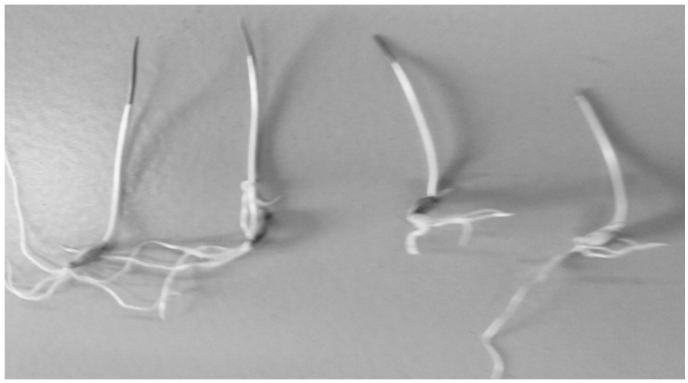
بررسی اثر تیمارهای مختلف در Agroinfiltration جوانه‌های جو

بذرها در ابتدای کشت آب‌گیری شدند. ابتدا ریشه‌ها و سپس اندام هوایی شروع به رشد کرد. زمانی که طول اندام هوایی به سه تا پنج سانتی‌متر رسید، از آن‌ها برای تلقیح آگروباکتریوم استفاده شد (شکل ۸). روز سوم و یا چهارم برای تلقیح انتخاب شد. برای بررسی فعالیت گلوکورونیدازی در جوانه‌ها، بافت بخش هوایی جوانه‌های سه تا چهار روزه رقم بهمن و ژنوتیپ EC-82-6 با استفاده از محیط القا و محیط MS توسط آگروباکتریوم سویه GV3301 فاقد ناقل تلقیح شد و پس از گذشت سه روز فعالیت گلوکورونیدازی در آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. بررسی جوانه‌ها، عدم وجود فعالیت در هر دو محیط القا را نشان داد (شکل ۹).



شکل ۷ - بررسی فعالیت گلوکورونیدازی در غلظت‌های مختلف سویه‌های آگروباکتریوم در محیط القا

Figure 7. β-Glucuronidase activity assay of different *Agrobacterium* strains concentrations in induction medium. 1) GV3301 strain in OD=0.4, 2) GV3301 strain in OD=0.8, 3) GV3301 strain in OD=1, 4) LBA4404 strain in OD=0.4, 5) LBA4404 strain in OD=0.8, 6) LBA4404 strain in OD=1.

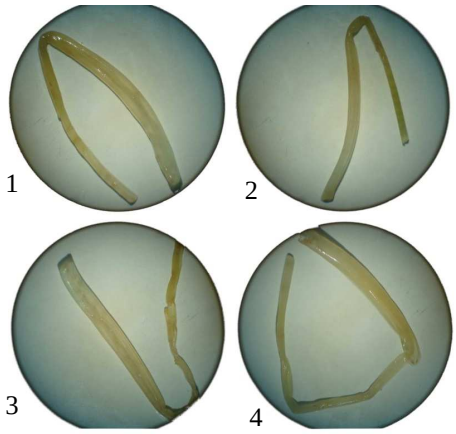


شکل ۸- جوانه‌های جو آماده تلقیح توسط آگروباکتریوم

Figure 8. Barley buds ready to treat with *Agrobacterium*

www.SID.ir

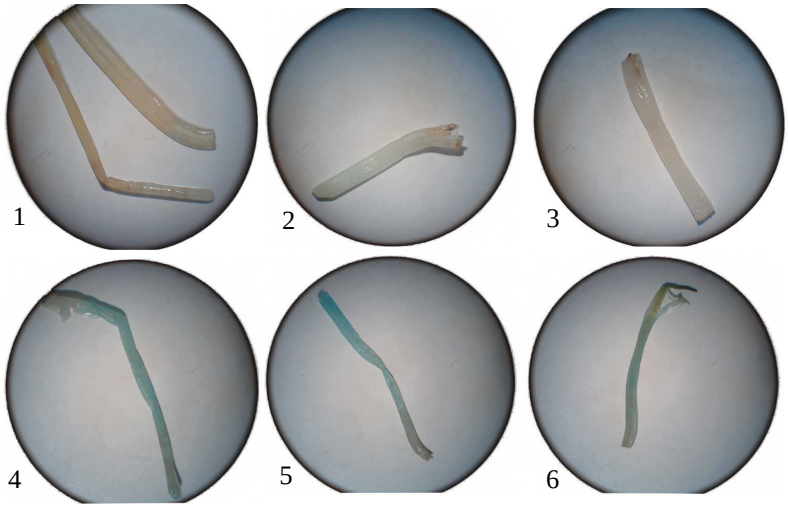
Archive of SID



شکل ۹ - سنجش فعالیت گلوکورونیدازی در جوانه‌های جو غیرتراریخته. ۱) رقم بهمن در محیط MS، ۲) رقم بهمن در محیط القا، ۳) ژنوتیپ EC-82-6 در محیط MS، ۴) ژنوتیپ EC-82-6 در محیط القا.

Figure 9. β-Glucuronidase activity assay in non-transgenic barley buds. 1) Bahman cultivar in MS medium, 2) Bahman cultivar in induction medium, 3) EC-82-6 genotype in MS medium, 4) EC-82-6 genotype in induction medium.

با مشخص شدن عدم وجود فعالیت گلوکورونیدازی در جوانه‌های دست‌ورزی نشده هر دو ژنوتیپ جو، تیمارهایی برای بهینه‌کردن شرایط بیان موقت در جوانه‌ها بررسی شد. ابتدا اثر استفاده از محیط القا و محیط MS، بر سویه GV3301 واجد ناقل $pBI121^{Gus\text{-}int}$ بررسی شد و پس از گذشت سه روز، فعالیت گلوکورونیدازی مورد سنجش قرار گرفت. بررسی جوانه‌ها حاکی از عدم وجود فعالیت در محیط MS و فعالیت مشخص در محیط القا بود (شکل‌های ۱۰-۱ و ۱۰-۴). سپس برای ارزیابی کارایی سویه‌های GV3301 و LBA4404 *آگروباکتریوم تومفاشینس* واجد پلاسمید بیانی ژن گزارشگر در بیان موقت در رقم بهمن و ژنوتیپ EC-82-6، هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم در هر دو ژنوتیپ جو سنجش شد. ارزیابی کیفی کارایی بیان موقت با سویه‌های آگروباکتریوم نشان‌دهنده قابلیت سویه GV3301 در محیط القا (جدول ۱) در بیان موقت ژن گزارشگر بود (شکل ۱۰) و مقایسه میان ارقام جو نیز نشان داد که ژنوتیپ EC-82-6 دارای پاسخ بهتری بوده است.



شکل ۱۰ - سنجش فعالیت گلوکورونیدازی در جوانه جو در تیمارهای مختلف. ۱) سویه GV3301 در محیط MS، ۲) سویه LBA4404 و ژنوتیپ EC-82-6، ۳) سویه LBA4404 و رقم بهمن، ۴) سویه GV3301 در محیط القا، ۵) سویه GV3301 و ژنوتیپ EC-82-6، ۶) سویه GV3301 و رقم بهمن.

Figure 10. β-Glucuronidase activity assay in barley buds under different treatments. 1) GV3301 strain in MS medium, 2) EC-82-6 genotype with LBA4404 strain, 3) Bahman cultivar with LBA4404 strain, 4) GV3301 strain in induction medium, 5) EC-82-6 genotype with GV3301 strain, 6) Bahman cultivar with GV3301 strain.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق در مورد بررسی اثر تیمارهای مختلف بر بیان موقت ژن گزارشگر در گیاه جو، استفاده از سویه GV3301 و محیط القا (جدول ۱) برای بیان موقت ژن توسط آگروباکتریوم در بخش هوایی جوانه گیاه جو در رقم بهمن و ژنوتیپ EC-82-6 پیشنهاد می‌شود. اگرچه ارزیابی سازه‌های ژنی برای بیان موقت در گیاه جو به‌طور معمول با بمباران ذره‌ای انجام شده است، اما نتایج این تحقیق نشان داد که ایجاد یک سیستم ارزان‌قیمت بیان موقت در جوانه‌های جو با استفاده از آگروباکتریوم امکان‌پذیر است، اگرچه ژنوتیپ گیاه جو نیز در این امر تاثیرگذار است.

References

Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P. A. and Voytas, D. F. 2014. DNA replicons for plant genome engineering. **The Plant Cell** 26: 151-163.

Bond, D. M., Albert, N. W., Lee, R. H., Gillard, G. B., Brown, C. M., Hellens, R. P. and Macknight, R. C. 2016. Infiltration-RNAseq: Transcriptome profiling of *Agrobacterium*-mediated infiltration of transcription factors to discover gene function and expression networks in plants. **Plant Methods** 12: 41.

Canto, T. 2016. Transient expression systems in plants: Potentialities and constraints. In: Vega, C. M. (Ed.). Advanced technologies for protein complex production and characterization. Springer, Cham. pp: 287-301.

Gao, C. and Nielsen, K. K. 2013. Comparison between *Agrobacterium*-mediated and direct gene transfer using the gene gun. In: Sudowe, S. and Reske-Kunz, A. B. (Eds.). Biolistic DNA Delivery. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 3-16.

Fischer, R. and Schillberg, S. 2004. Molecular farming: Plant-made pharmaceuticals and technical proteins. John Wiley and Sons.

Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., Gahrtz, M. and Kumlehn, J. 2007. Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. **Transgenic Plant Journal** 1: 104-117.

Hinchliffe, A. and Harwood, W. A. 2019. *Agrobacterium*-mediated transformation of barley immature embryos. In: Harwood, W. A. (Ed.). Barley. Humana Press, New York, NY. pp: 115-126.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter** 5: 387-405.

Lee, M. W. and Yang, Y. 2006. Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. In: Salinas, J. and Sanchez-Serrano, J. J. (Eds.). *Arabidopsis* protocols. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 225-229.

Mrízová, K., Holasková, E., Öz, M. T., Jiskrová, E., Frébort, I. and Galuszka, P. 2014. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. **Biotechnology Advances** 32: 137-157.

Mohammadhassan, R., Esfahani, K. and Kashefi, B. 2018. Constructional and functional evaluation of two new plant expression vectors - pBI121$^{gus\text{-}6}$ and pBI121^{5+1}. **Banat's Journal of Biotechnology** 9: 60-68.

Mortimer, C. L., Dugdale, B. and Dale, J. L. 2015. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: From transient to stable expression. **Current Opinion in Biotechnology** 32: 85-92.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.

Norkunas, K., Harding, R., Dale, J. and Dugdale, B. 2018. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Methods** 14: 71-85.

Rosenthal, S. H., Diamos, A. G. and Mason, H. S. 2018. An intronless form of the tobacco extensin gene terminator strongly enhances transient gene expression in plant leaves. **Plant Molecular Biology** 96: 429-443.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York.

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

Zamani, K. 2018. Transient gene expression in plants and its application in molecular farming and functional genomics. **Crop Biotechnology** 22: 65-79. (In Persian with English abstract).

www.SID.ir

Archive of SID
doi: 10.22124/c.2019.12934.1481

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 9, No. 1, Spring 2019 (71-81)

Optimization of transient expression by *Agrobacterium* (agroinfiltration) in leaves and buds of barley (*Hordeum vulgare* L.)

Kasra Esfahani[1*], Matin Adel[2] and Tahmineh Lohrasebi[3]

Received: January 14, 2019 Accepted: May 19, 2019

Abstract

Barley is one of the most important crops in the world and is also important in agricultural biotechnology as a recombinant protein production platform. In plants such as cereals, whose regeneration and transformation are difficult, in some cases transient gene expression is considered as a substitute for the stable method. *Agrobacterium*-based transient expression (agroinfiltration) is an inexpensive and quick way to study the function of genes and to evaluate the elements that affect gene expression (untranslated regions, introns, transcription factors and promoters). By using this method, it is possible to evaluate the function of gene constructs without time-consuming process of plant regeneration only within a few days. In order to optimize this method in barley, the effect of different treatments such as tissue type, plant age, leaves position, acetosyringone concentration, type of induction medium, time of assay after induction, *Agrobacterium* strain, OD of induction medium, type of procedure, duration and frequency of vacuum pump operation and barley genotype on transient expression of the *ß-glucuronidase* reporter gene in leaves were evaluated in this research. Also, the effect of type of induction medium, *Agrobacterium* strain and barley genotype on transient expression of the reporter gene in buds were evaluated. Transient gene expression of *ß-glucuronidase* were observed in all bud samples of Bahman cultivar and EC-82-6 genotype of barley which were inoculated with GV3301 strain harboring the reporter gene construct suspended in the induction medium with acetosyringone concentration of 200 uM by using insulin syringe. According to the results of this study, an effective and low-cost *Agrobacterium*-based transient expression system in barley is introduced.

Keywords: Gene transformation, Reporter gene, Transcription factors

1. Assist. Prof., Dept. of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology (IAB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2. Graduated M. Sc., Dept. of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology (IAB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3. Assist. Prof., Dept. of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology (IAB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
* Corresponding author: kasra13@nigeb.ac.ir

www.SID.ir