Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 84-95
DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.52960

پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۸ شمارهٔ۲، نیمهٔ دوم ۱۳۹۶، صفحهٔ ۹۵-۸۴

بهینه‌سازی انتقال ژن به عدس (*Lens culinaris* Medik.) با استفاده از آگروباکتریوم

فاطمه ذاکر تولایی[1*]، عبدالرضا باقری[2]، بهزاد قره‌یاضی[3] و کایران کمار شارما[4]

۱- استادیار مجتمع آموزش‌عالی شیروان
۲- استاد دانشکدهٔ کشاورزی و پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۴- دانشیار انستیتو تحقیقات بین‌المللی محصولات نیمه‌گرمسیری (ICRISAT)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۵

چکیده

عدس از جمله حبوبات مهم در ایران است که با توجه به وقوع تنش‌های مختلف در مناطق کشت آن در کشور، اصلاح آن جهت افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این زمینه، کارآیی استفاده از فناوری‌های نوین از جمله کشت این‌ویترو و انتقال ژن، قابل‌توجه می‌باشد. در این مطالعه بهینه‌سازی انتقال ژن به عدس با استفاده از ژن گزارشگر *gus* با واسطه اگروباکتریوم تومیفاشینس انجام شد. در این پژوهش اثر عواملی مانند نوع ریزنمونه، آنتی‌بیوتیک مورد استفاده، غلظت باکتری، مدت‌زمان کشت مشترک، تأثیر استوسرینگون، بر موفقیت تراریزش بررسی شدند. نتایج پژوهش نشان داد که ریزنمونه لپه شاخه‌دارشده روی محیط کشت دارای سیتوکنین پس از حذف سرشاخه‌ها یک ریزنمونه خوب برای فرایند انتقال ژن می‌باشد. غلظت پنج میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین بهترین محیط انتخابی برای شاخه‌های تراریخته شناخته شد. غلظت چهار میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری در ۲۵میلی‌لیتر محیط کشت مایع و مدت‌زمان ۷۲ساعت کشت مشترک شرایط مناسب را برای انتقال ژن فراهم کرد. استفاده از استوسرینگون بر نتایج بی‌تأثیر بود. پس از کشت مشترک، شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها روی محیط کشت انتخابی، ریشه‌زایی، سازگاری و انتقال به گلخانه انجام شد. آزمون هیستوشیمیایی *gus* در مرحله قبل از ریشه‌زایی بیان ژن *gus* را تأیید نمود. پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه تأیید حضور ژن *gus* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) روی نمونه‌های برگی انجام شد. امید است، نتایج این پژوهش برای اصلاح عدس از طریق مهندسی ژنتیک و همچنین استفاده از عدس به‌عنوان میزبان برای تولید ترکیبات دارویی مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: باززایی، ژن *gus*، عدس (*Lens culinaris* Medik.)، گیاه تراریخته، مهندسی ژنتیک

مقدمه

حبوبات ازمهم‌ترین منابع پروتئینی در رژیم غذایی بسیاری از مردم کشورهای درحال توسعه می‌باشند. در بین حبوبات، عدس با داشتن درصد بالایی از پروتئین، کیفیت و ارزش غذایی خوب و هضم آسان از اهمیت خاصی برخوردار است و مصرف توأم آن با غلات، کمبودهای پروتئینی غلات را تکمیل می‌کند. علاوه‌برآن، این گیاه سرشار از آهن، کلسیم، فسفر و ویتامین‌های تیامین و نیاسین بوده و برخی اسیدهای آمینه غیرمعمول مانند آلفا هیدروکسی آرنیتین، آلفا هیدروکسی آرژنین و هموآرژنین را نیز دارا می‌باشد. اهمیت غذایی عدس باعث شده است تا طی پنج دهه اخیر تولید جهانی آن از ۰/۸۵میلیون تن به ۴/۴۳میلیون تن برسد. باوجود ۱۵۵درصد افزایش در سطح زیرکشت و دوبرابرشدن عملکرد از ۵۲۸کیلوگرم در هکتار به ۱۰۶۸کیلوگرم در هکتار، اما همچنان در خیلی از کشورهای درحال توسعه این عملکرد پایین است (Rajendran *et al*., 2015).کشورهای عمده تولیدکننده عدس به‌ترتیب هند، استرالیا، کانادا و ترکیه می‌باشند که در مجموع بیش از ۷۳درصد عدس دنیا را تولید می‌کنند (Bohra *et al*., 2014). از جمله محدودیت‌هایی که باعث کاهش عمکرد در عدس می‌شود، می‌توان به خشکی آخر فصل، تنش گرما، عدم حاصلخیزی خاک، بیماری‌هایی مانند برق‌زدگی، پژمردگی فوزاریومی، آنتراکنوز و آفات اشاره کرد (Kumar *et al*., 2013). جهت اصلاح عدس برای افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌توان از فناوری‌های نوین از

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

جمله مهندسی ژنتیک استفاده نمود. تکنیک انتقال ژن علاوه‌بَر کمک به تولید واریته‌های مقاوم می‌تواند برای بهبود کیفیت گیاه و افزایش عملکرد ذاتی و همچنین در استفاده از عدس به‌عنوان میزبان برای تولید داروهای نوترکیب به‌کار رود. لذا بهینه‌سازی انتقال ژن در عدس می‌تواند کاری ارزشمند باشد. تاکنون در اصلاح عدس، از روش‌های انتخاب، هیبریداسیون داخل‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای، موتاسیون و کشت درون شیشه‌ای بهره گرفته شده است.

توانایی تولید تومور توسط چهار نژاد آگروباکتریوم تومی فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) در نوک ساقه و ریشه عدس تحت شرایط مزرعه، نخستین بار توسط Warkentin & McHughen (1991, 1993) گزارش شد. آن‌ها از تعدادی از انواع ریزنمونه‌ها از قبیل نوک ساقه، اپی‌کوتیل، ریشه و قطعات گره‌های کوتیلدونی برای آزمایش‌های تراریزش استفاده کردند. بیان موقت ژن*gus* در تمام مکان‌های زخم‌شده ریزنمونه‌ها به‌جز انتهای بریده‌شده ریزنمونه ریشه، در مجاورت گره کوتیلدولی مشاهده شد. در این مطالعه آگزیل‌ها (نقطه واقع در زاویه بین دمبرگ و ساقه)ی دمبرگ‌های کوتیلدونی به تراریزش پاسخی نشان ندادند. Maccarrone *et al*, (1995) الکتروپوریشن همزمان DNAی پلاسمیدی در پروتوپلاست‌های ریشه عدس را گزارش کردند. Chowrira *et al*, (1995) تراریزش در گیاه را با استفاده از مریستم‌های گره‌ای سالم انجام دادند. در این مطالعه از ژن گزارشگر*gus* استفاده شد. Öktem *et al*, (1999) آزمایش‌های تراریزش را با ریزنمونه‌های گره کوتیلدونی با استفاده از ژن *gus* با روش بمباران با تفنگ ژنی انجام دادند و وجود لکه‌های آبی‌رنگ را در بعضی از ریزنمونه‌های بمباران‌شده مشاهده کردند. Mahmoudian *et al*, (2002) توانستند روش نسبتاً جدیدی را برای تراریزش عدس به‌کار ببرند. آنان با استفاده از ریزنمونه‌های گره‌لپه‌ای، از تکنیک صافی خلأ با واسطه آگروباکتریوم استفاده کردند. البته در این مطالعه هیچ باززایی انجام نشد و فقط بیان موقت ژن، آن هم در ریزنمونه های آلوده‌شده با باکتری مشاهده شد. Gulati *et al*, (2001) با استفاده از ریزنمونه‌های گره‌لپه‌ای و با واسطه آگروباکتریوم و ژن‌های hygromycinphosphotransferase (hp**t**) و neomycin phosphotransferase II (nptII) انتقال ژن به عدس را بررسی کردند. ابتدا بیان ژن *gus* در ۳۰درصد ریزنمونه‌ها مشاهده شد. اما وقتی ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی کانامایسین برده شدند، همه آن‌ها از بین رفتند. آن‌ها نتیجه گرفتند که احتمالاً ژن نئومایسین فسفوترانسفراز، در عدس به‌میزان بسیارکم بیان شده و بنابراین در عدس نشانگر انتخابی بسیار ضعیفی است. Gulati *et al*, (2002) در مطالعه دیگری در تراریزش عدس با استفاده از تکنیک بمباران ژنی و بکاربردن گره‌لپه‌ای به‌عنوان ریزنمونه و با استفاده از ژن *hpt* به جای npt II، موفقیت بیشتری به‌دست آوردند. آنان همچنین توانستند با استفاده از تکنیک پیوند، ریزنمونه‌های تراریخته را روی گیاهچه‌های چهار-پنج روزه عدس پیوند کرده و بر مشکل اصلی باززایی عدس یعنی ریشه‌دهی فائق آیند. در این مطالعه نشان داده شد که پیوند ریزنمونه شاخه‌های عدس بر بسیاری از مشکلات ریشه‌دهی فائق آمده و مستقل از هورمون‌های رشد و رقم مورد استفاده عمل می‌کند. پیوند ریزنمونه باعث کاهش معنی‌دار در طول دوره باززایی و افزایش معنی‌دار در تولید گیاهان عدس باززایی شده داشت. آن‌ها در واقع مطالعه خود را بدون مرحله ریشه‌زایی به انجام رساندند و از ژن مقاومت به علف‌کش سولفونیل اوره یعنی ژن استولاکتات سینتاز (*als*) استفاده کردند. در این مطالعه پس از انجام بمباران ژنی، ریزنمونه‌ها برای تشکیل شاخه به محیط باززایی انتخابی منتقل شدند. بعد از دوهفته در محیط انتخابی همراه با ۵۰نانومولار کلرسولفوران، تمایز جوانه‌های شاخه‌ای مشاهده شد. غلظت پنج نانومولار کلرسولفوران باعث تشکیل کالوس همراه جوانه‌های شاخه‌ای شد که مانع طویل‌شدن شاخه‌ها می‌شد. با کاهش غلظت کلرسولفوران به ۲/۵نانومولار شاخه‌ها پس از چهار هفته توانستند کمی رشد کنند. فقط شاخه‌های سبز و سالم جدا شده و به گیاهچه‌های عدس پیوند زده شدند. آن‌ها موفق شدند با استفاده از این روش گیاهان با فنوتیپ نرمال و بارور تولید نمایند. آزمون مزرعه‌ای گیاهان T_2 نیز انجام شد. اما بنا به گزارش آن‌ها به‌دلیل خشکی هوا و فقدان گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در گیاهان تراریخته، سبب شد که این گیاهان هیچ بذری تولید نکنند. البته این دلیل برای عدم تولید بذر هنوز مبهم است. Sarker *et al*, (2003) توانایی تراریزش ریزنمونه‌های مختلف عدس شامل گره لپه‌ای، جنین سَربرداری شده، جنین نارس و اپی‌کوتیل را با استفاده از نژادLBA4404 آگروباکتریوم مورد بررسی قرار دادند. بالاترین درصد بیان موقت ژن مربوط به ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و بعد از آن جنین سربرداری‌شده بود. بیان موقت*gus* در ریزنمونه‌های جنینی نارس نسبتاً پایین بود. این پژوهشگران عقیده دارند که گره‌لپه‌ای قابلیت مستعدشدن برای تراریزش به‌وسیله آگروباکتریوم را ندارد، به این‌دلیل که باززایی شاخه‌های چندگانه از مریستم‌هایی صورت می‌گیرد که در لایه داخلی ریزنمونه که در طرف دورتر از دسترس آگروباکتریوم وجود دارند، صورت می‌گیرد. این پژوهشگران نیز فقط تا مرحله شاخه‌زایی پیش رفته و حضور ژن*gus* را به‌وسیلهPCR در

ریزنمونه‌های تراریخته تأیید کردند. Akcay *et al*, (2009) جهت تراریزش عدس از سه نژاد EHA105، C58C1 و KYRT1 اگروباکتریوم تومفاشینس استفاده کردند. گره کوتیلدونی به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. بیان موقت *gus* با استفاده از نژادKYRT1 حدود ۲/۸برابر دو نژاد دیگر گزارش شد. همچنین زخمی‌نمودن و استوسرینگون نیز مؤثر تشخیص داده شد. (Khatib *et al*, (2011 نیز ژن DREB1A را جهت ایجاد تحمل به علف‌کش با واسطه اگروباکتریوم به عدس منتقل کردند. این پژوهشگران از ریزنمونه جنین سربرداری‌شده استفاده کرده و شاخه‌های تراریخته را روی پایه‌های غیرتراریخته پیوند زدند. در این پژوهش با هدف بهینه‌سازی انتقال ژن به عدس با استفاده از ژن *gus* فاکتورهای مؤثر بر انتقال ژن مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت فرایند انتقال ژن به عدس بهینه‌سازی گردید. جهت بهینه‌سازی انتقال ژن از پلاسمید pCAMBIA-1301 که دارای ژن گزینشگر مقاومت به هیگرومایسین و ژن گزارشگر *gus* می‌باشد استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این بررسی از عدس رقم گچساران (ILL6212) که از نظر خصوصیات زراعی و سازگاری از اهمیت خاصی نسبت به دیگر رقم ها برخوردار بوده و در خراسان شمالی به‌طور وسیع کشت می‌گردد، استفاده شد. بذر مورد نظر از مرکز تحقیقات کشاورزی شیروان تهیه گردید.

آنتی‌بیوتیک مورد استفاده: با توجه به مطالعات قبلی که کانامایسین را جهت استفاده به‌عنوان ماده انتخابی برای انتخاب شاخه‌های تراریخته در عدس مناسب تشخیص نداده بودند (Gulati *et al*., 2002)، در این مطالعه از هیگرومایسین استفاده شده وغلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵میلی‌گرم بر لیتر از آن روی زنده‌مانی ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده مورد مقایسه قرار گرفت.

باکتری و پلاسمید: در این آزمون از پلاسمید pCAMBIA-1301 جهت بهینه‌سازی انتقال ژن به عدس استفاده شد. این پلاسمید ۱۱۸۴۹جفت‌بازی دارای ژن گزارشگر *uidA* از باکتری *E. coli* با یک اینترون تحت پیش‌بَر CaMV 35S و ترمیناتور نوپالین سنتتاز می‌باشد که از آن برای بررسی بیان ژن در گیاه استفاده می‌شود (شکل ۴-۱). این پلاسمید همچنین دارای ژن گزینشگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*) تحت کنترل پیش‌بَر و ترمیناتور CaMV 35S در قسمت T-DNA برای گزینش بافت گیاهی تراریخته و ژن گزینشگر مقاومت به کانامایسین برای انتخاب باکتری‌های تراریخته در قسمت بیرون از T-DNA خود می باشد.

جهت تکثیر pCAMBIA-130 ابتدا پلاسمید با استفاده از روش الکتروپوریشن وارد نژاد DH5α باکتری *E. coli* شد. بعد از آن کلونی‌های باکتری تراریخته در پتری‌های حاوی محیط کشت جامدLB دارای ۵۰میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، به‌صورت شبانه در ۳۷درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. تک‌کلونی‌های رشدیافته در محیط مایع LB در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به‌صورت شبانه رشد داده شدند. سپس استخراج پلاسمید از این باکتری‌ها با استفاده از کیت انجام شد. پس از آن وجود پلاسمید استخراج شده توسط الکتروفورز تأیید شد. صحت پلاسمید نیز از طریق هضم به‌وسیله آنزیم‌های برشی *Nco*I و *Pml*I و تفکیک قطعات روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۷۰ و رنگ‌آمیزی و رویت با دستگاه ژل‌داک تأیید شد.

پس از تأیید صحت پلاسمید، تراریزش آگروباکتریوم تومی‌فاشینس نژاد C58 با استفاده از روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه کولای پالسر Bio-Rad انجام شد. بعد از تراریزش آگروباکتریوم و کشت آن روی پلیت حاوی کانامایسین، از تک‌کلونی‌ها، روی پلیت‌های جدید زیرکشت شده و برای تهیه مایه تلقیح جهت کشت مشترک استفاده شد. کشت آگروباکتریوم در محیط کشت YEB انجام گردید.

ریزنمونه جهت هم‌کشتی: برای انتخاب ریزنمونه مناسب از نتایج مطالعات قبلی (ZakerTavallaie *et al*., 2011) در مورد بهینه‌سازی باززایی عدس استفاده شد. لذا ریزنمونه لپه همراه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی استفاده شد. قابل ذکر است که باززایی گیاهان تراریخته نیز دقیقاً طبق روش معرفی‌شده توسط ZakerTavallaie *et al*, (2011) انجام شد. بدین‌ترتیب که بذور پس از شستشو، ابتدا با الکل ۷۰درصد به مدت یک دقیقه و سپس با استفاده از محلول کلریدجیوه ۰/۱درصد و ۲قطره از توین۲۰ به‌مدت هفت دقیقه ضدعفونی گردید. بذور پنج تا هفت بار با آب‌مقطر شستشو داده شدند و به مدت ۲ تا سه ساعت در آب‌مقطر استریل خیسانده شدند. سپس پوسته بذرها جدا شده و بذور بدون پوسته در محیط کشت MS غنی‌شده با چهار میکرومولار BAP به‌مدت یک هفته در دمای ۲۴درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶/۸ (تاریکی/نور) کشت داده شدند. سپس از گیاهچه‌های به‌دست‌آمده ریزنمونه لپه به‌همراه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی تهیه شده و بر روی محیط کشت شاخه‌زایی MS غنی‌شده با ۷/۵میکرومولار 2ip به‌اضافه چهار میکرومولار Kin و ۲میکرومولار TDZ کشت داده شد و به‌مدت هشت روز در دمای ۲۴درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶/۸ (تاریکی/نور) قرار داده شدند. در این بین یک زیرکشت هم انجام شد. سپس ریزنمونه‌های دارای شاخه برای مدت هفت روز دیگر روی همین محیط، اما بدون

TDZ رشد کردند. در این هنگام برای تهیه ریزنمونه جهت کشت مشترک با آگروباکتریوم مناسب بودند. با توجه به نتایج ZakerTavallaie *et al*, (2011) این ریزنمونه در این مرحله قابلیت شاخه‌زایی خوبی داشت؛ ولی نحوه استفاده از آن در کشت مشترک برای انتقال ژن بررسی شد. بدین‌منظور دو روش تهیه ریزنمونه مقایسه شد: حذف کل شاخه‌ها از ریزنمونه و گذاشتن آن در محیط کشت مشترک پس از تلقیح با باکتری و حذف سر شاخه‌ها و نگه‌داشتن قسمت بیشتری از شاخه‌ها و گذاشتن آن در محیط هم‌کشتی پس از تلقیح با باکتری. پس از انجام آزمون روش برتر انتخاب و استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون آگروباکتریوم جهت هم‌کشتی: ۱۴روز بعد از کشت ریزنمونه در محیط شاخه‌زایی، از نمونه آگروباکتریوم حاوی پلاسمید در ۲۰میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEBدارای ۵۰میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، تلقیح انجام گرفت و جهت رشد در ۲۸درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۱۸ساعت پس از رشد در انکوباتور، با استفاده از سانتریفیوژ آرام، باکتری‌ها از محیط کشت جدا شده و برای هم‌کشتی با ریزنمونه در محیط کشت مایع $MS_{1/2}$ به‌صورت سوسپانسیون درآمد. OD باکتری در این سوسپانسیون برابر ۱/۱ بود.

غلظت مناسب سوسپانسیون باکتری در محیط کشت مایع $MS_{1/2}$ با رقیق‌کردن مقادیر مختلف از کشت باکتری در ۲۵میلی‌لیتر از کشت مایع $MS_{1/2}$ تعیین گردید. در این مطالعه رقت‌های با ODی ۰/۱۳، ۰/۱۸، ۰/۲۲ و ۰/۲۶ بررسی شدند. پس از ثبت نتایج بهترین غلظت تعیین گردید.

هم‌کشتی ریز نمونه و آگروباکتریوم: ریزنمونه‌های دارای شاخه حاصل از کشت ۱۴روزه در محیط کشت شاخه‌زایی که دارای تعداد زیادی شاخه بودند، برای تهیه ریزنمونه مورد استفاده در کشت مشترک استفاده شدند. به این‌ترتیب که ابتدا سرشاخه‌های ریزنمونه‌ها قطع گردید و سپس ریزنمونه‌های بدون سرشاخه و دارای قسمت مریستمی به‌مدت فقط چند ثانیه در سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار گرفتند. سپس این ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت شاخه‌زایی جدید به‌مدت سه روز قرار داده شدند. پس از سه روز به محیط کشت دارای ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت از بین بردن باکتری‌ها منتقل شدند.

اثر وجود استوسیرینگون(*Acetosyringon*) در محیط هم‌کشتی روی فراوانی تراریزش احتمالی: این آزمون با استفاده از ۶۰ریزنمونه انجام شد. تعداد ۳۰ریزنمونه پس از آغشته‌شدن در سوسپانسیون آگروباکتریوم در محیط شاخه‌زایی دارای ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون برای کشت مشترک گذاشته شدند و ۳۰ریزنمونه دیگر در محیط بدون استوسیرینگون کشت شدند. در نهایت میزان شاخه‌های باززایی‌شده از محیط انتخابی در دو محیط مورد مقایسه قرار گرفت.

تعیین زمان مناسب هم‌کشتی: جهت تعیین مدت‌زمان مناسب جهت هم‌کشتی، دو مدت‌زمان ۴۸ساعت و ۷۲ساعت مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج بررسی شد.

انتخاب گیاهان تراریخته احتمالی: استفاده از محیط انتخابی از یک هفته بعد از اتمام کشت مشترک شروع شد. بدین‌ترتیب که در مدت‌زمان حدود یک‌ماه، چهار زیرکشت انجام شد. در زیرکشت اول از سه میلی‌گرم درلیتر هیگرومایسین در محیط انتخابی استفاده شد و در هر زیرکشت مقدار آن اضافه گردید. در زیرکشت دوم از چهار میلی‌گرم درلیتر، در زیرکشت سوم و چهارم از پنج میلی‌گرم درلیترهیگرومایسین استفاده شد. در طی این مدت نمونه‌ها در محیط کشتMS غنی‌شده با چهار میکرومولار2ip و یک میکرومولار Kin رشد کردند. در طی هر زیرکشت نمونه‌های زرد و همچنین نکروزه که احتمالاً غیرتراریخته بودند، حذف شدند و فقط شاخه‌های سبز نگه داشته شدند. در شاخه‌های حاصل از هر ریزنمونه نیز کلاستر شاخه‌ها از هم جدا شده و پس از حذف شاخه‌های نامطلوب، بقیه شاخه‌ها در تیوب‌های جداگانه کشت شدند. در این مرحله شاخه‌ها جهت ارزیابی بیان ژن *gus* بررسی گردیدند.

ارزیابی بیان ژن *gus*: ارزیابی بیان ژن *gus* با استفاده از روش Hay *et al*, (1994) در مرحله قبل از ریشه‌زایی انجام شد. پس از تهیه محلول‌های لازم، نمونه‌ها به تیوب‌های حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Glue یک میلی‌مولار منتقل شده و در یک دستگاه خلأ به‌مدت پنج دقیقه گذاشته شد. تیوب‌های حاوی نمونه جهت رنگ‌آمیزی، به‌مدت ۲۴ساعت در انکوباتور ۳۷درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس نمونه‌ها از محلول قبلی خارج شده و در ارلن ۱۰۰میلی‌لیتری دو بار با آب دوبارتقطیر شستشو شدند. یک بار نیز با اتانول ۷۰درصد شستشو شده و سپس به مخلوط یک به سه استون–متانول منتقل شدند. سپس به‌مدت یک ساعت در چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. دو تا سه بار این محلول عوض شد تا این‌که نمونه‌ها کاملاً بی‌رنگ شدند. نقاط آبی که نشان‌دهنده صحت انتقال ژن بود، زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.

ریشه‌زایی شاخه‌های تراریخته احتمالی: قبل از انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی جهت اطمینان از عدم وجود باکتری، شاخه‌ها چند روز در محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند. پس از آن شاخه‌های طویل‌شده به محیط کشت ریشه‌زایی بدون آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. بدین‌ترتیب که ابتدا به‌مدت سه روز در محیط کشت MS دارای ۵۰میکرومولار NAA قرار داده شدند تا القای ریشه در شاخه‌ها صورت گیرد.

پس از آن به‌مدت ۱۰روز در مخلوط استریل محیط کشت مایع MS۱/۴ بدون ساکارز، همراه با ماسه و پرلیت جهت ظهور و رشد ریشه قرار داده شدند. شاخه‌های ریشه‌دارشده جهت توسعه ریشه و سازگاری با محیط بیرون به‌مدت یک هفته در سیستم کشت هیدروپونیک قرار داده شدند.

انتقال گیاهان تراریخته احتمالی به گلخانه: گیاهان پس از گذراندن یک هفته در سیستم آب‌کشت که طی آن با محلول غذایی آرنون تغذیه شدند، به گلخانه منتقل شدند. ریشه‌ها در محلول قارچ‌کش کربوکسین-تیرام فرو برده شده و بلافاصله در گلدان‌های با دهانه ۲۰سانتی‌متر حاوی مخلوط ماسه و رس و اندکی کاه برنج ضدعفونی‌شده کشت شدند و به‌وسیله پاکت های پلاستیکی پوشانیده شدند. گوشه‌های قسمت بالای پاکت ها جهت هوادهی پس از سه روز بریده شد و پاکت‌ها پس از یک هفته به‌طور کامل از روی گیاه برداشته شدند. دمای گلخانه ۲۵درجه سانتی‌گراد در روز و حداقل ۱۵درجه سانتی‌گراد در شب که برای رشد گیاهان مناسب است، تنظیم شد. در روزهای اول انتقال به گلخانه، هر دو روز یک‌بار آبیاری انجام می‌گرفت، ولی بعد از مدتی هر چهار روز یک‌بار آبیاری انجام شد. هر ۱۰ روز یک‌بار نیز از محلول غذایی آرنون (Arnon, 1938) برای آبیاری گلدان‌ها استفاده شد. پس از سه تا چهار ماه بذور برداشت گردید.

تجزیه و تحلیل PCR (Polymerase Chain Reaction)

حدود سه هفته بعد از انتقال گیاهان به گلخانه، DNA از بافت برگ تعدادی از گیاهان به روش Porebski *et al,* (1997) استخراج گردید. پس از تأیید و تعیین غلظتDNA، تراریخته‌بودن گیاهان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از یک جفت آغازگر برای تکثیر قطعه ۸۱۹جفت‌بازی از ژن *hpt* و همچنین یک جفت آغازگر برای تکثیر قطعه ۱/۲کیلوبازی از ژن *uidA* انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در ادامه آمده است.

جدول ۱- توالی آغازگر ژن‌های *gus* و *hyg*

Table 1. primer sequence of *gus*and*hyg*genes

آغازگر Primer	رفت Forward	برگشت Reverse
gus	5′ GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG 3′	5′ GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA 3′
hyg	5′ CGT TAT GTT TAT CGG CAC TTT G 3′	5′ GGG GCG TCG GTT TCC ACT ATC G 3′

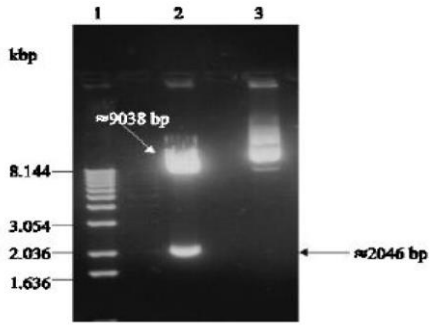
واکنش PCR با استفاده از ۵۰نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۰/۵میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر Taq polymerase، ۲میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر PCRbaffer X 10 و ۱۶/۵میکرولیتر آب دوبارتقطیر و در نهایت با حجم به ۲۵میکرولیتر با این برنامه دمایی انجام شد. واسرشت اولیه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه و در ۳۵چرخه بعدی به‌مدت یک دقیقه انجام شد. دمای مرحله اتصال آغازگر با توجه به نوع آغازگر انتخاب شده و در تمام چرخه‌ها زمان یک دقیقه برای آن‌ها درنظر گرفته شد. مرحله بسط آغازگر نیز در دمای۷۲درجه سانتی گراد و به‌مدت یک دقیقه برای تمام چرخه‌ها و ۱۰دقیقه برای چرخه نهایی انتخاب شد. دمای اتصال برای ژن‌های *gus* و *hpt* به‌ترتیب، ۵۹ و ۵۸درجه سانتی‌گراد بود.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲درصد با ولتاژ ۷۵ولت تفکیک گردیده و سپس با استفاده از ژل‌داک از آن عکس گرفته شد. جهت تعیین اندازه باندها از سایزمارکر۱۰۰bp استفاده شد.

نتایج و بحث

غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک: غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین تأثیری بر ریزنمونه‌های شاخه‌دارشده نداشت و همانند شاهد بود. با افزایش غلظت هیگرومایسین، مرگ‌ومیر ریزنمونه‌ها و نکروزه‌شدن آن‌ها افزایش یافت تا این‌که در پنج میلی‌گرم بر لیتر ریزنمونه‌ها کاملاً از بین رفتند.

تأیید صحت پلاسمید پس از استخراج از باکتری *E. coli* تراریخته‌شده در شکل۱ نشان داده شده است. هضم پلاسمید با استفاده از آنزیم‌های برشی *Nco*1 و *Pml*1 که یک باند حدودا ۲۰۴۶جفت‌بازی از دومین اگزون ژن *gus* و یک باند ۹۰۳۸جفت‌بازی تولید می‌نماید، انجام شد.



شکل ۱- ناقل هضم‌نشده و هضم‌شده پلاسمید pCAMBIA-1301؛ ۱: سایز مارکر (Gibco-BRL) 1kb، ۲: نمونه پلاسمیدی استخراج‌شده از باکتری و هضم‌شده با آنزیم‌های برشی *Nco*1 و *Pml*1 که یک باند حدوداً ۲۰۴۶جفت‌بازی از دومین اگزون ژن *gus* و یک باند ۹۰۳۸جفت بازی تولید شده است، ۳: نمونه هضم‌نشده پلاسمید

Fig. 1. Digested and nondigested pCAMBIA1301. 1: Size marker(Gibco-BRL); 2: Extracted plasmid from bacteria that was digested by *Nco*1 and *Pml*1 restriction enzymes containing two bands of 2046 bp and 9038 bp; 3: Nondigested plasmid

تعیین غلظت مناسب اگروباکتریوم در سوسپانسیون مورد استفاده برای کشت مشترک

رقت OD =۰/۲۶ از سوسپانسیون باکتری در MS ۱/۲، سبب محاصره ریزنمونه با باکتری در حال تکثیر و مرگ ریزنمونه گردید و در رقت OD =۰/۲۲ هم تا حدی این مشکل مشاهده شد. اما با رقت OD=۰/۱۸ و OD =۰/۱۳ مرگ‌ومیری در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. اما جهت کارآیی بهتر تراریزش از رقت OD =۰/۱۸ استفاده شد.

در تهیه ریزنمونه به دو صورت عمل شده بود که هر دو مورد جواب مثبت داد. ولی تیمارهای شاخه‌زایی متفاوتی برای دو نوع ریزنمونه مورد نیاز بود. ریزنمونه‌هایی که قسمت اعظم شاخه‌های آن‌ها قطع شده بودند، پس از کشت مشترک نیاز به شاخه‌زایی مجدد داشتند. یعنی پس از طی هفت تا ۱۰روز کشت در محیط القای شاخه‌زایی، به محیط کشت طویل‌شدن منتقل شدند. اما در مورد ریزنمونه‌هایی که فقط سرشاخه‌های آن‌ها زده شده بود، پس از سه روز هم‌کشتی یک هفته در محیط کشت MS بدون هورمون کشت شدند و پس از آن وارد محیط کشت طویل شدن شدند. این ریزنمونه‌ها نیازی به شاخه‌زایی مجدد نداشتند. ریزنمونه اول از لحاظ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در محیط انتخابی موفق‌تر بود، ولی ریزنمونه دوم موفقیت شاخه‌زایی و بقای بالاتری داشت. در ریزنمونه‌های نوع اول، شاخه‌زایی مجدد بعد از حذف شاخه‌ها به آسانی صورت نمی‌گرفت. ولی احتمال تراریخته‌بودن همان تعداد شاخه تولیدشده در مقایسه با ریزنمونه نوع دوم بیشتر بود. در آزمونی که در این مورد با استفاده از ۵۰ریزنمونه‌ها از هر نوع انجام گرفت (جدول ۲)، نهایتاً ریزنمونه نوع دوم که فقط سرشاخه‌های آن قطع شده بود، انتخاب گردید. با این وجود ریزنمونه نوع اول نیز برای انجام کشت مشترک قابل‌استفاده است. در این مطالعه ترجیحاً از ریزنمونه دوم استفاده شد. در واقع بعضی از ریزنمونه‌های نوع یک با این‌که خودشان در محیط انتخابی زنده ماندند، اما موفق به تولید شاخه مجدد نشدند. احتمالاً قسمت حذف‌شده شاخه‌ها خیلی زیاد بود. در ریزنمونه نوع دوم که سرشاخه‌ها حذف شد، در واقع فقط سرشاخه‌های شاخه‌هایی که رشد بیشتری داشتند و بلند بودند، حذف شده بود و تعداد شاخه زیادی که خیلی کوتاه بودند، سرشاخه آن‌ها حفظ می‌شد.

اثر وجود استوسیرینگون در محیط هم‌کشتی بر روی فراوانی تراریزش احتمالی

در این بررسی از ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط دارای استوسرینگون ۶۶درصد و از ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط فاقد استوسرینگون ۶۳درصد پس از یک ماه قرارگرفتن در محیط کشت انتخابی زنده ماندند. اگر چه کاربرد ۲۰۰میکرومولار استوسرینگون میزان زنده‌مانی شاخه‌های حاصل از هم‌کشتی را در محیط انتخابی را تا سه درصد افزایش داد، اما این میزان قابل‌توجه نیست.

جدول ۲- نتایج به‌دست‌آمده از هم‌کشتی دو نوع ریزنمونه با اگروباکتریوم

Table 2. Results of co-cultivation of two type explants with Agrobacterium

نوع ریزنمونه مورد استفاده Type of explant	تعداد ریزنمونه مورد استفاده No. of explant	تعداد ریزنمونه‌های زنده پس از یک ماه قرارگرفتن در محیط انتخابی No. of survived explants after one mounth in selective medium	تعداد کل شاخه‌های زنده و سبز یک ماه بعد از قرارگرفتن در محیط انتخابی No. of green and survived shoots after one mount in selective medium	درصد زنده‌مانی (بر اساس تعداد ریزنمونه) Percentage of survival (based on explant number)	درصد زنده‌مانی (بر اساس تعداد شاخه) Percentage of survival (based on shoot number)
ریزنمونه بدون شاخه Explant without shoots	50	45	34	90	68
ریزنمونه با شاخه Explant with shoots	50	35	40	70	80

شکل ۲- ریزنمونه مورد استفاده در کشت مشترک با سوسپانسیون اگروباکتریوم

Fig. 2. Employd explants in co-cultivation with Agrobacterium suspension

در واقع تأثیر مثبت ترکیب فنلی استوسرینگون به‌دلیل این است که فنل ژن‌های *vir* را فعال نموده و فرایند انتقال T-DNA را به سلول گیاهی تسریع می‌نماید (Sheikholeslam & Weeks, 1987)، اما از آنجاکه ترکیبات فنلی به‌میزان زیاد در عدس یافت می‌شود، خود این ترکیبات فرایند تراریزش را تحت تأثیر قرار می دهند و کاربرد استوسرینگون خارجی لزومی ندارد.

مدت‌زمان مناسب برای کشت مشترک

هر دو مدت‌زمان ۴۸ساعت و ۷۲ساعت برای دوره هم‌کشتی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج رضایت‌بخشی دربر داشت. در مورد استفاده از مدت‌زمان ۷۲ساعت این نگرانی وجود داشت که رشد سریع باکتری‌های موجود روی ریزنمونه در محیط کشت زیاد بوده و باعث آسیب‌زدن به ریزنمونه شود. اما کاربرد میزان کم از کشت باکتری (چهار میلی‌لیتر) در سوسپانسیون مورد استفاده در کشت مشترک، باعث شد که ریزنمونه در مدت سه روز کشت مشترک ریزنمونه کاملاً سالم بماند. تفاوت قابل‌توجهی بین مدت‌زمان ۴۸ساعت و ۷۲ساعت از لحاظ درصد زنده‌مانی شاخه‌ها در محیط انتخابی مشاهده نشد. دلیل نبودن تفاوت بین ۷۲ و۴۸ساعت این است که کارآیی باکتری در واقع در همان روز اول است و هرچه در توان داشته باشد، در همان مدت اعمال می‌کند. در صورت استفاده از کشت مایع ممکن است زمان کمتر هم کافی باشد، اما به‌دلیل این‌که از کشت جامد استفاده شده بود و مشکلی هم در رابطه با سلامت ریزنمونه وجود نداشت، از ۷۲ساعت استفاده شد. در واقع شاخه‌های حاصل از ریزنمونه‌های هم‌کشت‌شده با آگروباکتریوم، مرحله طویل‌شدن خود را در محیط انتخابی گذراندند. در این مدت در هر زیرکشت، شاخه‌های زردشده حذف شد و شاخه‌های سبز و نرمال به محیط انتخابی جدید حاوی هورمون‌های مرحله

طویل‌شدن یعنی چهار میکرومولار 2ip و یک میکرومولار kin با غلظت بیشتری از هیگرومایسین منتقل شدند. غلظت هیگرومایسین از سه میلی‌گرم در لیتر در اولین واکشت تا پنج میلی‌گرم در لیتر در واکشت‌های بعدی استفاده شد.

ارزیابی GUS

ارزیابی ژن *gus* به‌عنوان ژن گزارشگر در مرحله قبل از ریشه‌زایی انجام شد. نمونه برگی مورد آزمون با جواب مثبت در شکل ۳ نشان داده شده است.

شکل ۳- نمونه برگی با جواب مثبت در آزمون GUS

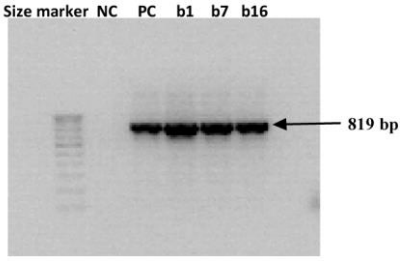
Fig. 3. Histochemical GUS staining of putative transgenic shoots

تجزیه و تحلیل PCR

واکنش PCR منجر به تکثیر یک قطعه ۱/۲کیلو بازی از ژن *uidA* (شکل ۴- الف) و یک قطعه ۸۱۹جفت‌بازی برای ژن *hpt* (شکل ۴- ب) در گیاهان تراریخته احتمالی گردید. در ضمن از شاهد مثبت (پلاسمید) و شاهد منفی (گیاه غیرتراریخته) برای کنترل صحت واکنش PCR و اطمینان از عدم آلودگی استفاده شد.

وجود ژن *uidA* از طریق PCR در گیاهان تراریخته تأیید شد (شکل۴- الف). همچنین با استفاده از آغازگرهای مرتبط با ژن *hpt* وجود این ژن نیز در گیاهان تراریخته با استفاده از PCR تأیید گردید (شکل ۴- ب).

در مطالعات قبلی از ریزنمونه‌های نوک ساقه، ریشه و قطعات گره‌های (Warkentin & McHughen, 1991, 1993)، گره کوتیلدونی öktem *et al*., 1999 & Akie*et al*. ,2009)، گره لپه‌ای Mahmoudian*et al*., 2002, (Gulati *et al*., 2002 & Sarker*et al*., 2003)، جنین سربرداری‌شده و جنین نارس (Sarker*et al*., 2003) و اپی‌کوتیل (Warkentin & McHughen, 1991, 1993) & Sarker *et al*., 2003 استفاده شده است.

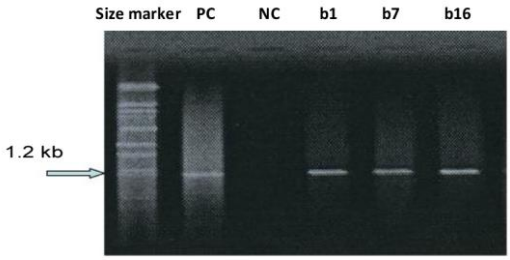


شکل ۴- الف) تکثیر قطعه ۱/۲ کیلوبازی از ژن uidA در DNA گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از پلاسمید pCAMBIA-1301

از راست به چپ: سایز مارکر، کنترل مثبت (پلاسمید)، کنترل منفی (DNAگیاه غیرتراریخته)، گیاهان تراریخته احتمالیb1، b7 و b16.

Fig. 4A. Amplified fragment of 1.2kb from uidA gene in potative transgenic lentil

Right to left: size marker, positive control (plasmid), negative control (non transgenic plant), potative transgenic plants of b1, b7 and B16



شکل ۴- ب) تکثیر قطعه ۸۱۹جفت‌بازی از ژن hpt در DNA گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از پلاسمید pCAMBIA_1301

از راست به چپ: سایز مارکر، کنترل منفی(DNA گیاه تراریخته)، کنترل مثبت (پلاسمید)، گیاهان تراریخته احتمالیb1، b7 و b16

Fig. 4B. Amplifiedfragment of 819 bp from *hpt* gene in potative transgenic lentil

Right to left: size marker, negative control(nontransgenic plant), positive control(plasmid), potative transgenic plants of b1, b7 and B16

از این ریزنمونه‌ها گره لپه‌ای، جنین سربرداری‌شده و گره کوتیلدونی بهتر از بقیه به تراریزش پاسخ داده‌اند. در هیچ‌یک از مطالعات قبلی از ریزنمونه مورد استفاده در این تحقیق استفاده نشده است. هرچند در بعضی از مطالعات قبلی گیاهان تراریخته هم تولید شده است، اما در هیچ‌کدام پژوهشگران موفق به انجام ریشه‌زایی از شاخه‌های تراریخته نشده‌اند. در موادری که به گیاه کامل دست پیدا کرده‌اند، از تکنیک ریزپیوندی شاخه‌های تراریخته روی پایه غیرتراریخته استفاده شده است (Gulati*et al*., 2002; Sarker *et al*., 2003 & Akie *et al*. ,2009). اهمیت ریزنمونه مورد استفاده در این مطالعه این است که علاوه‌بر مناسب‌بودن برای تراریزش به‌لحاظ وجود مقدار زیاد

بافت مریستمی، قابلیت خوبی هم برای باززایی دارد و طبق گزارش ZakerTavallaie *et al*, (2011) از هر ریزنمونه حداکثر تا ۴۰شاخه تولید شده است و شاخه‌ها نیز ریشه‌دهی خوبی داشته‌اند. در این مطالعه نیز شاخه‌دهی و ریشه‌زایی خوبی مشاهده شد. در مطالعه Akie *et al*., 2009) وجود استوسرینگون در موفقیت تراریزش مؤثر تشخیص داده شد، اما در این مطالعه تأثیری بر میزان تراریزش نداشت. دلیل آن می تواند محتوای بالای فنلی در عدس باشد که نیاز به استوسرینگون را مرتفع می‌سازد. البته نوع ریزنمونه و روش تراریزش و احتمالاً ژنوتیپ هم ممکن است باعث تفاوت نتیجه در مطالعه حاضر و مطالعه Akie *et al*, (2009) باشد. زیرا ممکن است محتوی فنل در بافت‌های مختلف گیاه متفاوت باشد. همچنین میزان زخم‌شدن در زیرنمونه هم میزان نیاز به استوسرینگون را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعه Gulati *et al*, (2002) استفاده از کانامایسین به‌عنوان عامل انتخابگر باعث ازبین‌رفتن تمام ریزنمونه‌ها شد. آن‌ها بیان کردند که چون میزان بیان ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز در عدس بسیار پایین است، این اتفاق افتاده است. البته در مطالعه حاضر در بخش مقدماتی مقایسه‌ای بین کانامایسین و هیگرومایسین انجام شد که هیگرومایسین مناسب‌تر تشخیص داده شد (نتایج در این مطالعه نشان داده نشده است). لذا از هیگرومایسین به‌عنوان عامل انتخابگر استفاده شد.

بدین‌ترتیب با تأیید تراریخته‌بودن گیاه در مرحله گلخانه، تراریزش عدس با استفاده از آگروباکتریوم به‌طور کامل بهینه سازی شد. امید است نتایج این پژوهش بتواند برای انجام پژوهش‌های آینده در اصلاح عدس و همچنین استفاده از آن به‌عنوان میزبان برای تولید ترکیبات دارویی و مفید با استفاده از مهندسی ژنتیک مفید واقع شود.

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. 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.
3. 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.
4. Gulati, A., Schryer, P., and McHughen, A. 2001. Regeneration and micrografting of lentil shoots. *In vitro* Cellular and Development Biology 37: 798-802.
5. 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.
6. Hay, I., Lachance, D.A., Von Aderkas, P., and Charest, P.J. 1994. Ransient chimeric gene expression in pollen of five conifer species following microparticle bombardment. Canadian Journal of Forest Research 24(12): 2417-2423.
7. 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. subspculinaris) transformed with the Agrobacterium system.Crop Pasture Science 62: 488-495.
8. Kumar, S.K., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P., and Sarker, A. 2013. Global lentil production: constraints and strategies. SATSAMukhapatra. Annual Review of Information Science and Technology 17: 1-13.
9. Maccarrone, M., Veldink, GA., Finazzi, A.A., and Vliegenthart, J.F. 1995. Lentil root protoplasts: a transient expression system suitable for coelectroporation of monoclonal antibodies and plasmid molecules. Biochimicaet Biophysica Acta 1243: 136-142.
10. 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.
11. Öktem, H.A., Mahmoudian, M., Eyidoðan, F., and Yücel, M. 1999. Gus gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. Lens Newsletter 26: 3-6.
12. 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.

13. Rajendran, S.K., Kumar, J., Hamwieh, A., and Baum, M. 2015. Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. Front Plant Science 6: 78-90.
14. 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.
15. Sheikholeslam, S.N., and Weeks, D.P. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology 8: 291-308.
16. Warkentin, T.D., and McHughen, A. 1993. Regeneration from lentil cotyledonary nodes and potential of this explant for transformation by *Agrobacterium tumefaciens.* Lens Newsletter 20: 26-28.
17. Zaker Tavallaie, 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.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 84-95

Optimization of genetic transformation in Lentil (*Lens culinaris* Medik.) using *Agrobacterium tumefaciens*

Zaker Tavallaie[1*], F., Bagheri[2], A., Ghareyazie[3], B. & Sharma[4], K.K.

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

Received: 19 January 2016
Accepted: 13 April 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.52960

Introduction

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) may have been one of the first agricultural crops grown more than 8,500 years ago and belongs to genus Lens from family leguminous and it is diploid (2n=14). Lentil is a seed propagating, self-pollinating crop originating from Near East. Lentil contains high percentage of protein, and has high nutrient value and easy digestibility. Genetic engineering has high potential to improve tolerance of lentil against biotic and abiotic stresses. Genetic engineering may also have a role in eliminating anti-nutritional factors and improving the nutritional quality of lentil proteins. Lentil can also be employed as host to produce drug using gene transformation. To date only a few reports are available on attempts to transform lentil. In this research we attempted to optimize conditions of gene transformation in lentil.

Materials & Methods

Seeds of lentil (*Lens Culinaris* Medik) variety of Gachsaran (ILL6212) were used in present investigation, collected from Shirvan Agriculture Research Center, northeast of Iran. The Explants of Cotyledon with slight part of Embryo Axes (CEA) were prepared as described in Zakertavallaie *et al*, (2011) study. The explants were kept on Shoot Induction Media (SIM) including MS media supplemented with 7.5µM 2ip, 4 µM Kin and 2 µM TDZ for 8 days. Then explants containing shoots sub cultured on MS media for another 7 days. 15 days explants containing shoots were used for co-cultivation with *Agrobacterium*. *Agrobacterium tumifaciens* strain C58 containing binary vector of pCAMBIA1301 was used for transformation experiments. This plasmid contains a reporter gene *gus* and a selectable gene *hpt*II, into T-DNA for selection of putative transgenic shoots and selectable marker gene *npt*II to select transformed bacteria in backbone sequence. Suspension of agrobacterium in 1/2 MS with 4 concentration of OD: 0.13, OD: 0.18, OD: 0.22 and OD: 0.26 was compared to use in co-cultivation media. Explants containing shoots were used for co-cultivation. There was compared two type of preparation of explants to use in co-cultivation. About some of explants, only tip of the shoots removed using scalpel but about some of them almost of shoots removed. All of explants were submerged in *Agrobacterium* suspension for 2 second and were co-cultured on shoot induction media. Cu-cultivated explants containing shoots were cultured on MS media containing 250mg/lit cefotaxim for 7 days. In this stage shoots transferred to elongation media including MS supplemented with 4µM 2ip and 1µM Kin containing 3 mg/L hygromycine to select transgenic shoots and 200 mg/lit cefotaxim to kill bacteria. The hygromycine was increased with each subculture at 7 days intervals up to 5 mg/lit and the non-health and non-green shoots were discarded in each subculture.

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

Elongation of shoots, rooting, hardening and glasshouse growth was done according to Zakertavallaie *et al*, (2011) protocol. Gus assay carried out before root induction using Hay *et al.* (2004) protocol and Blue dot were observed under microscope. DNA was extracted from leaves of both non transgenic and putative transgenic plants using modified CTAB protocol. DNA was subjected to Polymerase change reaction using the *hyg* and *gus* primers with. PCR was carried out with following condition: PCR reaction mix of 25 µl contained 2 µl genomic DNA (100ng/µl), 2.5µl 10X buffer, 2 µl $MgCl_2$ (50mM), 0.5 µl dNTP (10Mm) and 0.5 µl Taq DNA polymerase (5u/µl). The concentration of primers were also 100 pmol/ µl. in PCR amplification DNA denatured at 94ºC for 5 min then followed by 35 cycles with 1 min at 94ºC, I min at annealing temperature (for *gus* gene at 58 ºC and for *hpt* gene at 59 ºC), 1 min at 72 ºC. final extension was carried out at 72 ºC for 10 min. PCR product was run on 1.2% agarose gel and observed under UV after staining with ethidium bromide.

Results & Discussion

Explants after shoot induction were prepared for co-cultivation. Co-cultivation period was 72 hours. Concentration of Agrobacterium was important. Acetoceringone has no effect on success of gene transformation. Concentrations of 3 to 5 mg/lit hygromycine were suitable for selection media in shooting stage. Gus assay confirmed gene transformation in putative transgenic shoots. Also PCR reaction confirmed existence of *gus* and *hpt* genes in plants.

Conclusion

The employed protocol in this research can be used for gene transformation of lentil using another gene to improve it about other treats such as enhancement of tolerance to biotic and abiotic stresses.

Key words: Genetic engineering, Gus gene, Lentil (*Lens culinaris* Medik.), Regeneration, Transgenic plant