ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۷۸- ۶۷

تاثیر شوک حرارتی و تیمارهای هورمونی در انتقال ژن به ذرت (*Zea mays*) توسط اگروباکتریوم

The effects of heat shock and phytohormons on Agrobacterium mediated transformation of maize (*Zea mays* L.)

زهرا رضی[۱]، حسن رهنما*[۲]

۱و۲- کارشناس ارشد و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

Razi Z[1], Rahnama H*[2]

1,2. MSc Student and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

انتقال ژن با کارایی بالا به ذرت (*Zea mays* L.) با استفاده از یک ناقل دوگانه استاندارد کاربرد زیادی در مطالعات مهندسی ژنتیک و ژنومیکس کاربردی دارد. هدف از انجام این پژوهش افزایش میزان تراریختی ارقام ذرت با استفاده از تیمار شوک حرارتی و هورمون های گیاهی است. در این مطالعه جنین‌های نارس ذرت (۲ mm – ۱/۵) مربوط به ارقام B73 و Mo17 با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه AGL01 حاوی ناقل دوگانه pCAMBIA3301 آلوده شدند. جنین‌ها قبل از آلودگی تحت تیمار T_1 (۴۶°C) به مدت ۳ دقیقه، یک دقیقه در یخ، ۳۰ دقیقه سانتریفوژ $g \times$ ۲۰،۰۰۰ در ۴°C) و T_2 (بدون تیمارهای حرارتی و سانتریفوژ) قرار گرفتند. همچنین ترکیباتی مانند دی‌تیوتریتول (DTT) و پلورونیک اسید F68 (F68) به محیط هم کشتی اضافه شده و با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که استفاده از تیمارهای دمایی و سانتریفوژ، انتقال ژن به B73 را کمی بهبود بخشیده در حالی‌که در انتقال ژن *gus* به Mo17 هیچ تغییری ایجاد نمی‌کند. همچنین اضافه کردن DTT و یا F68 به محیط هم‌کشتی منجر به افزایش چشمگیر انتقال T-DNA به B73 شد، در عین حال در رقم Mo17 هیچ نتیجه امیدبخشی مبنی بر انتقال ژن مشاهده نشد. در رقم B73، بسته به نوع تیمار ۱۸-۵ درصد از جنین‌های نارس، کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین تولید کردند. آزمون هیستوشیمیایی بر روی کالوس‌های مقاوم بعد از ۸ هفته در محیط انتخابی و همچنین PCR که تاکیدی بر انتقال و بیان ژن گزارشگر *gus* بودند، فرکانس ۱۸ درصدی انتقال ژن در تیمارهای T_1 به همراه F68 را در مقابل فرکانس صفر درصدی انتقال ژن در کالوس‌های مقاوم از تیمارهای T_2 و بدون دترجنت نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل تیمار T_1 به همراه F68 برای انتقال ژن بواسطه اگروباکتریوم به رقم B73 ذرت پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

**اگروباکتریوم،
آنتی اکسیدان،
تراریختی،
ذرت،
*Gus***

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

افزایش تولیدات کشاورزی، یک هدف اساسی در تغذیه جمعیت رو به رشد دنیا به شمار می‌رود. از این‌رو ذرت به دلیل داشتن ارزش غذایی خاص و همچنین به عنوان یک گیاه تک لپه‌ای مدل برای مطالعات ژنتیکی، ژنومیکس و زیست‌شناسی مولکولی، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. پیشرفت‌های اخیر در مطالعات ژنوم ذرت، به کشف اطلاعات ژنتیکی جدید و با ارزشی منجر شده است (Dong et al. 2005). بنابراین بکارگیری رویکردهای بیوتکنولوژی در ذرت به منظور یکی کردن صفات مطلوب در چندین رقم آن، هدف نهایی تلاش‌های بی‌وقفه پژوهشگران در سراسر دنیا می‌باشد. در این میان، روش‌هایی که به انتقال DNA مرتبط هستند از توجه ویژه‌ای برخوردارند. از جمله می‌توان به روش بیولیستیک (Fromm et al. 1990; Gordon-Kamm et al. 1990)، و یا انتقال به واسطه اگروباکتریوم (Fram et al. 1996; Ishida et al. 2002; Huang and Wei 2005) اشاره نمود. مزیت‌های موجود در روش انتقال به واسطه اگروباکتریوم از جمله سادگی و پایین بودن هزینه تجهیزات مورد نیاز، و امکان انتقال قطعه‌های بزرگتر DNA به سلول گیرنده، موجب استفاده از آن برای گیاهان مختلف حتی تک لپه‌ای‌ها شده است (Slater et al. 2003). از طرف دیگر، موانع تحمیل شده توسط روش تراریختی و باززایی ضعیف بافت‌ها وسلول‌های کشت شده دو عامل محدود کننده اصلی ایجاد گیاه ذرت تراریخت به شمار می‌رود. با توجه به شرایط ذکر شده، تراریختی ذرت با واسطه اگروباکتریوم در چندین مطالعه با تمرکز بر روی عوامل مختلف تاثیرگذار در این روش نظیر ژنوتیپ گیاه، مراحل تکامل ریز نمونه، نوع و سویه گیاه، اجزای فنلی، دوره همکشتی، ناقل‌ها، pH، دما و همچنین اجزای محیط کشت انجام گرفته است (Amoah et al. 2001; Huang and Wei 2005 ; Frame et al. 2006). در این میان برخی روش‌های امیدبخش در بهبود روند انتقال ژن مبنی بر استفاده از ناقل‌های دوگانه قدرتمند (Ishida et al. 1996; Negrotto et al. 2000) و یا اضافه کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدان (Frame et al. 2002; Lupotto et al. 2004; Vega et al. 2008) ارایه شده است.

آنتی اکسیدان‌های مختلفی برای بهبود انتقال ژن در گیاهان سرسخت بکار گرفته شده‌اند. از جمله این ترکیبات می‌توان به ال- سیستئین[1] اشاره نمود که به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایجی مبنی بر افزایش روند انتقال ژن به دنبال داشته است. نشان داده شده که استفاده از ال- سیستئین در محیط کشت همکشتی فرکانس انتقال ژن را افزایش می‌دهد (Frame et al. 2006). همچنین گزارش شده است که دی تیو تریتول (DTT)[2] همراه با پلی وینیل پلی‌پیرولیدون (PVP) در انگور (*Vitis vinifera*) (Perl et al. 1996)، یا DTT در ترکیب با ال- سیستئین در سویا (Olhoft et al. 2001; Olhoft and Somers 2001; Paz et al. 2004) باعث افزایش انتقال DNA می‌شود. مطالعات انجام شده توسط Vega et al. (2008) بر روی لاین Hi-II ذرت نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین نمک در ترکیب با ال- سیستئین به تنهایی، و یا ال- سیستئین بعلاوه DTT باعث افزایش انتقال ژن به ذرت می‌شود.

استفاده از شوک دمایی هم یکی از روش‌های مرسوم در کشت بافت و تراریختی موجودات مختلف محسوب می‌شود. برای مثال، بیان تراژن در پروتوپلاست گیاه اطلسی که با روش پلی‌اتیلن گلیکول تراریخت شده بود، در اثر شوک حرارتی ۴۵ºC به مدت ۴۵ دقیقه، افزایش پیدا کرد (Zakai et al. 1993). بررسی‌های انجام شده توسط (Khanna et al. 2004) نشان داد که که تراریختی موز با استفاده از *A. tumefaciens* در اثر یک شوک حرارتی ۴۵°C به مدت ۵ دقیقه افزایش پیدا می‌کند. علاوه بر دما، استفاده از نیروی سانتریفوژ هم گاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Hiei and Komari 2006) نشان دادند که فرکانس تراریختی گیاهان ذرت و برنج بوسیله پیش‌تیمار جنین‌های نارس با شوک دمایی و همچنین سانتریفوژ بطور معنی‌داری بهبود پیدا می‌کند.

در بیشتر پروتکل‌های ارایه شده از رقم A188 ذرت و هیبرید Hi-II (A188×B73) استفاده شده که هر دو جزء ذرت‌های با القای بالای کالوس جنین‌زا (D'Halluin et al. 1992; O'Kennedy et al. 2001) طبقه‌بندی می‌شوند ولی در صنعت کشاورزی از ارزش بسیار پائینی برخوردار هستند. پس دستیابی به روشی مناسب با

[1] L- cycteine
[2] Dithiothreitol

Archive of SID
www.SID.ir

کارایی بالای انتقال ژن در ارقامی که از نظر کشاورزی ارزشمند هستند، از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این تحقیق، روشی کارا برای انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم تومفاسینس در رقم B73 ذرت پیشنهاد می‌شود. در اینجا نشان داده شده است که ترکیبی از ال- سیستئین در کنار آنتی اکسیدان پلورونیک اسید F68 (F68)[1] در محیط هم‌کشتی بعد از یک دوره حرارتی که قبل از تلقیح در ریزنمونه‌ها اعمال می‌شود، می‌تواند کارایی انتقال ژن را به میزان ۱۸ درصد افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و محیط کشت

ریزنمونه به کار رفته در این پژوهش جنین نارس ذرت از رقم‌های Mo17 و B73 بود که در طی تابستان ۱۳۸۸ در مزرعه موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر کرج کشت شد. ۱۲ الی ۱۷ روز پس از تلقیح، بلال‌ها برداشت شده و سپس در راستای طولی برش خورده و در الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و توین ۲۰ به میزان یک میلی‌لیتر در لیتر به مدت ۲۰ دقیقه همراه با شیکر ضدعفونی شده و سپس ۳ بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب استریل شستشو داده شدند (Frame et al. 2002). پس از ضدعفونی، بلال‌های دو نیم شده در یک پتری استریل قرار داده شده و جنین‌های نارس که چسبیده به دیواره جانبی بالایی پوسته دانه قرار دارد در اندازه‌های ۲-۱/۵ میلی‌متر با اسپاتول خارج گردیدند. بعد از جداسازی، جنین‌های نارس ذرت در مرحله بررسی باززایی و همچنین بررسی انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی باززایی جنین‌های نارس

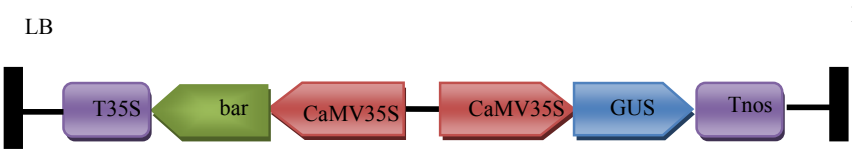
به منظور ارزیابی میزان باززایی دو لاین مورد بررسی، ابتدا جنین‌ها در محیط کشت N6 شامل نمک‌های N6، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2،4-D، ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال- پرولین، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر MES، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، pH8 و ۳ گرم در لیتر ژل‌رایت کشت شدند (Takavar et al. 2010). این محیط کشت در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. و سپس ویتامین‌های N6، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیستئین، و ۰/۸۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره بعد از فیلترکردن به آن هم اضافه شد.

از هر رقم حدود ۵۰ تا ۶۰ جنین در یک پتری دیش ۱۰۰ × ۱۵ میلی‌متر شیشه‌ای کشت شد. پتری دیش‌ها در تاریکی با دمای ۲۸±۱ درجه سانتی‌گراد با دور واکشت دو هفته‌ای نگهداری شدند. در هنگام واکشت جنین‌ها بسته به رشد بین پتری دیش‌های بیشتری تقسیم شدند. کشت‌ها پس از یک ماه با استریومیکروسکوپ ارزیابی شدند و فراوانی کال‌زایی و تولید کالوس‌های جنین‌زا اندازه‌گیری شد. در مواردی که هدف بررسی فراوانی باززایی بود، تعداد گیاهچه های بدست آمده شمارش شد.

به منظور باززایی، کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت باززایی اول منتقل شده و سپس در همان شرایط دمایی فوق در دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و در شدت نوری ۷۰۰۰ لوکس به مدت دو هفته قرار گرفتند. محیط کشت باززایی اول شامل نمک‌ها و ویتامین‌های MS (Murashige and Skoog 1962)، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۶۰ گرم در لیتر ساکارز، pH8 و ۳ گرم در لیتر ژل‌رایت بود. بعد از این مدت نمونه‌ها در شرایط نوری فوق، به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت باززایی دوم منتقل شدند. این محیط کشت مشابه محیط کشت باززایی اول بود با این تفاوت که میزان ساکارز آن به ۳۰ گرم در لیتر کاهش پیدا کرد. تا زمانی که طول ریشه‌ها به اندازه کافی (حدود ۱۰ سانتی‌متر) صورت گیرد گیاهچه‌های باززا شده در این محیط کشت نگهداری شدند. پس از آن گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک استریل (حاوی ۵۰ درصد خاک زراعی، ۲۵ درصد خاک برگ و ۲۵ درصد پرلیت) انتقال داده شدند. جهت ایجاد سازگاری گیاه در گلدان، کیسه‌ای نایلونی دارای چندین منفذ به روی گلدان کشیده شد و گیاه وارد اولین مراحل سازگاری به محیط طبیعی شد. به منظور تغذیه و آبیاری از محلول دو در هزار فوسامکو ۴ استفاده شد. پس از گذشت ۳ هفته که به تدریج به اندازه روزنه‌های پوشش نایلونی افزوده می‌شد، پوشش

[1] Pluronic F-68

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- ناحیه T-DNA ناقل دوگانه استاندارد pCAMBIA3301 مورد استفاده در تراریختی ذرت. LB و RB به ترتیب سرحد چپ و راست؛ T35S پایانبر 35S؛ *bar* ژن مقاومت به علف کش فسفینوتریسین؛ CaMV35S پیشبر ژن ویروس موزائیک گل کلم؛ GUS ژن گزارشگر *gus*؛ Tnos پایانبر *nos*.

سلوفانی برداشته شد. در مراحل بعدی گیاهان بـه گلـدان بزرگتـر منتقل شده و به شرایط نوری ۱۸ هزار لـوکس انتقـال داده شـدند (Takavar et al. 2010).

سویه اگروباکتریوم

در این مطالعـه از *Agrobacterium tumefaciens* سـویه *AGL01* حـاوی ناقـل دوگانـه pCAMBIA3301 کـه حـاوی پیشـبر *CaMV35S*، ژن بتاگلوکورونیـداز[1] (*gus*)، و ژن مقاومـت بـه فسفینوتریسین[2] (*bar*) بود، استفاده شد (شکل ۱).

روش انتقال ژن

آماده‌سازی اگروباکتریوم و تلقیح ریزنمونه ها با اگروباکتریوم

اگروباکتریوم به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین کشت شد. به منظور آماده‌سازی اگروباکتریوم جهت انتقال ژن، یک لوپ به اندازه ۳ میلی‌متر مربع از کشت باکتری سه روزه، به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع آلوده‌سازی (محیط A ، جدول ۱) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول یک مولار استوسرینگون در یک فالکون استریل ۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد و به صورت افقی در شیکر-انکوباتور با ۷۵ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۵-۴ ساعت، تا رسیدن به OD = ۰/۳–۰/۴ قرار داده شد (Frame et al. 2006).

برای انتقال ژن، جنین‌های نارس پس از استخراج در تیوپ حاوی محیط تلقیح تحت تیمارهای T_1 (۴۶°C) به مدت ۳ دقیقه، یک دقیقه در یخ، ۳۰ دقیقه سانتریفوژ $20,000\times g$ در ۴°C) و T_2 (بدون تیمارهای حرارتی و سانتریفوژ) قرار گرفته و بعد از دو بار شستشو با محیط تلقیح، سوسپانسیون اگروباکتریوم به جنین‌ها اضافه شد. جنین‌ها به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری (همراه با تکان‌های ملایم با دست) غوطه‌ور شده وسپس به مدت ۵ دقیقه در حالت سکون قرار داده شدند و در نهایت به محیط کشت هم‌کشتی انتقال داده یافتند (Frame et al. 2006).

محیط کشت هم کشتی

بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم، جنین‌های نارس پـس از خشک شدن به وسیله کاغذ خشک‌کن استریل به محیط کشـت B (جدول ۱) انتقال داده شدند. جنـین‌هـا در ایـن مرحلـه از ناحیـه محور جنینی روی محـیط کشـت قـرارداده شـدند در حـالی کـه اسکوتلوم به سمت بالا قرار داشت. به منظور جلوگیری از نکـروز شدن کالوس‌هـا، ۳۰۰ میلـی‌گـرم در لیتـر بـه محـیط کشـت ال-سیستئین اضافه شد. در این قسمت افزودن DTT بـه میـزان ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر و یا ۰/۰۲ درصد F68 به محیط هـم‌کشـتی و اثـر آنها بر روی انتقال ژن در مقابل تیمارهـای بـدون آنتـی‌اکسـیدان، مورد بررسی قرار گرفتند. ریزنمونـه‌هـا ۳ روز در ایـن محـیط در دمـای ۲۰°C در تـاریکی نگهـداری شـدند (Frame et al. 2002; Takavar et al. 2010).

جهت جلوگیری از رشد اگروباکتریوم در مراحـل بعـدی از آنتـی بیوتیـک‌هـای سفوتاکسـیم بـه میـزان ۲۵۰ میلـی‌گـرم در لیتـر یـا ونکومایسین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

محیط استراحت

پس از ۷۲ ساعت نگهداری ریزنمونه‌ها در دمای ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد و تاریکی، ریزنمونه‌های آلوده‌شده از محیط کشت هم-کشتی به محیط کشت استراحت (محیط C، جدول ۱) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی منتقل و به مدت ۸-۵ روز نگهداری شدند (Frame et al. 2006).

[1] β-glucuronidase
[2] Phocphinothericin

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت مورد استفاده در انتقال ژن

ترکیبات محیط	واحد در لیتر	مقدار و نوع محیط						
		A	B	C	D1	D2	E	F
نمک N6	g	۲	۲	۴	۴	۴	-	-
نمکMS	g	-	-	-	-	-	۴/۳	۲/۹
ساکارز	g	۶۸/۵	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۶۰	۳۰
گلوکز	g	۳۶	-	-	-	-	-	-
ال- پرولین	g	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	-	-
MES	g	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	-	-
2-4-D	mg	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	-	-
pH		۵/۲	۵/۸	۵/۸	۵/۸	۵/۸	۵/۶	۵/۶
ژلرایت	g	-	۳	۳	۳	۳	۳	۳
X۱۰۰۰ ویتامین های N6	ml	۱	۱	۱	۱	۱	-	-
X۱۰۰۰ ویتامین های MS	ml	-	-	-	-	-	۱	۱
گلایسین	mg	-	-	-	-	-	۲	۲
نیترات نقره	mg	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸۵	-	-	-	-
ال- سیستئین	g	-	۰/۴	-	-	-	-	-
استوسرینگون	µM	-	۱۰۰	-	-	-	-	-
سفاتوکسیم	g	-	-	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	-
فسفینوتریسین	mg	-	-	-	۲/۵	۵	۵	-

محیط کشت انتخابی

برای تأمین محیط کشتی جهت رشد کالوس‌های حامل ژن انتقالی و عدم رشد کالوس‌های فاقد ژن انتقالی، از ماده علف‌کش فسفینوتریسین (PPT) استفاده شد. اساس محیط کشت انتخابی همان محیط کشت استراحت بود با این تفاوت که علف‌کش فسفینوتریسین به آن اضافه گردید. در محیط کشت انتخابی، فسفینوتریسین پس از اتوکلاو، زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، اضافه شد. کالوس‌هایی که حامل ژن انتقالی بودند، در این محیط کشت امکان رشد پیدا کردند. در مقابل، رشد کالوس‌های فاقد ژن انتقالی به دلیل عدم تحمل محیط کشت انتخابی امکان‌پذیر نبود و این کالوس‌ها نکروز شدند. محیط‌های کشت انتخابی اول D_1، دوم D_2 (جدول ۱) به ترتیب حاوی ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم درلیتر از ماده فسفینوتریسین بودند ریز نمونه‌ها در هر یک از محیط‌های کشت انتخابی به مدت دو هفته نگهداری شد. سپس به محیط کشت انتخابی با غلظت بالاتر فسفینوتریسین جهت غربالگری دقیق‌تر برده شد. ریز نمونه‌ها در محیط‌های کشت انتخابی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی، نگهداری شده و هر دو هفته یکبار در محیط کشت انتخابی دوم واکشت شدند (Frame et al. 2002).

آزمون *gus* به منظور ارزیابی بیان بتاگلوکورونیداز (*gus*)

ژن باکتریایی *gus* که آنزیم بتاگلوکورونیداز (*gus*) را کد می‌کند، قادر به شکستن گلوکورونید و ایجاد واکنش رنگی در pH قلیایی است. آزمایش هیستوشیمیایی با استفاده از X-Gluc امکان سنجش بیان ژن را به طور اختصاصی در سلول و بافت گیاهی فراهم می‌آورد. آزمون هیستوشیمیایی در آزمایش‌های مربوط به بهینه‌سازی انتقال ژن به ذرت بر روی کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین بعد از ۸ هفته در محیط کشت انتخابی صورت گرفت. قطعه‌ای از بافت کالوس درون تیوپ حاوی بافر X-Gluc غوطه‌ور گشته و در دمای ۳۷°C نگهداری شد. در صورت انتقال ژن، بیان آنزیم بتاگلوکورونیداز در بافت، بعد از ۲ تا ۳۶ ساعت نمونه بافتی آبی رنگ می‌شود (Jefferson 1987).

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی مولکولی کالوس‌های تراریخته

پس از انتخاب اولیه در محیط انتخابی حاوی PPT و انجام آزمون GUS، کالوس‌های حاصل برای اطمینان از انتقال ژن، مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. جهت انجام این کار پس از استخراج DNA از کالوس‌های تراریخت احتمالی واکنش PCR انجام شد.

استخراج DNA ژنومی از کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین بعد از ۸ هفته در محیط کشت انتخابی با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا صورت گرفت (Dellaporta et al. 1983). بدین منظور ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کالوس در هاون کوچک با استفاده از ازت مایع منجمد پودر شد. این پودر سپس به یک به تیوپ ۱/۵ میلی-لیتری منتقل گردید. به پودر حاصل ۷۵۰ میکرولیتر بافر EB و ۰/۵ میکرولیتر مرکاپتواتانل اضافه شده، پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به مخلوط افزوده، کمی ورتکس کرده به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیده و مایع بالایی به یک تیوپ ۱/۵ میلی‌متری منتقل شد. هم حجم مایع روشناور ایزوپروپانول به آن افزوده، ۱۰ دقیقه در ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، محلول رونشین خالی شده و رسوب سپس با اتانل ۸۰ درصد شستشو داده شد، پس از تخلیه اتانل، رسوب در دمای اتاق خشک شده، در ۲۵-۵ میکرولیتر محلول TE یا آب مقطر دوبار استریل شده حل شد.

برای اثبات تراریختی کالوس و حضور ژن‌های *gus* و *bar* علاوه بر سنجش هیستوشیمیایی (برای ژن *gus*) از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها نیز استفاده شد. اجزا، مقادیر و شرایط برای انجام PCR به شرح زیر بود:

جهت انجام PCR یک محلول مادری بر اساس حجم هر واکنش و تعداد واکنش‌های مورد نیاز مطابق زیر تهیه گردید: به ازای یک حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری، $MgCl_2$, 10x (۰/۷ میکرولیتر)، 10x PCR Buffer (۲/۵ میکرولیتر)، dNTP (۰/۵ میکرولیتر)، Taq DNA Polymerase (۰/۲ میکرولیتر)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و رو به عقب (آغازگر F-Gus: 5′-ggtgggaaagcgagacga-3′ و R-Gus: 5′-acctaaggccgtatcaat-3′ برای ژن *gus* و F-Bar: 5′-ctcgagtcaaatctcggtgacggg-3′ و R-Bar: 5′-cgagtctaccatgagcccagaacg-3′ برای ژن *bar*)، و یک میکرولیتر از DNA الگو، که در نهایت با ۱۸/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید.

شرایط انجام PCR برای ژن های *gus* و *bar* بصورت ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ چرخه در ۹۵°C به مدت یک دقیقه، ۶۱°C به مدت یک دقیقه، ۷۲°C به مدت یک دقیقه (برای ژن *bar* به مدت ۱/۵ دقیقه) ادامه یافته و در نهایت در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. براساس آغازگرهای اختصاصی طراحی شده نتیجه PCR قطعاتی به اندازه ۴۸۰ bp برای ژن *gus* و ۵۲۰ bp برای ژن *bar* را تکثیر کرد.

نتایج و بحث

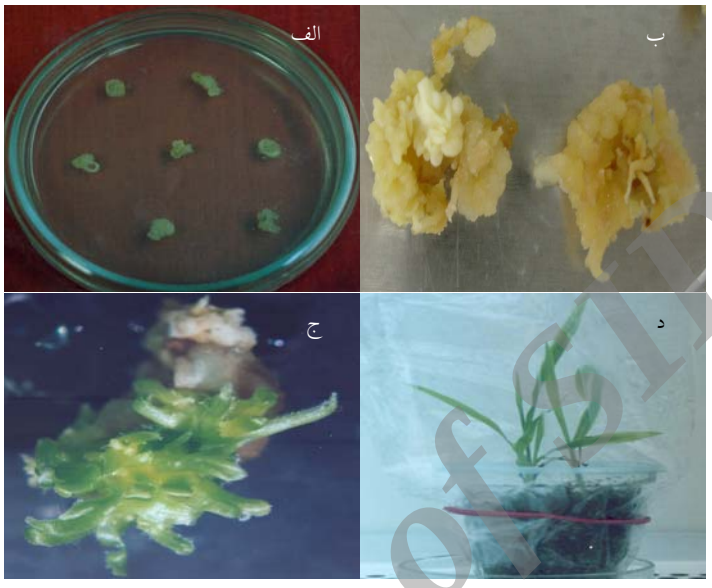
اولین گام در موفقیت انتقال ژن به گیاه داشتن یک روش باززایی بهینه برای آن می‌باشد. طبق گزارش‌های موجود بهترین ریزنمونه برای کشت بافت گیاه ذرت جنین نارس است (Lu et al. 1982; Quan et al. 2004; Oneto et al. 2010). در مطالعه حاضر جنین-زایی و باززایی دو لاین مهم تجاری ذرت (B73 و Mo17) و انتخاب لاین مناسب برای مطالعات انتقال ژن مورد بررسی قرار گرفت. هر دو لاین مورد بررسی توانستند در عرض ۵ تا ۶ روز در محیط کشت القای کالوس تولید کالوس‌های اولیه نرم و زرد رنگی نمایند (شکل ۲). فرکانس القای کالوس در لاین‌های B73 برابر ۶۴ درصد و در لاین Mo17 معادل ۶۸ درصد بود (جدول ۲). بعد از حدود ۹ تا ۱۰ هفته میزان کالوس‌های جنین‌زا در لاین B73 برابر ۱۵درصد و در لاین Mo17 معادل ۱۱ درصد بود. با این وجود، میزان باززایی در لاین B73 حدود دو درصد بود در حالی که هیچ نمونه باززا شده‌ای برای لاین Mo17 در روش مورد استفاده، بدست نیامد.

در مطالعه حاضر از هورمون 2,4-D به عنوان تنظیم کننده رشد جهت کالوس‌زایی و باززایی استفاده شد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش بسیار مهمی در تشکیل کالوس دارند و تاثیر آنها بر باززایی گیاهان در کشت کالوس ذرت مورد بررسی قرار گرفته

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- القای کالوس، تشکیل کالوس‌های جنین‌زا و فرکانس باززایی گیاهان در دو لاین B73 و Mo17 ذرت

لاین	درصد کالوس‌های القا شده	درصد کالوس‌های جنین زا	درصد باززایی
B73	۶۴	۱۵	۲
Mo17	۶۸	۱۱	۰



شکل ۲- مراحل کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی از جنین نارس ذرت. الف) تشکیل کالوس اولیه از جنین نارس ذرت؛ ب) تشکیل کالوس‌های جنین‌زا؛ ج) شروع باززایی از کالوس‌های جنین‌زا؛ د) انتقال گیاهچه‌ها به گلدان دارای پوشش نایلونی.

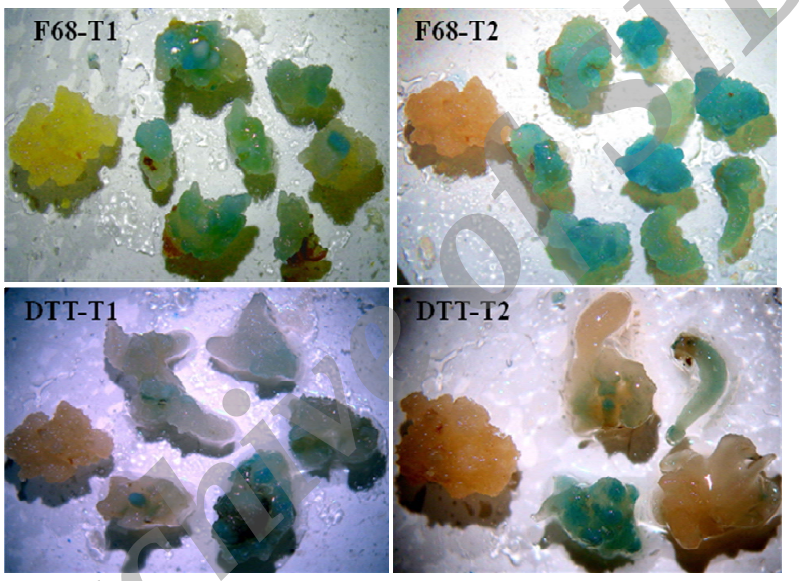
است (Bhaskaran and Smith 1990). معمولا دامنه غلظت ۱۳/۶-۴/۵ میکرومولار برای تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در کشت بافت غلات مناسب است. طبق گزارش‌های قبلی اکسین 2،4-D یک عامل تعیین‌کننده برای القای کالوس در جنین‌های نارس ذرت می‌باشد (Armstrong and Green 1985; Bohorova et al. 1999). در مطالعه حاضر غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر اکسین 2،4-D به عنوان مقدار ثابت در محیط‌های کشت انتخاب شد. نشان داده شده است که نیترات نقره از طریق رقابت در ایجاد پیوند با جایگاه اتصال اتیلن از عمل آن جلوگیری می‌کند (Ezura et al. 2000) و بنابراین باعث تحریک تشکیل جنین‌های نوع II و افزایش باززایی می‌شود (Songstad et al. 1991; Caryalho et al. 1997). اثرات مثبت نیترات نقره روی ژنوتیپ‌های مختلف ذرت (Vain and Dunl 1989) و گندم (Fernandez et al. 1999) گزارش شده است. بررسی‌های انجام شده بر روی جنین های رسیده هم نشان داده که نیترات نقره نقش محرکی در القای جنین‌های سوماتیکی دارد. به همین دلیل در مطالعه اخیر از غلظت ۰/۸۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره استفاده شد.

همانگونه که قبلا ذکر شد نقش محرک آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ال- سیستئین و DTT در گیاهانی مانند انگور و سویا به اثبات رسیده است (Per et al. 1996; Olhoft et al. 2001; Olhoft and Somers 2001; Paz et al. 2004; Frame et al. 2006). به‌علاوه (Vega et al. 2008) نشان دادند که استفاده از غلظت‌های پایین نمک در ترکیب با ال- سیستئین به تنهایی، و یا ال- سیستئین بعلاوه DTT باعث افزایش انتقال ژن به لاین Hi-II ذرت می‌شود. با توجه به اینکه یکی از موانع احتمالی در تراریختی ذرت بواسطه اگروباکتریوم مربوط به مرحله بازیابی سلول‌های دریافت کننده T-DNA می‌باشد، احتمالا ال- سیستئین می‌تواند در محیط هم‌کشتی به کاهش مرگ سلولی که باعث پاسخ بسیار حساس سلول‌های

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- نتایج حاصل از تیمارهای مختلف استفاده شده در انتقال ژن به رقم Mo17.

فرکانس انتقال (٪)	تعداد کالوس-های آبی شده	تعداد کالوس‌های آزمون شده	تعداد کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین	تعداد ریزنمونه تلقیح شده	تیمار		ژنوتیپ
					آنتی اکسیدان	دما و سانتریفوژ	
	۰	۱۰	۱۹	۱۰۰	F68	T۱	MO17
	۰	۱۰	۲۹	۱۰۰	DTT		
	۰	۱۰	۱۴	۱۰۰	_		
۰	۰	۱۰	۹	۱۰۰	F68	T۲	
	۰	۱۰	۲۹	۱۰۰	DTT		
	۰	۱۰	۱۱	۱۰۰	_		



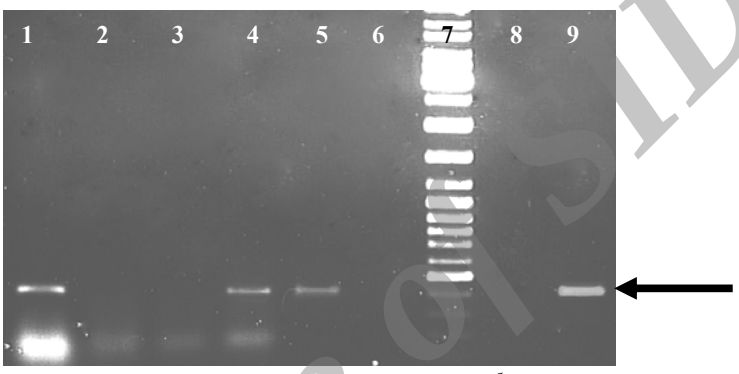
شکل۳- آزمون هیستوشیمیایی کالوس‌های مقاوم به علف‌کش فسفینوتریسین بعد از هشت هفته در محیط کشت انتخابی

اسکوتلوم ذرت تلقیح شده با اگروباکتریوم می‌شود، کمک کرده که این امر منجر به حیات پس از تلقیح سلول‌های مستعد جنین‌زا و بنابراین افزایش فرکانس تراریختی می‌شود. به همین دلیل در پژوهش حاضر استفاده از تیمارهای دما و سانتریفوژ به همراه بکارگیری ال- سیستئین به تنهایی، ال- سیستئین + DTT و ال- سیستئین + F68 در محیط هم‌کشتی مورد مقایسه قرار گرفت. ارزیابی اولیه با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS بر روی کالوس‌های هشت هفته‌ای رشد کرده در محیط انتخابی حاوی PPT نشان داد که استفاده از تیمارهای دمایی و سانتریفوژ، انتقال ژن به B73 را بهبود بخشیده در حالی‌که در Mo17 تغییر چشمگیری ایجاد نمی‌کند (شکل۳ ، جداول ۲ و ۳). همچنین اضافه کردن DTT و F68 به محیط هم‌کشتی باعث افزایش انتقال T-DNA شد. بسته به نوع تیمار، بین ۱۸- صفر درصد از جنین‌های نارس کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین تولید کردند. بهترین نتیجه (۱۸ درصد) مربوط به تیمارهای T۱ به همراه F68 بود، در صورتی‌که هیچ‌یک از جنین‌های نارس در محیط انتخابی در تیمارهای T۲ و بدون دترجنت کالوس‌های مقاوم تولید نکردند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳ – نتایج حاصل از تیمارهای مختلف استفاده شده در انتقال ژن به رقم B73.

ژنوتیپ	دما و سانتریفوژ	تیمار	آنتی اکسیدان	تعداد ریزنمونه تلقیح شده	تعداد کالوس‌های مقاوم به فسفینوتریسین	تعداد کالوس-های آزمون	تعداد کالوس-های آبی شده	فرکانس انتقال (٪)
B73	T۱		F68	۱۰۰	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
			DTT	۱۰۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
			_	۱۰۰	۶	۶	۶	۱
	T۲		F68	۱۰۰	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
			DTT	۱۰۰	۹	۹	۹	۹
			_	۱۰۰	۸	۸	۰	۰



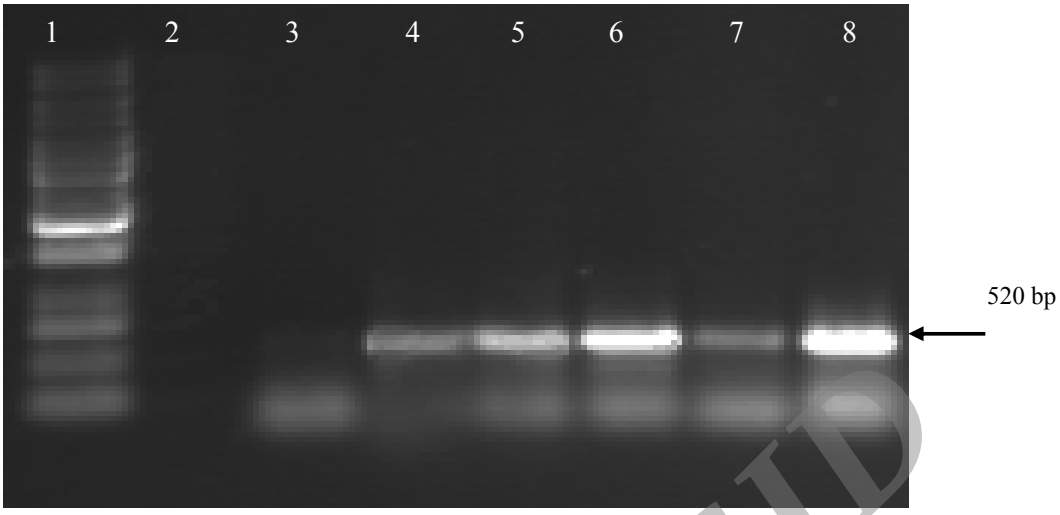
شکل ۴– آزمون PCR برای ژن *gus* در کالوس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک فسفینوتریسین بعد از هشت هفته در محیط انتخابی. ۱، ۴ و ۵) کالوس‌های تراریخت احتمالی؛ ۲، ۳ و ۶) کالوس‌های غیرتراریخت؛ ۷) نشانگر وزن مولکولی (1 kb ladder)؛ ۸) کنترل منفی؛ ۹) کنترل مثبت (آب).

برای اثبات تراریختی و حضور ژن *gus* در کالوس‌های هشت هفته‌ای رشد کرده در محیط انتخابی، علاوه بر سنجش هیستوشیمیایی، از روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* هم استفاده شد. آغازگرهای طراحی‌شده برای ژن *gus* طبق پیش‌بینی، قطعه‌ای به اندازه ۴۸۰ جفت‌باز را تکثیر کردند که در نمونه‌های تراریخت و شاهد مثبت پلاسمیدی وجود داشت، اما شاهدهای منفی (نمونه غیرتراریخت و آب) فاقد نوار در این محل بودند (شکل۱۴–۵). نتایج حاصل نشان داد که در تمامی کالوس‌هایی که در آزمون هیستوشیمیایی رنگ آبی تولید کرده بودند، آزمون PCR هم مثبت بود.

با توجه به حضور ژن *bar* به عنوان نشانگر انتخابی در انتخاب کالوس‌های تراریخت احتمالی، با استفاده از روش PCR و بهره-گیری از آغازگرهای اختصاصی ژن *bar*، حضور این ژن در کالوس‌های رشد کرده در محیط کشت انتخابی مورد بررسی قرار گرفت. پس از الکتروفورز نمونه‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد قطعه‌ای به طول ۵۲۰bp درنمونه‌های تراریخت و شاهد مثبت وجود داشت، اما شاهدهای منفی (نمونه گیاهی غیرتراریخت و آب) فاقد نوار در این محل بودند (شکل۵). نتایج حاصل از آزمون PCR برای ژن *bar* با نتایج حاصل از آزمون هیسوشیمیایی و PCR برای ژن *gus* مطابقت داشت.

نقش محرک شوک دمایی در انتقال ژن به گیاهانی مانند اطلسی و موز گزارش شده است (Zakai et al. 1993 ; Khanna et al. 2004). همچنین (Hiei and Komari 2006) نشان دادند که پیش-تیمار جنین‌های نارس ذرت و برنج با شوک دمایی و همچنین سانتریفوژ بطور میزان تراریختی این گیاهان را معنی‌داری افزایش می‌دهد (Hiei and Komari 2006). هرچند مکانیسم این کار چندان مشخص نیست ولی بنظر می‌رسد روش عملکرد شوک

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵- آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* برای کالوس‌های تراریخت احتمالی. ۱) نشانگر وزن مولکولی (1 kb ladder)؛ ۲) کنترل منفی (آب)؛ ۳) کالوس غیرتراریخت؛ ۴، ۵، ۶، ۷) کالوس های تراریخت احتمالی؛ ۸) کنترل مثبت نشانگر.

دمای بر حسب گونه گیاهی و نوع مواد استفاده شده، متفاوت باشد. خانا و همکاران گزارش دادند که سانتریفوژ همزمان سلول-های موز و *A. tumefaciens* حدود چهار برابر میزان تراریختی را افزایش می‌دهد (Khanna et al. 2004). آنها مشاهده کردند که میزان اتصال باکتری‌ها به سلول‌ها گیاهی پس از مرحله سانتریفوژ بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. برخلاف نظر آنها، هایی و همکاران بیان کردند میزان اتصال باکتری‌ها به سلول‌های گیاهی در اثر سانتریفوژ تغییری نمی‌کند بلکه به عقیده آنها احتمالاً سانتریفوژ مانع تمایز و نمو اندام‌ها می‌شود و از طرف دیگر باعث تحریک تمایززدایی سلول‌های گیاهی می‌گردد و به این وسیله سلول‌های گیاهی را مستعد تراریختی می‌نماید (Hiei and Komari 2006). از آنجایی که تیمار کالوس‌ها و یا سوسپانسیون سلولی گیاهی (که قبلا تمایز زدایی شده‌اند) با سانتریفوژ تاثیری بر سلول‌ها ندارد، شاید دلیلی بر تائید این فرضیه باشد. با این وجود مکانیسم عمل چندان مشخص نیست.

در مطالعه اخیر تلاش شد تلفیقی از تیمارهای حرارتی، سانتریفوژ و استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدان برای بررسی تاثیر آنها بر تراریختی استفاده شود. در تیمارهای شوک حرارتی و سانتریفوژ (بدون DTT و F68) انتقال ژن بسیار پایین و بدون اعمال حرارت، فرکانس انتقال صفر مشاهده گردید. در حالی‌که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش فرکانس انتقال را نشان داد. بر این اساس، انتقال ژن توسط ناقل دوگانه استاندارد در شرایطی که در محیط هم‌کشتی تنها از ال-سیستئین استفاده شود نتیجه‌ای در بر نداشته، ولی تاثیر استفاده از DTT و F68 همراه با تیمارهای حرارتی و سانتریفوژ انتقال ژن به B73 را بهبود بخشید. با این وجود، در رقم Mo17 هیچ نتیجه امیدبخشی مبنی بر انتقال ژن مشاهده نشد. پس این احتمال وجود دارد که ترکیبی از ال- سیستئین در کنار آنتی‌اکسیدان بعد از یک تیمار حرارتی و سانتریفوژ، می‌تواند به قدرت سلول‌های جنین‌های نارس برای آلودگی مرتبط باشد. ترکیبی از F68 و ال- سیستئین سلول‌های رقم B73 را بهتر مستعد پذیرش DNA خارجی و آلودگی می‌کند، ترکیبی که توان ایجاد این تغییر را در رقم MO17 ندارد. به هر حال هنوز نقش بالقوه DTT و F68 در بهبود انتقال ژن به بعضی ارقام ذرت نامعلوم باقی مانده است. ولی نتایج این تحقیق برای انتقال ژن‌های سودمند به رقم B73 و همچنین مطالعات مهم مهندسی ذرت از جمله بررسی ژنوم و همچنین ساختار سلولی ارقام مختلف ذرت بسیار سودمند می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uid*A in wheat inflorescence tissue. J Exp Bot 52: 1135-1142.

Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164: 207-214.

Bhaskaran S, Smith RA (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review Crop Sci 30: 1328-1336.

Bohorova NE, Zhang W, Julstrum P, McLean S, Luna B, Briton RM, Diaz L, Ramos ME, Estanol P, Pacheco M, Salgado M, Hoistington DA (1999) Production of transgenic tropical maize with *cry*lAb and *cry*lAc genes via microprojectile bombardment of immature embryos Theo App Gen 99: 437- 444.

Caryalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Rep. 17: 73-76.

D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, Beuckeleer MD, Leemans J (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. Plant Cell 4: 1495-1505.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version 2. Plant Mol Biol Rep 1: 19-22.

Dong Q, Lawrence CJ, Schlueter SD, Wilkerson MD, Kurtz S, Lushbough C, Brendel V (2005) Comparative plant genomics resources at Plant GDB. Plant Physiol 139: 610-618.

Ezura H, Yuhashi KI, Yasuta T, Minamisawa K (2000) Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. Plant Breed 119: 75-79.

Fernandez S, Michaux-Ferriere N, Coumans M (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf): histology and improvement by $AgNO_3$. Plant Growth Regulation 28: 147-155.

Frame BR, McMurray JM, Fonger TM, Main ML, Taylor KW, Torney FJ, Paz MM, Wang K (2006) Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts Plant Cell Rep 25: 1024-1034.

Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiol 129: 13-22.

Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Biotechnol 8: 833-839.

Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Strat WG, O'Brian JV, Chambers SA, Adams JWR, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger W, Kausch AP, Lemaux PG (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2: 603-618.

Hiei Y, Komari T (2006) Improved protocols for transformation of Indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue and Org Cult 85:271-283.

Huang XQ, Wei ZM (2005) High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep 22: 793-800.

Ishida Y, Saito H, Ohta SH, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* Nat Biotech 14: 745-750.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep 5: 387-405.

Khanna H, Becker D, Kleidon J, Dale J (2004) Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). Mol Breed 14: 239-252.

Lu C, Vasil IK, Ozias-Akins P (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays*. Theor Appl Genet 62: 109-112.

Lupotto E, Conti E, Reali A, Lanzanova C, Baldoni E, Allegri L (2004) Improving *in vitro* culture and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. Maydica 49: 21-29.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473- 497.

Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Rep 19: 798-803.

O'Kennedy MM, Burger JT, Berger DK (2001) Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and detailed analysis of a low-copy integration. Plant Cell Rep 20: 721-730.

Olhoft P, Lin K, Galbraith J, Nielsen N, Somers D (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 731-737.

Olhoft P, Somers D (2001) L-cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711.

Oneto CD, Bossio E, Gonzalez G, Faccio P, Lewi D (2010) High and low pressure gene gun devices give similar transformation efficiencies in maize calluses. African J Plant Sci 4: 217-225.

Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacteriu*m-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. Euphytica 136:167-179.

Archive of SID

www.SID.ir

Perl A, Lotan O, Abu-Abied A, Holland D (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape–*Agrobacterium* interactions. Nat Biotechnol 14: 624-628.

Quan R, Shang M, Zhang H, Zhao Y, Zhang J (2004) Improvement chilling tolerance by transformation with beta gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in Maize. Plant Sci 166: 141-149.

Slater A, Scott NW, Foweler MR (2003) Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants. Oxford University Press pp: 35-79.

Songstad DD, Armstrong CL, Petersen WL (1991) $AgNo_3$ increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Rep 9: 699-702.

Takavar S, Rahnama H, Rahimian H, Kazemitabar K (2010) *Agrobacterium* Mediated Transformation of Maize (*Zea mays* L.) J Sci 21: 21-29.

Vain P, Dunl V (1989) Enhancement of Production and Regeneration of Embryogenic Type II Callus in *Zea mays* L. by $AgNO_3$. Plant Cell Tissue and Org Cult 18: 143-151.

Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ (2008) Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. Plant Cell Rep 27: 297-305.

Zakai N, Ballas N, Hershkovitz M, Broido S, Ram R, Loyter A (1993) Transient gene expression of foreign genes in preheated protoplasts: stimulation of expression of transfected genes lacking heat shock elements. Plant Mol Biol 21: 823-834.

Archive of SID

www.SID.ir