

انتقال ژن *codA* به عدس (*Lens culinaris M.*) و تولید گیاهان تراریخته T1فاطمه ذاکر تولایی^{۱*}، بهزاد قره‌یاضی^۲، عبدالرضا باقری^۳ و کایران کمار شارما^۴

۱- استادیار مجتمع آموزش عالی شیروان

۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ghareyazie@yahoo.com

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و عضو هیئت علمی گروه بقولات پژوهشکده علوم گیاهی

دانشگاه فردوسی مشهد، abagheri@um.ac.ir

۴- دانشیار انستیتو تحقیقات بین‌المللی محصولات نیمه‌گرمسیری (ICRISAT)، k.sharma@cgiar.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸

چکیده

عدس از جمله حبوبات مهم در ایران است که با توجه به وقوع تنش‌های مختلف در مناطق موردکشت، اصلاح آن جهت افزایش تحمل به تنش‌های محیطی و از جمله تنش‌های غیرزیستی نظیر سرما و یخ‌زدگی اهمیت زیادی دارد. این پژوهش با هدف انتقال ژن *codA* به عدس، به‌منظور افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما انجام شد. اثر مثبت انتقال این ژن، افزایش تحمل به تنش سرما، قبلاً در برخی از گیاهان دیگر نظیر آرابیدوپسیس و برنج گزارش شده است. در مطالعات قبلی نگارنده، بهینه‌سازی، بازرایی و انتقال ژن به عدس انجام گرفته است. در این مطالعه با استفاده از یافته‌های دو مطالعه‌ی قبلی، ژن *codA* با هدف افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی، به‌ویژه سرما، به عدس منتقل شد. حضور ژن *codA* در گیاهان تراریخته T0 با استفاده از PCR و همچنین تلفیق ژن در ژنوم نیز با استفاده از دات‌بلاتینگ و سادرن‌بلاتینگ تأیید شد. رونویسی از ژن نیز با کمک تکنیک RT-PCR تأیید گردید. پس از حصول گیاهان T1، تراریخته‌بودن آن‌ها نیز با استفاده از PCR و RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: بازرایی، تراریخته، ژن *codA* عدس (*Lens culinaris M.*)

مقدمه

مرحله زایشی و باردهی، بارندگی به اتمام رسیده، و علاوه بر آن به دلیل پراکنش نامناسب بارندگی و در نتیجه تخلیه رطوبت خاک، گیاه در حساس‌ترین مرحله زندگی خود با تنش خشکی مواجه شده و لذا عملکرد آن به شدت کاهش می‌یابد. در صورت دراختیارداشتن ارقام مقاوم به سرما و یخ‌زدگی، کشت پاییزه- زمستانه عدس می‌تواند گزینه مناسبی برای برون‌رفت از این مشکل باشد. در این نوع کشت، سبزشدن گیاه قبل از وقوع سرماهای زمستانه صورت گرفته و سپس گیاه به‌صورت رزت در پاییز و زمستان از بارندگی استفاده کرده و در بهار رشدرویشی خود را ادامه می‌دهد. در این صورت گیاه سریع‌تر به مرحله زایشی رسیده و مشابه با کشت بهاره با تنش خشکی مواجه نخواهد شد.

تاکنون گزارش‌های اندکی در مورد تراریزش عدس در دسترس می‌باشد (Bagheri et al., 2012). توانایی تولید تومور توسط چهار نژاد آگروباکتریوم در نوک ساقه و ریشه عدس تحت شرایط مزرعه نخستین بار توسط Warkentin و Maqahagen در سال‌های ۹۱ تا ۹۳ گزارش گردید.

به‌طور کلی حبوبات دومین گروه مهم محصولات زراعی پس از غلات به‌شمار می‌روند. عدس با میزان ۲۷/۵ تا ۳۱/۷ درصد پروتئین به‌عنوان منبع غنی از پروتئین محسوب می‌شود. همچنین دارای مقادیر قابل توجهی اسید فولیک، آهن، کلسیم، فسفر، پتاسیم، ویتامین A و ویتامین‌های گروه B می‌باشد. کشورهای عمده تولیدکننده عدس به ترتیب هند، استرالیا، کانادا و ترکیه می‌باشند که در مجموع بیش از ۷۳ درصد عدس دنیا را تولید می‌کنند (Bohra et al., 2014). به‌گزارش آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۹۲ سطح زیرکشت کل حبوبات در ایران ۷۷۰ هزار هکتار بوده است که ۲۰/۲ درصد از آن به عدس اختصاص داشته است (Agriculture Statistics Letter, 2013). در ایران عمده مناطق عدس‌کاری در نواحی کوهستانی و مرتفع با زمستان‌های سخت واقع شده است که با توجه به حساسیت ارقام موجود به سرما و یخبندان، کشت پاییزه آن مقدور نبوده و لذا کشت آن غالباً در بهار و به‌صورت دیم انجام می‌شود. در این مناطق، قبل از رسیدن گیاه به

*نویسنده مسئول: f.zaker.t@um.ac.ir، تلفن همراه: ۰۹۱۵۵۰۸۷۶۹۱

در گیاهان تراریخته کفایت می‌کند. *Deshnium et al.* (1995) ژن *codA* را تحت کنترل یک پروموتور دائمی به ژنوم سیانوباکتری منتقل کردند. *Alia et al.* (1998) نشان دادند که بیشترین اثرات تراریزش با این ژن تغییر در تحمل به تنش شوری است. آرابیدوپیس‌های تراریخته با استفاده از ژن *codA* در طی جوانه‌زنی بذرها و رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌ها و گیاهان بالغ نسبت به تنش شوری بالا و همچنین به تنش دماهای خیلی زیاد و خیلی کم متحمل شده بودند. همچنین تحمل آن‌ها در مقابل یخ‌زدگی در دمای پایین در طی خیساندن و جوانه‌زنی بذرها افزایش یافت (*Alia et al.*, 1998a). *Sakamoto et al.* (2000) گیاه برنج را با استفاده از دو نسخه از ژن کولین‌اکسیداز که یکی از آن‌ها موسوم به pChlCOD دارای یک توالی رهبر برای انتقال محصول ژن به کلروپلاست بود و منجر به تجمع گلایسین‌بتائین در کلروپلاست می‌شد و دیگری با نام pCytCOD که گلایسین‌بتائین را در سایتوزول جمع می‌داد، تراریخته نمودند. بررسی‌های آن‌ها نشان داد که معرفی ژن *codA* به گیاه برنج منجر به تولید گلایسین‌بتائین توسط گیاه تراریخته شد. نتایج آن‌ها نشان داد که هرچند تنش شوری مانع رشد هر دو گیاه برنج تراریخته و نوع وحشی شد، اما هر دو گیاه تراریخته شده با پلاسמידهای pChlCOD و pCytCOD بعد از رهاشدن از شرایط تنش شوری رشد خود را سریع‌تر از گیاهان غیرتراریخته از سرگرفتند. *Sakamoto et al.* (2000) ژن *codA* را به آرابیدوپیس منتقل کردند. گیاهان تراریخته قادر به تجمع گلایسین‌بتائین در کلروپلاست‌ها بوده و تحمل به یخ‌زدگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. آن‌ها اعلام کردند که مهندسی بیوسنتز گلایسین‌بتائین به‌وسیله تراریزش با ژن *codA* ممکن است یک روش مؤثر برای افزایش تحمل به یخ‌زدگی در گیاهان باشد. *Alia et al.* (1998) با انتقال ژن *codA* به آرابیدوپیس، تحمل بذرها تراریخته را به تنش دمای پایین مورد آزمون قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بتائین سنتز شده در داخل گیاه، در حفاظت از گیاه در مقابل تنش دمای پایین مؤثر است. ژن *codA* در ایران توسط *Mortazavi et al.* (2006) به برنج منتقل شده است. ارزیابی‌های مولکولی اولیه حاکی از وراثت‌پذیری این ژن می‌باشد. *Yong Jan et al.* (2004) با موفقیت ژن *codA* را به گوجه‌فرنگی منتقل کردند. گیاهان تراریخته که گلایسین‌بتائین را در خود تجمع داده بودند، در تمام مراحل رشدی تحمل بیشتری در مقابل سرما از خود نشان دادند. هدف از این مطالعه، انتقال ژن *codA* به عدس با استفاده از یافته‌های قبلی نگارنده در بهینه‌سازی و تراریزش عدس و تولید گیاهان تراریخته می‌باشد.

کوالکترپوریشن DNA پلاسמידی در پروتوپلاست‌های ریشه عدس توسط *Maccarrone et al.* (1995) گزارش شده است. *Chowrira et al.* (1995) تراریزش در گیاه را با استفاده از مرستم‌های گره‌ای سالم انجام دادند. *Öktem et al.* (1999) آزمایشات تراریزش را با ریزنمونه‌های گره کوتیلدونی با استفاده از تفنگ ژنی انجام دادند و بیان ژن گزارشگر GUS را به میزان ۵۰ درصد در ریزنمونه‌های بمباران شده مشاهده کردند. *Mahmoudian et al.* (2002) با استفاده از تکنیک *Vacuum infiltration* و با آگروباکتريوم روی تراریزش عدس توانستند بیان موقت ژن GUS را در ریزنمونه‌های آلوده شده با باکتری مشاهده نمایند، بی آن‌که باززایی انجام‌دهند. *Khatib et al.* (2011) نیز ژن DREB1A را جهت ایجاد تحمل به علف‌کش با آگروباکتريوم به عدس منتقل کردند.

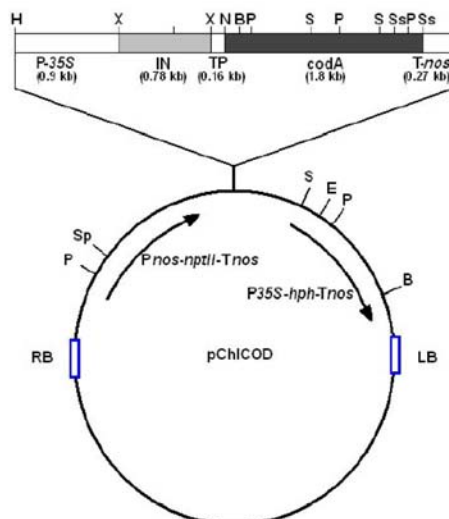
گلایسین‌بتائینیک حفاظت‌کننده اسمزی مهم می‌باشد که در باکتری‌ها، اکثر گیاهان عالی و جانوران تجمع پیدا می‌کند. به‌علاوه نقش تنظیم‌کننده اسمزی هم دارد و ساختار ماکرومولکول‌ها را به‌وسیله حفاظت از آن‌ها در مقابل خسارات ایجاد شده به‌وسیله انواع مختلف استرس پایدار نگه می‌دارد. در غلظت‌های بالا مداخله‌ای با عملکردهای سیتوپلاسمی نداشته و به‌طور کارآ و مؤثری ساختار و عملکرد بسیاری از ماکرومولکول‌ها را ثابت می‌بخشد. به‌نظر می‌رسد که بتائین یک عامل مهم در تحمل به تنش در گیاهان می‌باشد. این ماده یک محلول سازگار بی‌نهایت مؤثر بوده و حضور آن به‌میزان زیادی با توانایی رشد گیاهان در شرایط محیطی خشک و یا شور همبستگی دارد. *Sakamoto et al.* (1995) اظهارداشتند که گلایسین‌بتائین تحت شرایط تنش، القاء شده و تجمع یافته و سطح آن با درجه افزایش تحمل به تنش همبستگی دارد (*Saneoka et al.*, 1995). کاربرد خارجی بتائین، رشد و زنده‌مانی یک وارپته وحشی از گیاهان را تحت شرایط تنش‌های مختلف بهبود بخشیده است (*Hayashi et al.*, 1998). گلایسین‌بتائین همچنین فعالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را تحت شرایط کمبود آب حفاظت کرده و حتی غشاءها را در طی یخ‌زدگی پایدار نگه می‌دارد و به‌پایداری ساختار سوم پروتئین‌ها کمک کرده و از تخریب آن‌ها به‌وسیله محلول‌های ناسازگار و مخرب ممانعت می‌کند (*Hayashi et al.*, 1997). ژن کولین‌اکسیداز *codA* ابتدا از *Arthrobacter pascens* جداسازی شد. مزیت عمده استفاده از *codA* به‌عنوان ابزار مهندسی ساخت گلایسین‌بتائین در مقایسه با دیگر ژن‌های دخیل در سنتز این آنزیم، این است که معرفی تنها یک ژن *codA* برای این آنزیم جهت تبدیل کولین به گلایسین‌بتائین

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و پلاسمید مورد استفاده

در این مطالعه از رقم گچساران (ILL6212) که از ایستگاه تحقیقات دیم شمال شرق کشور تهیه شده بود و پلاسمید pChlCOD که ۱۶ کیلوباز طول دارد، استفاده شد (شکل ۱).

این پلاسمید دارای ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) برای گزینش باکتری، ژن مقاومت به هیگرومایسین (*hpt*) برای گزینش شاخه‌های تراریخته احتمالی و ژن کولین‌اکسیداز (*codA*) از باکتری *Arthrobacter globiformis* است که محصول آن کولین را به گلایسین‌بتائین تبدیل می‌نماید.



شکل ۱- پلاسمید pChlCOD

Fig. 1. pChlCOD plasmid

تمامی این ژن‌ها تحت پیش‌بر دائمی ۳۵S در داخل یک قرار گرفته‌اند. لازم به‌ذکر است که این پلاسمید دارای یک‌توالی رهبر (TP) در ابتدای چهارچوب ژنی کولین‌اکسیداز می‌باشد. اصل پلاسمید دارای یک اینترون برنج (IN) نیز می‌باشد که این اینترون در پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق حذف‌گردید. پلاسمید توسط پروفیسور موراتا از مؤسسه ملی زیست‌شناسی پایه، اکازاکی، ژاپن (Professor N. Murata)

ارسال شده است. استخراج پلاسمید از باکتری *E. coli* با استفاده از کیت شرکت پرومگا انجام شد. صحت پلاسمید استخراج‌شده با استفاده از آغازگرهای تکثیرکننده قطعه ۷۰۰ کیلوبازی از ژن کدکننده نومایسین فسفوترانسفراز با استفاده از روش PCR با استفاده از مواد مندرج در جدول ۱ تأیید شد.

جدول ۱- اجزای واکنش PCR برای تأیید پلاسمید pChlCOD

Table 1. Components of PCR reaction to verify pChlCOD plasmid

مقدار (میکرولیتر) Amount (µl)	مواد Materials
2	plasmid (25ngµl ⁻¹)
2.5	PCR Buffer (10X)
2	MgCl ₂ (50mM) کلرید منیزیم
0.3	dNTP (10mM)
0.3	Forward primer (200ngµl ⁻¹) آغازگر رفت
0.3	Reverse primer (200ngµl ⁻¹) آغازگر برگشت
0.3	Taq polymerase (5µl ⁻¹)
17.3	Sterile water آب مقطر استریل
25	Final volume حجم نهایی

مندرج در جدول ۲ هضم شده و سپس محصول روی ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۵۰ دقیقه با ۸۰ ولت تفکیک شد.

حذف اینترون برنج از پلاسمید به این صورت انجام شد که ابتدا پلاسمید با استفاده از آنزیم *Xba1* و استفاده از مواد

جدول ۲- مواد مورد استفاده برای هضم پلاسمید pChCOD
Table 2. Used material to digest pChCOD plasmid

مقدار Amount (μLit)	مواد Materials
2.5	<i>Xba1</i> (5u ul ⁻¹)
5	plasmid (50ngul ⁻¹)
0.5	BSA
2.5	Digestion Bafer 2(10X)
14.5	water
25	حجم نهایی Final volume

قطعه، صحت جداسازی با بارگذاری ۲ میکرولیتر از DNA روی ژل آگارز تأیید شد. جهت اتصال قطعه DNA پلاسمیدی، از مواد مندرج در جدول ۳ استفاده شد.

پس از تفکیک و رنگ آمیزی، روی ژل دو قطعه ۰/۷۸ کیلوبازی و حدوداً ۱۵/۳ کیلوبازی مشاهده شد. باند ۰/۷۸ کیلوبازی همان اینترون برنج بود که حذف شد. باند ۱۵/۳ کیلوبازی بقیه پلاسمید را تشکیل می‌داد. پس از حذف

جدول ۳- مواد مورد استفاده جهت خوداتصال پلاسمید pChCOD
Table 3. Materials for relegation of pChCOD plasmid

مقدار Amount (μLit)	مواد Materials
5	plasmid(50ng μl)
1	T4 ligase buffer (10X)
0.5	T4 DNA ligase (20u/μl)
3.5	Water
10	حجم نهایی Final volume

پلاسمید جدید با استفاده از آغازگرهای *hpt* و *codA-4* و *codA-5* به وسیله واکنش PCR تأیید شد.

پس از اتصال این قطعه و تولید پلاسمید جدید، ابتدا وجود پلاسمید با استفاده از الکتروفورز تأیید شد. سپس صحت

جدول ۴- توالی آغازگر ژن‌های *codA-4*، *codA-5* و *hpt*
Table 4. primer sequences of *codA-4*، *codA-5* and *hpt* genes

برگشت reverse	رفت Forward	آغازگر Primer
5' CGG TTA GCA GGG TGA AGT TCT CCT 3'	5' GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG 3'	<i>codA-4</i>
5' TGC GTC TTG CGG ATG TAG TCC T 3'	5' GAT ACG CCG AAG CTG TTG ATG C 3'	<i>codA-5</i>
5' GGG GCG TCG GTT TCC ACT ATC G 3'	5' CGT TAT GTT TAT CGG CAC TTT G 3'	<i>hpt</i>

در دمای ۸۰- به خوبی سرد شد. میکروتیوب حاوی باکتری مستعد تراریزش آگروباکتریوم از فریزر ۸۰- برداشته روی یخ ذوب شد. ابتدا در هر یک از میکروتیوب‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط کشت YEB ریخته شد و سپس DNA پلاسمیدی اضافه شد. به‌ازای هر نمونه از یک کووت استفاده شد. عمل تراریزش با

پلاسمید جدید با استفاده از روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* منتقل شد. سپس استخراج پلاسمید از *E. coli* و تأیید مجدد آن انجام شد. سرانجام با استفاده از روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه کولای پالسر Bio-Rad به آگروباکتریوم منتقل شد. بدین ترتیب که تیپ‌ها قبل از استفاده

هیدروپونیک رشد نمودند. سپس به گلدان‌های بزرگ در گلخانه منتقل شده و تا زمان بذردهی نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی
استخراج DNA طبق روش (Porebski *et al*, 1997) از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخته احتمالی و همچنین گیاهان غیرتراریخته در مرحله گل‌دهی، جهت انجام آنالیزهای مولکولی انجام شد.

تأیید تراریخته بودن گیاهان T0 با استفاده از PCR
برای انجام PCR از آغازگرهای *codA-4* و *codA-5* استفاده شد. جفت آغازگر *codA-4*، یکجفت آغازگر کاملاً اختصاصی و مونومورف به طول ۲۴ باز است که سبب تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز از ابتدای ژن کدکننده کولین‌اکسیداز می‌شود. دمای اتصال بهینه برای این آغازگر ۶۰ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد بود. جفت آغازگر *codA-5* نیز مونومورف و اختصاصی بوده و قطعه‌هایی به طول ۵۶۹ باز را از انتهای ژن کدکننده کولین‌اکسیداز تکثیر می‌کند. دمای اتصال این آغازگر نیز ۶۰ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد بود. از آنجا که دوجفت آغازگر مذکور دارای مشابهت ساختاری بودند، به‌گونه‌ای که امکان اتصال آن‌ها به یکدیگر و تشکیل ساختارهای پایدار وجود داشت، استفاده همزمان از آن‌ها در یک واکنش مقدور نبود. بنابراین جداگانه در واکنش PCR استفاده شدند. مخلوط واکنش PCR با استفاده از مواد مندرج در جدول ۵ تهیه شد. برنامه دمایی PCR نیز به شرح زیر انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و در ۳۵ چرخه بعدی، به مدت یک دقیقه انجام شد. دمای مرحله اتصال برای هر دو آغازگر ۶۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه در نظر گرفته شد. مرحله پلیمریزاسیون آغازگر نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه برای تمام چرخه‌ها و ۱۰ دقیقه برای چرخه نهایی انتخاب شد. علاوه بر DNA گیاهان تراریخته از شاهد‌های مناسب شامل DNA گیاهان غیرتراریخته، واکنش بدون DNA و یک واکنش با DNA پلاسمیدی نیز استفاده شد تا کنترل مناسب در حین آزمایش انجام شود.

پس از انجام PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۷۵ ولت تفکیک شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید عکس‌برداری شد. جهت تعیین اندازه باندها از سایز مارکر ۱۰۰ bp استفاده شد.

ولتاژ ۲۶۰ انجام شد. بعد از انجام تراریزش، با اضافه کردن یک میلی‌لیتر از محیط مایع YEB به هر کووت جهت رشد باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس از این کشت روی محیط YEB دارای کانامایسین پلیت و کشت شده و از آن برای تهیه محیط کشت مایع برای تراریزش استفاده شد.

تهیه ریزنمونه برای کشت مشترک
تهیه ریزنمونه و مراحل باززایی طبق پروتکل معرفی شده توسط (ZakerTavallaie *et al.*, 2011) انجام شد.

انجام کشت مشترک ریزنمونه و آگروباکتریوم
ریزنمونه‌های دارای شاخه حاصل از کشت ۱۴ روزه در محیط کشت شاخه‌زایی برای کشت مشترک استفاده شدند. ابتدا سرشاخه‌های ریزنمونه قطع و سپس به مدت چندثانیه در سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار گرفت. سپس روی محیط کشت مشترک دارای هورمون‌های شاخه‌زایی به مدت سه روز کشت شدند. ریزنمونه‌های حاصل از کشت مشترک پس از سه روز به محیط کشت MS دارای ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت از بین بردن باکتری‌های محیط کشت منتقل شدند. استفاده از سفوتاکسیم تا چندین زیرکشت ادامه داشت. پس از یک هفته، استفاده از هیگرومایسین در محیط کشت شروع شد. ولی پس از آن برای شاخه‌زایی و سپس طویل شدن شاخه‌های حاصله، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، مخصوص محیط کشت طویل شدن شاخه‌ها حاوی چهار میکرومولار Zip به اضافه یک میکرومولار Kin استفاده شد. در هر زیرکشت شاخه‌های زرد و نکروزه حذف و شاخه‌های سبز تقسیم شده و در لوله‌های آزمایش جداگانه کشت شدند. در هر زیرکشت برای محیط کشت انتخابی از غلظت بالاتری از هیگرومایسین استفاده شد. این غلظت‌ها از سه میلی‌گرم بر لیتر تا پنج میلی‌گرم در لیتر تا انتهای مرحله طویل شدن و قبل از انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی اعمال شد. در آخرین زیرکشت قبل از ریشه‌زایی، با شمارش شاخه‌های سالم حاصل از ریزنمونه‌ها درصد زنده‌مانی شاخه‌ها در محیط کشت انتخابی تعیین شد.

ریشه‌زایی، سازگاری و انتقال گیاهان به گلخانه
شاخه‌های طویل شده جهت القای ریشه به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت BSB^{۱/۴} به اضافه ۵۰ میکرومولار NAA به مدت سه روز منتقل شدند. پس از آن برای ظهور و رشد ریشه‌ها به مدت ۱۰ روز در لوله‌های آزمایش حاوی مخلوط استریل محیط کشت BSB^{۱/۴}/P^۱ بدون قند به اضافه ماسه و پرلیت کشت شدند. سپس جهت توسعه ریشه و سازگار شدن گیاه با محیط بیرون، به مدت یک هفته تا ۱۰ روز در محیط کشت

به‌عنوان شاهد روی غشای نایلونی ریخته شد و سپس جهت تثبیت DNA به غشاء در دستگاه UV cross linker قرار داده شد.

تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از دات‌بلا تینگ جهت انجام دات‌بلا تینگ از DNA استخراج‌شده از گیاهان تراریخته استفاده شد. مقدار ۲۵۰ نانوگرم DNA از هر کدام از گیاهان تراریخته و غیرتراریخته و همچنین پلاسמיד

جدول ۵- اجزای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای *codA*
Table 5. Components of PCR reaction using *codA* primers

مقدار Amount (μLit)	مواد Materials
2	DNA (50ng/μl)
2.5	PCR Buffer (10X)
2	MgCl ₂ (50mM)
0.5	dNTPs (10mM)
0.3	Forward primer (200ng/μl)
0.3	Reverse primer (200ng/μl)
0.5	Taq polymerase (5u/μl)
16.9	water
25	حجم نهایی Final volume

کاپیلاری از ژل به غشاء نایلونی دارای بار مثبت منتقل شده و غشاء پس از شستشو جهت تثبیت در دستگاه UV cross linker قرار داده شد. مراحل بعدی ساترن‌بلا تینگ مشابه دات‌بلا تینگ انجام شد. برای تهیه پروب از قطعه ۵۶۵ جفت‌بازی از ژن *codA* حاصل از واکنش PCR استفاده شد.

تأیید گیاهان تراریخته T0 با استفاده از RT-PCR

استخراج RNA از گیاهان تراریخته احتمالی و غیرتراریخته با استفاده از روش Porebski *et al*, (1997) انجام شد. cDNA تک‌رشته‌ای از RNA با استفاده از کیت Ink.BioLabs® نسخه ۱/۳ ساخته شد. محصول واکنش نهایی تا حجم ۵۰ میکرولیتر با آب رقیق شده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

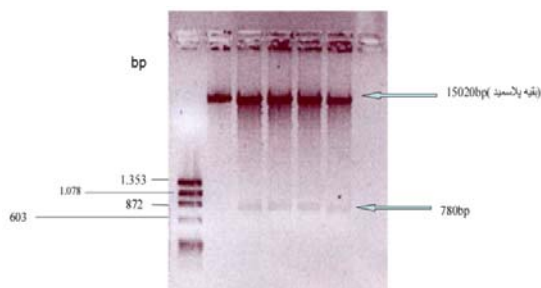
در مرحله دوم با استفاده از مواد مندرج در جدول ۶، PCR معمولی با استفاده از cDNA حاصل از مرحله اول به‌عنوان الگو و جفت‌آغازگر *codA-4* انجام شد. برنامه دمایی به‌این ترتیب بود که واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و در ۳۵ سیکل بعدی به مدت یک دقیقه انجام شد. دمایی مرحله اتصال آغازگر ۶۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه در نظر گرفته شد. مرحله بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه و ۱۰ دقیقه برای سیکل نهایی انتخاب شد. محصول PCR روی ژل آغاز ۱/۲ درصد تفکیک و از آن عکس گرفته شد.

سپس عمل هیبریداسیون به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس پروب با استفاده از قطعه ۵۶۵ کیلوبازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پلاسמיד با استفاده از پرایمر *codA-5* تهیه شد. برای نشان‌دار کردن پروب از روش آلکالین فسفاتاز استفاده شد. پس از افزودن پروب، به منظور انجام هیبریداسیون به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در آن هیبریداسیون با همان دما قرار داده شد. پس از شستشوی بلات DNA و سپس آغشته کردن آن با محلول CDP-Star، در تاریکی ورقه فیلم اتورادیوگرافی روی بلات و داخل کاست گذاشته شد و پس از چند ساعت، به وسیله تیمار بلات با محلول developer و fixer لکه‌ها قابل مشاهده شد.

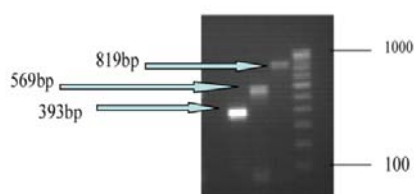
تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از ساترن‌بلا تینگ

حدود ۳۰ میکروگرم از DNA ژنومی از هر کدام از گیاهان تراریخته احتمالی و گیاهان غیرتراریخته جهت هضم با آنزیم Hind-III به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس با افزودن ۲/۵ حجم از اتانول ۹۵ درصد و ۱/۱۰ حجم از استات سدیم ۳ مولار و سپس قراردادن در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، و سپس سانتریفوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه DNA رسوب داده شده و در TBA حل شد. DNA به مدت ۱۸ ساعت تحت ولتاژ ۲۵ ولت تفکیک و سپس رنگ‌آمیزی و اِسْمیر تحت اشعه UV مشاهده شد. سپس DNA بعد از دناتوراسیون و بدون انجام نئوتریلیزاسیون با استفاده از روش

بدون اینترون بود، از ژل جداسازی شده و سپس اتصال مجدد انجام گردید.



شکل ۳- تفکیک باندی پلاسمید هضم‌شده با آنزیم برشی *XbaI* جهت حذف قطعه اینترون برنج از پلاسمید
Fig. 3. Segregation of digested plasmid by restriction enzyme of *XbaI* to eliminate rice intron from plasmid



شکل ۴- تایید پلاسمید با استفاده از آغازگرهای *codA-5* و *codA-4* .hpt

Fig 4. Verification of plasmid using primers of *hpt*, *codA-4* and *codA-5*

پس از اتصال بقیه پلاسمید به یکدیگر صحت آن با استفاده از آغازگرهای *hpt* و *codA-4* و *codA-5* تأیید شد (شکل ۴).

جدول ۷ نتایج حاصل از تراریزش را به‌طور خلاصه تا مرحله انتقال به گلخانه نشان می‌دهد. لازم به‌ذکر است که در مرحله ریشه‌دهی به‌دلیل آلودگی قارچی شدید و پس از آن ایجاد آلودگی باکتریایی در مرحله کشت هیدروپونیک تعداد گیاهان منتقل شده به گلخانه به‌شدت کاهش یافت.

همان‌گونه که از نتایج جدول استنباط می‌شود، این ریزنمونه کارآیی بسیار بالایی در تراریزش عدس دارد و به‌نظر می‌رسد دلیل آن، این است که با استفاده از این نوع ریزنمونه در زمان کشت مشترک مقدار بسیار زیادی بافت مریستم به‌طور مستقیم در تماس با آگروباکتریوم قرار می‌گیرند و امکان تراریزش افزایش می‌یابد. از طرفی درصد بالای شاخه‌زایی امکان تولید شاخه‌های تراریخته را افزایش می‌دهد. متأسفانه

جدول ۶- اجزای واکنش PCR

Table 6. Components of PCR reaction

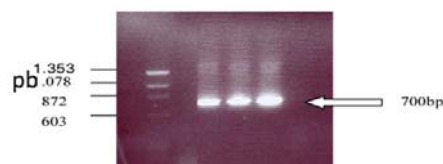
مقدار Amount (µl)	مواد Materials
2	cDNA
2.5	PCR Buffer 10X
2	MgCl ₂
0.8	dNTP
0.5	Forward primer
0.5	Reverse primes
0.5	Taq. Polymerase
16.2	H ₂ O

نسل T1 و تأیید تراریخته‌بودن

گیاهان تراریخته احتمالی به گلخانه منتقل شده و تعداد قابل توجهی بذر هم تولید نمودند. بذرهای این گیاهان پس از چندروز قراردادن در یخچال جهت شکستن خواب احتمالی، ضدعفونی شده و ابتدا در محیط این‌ویترو جوانه‌زدند و پس از رشد اولیه در گلدان‌های کوچک حاوی مخلوط پرلیت و ماسه که با محلول ۱/۲ آرنون تغذیه می‌شدند، به گلخانه منتقل شدند. پس از رشد کافی در گلخانه DNA این گیاهان T1 و همچنین گیاهان غیرتراریخته استخراج شده و سپس با روش یادشده در مورد گیاهان T0، با استفاده از PCR با استفاده از آغازگرهای *codA-4* و *codA-5* و همچنین RT-PCR با استفاده از آغازگر *codA-4* تراریخته‌بودن آن‌ها تأیید شد.

نتایج و بحث

پس از تکثیر پلاسمید با استفاده از *E. coli*، وجود پلاسمید مجدداً با استفاده از PCR به‌وسیله آغازگرهای تکثیرکننده یک‌قطعه ۷۰۰ جفت بازی از ژن *nptII* تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأیید صحت پلاسمید با استفاده از PCR
Fig. 2. Identification of plasmid using PCR

حذف اینترون برنج از پلاسمید: با توجه به این که وجود اینترون برنج در پلاسمید ضرورتی نداشت، این قطعه از اینترون حذف گردید. شکل ۳ تصویر تفکیک باندی پلاسمید هضم‌شده با آنزیم برشی *XbaI* و قطعه اینترون به‌طول ۷۸۰ جفت‌باز را نشان می‌دهد. باند بزرگ‌تر که حاوی پلاسمید

آنالیزهای مولکولی

تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از PCR از چهار گیاه تراریخته احتمالی در PCR، سه گیاه جواب مثبت داد.

وجود هر سه باند مورد انتظار در گیاهان، وجود ژن در هر سه گیاه را تأیید نمود. وجود گیاه غیرتراریخته شاهد و کنترل منفی که در آن به جای DNA از آب استفاده شده بود نیز جهت تأیید گیاهان تراریخته مورد آزمون قرار گرفت.

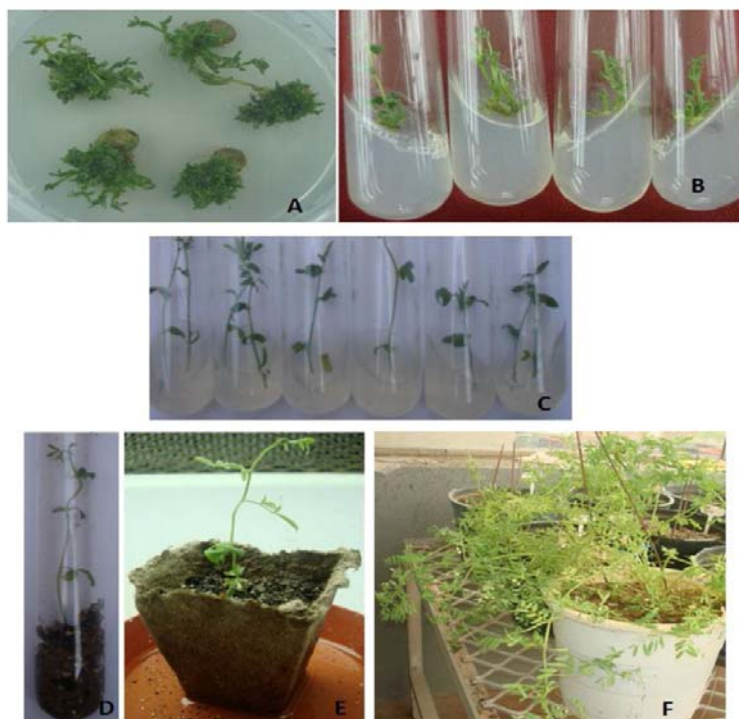
به دلیل آلوده شدن شاخه‌ها با قارچ در محیط رشد و توسعه ریشه (۱۰ روز در مخلوط استریل محیط کشت مایع ۱/۴MS بدون ساکارز، همراه با ماسه و پرلیت) و به دنبال آن، آلودگی باکتریایی تعداد زیادی از شاخه‌های ریشه‌دار شده و احتمالاً تراریخته در این مرحله از بین رفتند.

در ادامه آنالیزهای مولکولی بر روی چهار گیاه تراریخته احتمالی و سه گیاه شاهد زنده و بارور انجام گردید.

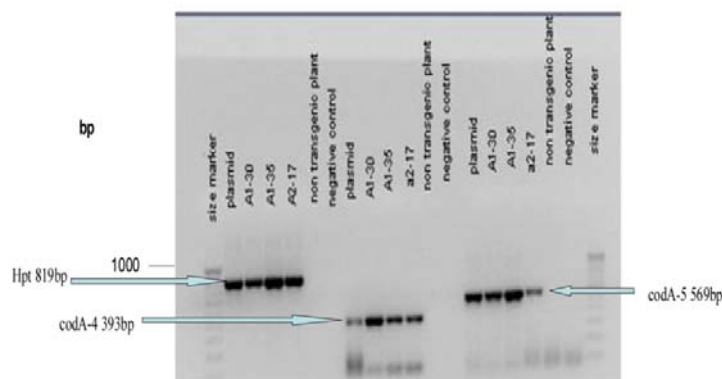
جدول ۷- نتایج حاصل از آزمایشات تراریزش عدس

Table 7. Results of gene transformation of Lentil experiments

تعداد گیاهان منتقل شده به گلخانه No of plants in green house	تعداد شاخه‌های ریشه‌دار شده No. of rooted shoots	تعداد کل شاخه‌های سالم پنج هفته پس از قرار گرفتن در محیط انتخابی No of normal shoots after 5 weeks on selection media	تعداد ریزنمونه سالم پس از پنج هفته قرار گرفتن در محیط انتخابی زنده و سالم No. of explants with normal shoots after 5 weeks on selection media	تعداد ریزنمونه در کشت مشترک No. of explants in co-cultivation culture	آزمایش Experiment
20	56	70	50	100	1
22	70	88	76	124	2
18	85	110	80	136	3
17	90	120	101	157	4
4	80	110	90	112	5
3	65	85	76	114	6
84	446	583	473	743	total
11	60	78	63		percentage



شکل ۵- مراحل باززایی گیاهان تراریخته. A: شاخه‌زایی؛ B: طول شدن شاخه‌ها؛ C: القای ریشه؛ D: ریشه‌دهی؛ E: سازگاری؛ F: گیاه کامل
Fig. 5. Regeneration of transgenic plants after co-cultivation. A: shoot elongation; B: shoot elongation; C: root induction; D: rooting; E: hardening; F: whole plant

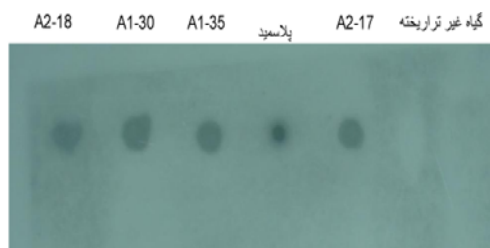


شکل ۶- تأیید گیاهان تراریخته با استفاده از PCR با آغازگرهای *codA-4*، *codA-5* و *hpt*. سایز مارکر 100bp می‌باشد.

Fig. 6. Verification of putative transgenic plants by PCR using *codA-4*، *codA-5* and *hpt* primers

A1-35 مربوط به آزمون اول تراریزش و گیاهان A2-17 و A2-18 مربوط به آزمون دوم تراریزش می‌باشد. بنا به دلایلی که قبلاً ذکر شد، از آزمون‌های آخر، گیاهی به این مرحله نرسید. شکل ۷ لکه‌های مشاهده شده پس از رنگ‌آمیزی را نشان می‌دهد.

تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از دات‌بلا تینگ آزمون دات‌بلا ت با استفاده از چهار گیاه تراریخته احتمالی باقیمانده و گیاه شاهد غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی و پلاسמיד به عنوان شاهد مثبت انجام شد. گیاهان A1-30 و



شکل ۷- تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از دات‌بلا تینگ

Fig. 7. Verification of putative transgenic plants of T0 using dot blotting

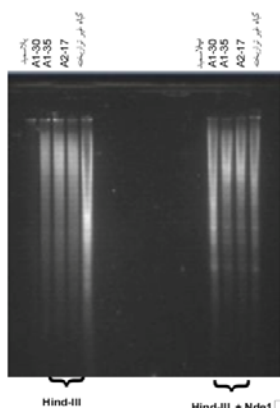
آغازگر برگشت *codA-5* استفاده شده بود. تفکیک باندهای حاصل از PCR که با استفاده از cDNA به عنوان الگو انجام شده بود در شکل ۱۰ قابل مشاهده است. ظاهراً با آغازگر oligodT سنتز cDNA موفق نبوده است. اما استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *codA* به طور موفقی رونویسی از ژن *codA* را تأیید نمود.

تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از آنالیز سادرن باندهای تشخیص داده شده به وسیله پروب در شکل ۱۰ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل دیده می‌شود، باندهای سمت چپ با استفاده از آنزیم برشی Hind-III و در سمت راست با استفاده از هضم دوگانه آنزیم‌های برشی Hind-III و Nde1 ایجاد شده‌اند. در باندهای سمت چپ با توجه به این که آنزیم Hind-III فقط یک برش در T-DNA ایجاد می‌نماید، می‌توان تعداد نسخه درج شده از ژن *codA* در ژنوم گیاه را حدس زد و نتیجه گرفت که در گیاهان تراریخته A1-30 و A2-17 حداقل دو نسخه و در گیاه تراریخته A1-35 حداقل یک نسخه از ژن *codA* درج شده است.

حصول گیاهان T1 و تأیید تراریخته بودن آن‌ها با استفاده از PCR

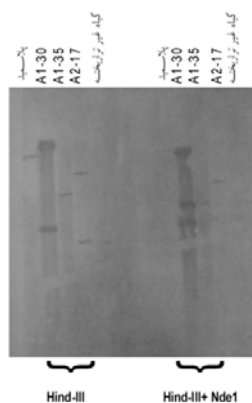
گیاهان تراریخته نسل T0 به مرحله بلوغ رسیده و بذری خوبی تولید نمودند. تعدادی از بذرها مجدداً کشت شده و تراریخته بودن گیاهان T1 با استفاده از PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۱۲ وجود ژن *codA* را با استفاده از PCR در چهار گیاه T1 نشان می‌دهد.

تأیید گیاهان تراریخته احتمالی T0 با استفاده از RT-PCR برای سنتز cDNA از RNA دو آزمون یکی با استفاده از آغازگر oligodT و دیگری آغازگر اختصاصی ژن *codA* یعنی



شکل ۸- تفکیک DNA حاصل از هضم با آنزیم Hind-III و هضم دوگانه با آنزیم‌های Hind-III و NdeI گیاهان تراریخته احتمالی، غیر تراریخته و پلاسمید

Fig. 8. Segregation of digested DNA using Hind-III and double digested DNA using Hind-III and NdeI enzymes from putative transgenic plants, nontransgenic plant and plasmid



شکل ۹- آنالیز لکه‌گذاری سادرن سه گیاه تراریخته احتمالی نشان‌دهنده ادغام ژن *codA* در ژنوم گیاهان

Fig. 9. Southern blotting of 3 putative transgenic plants indicated to integration of the *codA* gene in plants



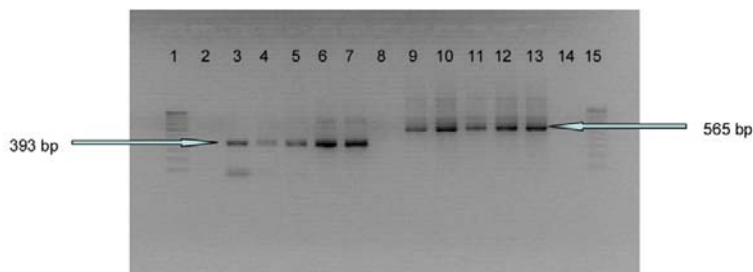
شکل ۱۰- وجود باند ۵۶۵ جفت باز در RT-PCR نشانگر تأیید تراریخته بودن گیاهان

از چپ به راست: سایز مارکر 100bp، پلاسمید، گیاهان تراریخته A1-30، A1-35 و A2-17، گیاه شاهد غیرتراریخته و شاهد بدون DNA که سنتز از cDNA از RNA در این گروه با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن انجام گرفته بود. نمونه‌های بعدی نیز به ترتیب پلاسمید، گیاهان تراریخته A1-30، A1-35 و A2-17، گیاه شاهد غیرتراریخته، شاهد بدون DNA و سایز مارکر که نمونه‌های RNA در این گروه توسط آغازگر oligodT سنتز شده بود.

Fig. 10. Existence of 565bp fragment in RT-PCR segregation verified transgenic plants

Left to right: 100bp size marker, plasmid, transgenic plants of A1-30, A1-35 and A2-17, nontransgenic plant, negative control (in this group especial primer used to synthesis cDNA).

Following samples are plasmid, transgenic plants of A1-30, A1-35 and A2-17, nontransgenic plant, negative control and size marker (in this group oligodT primer used to synthesis cDNA)



شکل ۱۱- تأیید گیاهان تراریخته T1 با استفاده از PCR

با استفاده از آغازگر *codA-4* قطعه ۳۹۳ جفت‌بازی و با استفاده از آغازگر *codA-5* قطعه ۵۶۵ جفت‌بازی از ژن *codA* تکثیر شد. از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰bp، گیاه غیرتراریخته، پلاسمید، گیاهان T1 تراریخته A1-30-1، A1-30-2، A1-30-3 و A1-30-4، شاهد بدون DNA، پلاسمید، گیاهان T1 تراریخته A1-30-1، A1-30-2، A1-30-3 و A1-30-4، گیاه غیرتراریخته و سایز مارکر می‌باشد.

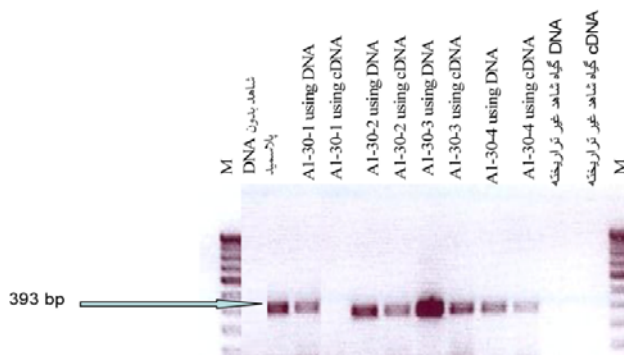
Fig. 11. Verification of T1 transgenic plants by PCR

Primer of *codA-4* amplified 393 bp fragment and primer of *codA-5* amplified 565 bp fragment from *codA* gene
Left to right: size marker 100bp, nontransgenic plant, plasmid, T1 transgenic plants of A1-30-1, A1-30-2, A1-30-3, A1-30-4, negative control (without DNA), plasmid, nontransgenic plant, plasmid, T1 transgenic plants of A1-30-1, A1-30-2, A1-30-3, A1-30-4, nontransgenic plant and size marker 100bp

تراریخته روی ژل الکتروفورز نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، فقط گیاه A1-30-1 در RT-PCR جواب مثبت نداد. این درحالی‌است که تراریخته بودن این گیاه با استفاده از PCR تأیید شده بود. وجود ژن در گیاه با استفاده از PCR تأیید شده است، ولی چون سادرن‌بلا تینگ انجام نشده، تلفیق شدن یا نشدن ژن در ژنوم گیاه نامشخص است.

تأیید گیاهان تراریخته T1 با استفاده از RT-PCR

در ساخت cDNA از آغازگر اختصاصی ژن یعنی *codA-5* استفاده شده بود. شکل ۱۲ الگوی باندی حاصل از PCR دوم با استفاده از cDNA به‌عنوان الگو را در مقایسه با PCR همزمان با استفاده از DNA استخراج شده از گیاهان



شکل ۱۲- مقایسه قطعه تولیدشده در PCR با استفاده از cDNA و DNA به عنوان الگو در PCR

Fig. 12. Comparison between produced fragments using cDNA and DNA as template by PCR

RT-PCR تأیید شد. انجام آزمون زیستی و ایمنی در آینده انجام خواهد شد. امید است گیاهان تراریخته تحمل خوبی نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان دهند.

ولی در مورد سه گیاه دیگر می‌توانیم بگوییم که ژن در ژنوم گیاه تلفیق شده و رونویسی نیز انجام گرفته است. بدین ترتیب تراریخته بودن گیاهان T1 نیز با استفاده از PCR و

منابع

1. Akcay, U.C., Mahmoudian, M., Kamci, H., Yucel, M., and Oktem, H.A. 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik). Plant Cell Report 28: 407-417.
2. Alia, K., Hayashi H., Chen, T.H.H., and Murata, N. 1998a. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. Plant Cell Environment 21: 232-239.
3. Alia, M., Hayashi H., Sakamoto A., and Murata, N. 1998b. Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of betaine. Plant Journal 16: 155-161.
4. Bagheri, A., Ghasemi Omran, V., and Hatefi, S. 2012. Indirection in vitro regeneration of lentil (*Lens culinaris* Medik.). Journal of Plant Molecular Breeding 1: 43-50.
5. Bohra, A., Pandey, M.K., Jha, U.C., Singh, B., Singh, I.P., Datta, D., Chaturvedi, S.K., Nadarajan, N., and Varshney, R.K. 2014. Genomics-assisted breeding in four major pulse crops of developing countries: present status and prospects. Theoretical and Applied Genetics 127: 1263-1291.
6. Chowrira, G.M., Akella, V., and Lurquin, P.F. 1995. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems. In: Planta. Generating transgenic plants without in vitro tissue culture. Molecular Biotechnology 3: 17-23.
7. Deshniem, P., Gombos, Z., Nishiyama, Y., and Murata, N. 1997. The action in vivo of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low temperature. Journal of Bacteriology 179: 339-344.
8. Gulati, A., Schryer, P., and Mchughen, A. 2002. Production of fertile transgenic lentil (*Lens culinaris* Medik.) plants using particle bombardment. In vitro Cellular and Development Biology-Plant 38: 316-324.
9. Hayashi, H., Alia, M., Sakamoto, H., Nonaka, T.H.H., and Murata, N. 1997. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Plant Journal 12: 133-142.
10. Hayashi, H., Alia, M., Mustardy, P., Deshniem, M., and Murata, N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Plant Journal 12: 133-142.
11. Hayashi, H., Alia, M., Sakamoto, A., Nonaka, H., Chen, T.H.H., and Murata, N. 1998. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. Journal of Plant Research 111: 357-362.
12. Khatib, F., Makris, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kumar, S., Sarker, A., Eroskine, W., and Baum, M. 2011. Expression of the DREB1A gene in lentil (*Lens culinaris* Medik. Subsp culinaris) transformed with the *Agrobacterium* system. Crop Pasture Science 62: 488-495.
13. Maccarrone, M., Veldink, G.A., Finazzi, A.A., and Vliegthart, J.F. 1995. Lentil root protoplasts: a transient expression system suitable for co-electroporation of monoclonal antibodies and plasmid molecules. Biochimica et Biophysica Acta 1243: 136-142.
14. Mahmoudian, M., Yucel, M., and Oktem, H.A. 2002. Transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology Reports 20: 251-257.
15. Öktem, H.A., Mahmoudian, M., Eyidođan, F., and Yücel, M. 1999. Gus gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. Lens Newsletter 26: 3-6.
16. Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8-15.
17. Sakamoto, A., and Murata, N. 2001. The use of bacterial choline oxidase, a glycine betaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. Plant Physiology 125: 180-188.
18. Sakamoto, A., Valverde, R., Alia, T.H.H., and Murata, N. 2000. Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. Plant Journal 22: 449-453.

19. Saneoka, H., Nagasaka C., Hahn D.T., Yang W.J., Premachandra, G.S., Joly, R.J., and Rhodes, D. 1995. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiology* 107: 631-638.
20. Sarker, R.H., Biswas, A., Mustafa, B.M., Mahbub, S., and Hoque, M.I. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of lentil. *Plant Tissue Culture* 13: 1-12.
21. ZakerTavallaie, F., Ghareyazie, B., Bagheri, A., and Sharma, K.K. 2011. Lentil regeneration from cotyledone explant bearing a small part of the embryo axis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 21: 169-180.

Genetic transformation of Lentil (*Lens culinaris* M.) and production of transgenic fertile plants

Zaker Tavallaie^{*}, F., Ghareyazie², B., Bagheri³, A. & Sharma⁴, K.K.

1. Assistant professor, Complex Higher Education of Shirvan, Iran
2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)
3. Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran; abagheri@um.ac.ir
4. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)

Received: 19 January 2016

Accepted: 6 April 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v7i2.53151

Introduction

Lentil is an important pulse crop in Iran. Lentil is a seed propagating, self-pollinating crop originating from Near East. It is containing 27.5% -31.75% protein and it has high level of iron, calcium, phosphor, thiamin, niacin, and some unusual amino acid as hydroxyarnitin, hydroxyarginin and homo arginin. FAOSTAT reported that the world production of lentils was 4,975,621 metric tons in 2013. Major producing countries are India, Australia, Canada and Turkey. According to Iranian agricultural statistic (2014), area of pulses cultivation estimated 770000 hectares and its 20.2% belong to Lentil. Important abiotic stresses that affect lentil are cold, freezing, drought, heat and salinity. Highland and cold temperatures areas are the main producer in Iran and production of lentil in these areas is limited. So we need tolerant cultivars against cold and freezing stresses for sowing during autumn. Glycine betaine (GB) accumulates in some plants under abiotic stress such as cold. GB stabilizes the structures and activities of enzymes and protein complexes and maintains the integrity of membranes against the damaging effects of excessive salt, cold, heat and freezing. The *codA* gene from *Arthrobacter globiformis* bacteria encodes choline oxidase enzyme that catalyzes synthesis of glycine betaine from choline. The efficiency of biotechnology techniques, especially tissue culture and gene transformation is noticeable in this aspect. The objective of this research is gene transformation of lentil using *codA* gene to enhance its tolerance against abiotic stress especially cold tolerance.

Materials and Methods

Seeds of lentil (*Lens culinaris* Medik) variety of Gachsaran (ILL6212) collected from Shiravan Agriculture Research center in Iran were used in this investigation.

Gene transformation of lentil was done using pChlCOD plasmid. This plasmid is containing *codA* gene. Gene transformation was done by *Agrobacterium tumefaciens* using Cotyledon with slight part of Embryo Axes explant after shooting for cu-cultivation. Co-cultivation and following selection and regeneration was done according to Zaker Tavallaie *et al*, (2011) protocol. The plasmid was containing one intron of rice that it eliminated before cu-cultivation. Three weeks after transferring seedling to glasshouse DNA was extracted from leaves samples using modified CTAB protocol. Existence of *codA* gene was investigated by PCR reaction using *codA*-4 and *codA*-5 primers. Putative transgenic plants were verified by dot blotting also. To determine integration of the gene into transgenic lentil southern blotting also was done. RT-PCR after RNA extraction from leaves sample from mature plants was done to investigate transcription of *codA* gene. We collected some seeds from putative transgenic plants and after cultivation in glasshouse T1 plants were obtained.

* Corresponding Author: f.zaker.t@um.ac.ir; Mobile: 09155087691

PCR, RT-PCR experiments on investigate existence of *codA* gene and dot blotting was done on T1 transgenic plant.

Results and Discussion

The existence of *codA* gene into T0 putative transgenic plants was confirmed by PCR and dot blotting. Integration of *codA* gene into genome was revealed by Southern blotting and transcription of the gene confirmed by RT-PCR assay, respectively. The existence of gene into T1 plants and its transcription was also confirmed using PCR and RT-PCR. Considering the availability transgenic seeds, it is possible to perform further bioassay experiments regarding to enhancement of tolerance of transgenic plants against abiotic stress especially cold stress.

Conclusion

Gene transformation of lentil by *Agrobacterium* using *codA* gene was achieved successfully. After co-cultivation, regeneration of transgenic shoots including shoot induction, shoot elongation, root induction, hardening and growth in glasshouse to rich to mature plants was done successfully according to Zaker Tavallaie *et al*, (2011) protocol. Hygromycine was used as selection agent in selection media. T0 transgenic plants verified using PCR, Dot blotting, Southern blotting and RT-PCR. T1 transgenic plants also confirmed by PCR and RT-PCR. It is necessary to achieve all bio assays about tolerance of transgenic plants against abiotic stress. Also we will investigate inheritance of treat in following generation of T1 plants. Also we will do other necessary investigation such as biosafety experiments. We hope the transgenic plants will be tolerant against abiotic stresses such as cold and freezing.

Key words: *CodA* gene, Lentil (*Lens culinaris* M.), Regeneration, Transgenic plants