Crop Biotech.
Vol.2, No. 2, Spring and Summer 2012

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره دوم، بهار و تابستان ۱۳۹۱ (۶۲-۴۹)

ترانسفورماسیون پایدار و آسان جنین بالغ برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از روش *In planta*

صدیقه نصررمزی[۱]، محمدمهدی سوهانی[۲]*، سیدحسن حسنی[۳] و جعفر اصغری[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، استادیار بیولوژی سلولی، استادیار بیوشیمی و دانشیار فیزیولوژی علف‌های هرز، دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

A Stable and Simple Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Mature Embryo using *in planta* Method

S. NASR-RAMZI[1], M. M. SOHANI[2]*, S. H. HASSANI[3] AND J. ASGHARI[4]
1, 2, 3, 4, M.Sc of Agricultural Biotechnology, Assistant Professor of Molecular Biology, Assistant Professor of Biochemistry and Associate Professor of Weed Physiology, University of Guilan
(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

Abstract

Agrobacterium-mediated transformation technique is a powerful and essential tool for genetic transformation and transgenic plant production such as transgenic rice. In this study, an *in planta* transformation method was used for rice plants transformation. First, rice seeds were soaked for two days and the mature rice embryos were inoculated by means of an *Agrobacterium* coated needle. An experiment with factorial design including two strains of *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105 and LBA4404) harboring pCAMBIAl105.1R, three levels of acetosyringone (0, 100 and 200 µM), three cultivars of rice (Hashemi, Hasani and Gharib) and two treatments of vacuumed and non-vacuumed operations was carried out in a Completely Randomized Design with three replications. Integration of the transgene into the genome of putative transgenic rice plants were confirmed using resistance of leaf tissues to Hygromycin, the histiochemical GUS assay and PCR with at least three different genes. The results obtained revealed that EHA105 strain and Hashemi cultivar, in presence of 100 µM acetosyringone in a *vir* genes induction medium and by using vacuum had the highest transformation efficiency of 37.46%. The stability of transformation was further analysed in T_1 generation, with 21% of genotypes confirmed transgenic.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Acetosyrmgone, Virulence genes, *Oryza sativa* L. var. *indica*

چکیده

ترانسفورماسیون ژنتیکی برنج با استفاده از آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) رویکردی مطلوب، ضروری و قدرتمند برای انتقال‌ژن به گیاهان زراعی می‌باشد. در این پژوهش به‌منظور ترانسفورماسیون گیاهان برنج از روش *In planta* استفاده شد. بر این اساس، بذور برنج به‌مدت دو روز خیسانده شدند و سپس سمت مریستم انتهایی بذر که جنین بالغ برنج وجود دارد، در مراحل اولیه جوانه‌زنی با سوزن آغشته به محلول آگروباکتریوم زخم‌زنی و تلقیح شد. آزمایش با دو سویه آگروباکتریوم (EHA105 و LBA4404) حاوی پلاسمید pCAMBIAl105.1R، سه غلظت استوسیرینگون (۲۰۰µM، ۱۰۰ و ۰)، سه رقم برنج (هاشمی، حسنی و غریب) و دو روش وکیوم و بدون وکیوم به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از آزمون مقاومت بافت‌های برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین، آزمون بافت شیمیایی GUS و واکنش PCR با حداقل سه ژن مختلف بررسی شد. در نهایت، سویه EHA105 در رقم هاشمی، با حضور ۱۰۰µM استوسرینگون همراه با استفاده از وکیوم بالاترین کارایی ترانسفورماسیون (۳۷/۴۶٪) را نشان دادند. پایداری ترانس‌ژن در نسل بعد بررسی و به این‌منظور ۶۰ گیاه از نسل T_1 با استفاده از سه تست اشاره‌شده آزمون و ترانسفورماسیون‌بودن ۲۱٪ آن‌ها تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium tumefaciens*، استوسرینگون، ژن‌های بیماری‌زا، *Oryza sativa* L. var. *indica*

* نویسنده مسئول: محمدمهدی سوهانی
E-mail: msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، از انواع گرم منفی و خاکزی است. در شرایط طبیعی، زخم‌های گیاه، مکانی را برای آلوده‌سازی مهیا می‌کنند و باکتری با انتقال قسمتی از DNA پلاسمید خود (T-DNA) به ژنوم گیاه، منجر به آلوده‌شدن آن می‌شود. این باکتری علاوه بر گیاه، قابلیت انتقال ژن را تقریباً به هر سلول زنده‌ای از جمله پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها دارد (Danilova. 2007; Tzfira. 2004).

ترانسفورماسیون با آگروباکتریوم یک روش ترجیحی برای انتقال ژن‌ها به دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهان زراعی از جمله برنج می‌باشد. ترانسفورماسیون با آگروباکتریوم به‌دلیل دست‌کاری آسان، راندمان بالا، تعداد نسخه کم ترانس‌ژن در ژنوم میزبان و هزینه کم روش باارزشی است (Gelvin. 2006; Gould. 1996; Hiei *et al*. 1997).

در حال حاضر یکی از تکنیک‌های رایج ترانسفورماسیون غلات به‌خصوص برنج استفاده از آگروباکتریوم بر پایه تکنیک‌های کشت‌بافت است (Hiei *et al*. 2008). اما، علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در سیستم کشت‌بافت در خصوص کاهش تولید گیاهان شیمر، همچنان انتخاب تک‌سلول‌های ترانسفورم‌شده و باززایی آن‌ها به گیاه کامل با وقوع بالای تنوع سوماکلونال همراه است. تکنیک‌های کشت‌بافت به‌دلیل تأثیرات اپی‌ژنتیکی و نوترکیبی کروموزومی بر سلول‌های میزبان سبب وقوع این پدیده می‌شود (Finnegan *et al*. 2000; Mohan. 2001). به‌عنوان مثال، در یک آزمایش تعدادی ژنوتیپ برنج با استفاده از تکنیک کشت‌بافت به‌دست آمد که بیش از ۲۰۰تای آن‌ها دارای تنوع سوماکلونال بودند (An *et al*. 2005). علاوه بر این، در روش کشت‌بافت نیاز به شرایط استریل است و باززایی برخی از گیاهان در این روش به‌سختی انجام می‌شود. روش دیگر استفاده از آگروباکتریوم در ترانسفورماسیون گیاهان، روش *in planta* است که در شرایط *in vivo* انجام می‌شود، نیازی به کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی وجود ندارد و در بسیاری موارد توانایی ترانسفورم‌نمودن گیاهان تحت آزمایش را دارد. با استفاده از روش *in planta* تنوع سوماکلونال به حداقل رسیده و به‌طور قابل توجهی در زمان، هزینه‌ها و مراحل طولانی کشت‌بافت صرفه‌جویی می‌شود (Rashid *et al*. 1996; Supartana *et al*. 2005; Supartana *et al*. 2006). این روش برای گیاهانی که در زمینه کشت‌بافت و باززایی سرسخت هستند (مانند گیاه برنج) بسیار مفید بوده و می‌تواند جایگزین روش کشت‌بافت شود. استفاده از این روش در غلاتی مانند برنج (Supartana *et al*. 2005; Lin *et al*. 2009)، ذرت (Chumakov *et al*. 2006)، گندم (Supartana *et al*. 2006)، گندم سیاه (Bratic *et al*. 2007) گزارش شده است.

قابل ذکر است هدف این پژوهش بررسی و مطالعه تأثیر فاکتورهای مؤثر بر کارایی ترانسفورماسیون گیاه برنج شامل ارقام بومی مختلف هاشمی، غریب و حسنی، یک محیط کشت القاءکننده ژن‌های بیماری‌زا[1] (*vir*)، دو سویه مختلف باکتری *A.tumefaciens*، استفاده از شرایط خلأ برای تلقیح در روش *in planta* با استفاده از سه آزمون مقاومت بافت‌های برگ به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین، رنگ‌آمیزی برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش PCR بود. همچنین پایداری ترانس‌ژن در نسل T_1 ارزیابی و مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه‌های باکتری، پلاسمید و مواد مورد استفاده

در این پژوهش ارقام محلی برنج هاشمی، حسنی و غریب از موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، تهیه

1. Virulence gene (*vir* gene)

شد. دو سویه آگروباکتریوم EHA105، (Hood *et al.* 1993) و LBA4404 (Hoekema*et al.* 1983) حامل پلاسمید گیاهی pCAMBIA1105.IR (کامبیا[1]، کانبرا، استرالیا، با شماره دسترسی بانک ژن AF354045) جهت ترانسفورماسیون استفاده شد. این ناقل حاوی ژن مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*) به‌منظور انتخاب بافت‌های گیاهی تراریخت‌شده و همچنین حاوی ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS-Plus*) با اینترون چالکون سینتاز[2] در نزدیک پایانه ′۵ می‌باشد و حاوی پروموتور قوی CaMV35S در ناحیه T-DNA است. ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (*aadA1*) به‌منظور گزینش باکتری‌های تراریخت‌شده نیز در خارج T-DNA وجود دارد.

آنتی‌بیوتیک‌های ایگرومایسین [3] (Hyg)، ونکومیسین[4] (Van) و ریفامپیسین[5] (Rif) و مواد شیمیایی 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide (X-Gluc) و 4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone (استوسیرینگون،AS) از شرکت سیگما[6]، اسپکتینومایسین[7] (Spec) و سفاتوکسیم[8] (Cef) از شرکت داروپخش تهیه و خریداری شدند. مواد شیمیایی مورد نیاز برای تهیه محیط‌های کشت باکتری و محلول یوشیدا از شرکت مرک[9] خریداری شدند.

ترانسفورماسیون بذور با آگروباکتریوم

به‌منظور انجام ترانسفورماسیون، ابتدا بذور ارقام مختلف برنج با استفاده از اتانل ۹۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه و سپس هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ به‌مدت ۲۰–۱۵ دقیقه ضدعفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر اتوکلاوشده، آبکشی شدند. بذور به‌مدت دو روز در تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در بین کاغذهای صافی درون ظرف پتری قرار گرفتند و رطوبت کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت تا جوانه بزنند و سفیدی حاصل از رشد ریشه‌چه در آن‌ها ظاهر شود.

سویه‌های باکتری براساس روش Gelvin (2006) طی سه مرحله و در سه محیط به‌صورت جداگانه کشت داده شدند. بر این اساس، یک کلونی از کشت جامد جدا و در محیط کشت مایع LB (۱۰g/L پپتون، ۱۰g/L عصاره مخمر، NaCl ۵g/L، pH=۷) همراه با آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (۱۰۰µg/ml) و اسپکتینومایسین (۱۰۰µg/ml) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۲۵۰rpm به‌مدت ۱۶ ساعت در داخل شیکر انکوباتور کشت داده شدند. مقدار ۰/۵ml از باکتری‌های رشدیافته در مرحله اول به‌۵۰ ml از محیط کشت AB (۵۰ml بافر 20XAB، ۵۰ ml محلول نمک 20XAB و ساکارز ۰/۵٪ در حجم کل ۱ لیتر) همراه با همان آنتی‌بیوتیک‌ها اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰rpm به‌مدت ۱۶ ساعت کشت شدند تا OD_{600} باکتری به حدود ۱–۰/۸ برسد. سپس محیط کشت AB در ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و محیط کشت کاملاً خارج شد. نمک 20XAB شامل NH_4Cl ۲۰gr/L، $7H_2OMgSO_4$ ۶gr/L، KCl ۳gr/L، $CaCl_2$ ۲gr/L و $FeSO_47H_2Omg$ ۵۰ می‌باشد و بافر 20XAB شامل K_2HPO_4 ۶۰gr/L و NaH_2PO_4 ۲۰gr/L است که قبل از اتوکلاو، pH آن روی ۷ تنظیم می‌شود. به‌منظور القاء ژن‌های بیماری‌زا در آگروباکتریوم، باکتری رسوب‌داده شده از مرحله قبل در ۱۰۰ml از محیط کشت القایی (نمک XAB ۱، بافر فسفات ۲mM در pH=۵/۶، mM ۵۰ 2-(4-morpholino)-ethansulfunic acid (MES)، گلوکز ۰/۵٪) حل و ترکیب فنولیک

1. Cambia
2. Chalcone synthases
3. Hygromycin
4. Vancomycin
5. Rifampicin
6. Sigma
7. Spectinomycin
8. Cefotaxime
9. Merck

استوسرینگون در غلظت‌های نهایی ۲۰۰ µM، ۱۰۰ µM و ۰µM در درون محیط کشت القایی اضافه شد. باکتری‌ها به‌مدت ۲۴-۱۴ ساعت، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۰ rpm کشت شدند.

جهت تلقیح بذور با آگروباکتریوم، از یک سوزن به قطر ۰/۵ میلی‌متر استفاده شد. به این منظور ناحیه جنینی بذر جوانه‌زده با سوزن آغشته به هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم تا عمق حدود یک میلی‌متری سوراخ شد. سپس نیمی از بذور تلقیح‌شده با هر کدام از دو سویه آگروباکتریوم، به‌طور جداگانه تحت شرایط خلأ، با استفاده از دستگاه وکیوم (Eppendorf, Concentrator plus) در دمای محیط و تا زمان جوش‌آمدن محلول درون محیط کشت القایی قرار گرفتند. بذور تلقیح‌شده در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، در شرایط تاریکی، به‌مدت ۹ روز نگه‌داری تا جوانه بزنند و بعد از این مدت به منظور حذف باکتری با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۱۰۰۰mg/L) و ونکومایسین (۱۰۰۰mg/L)به‌مدت یک ساعت تیمار شدند (Bechtold *et al*. 1993).

گیاهچه‌های حاصل در شرایط آبکشت در محیط تغذیه‌ای یوشیدا[1] [NH_4NO_3 ۱/۴mM، ۰/۲۳mM NaH_2PO_4، ۰/۵۱mM K_2SO_4، ۱mM $CaCl_2$، ۱/۷mM $MgSO_4$، ۱۲mM $MnCl_2$، ۰/۰۷۵mM $(NH_4)6Mo_7O_{24}$، ۱۹mM H_3BO، ۰/۱۵mM $ZnSO_4$، ۰/۱۵mM $CuSO_4$، ۳۶mM $FeCl_3$ و ۷۸mM اسیدسیتریک] (Yoshida *et al*. 1971) کشت شدند. محیط کشت مذکور که با غلظت ۸۰۰ برابر می‌باشد در pH=۵ تنظیم و هر دو روز یک‌بار محلول غذایی گیاهان تعویض شد. پس از تقویت سیستم ریشه‌ها، گیاهچه‌ها وارد گلدان و در نهایت به گلخانه انتقال یافتند.

1. Yoshida

واکنش PCR

استخراج DNA از جوان‌ترین برگ گیاهچه‌ها با روش CTAB تغییریافته انجام شد (Clarke. 2009). توالی‌های موجود در بخش T-DNA وکتور شامل آغازگر CaMV35S، ترمیناتور nos، ژن *GUS-Plus*، ژن‌های مقاومت به Hyg و Spec، جهت آنالیز گیاهان ترانسفورم‌شده، استفاده شد. پرایمر توالی‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu) طراحی شد (جدول ۱). واکنش‌های PCR شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، آغازگرهای رفتی و برگشتی (۱۰pmoles) هر کدام ۱ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰mM)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، 10X buffer و ۰/۳ میکرولیتر polymerase*Taq* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده و محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

رنگ‌آمیزی برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز

آزمایش هیستوشیمیایی GUS برای نمونه‌های ترانسفورم‌شده با روش جفرسن انجام شد (Jefferson. 1987). تأثیر آنزیم GUS روی سوبسترای مربوط (X-gluc) سبب تبدیل فراورده واکنش به رنگ آبی در نمونه‌های تراریخت می‌شود. بر این اساس ابتدا قطعات برگی در محلول رنگ‌دهی (X-Gluc, ۰/۵mg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ ساعت و سپس داخل محلول تثبیت‌کننده (اتانل ۵۰٪، فرمالدهید ۱۰٪، اسیداستیک ۱۰٪) در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده و بعد از حذف محلول فوق در اتانل ۷۰٪ نگه‌داری شد. درنهایت نمونه‌ها برای تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز و ظهور رنگ آبی زیر میکروسکوپ بررسی شدند.

آزمون مقاومت بافت‌های برگ به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین

در این آزمون ابتدا قطعات برگی به طول حدود ۲ سانتی‌متر از هر گیاه جدا شده و درون محلول حاوی 6-benzylaminopurine (BAP) با غلظت ۰/۱ mg/L و Hyg با غلظت ۵۰ mg/L غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. در این آزمایش شاهد گیاهان غیرترانسفورم بوده‌اند. براساس این آزمون نمونه‌های برگی گیاهان تراریخت رنگ سبز خود را حفظ و نمونه‌های شاهد زرد رنگ و علائمی از نکروز خواهند داشت (Wang and Waterhouse. 1997).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش با دو سویه آگروباکتریوم (EHA105 و LBA4404) حاوی پلاسمید pCAMBIAl 105.1R، سه غلظت AS (۲۰۰ µM، ۱۰۰، ۰)، سه رقم برنج (هاشمی، حسنی و غریب) و دو روش وکیوم و بدون‌وکیوم به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و هر تکرار شامل ۵ بذر انجام و داده‌های آزمایش با استفاده از نسخه ۹ نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. تمام نمودارها با استفاده از برنامه Excel (2010) رسم شدند.

نتایج و بحث

جهت آنالیز و تأیید ترانس‌ژنیک‌بودن نمونه‌های گیاهی (در نسل T_0 و T_1) ابتدا به روش شرح داده شده در بخش مواد و روش‌ها، تست HYG روی نمونه‌ها انجام شد. این آزمایش به نسبت گران، اما مزیت عمده آسانی و سرعت آن می‌باشد. پس از آن گیاهان غیرترانسفورم حذف و بقیه جهت تست هیستوشیمیایی GUS آزمون شدند. در مرحله بعد فقط گیاهانی که نتیجه هر دو آزمون HYG و GUS آن‌ها مثبت بوده است، تراریخته تلقی شدند و آزمون‌های PCR روی آن‌ها انجام شد. واکنش PCR برای ژن Spec و برای نمونه‌های مثبت باقی‌مانده انجام شد و تنها انواعی که فاقد باند بوده‌اند فاقد آلودگی باکتریایی تلقی شده، جهت ادامه کار از آن‌ها استفاده شد. در ادامه تست PCR برای چهار ژن باقی‌مانده (جدول۱) انجام شد تا صحت آزمون‌های قبلی تأیید شود.

براساس پرایمرهای طراحی‌شده (جدول ۱) تکثیر ترمیناتور nos یک قطعه به‌طول ۱۷۰bp (شکل ۱، A)، ژن GUS-Plus یک قطعه به‌طول ۴۴۵bp (شکل ۱، B)، ژن مقاومت به هایگروماسین یک قطعه به‌طول ۴۸۰bp (شکل ۱، C) و پرومتور CaMV35S یک قطعه به‌طول ۴۵۰bp (شکل ۱، D) را تولید می‌کند.

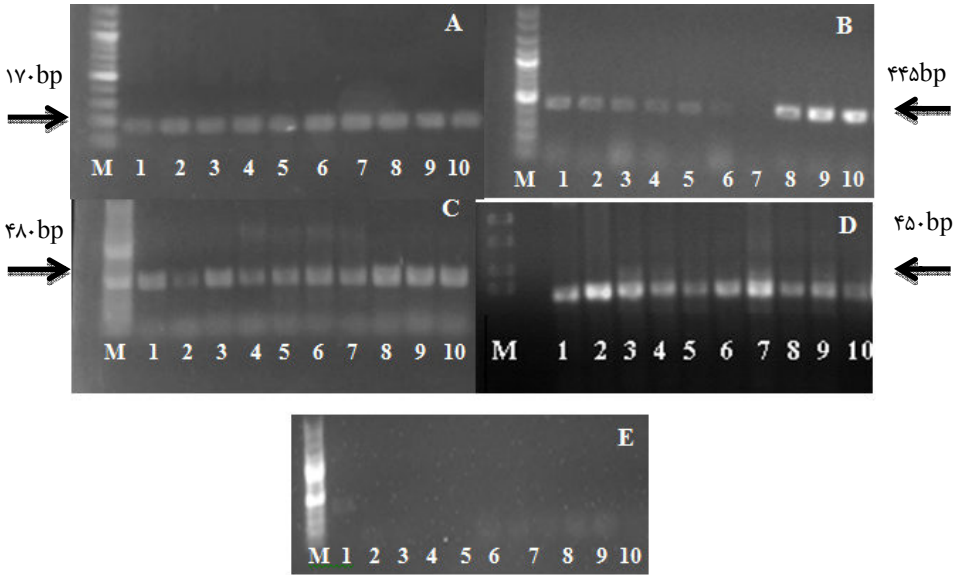
از آن‌جا که ژن مقاومت به Spec خارج از ناحیه T-DNA انتقالی قرار دارد، ژن فوق در گیاهان ترانسفورم‌شده واقعی تکثیر نمی‌شود. بررسی تکثیر این ژن کمک می‌کند که بتوان تشخیص داد باندهای حاصل از PCR قطعات مختلف وکتور، حاصل از آلودگی‌های باکتریایی گیاهچه‌ها نیست (شکل ۱، E). در این آزمایش احتمال حذف کامل باکتری آگروباکتریوم بعد از ترانسفورماسیون به‌طریق دیگر نیز بررسی شد. پس از تیمار گیاهچه‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های Cef و Van، قطعات برگی از گیاهان T_0 تهیه و در ۱ میلی‌لیتر آب استریل در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری آسیاب شد، ۱۰۰µl از محلول فوق بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت LB و آنتی‌بیوتیک Spec به‌مدت سه روز کشت شدند. عدم‌تشکیل کلونی نشان‌دهنده حذف کامل آگروباکتریوم از بافت‌های گیاهی تلقیح‌شده بوده است. نتایج حاصل با نتایج PCR مقایسه شد و تقریباً در تمام موارد هیچ کلونی روی پلیت از گیاهان فاقد باند تشکیل نشد که نشان داد PCR برای ارزیابی کفایت می‌کند. لذا این آزمون فقط برای ۳۰ گیاهچه انجام شد و در سایر موارد نتایج PCR ملاک قضاوت قرار گرفت. نتایج PCR با استفاده از ژل آگارز بررسی شد. به‌منظور صرفه‌جویی در فضا

فقط واکنش PCR ۱۰ عدد از گیاهچه‌های ترانسفورم در تیمار سویه EHA105، در غلظت ۱۰۰µM استوسرینگون با اعمال وکیوم رقم هاشمی نشان داده شده است و واکنش‌های PCR سایر تیمارها نشان داده نشدند. در نهایت نمونه‌هایی که باندهای مورد نظر را تکثیر کرده‌اند، PCR مثبت و به‌عنوان گیاه تراریخت تلقی شدند.

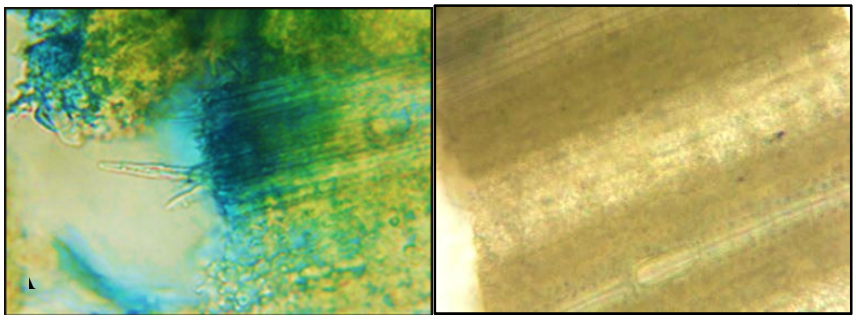
آزمون GUS از نمونه‌های برگی انجام شد و بافت‌های برگی زیر میکروسکوپ برای بیان‌ژن بتاگلوکورونیداز بررسی شدند. ظهور رنگ آبی در نمونه‌ها تأییدکننده صحت ترانسفورماسیون آن‌ها بوده است (شکل ۲).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی ترانسفورماسیون گیاه برنج

آغازگر	توالی	طول محصول PCR (bp)	Tm (°C)
For-CaMV35s	5'-AAC TCG CCG TGA AGA CTG G-3′	450	58.8
Rev-CaMV35s	5'-GTC TTG CGA AGG ATA GTG G-3′		56.7
For-GUS	5'-CCG TCC CAA GCA GTT ACA A-3′	445	63.7
Rev-GUS	5'-GGT CAC AAC CGA GAT GTC C-3′		64
For-nos	5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT T-3′	170	64
Rev-nos	5'-TTG CGC GCT ATA TTT TGT T-3′		63.1
For-Hyg	5'-GAT GTT GGC GAC CTC GTA T-3′	480	63.7
Rev-Hyg	5'-GTG CTT GAC ATT GGG GAG T-3′		63.9
For-Spec	5'-ATT TGC CGA CTA CCT TGG T-3′	373	63.7
Rev-Spec	5'-GAA CAT AGC GTT GCC TTG G-3′		63.9

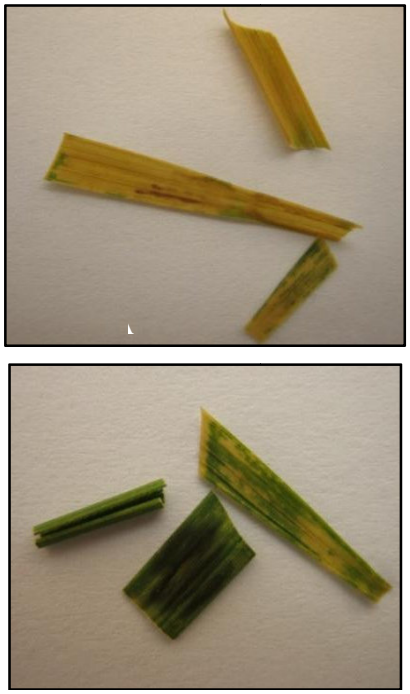


شکل ۱- واکنش PCR گیاهچه‌های ترانسفورم‌شده در تیمار سویه EHA105 در غلظت ۱۰۰µM استوسرینگون با اعمال وکیوم رقم هاشمی در نسل T_0. به‌منظور صرفه‌جویی در فضا واکنش‌های PCR سایر تیمارها نشان داده نشده‌اند، A) تکثیر باند ۱۷۰bp از ترمیناتور *nos*، B) تکثیر باند ۴۴۵bp از ژن *GUS-Plus*، C) تکثیر باند ۴۸۰bp از ژن مقاومت به هایگرومایسین، D) تکثیر باند ۴۵۰bp از پرومتور CaMV35S و E) عدم‌تکثیر باند ۳۷۳bp از ژن مقاومت به اسپکتینومایسین. M) مارکر و شماره‌ها مربوط به نمونه‌های گیاهی مورد آزمون می‌باشند.



شکل ۲- بیان ژن بتاگلوکورونیداز با ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم‌شده (A) و نمونه شاهد (B)

آزمون مقاومت بافت‌های برگ برنج به آنتی‌بیوتیک Hyg انجام شد. بعد از گذشت ۷ روز قطعات برگ گیاهان حساس و غیرترانسفورم زرد رنگ شده و علائم نکروز در آن‌ها ظاهر شد. قطعات برگی گیاهان ترانسفورم‌شده عمدتاً سبز رنگ باقی ماندند. بافت‌های برگی مقاوم و ترانسفورم مدت‌ها حتی پس از پایان آزمایش همچنان رنگ سبز خود را حفظ کردند (شکل ۳).



شکل ۳- آزمون مقاومت بافت برگ برنج به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین ۷ روز پس از شروع آزمایش. A) نمونه شاهد و گیاهان غیرترانسفورم همراه با ظهور رنگ زرد و لکه‌های نکروزه، B) حفظ رنگ سبز در قطعات برگ نمونه‌های ترانسفورم‌شده.

قابل ذکر است که جهت تأیید ترانس‌ژنیک‌بودن نمونه‌های گیاهی ابتدا تست HYG روی نمونه‌ها انجام شد. گیاهان غیرترانسفورم حذف و بقیه جهت تست هیستوشیمیایی GUS آزمون شدند. واکنش PCR برای نمونه‌های مثبت باقی‌مانده انجام شد. در نهایت نمونه‌های با تکثیر باند موردنظر ترانسفورم تلقی شدند.

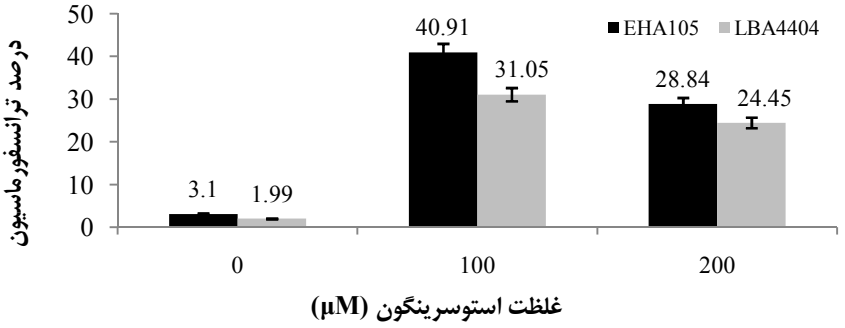
اثرات متقابل سطوح AS و باکتری بر کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از سه آزمون PCR، گاس و Hyg نشان دادند که سویه EHA105 در غلظت ۱۰۰µM از AS دارای بیشترین کارایی معادل ۴۰/۹۱٪ و بعد از آن به ترتیب دو غلظت ۲۰۰µM و ۰ µM از AS به‌ترتیب دارای کارایی ۲۸/۸۴٪ و ۳/۱٪ هستند. سویه LBA4404 در غلظت ۱۰۰µM از AS بیشترین کارایی معادل ۳۱/۰۵٪ و سپس مقادیر ۲۰۰µM و ۰ µM از AS به‌ترتیب کارایی ۲۴/۴۵٪ و ۱/۹۹٪ را نشان دادند (شکل ۴).

اثرات متقابل سطوح AS و رقم بر کارایی ترانسفورماسیون نشان دادند که رقم هاشمی همراه با غلظت ۱۰۰µM از AS با کارایی ۴۰/۵۱٪ نسبت به دو رقم غریب (۳۸/۲۴٪) و حسنی (۳۷/۰۱٪) در همان غلظت AS کارایی بالاتری داشته است که این مقدار از نظر آماری در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (شکل۵).

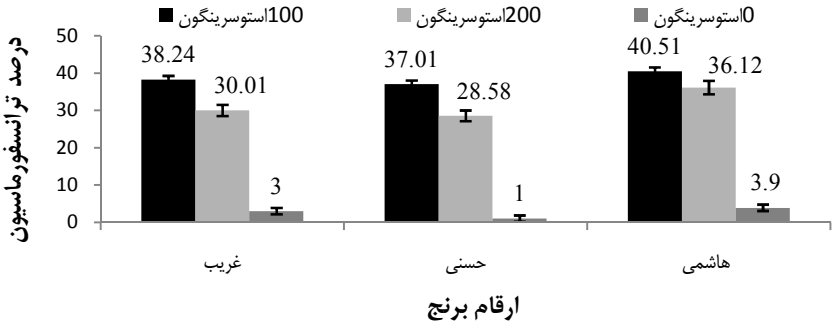
اثر متقابل سطوح AS و وکیوم بر کارایی ترانسفورماسیون نشان داد که بیشترین کارایی ترانسفورماسیون در غلظت ۱۰۰µM از AS همراه با

اعمال وکیوم ۳۶/۷۶٪، درحالی‌که در فقدان وکیوم کارایی ۲۹/۳۷٪ بوده است. در غلظت ۲۰۰µM از ASکارایی همراه با وکیوم ۲۰/۹۹٪ و بدون آن ۱۸/۰۳٪ بوده است. کارایی ترانسفورماسیون در فقدان AS همراه با وکیوم ۳٪ و بدون‌وکیوم ۱/۳٪ بوده است (شکل ۶).

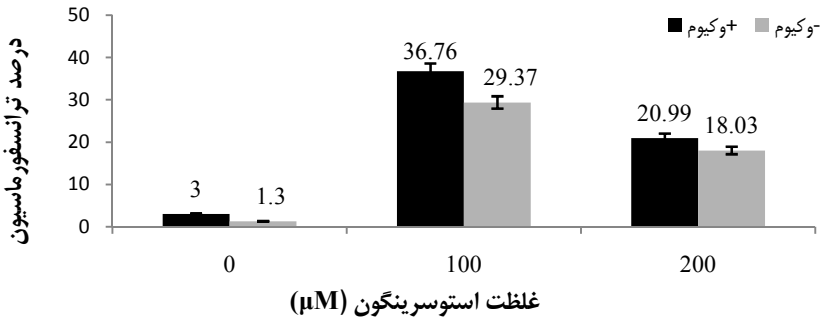
بررسی ارقام مختلف تلقیح‌شده با آگروباکتریوم نشان داد که درصد کارایی ترانسفورماسیون رقم هاشمی (۴۵/۷٪) نسبت به مقدار آن در ارقام غریب (۳۹/۸٪) و حسنی (۳۰/۸٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر است. ضمن اینکه اثر متقابل باکتری × رقم معنی‌دار نبوده است. در یک آزمایش ریزآرایه‌ها روی سوسپانسیون سلول‌های تنباکو تعدادی از ژن‌های مرتبط با دفاع گیاهی و تقسیم یا رشد سلولی



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری و استوسرینگون بر درصد کارایی ترانسفورماسیون



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و استوسرینگون بر درصد کارایی ترانسفورماسیون



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل استوسرینگون و وکیوم بر درصد کارایی ترانسفورماسیون

شناسایی شد که در مراحل اولیه ترانسفورماسیون گیاه با آگروباکتریوم به‌طور افتراقی بیان شده بودند (Veena *et al*. 2003). سنجش‌های آلودگی سلول‌ها با آگروباکتریوم نژادهای "مستعد انتقال" (دارای توانایی انتقال T-DNA و پروتئین‌های *vir*) و "نقص انتقال" (فاقد پلاسمیدهای Ti و ناتوان در انتقال T-DNA) نشان داد که سلول‌های گیاهی پس از ۶ ساعت پاسخ داده و منجر به غیرفعال‌شدن ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی گردید. جالب اینکه، در مراحل دیرتر (۳۶-۲۴ ساعت) از تلقیح با نژادهای با "نقص انتقال" ژن‌های مذکور به‌طور معنی‌داری فعال شده، درحالی‌که سلول‌هایی که با نژادهای "مستعد انتقال" تلقیح شده بود، همچنان سرکوب ماند (Veena *et al*. 2003). سرکوب ژن‌های دفاعی در طی آلودگی با نژادهای مختلف "مستعد انتقال" در سایر آزمایشات نیز مشاهده شد که واکنش‌های دفاعی در یک ترانسفورماسیون موفق سرکوب می‌شود (Ditt *et al*. 2005). در آزمایش حاضر، هر کدام از سویه‌های باکتری دارای کارایی یکسان در سرکوب و یا تأخیر در فعال‌شدن ژن‌های بیماری‌زایی در رقم هاشمی بوده‌اند. میزان سرکوب ژن‌های بیماری‌زایی در رقم هاشمی احتمالاً بیشتر از دو رقم دیگر بوده و میزان بیان آن‌ها به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است. احتمال دیگر، تأخیر در فعال‌شدن این ژن‌ها در رقم هاشمی در مقایسه با دو رقم دیگر بوده است، لذا باکتری موفق به بهره‌برداری بهتر از ماشین سلول میزبان در این رقم شده است.

هر دو سویه EHA105 و LBA4404 در گیاهان و آزمایش‌های مختلف سویه‌های مناسب برای ترانسفورماسیون غلات معرفی شده‌اند (Hellens *et al*. 2000). اما در این آزمایش و در ارتباط با سه رقم مورد استفاده کارایی ترانسفورماسیون سویه EHA105 به‌طور معنی‌داری بالاتر از سویه LBA4404 بوده است. سویه‌ی EHA105 به‌دلیل داشتن ژن‌های اضافی بیماری‌زا نسبت به سویه LBA4404، فوق بیماری‌زا با دامنه میزبانی وسیع می‌باشد. در ترانسفورماسیون اغلب از سویه‌های با قدرت بیماری‌زا بالا و سرعت رشد سریع استفاده می‌شود (Veluthambi *et al*. 2003).

ترانسفورماسیون با استفاده از آگروباکتریوم نیازمند فعال‌شدن ژن‌های *vir* است. این ژن‌ها را سیگنال‌های شیمیایی نظیر ترکیبات فنولیک القاء می‌کنند که به‌طور طبیعی در مکان زخم سنتز می‌شوند (Peng *et al*. 1998). القاء ژن‌های بیماری‌زا در شرایط *in vitro* از طریق افزودن ترکیبات شیمیایی القاگر انجام می‌شود که منجر به گسترش فرایند ترانسفورماسیون به گیاهان غیرحساس به آگروباکتریوم می‌شود (McCullen and Binns. 2006). استفاده از ترکیب شیمیایی القاگر نظیر AS برای القای ژن‌های بیماری‌زا در بسیاری از دستورالعمل‌های مورد استفاده برای ترانسفورماسیون غلات توصیه شده است (Rashid *et al*. 2010; Zhao *et al*. 2001). اگرچه ترکیبات القاگر مختلفی مانند کنیفریل الکل[1]، کنیفرین[2] و اتیل فریولیت[3] نیز وجود دارند ولی AS ارجحیت دارد زیرا در غلظت‌های کم مؤثر است، نسبت به بقیه ترکیبات القاگر خاصیت القاءکنندگی بیشتری داشته، از نظر تجاری در دسترس و دارای قیمت کمتری است (Dye *et al*. 1997; Gelvin. 2006).

القاء ژن‌های ناحیه بیماری‌زا تحت شرایط اسیدی (حدود pH=۵/۵) رخ می‌دهد، که معمولاً pH اطراف ریزوسفر است و القاء بسیار کمی در pH خنثی اتفاق می‌افتد. استفاده از محیط‌های کشت غنی که دارای pH=۷/۵ است برای القاء اشتباه بوده و حتی تنظیم pH آن‌ها نیز مؤثر نیست (Liu *et al*. 1993; Fierer and Jackson. 2006). بر این اساس، در این آزمایش از محیط کشت "حداقل" تحت شرایط

1. Coniferyl alcohol
2. Coniferin
3. Ethyl ferulate

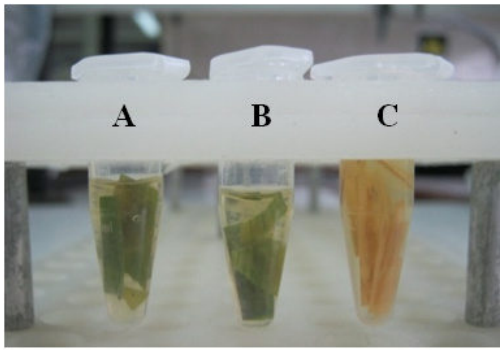
اسیدی استفاده شد. ثابت شده است که AS نیز در دامنه اسیدی ۵/۵–۵ دارای بالاترین تأثیر در القاء این ژن‌ها است (Yuan *et al*. 2007). از طرفی دمای بهینه القاء ژن‌های *vir* به میزان ۲۵°C است که عموماً پایین‌تر از مقدار آن برای رشد رویشی بهینه آگروباکتریوم (۲۸°C) است (Alt-Moerbe *et al*. 1988). در پروتکل حاضر از محیط کشت ½ MS جهت تهیه اینوکولوم استفاده شد درحالی‌که در برخی از آزمایشات آب پیشنهاد می‌شود.

در این پژوهش از غلظت‌های مختلف AS استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده بیشترین کارایی ترانسفورماسیون برای غلظت ۱۰۰µM از As بود. غلظت ۲۰۰µM دارای کارایی متوسط و در نهایت کم‌ترین کارایی ترانسفورماسیون مربوط به سطح بدون استفاده از AS بود. غلظت ۱۰۰µM AS به‌عنوان غلظت مؤثر بر القاء ژن‌های بیماری‌زا است (Anand *et al*. 2008). به‌منظور ترانسفورماسیون ارقام برنج تیپ ایندیکا در شرایط *in vitro*، سویه EHA105 و غلظت ۱۰۰µM از AS، یک شرایط بهینه در ترانسفورماسیون معرفی شده است (Hiei *et al*. 2006; Hiei *et al*. 2008; Kumar *et al*. 2005).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از وکیوم به‌مدت ۳–۲ دقیقه پس از انجام تلقیح بذور، منجر به افزایش کارایی ترانسفورماسیون شد که احتمالاً به سبب بهبود راندمان ورود باکتری به داخل سلول‌های گیاهی بوده است. اولین گزارش مربوط به استفاده از وکیوم جهت ترانسفورماسیون، مربوط به گیاه آرابیدوپسیس است (Bechtold *et al*. 1993). استفاده از وکیوم جهت تلقیح، در گیاهان دیگر از قبیل کلزا (Wang *et al*. 2003; Jin *et al*. 2004; Xu *et al*. 2004)، کلم (Liu *et al*. 1998)، لوبیا (Liu *et al*. 2005)، تربچه (Curtis and Nam. 2001) و برنج (Lin *et al*. 2009) نیز گزارش شده است.

بررسی ترانسفورماسیون گیاهان نسل T_1

به‌منظور بررسی پایداری ترانسفورماسیون و انتقال ترانس‌ژن به نسل بعد، گیاهان T_1 آنالیز و بررسی شدند. به این منظور، ۶۰ عدد از گیاهان ترانسفورم‌شده نسل T_0 رقم هاشمی (که دارای بالاترین کارایی ترانسفورماسیون بوده است) انتخاب و بذر آن‌ها جداگانه جمع‌آوری و از هر کدام یک بذر کشت شد. هر سه آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین (شکل ۷)، GUS (شکل ۸) و PCR (شکل ۹) روی گیاهان نسل T_1 انجام شد.



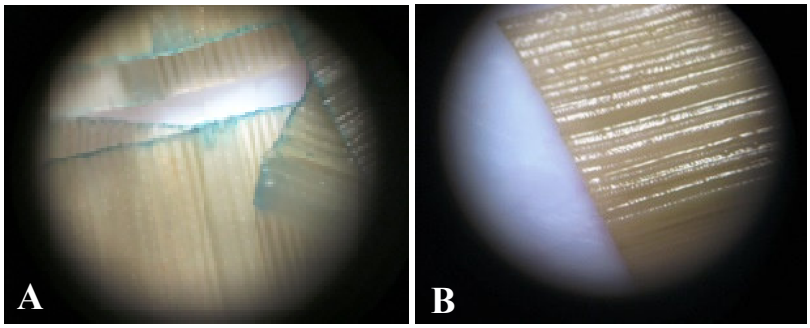
شکل ۷– آزمون مقاومت بافت برگی به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین از گیاهان T_1 رقم هاشمی۷ روز پس از شروع آزمایش. حفظ رنگ سبز در نمونه‌های ترانسفورم‌شده (A و B) و زرد و نکروزه‌شدن نمونه‌های شاهد (C).

نتیجه بررسی‌ها نشان داد که ۲۱٪ از گیاهان نسل T_1 همچنان ترانسفورم بوده‌اند درحالی‌که بقیه گیاهان این نسل حداقل در یکی یا تمام آزمون‌های مذکور ترانسفورم بودنشان تأیید نشد. بر این اساس تعیین مکان مناسب برای تلقیح بذور با سوزن آلوده به آگروباکتریوم مهم است. در جنین بذرهای برنج در حال جوانه‌زنی، توده‌های سلولی اولیه یا پریموردیا[1] اندام‌های مختلف شکل گرفته است اما، فقط مریستم انتهایی جنین‌ها در تولید سلول‌های زایشی دخیل هستند (Lersten. 2004). تنها در صورت

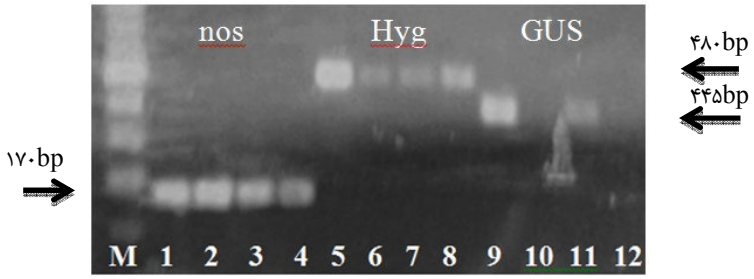
1. Primordial

ترانسفورماسیون این قبیل سلول‌های زایشی است که ژن انتقالی به نسل بعد انتقال می‌یابد. بنابراین، بهترین مکان برای تلقیح کنار مریستم انتهایی ساقه‌چه[1] جنینی است که بعداً ساقه‌چه از آن خارج می‌شود. نکته دیگر اینکه زخم‌زنی با سوزن سبب آسیب به جنین و ساقه‌چه جنینی بذرها می‌شود، لذا ساقه‌چه در مراحل بعدی نمو از بین می‌رود یا شکل غیرطبیعی خواهد داشت (Lin *et al*. 2009). یکی از مشکلات انجام روش *in planta* ظهور ۱۵–۱۰ درصد گیاهچه‌های غیرطبیعی به سبب آسیب به جنین پس از تلقیح است.

1. Plumule



شکل ۸– بیان ژن بتاگلوکورونیداز به‌صورت ظهور رنگ آبی در بافت برگ گیاهان T_1.
ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم (A) و نمونه شاهد (B)



شکل ۹– واکنش PCR در چهار عدد از گیاهان نسل T_1رقم هاشمی که حضور سه ژن مختلف در آن‌ها بررسی شده است. از چپ به راست M- مارکر، شماره‌های ۱ تا ۴ مربوط به تکثیر باند ۱۷۰bp از ترمیناتور *nos*، شماره‌های ۵ تا ۸ مربوط به تکثیر باند ۴۸۰bp از ژن هایگرومایسین و شماره‌های ۹ تا ۱۲ مربوط به تکثیر باند ۴۴۵bp از ژن *GUS* می‌باشند و همگی به‌ترتیب مربوط به گیاهان ۴–۱ هستند. گیاهان شماره ۲ و ۴ به سبب عدم‌تشکیل باند در ژن *GUS* به‌عنوان ترانس‌ژنیک تأیید نشدند.

با توجه به نتایج حاصل از آنالیزهای آماری در نهایت مشخص شد که سویه EHA105 در رقم هاشمی، با حضور ۱۰۰μM از AS همراه با استفاده از وکیوم دارای بالاترین کارایی ترانسفورماسیون (۳۷/۴۶٪) است. با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان کاربرد موفقیت‌آمیز روش ترانسفورماسیون *in planta* را در ترانسفورماسیون سه رقم بومی برنج ایرانی هاشمی، غریب و حسنی گزارش داد.

سپاسگزاری

از حمایت کمیته زیست‌فناوری دانشگاه گیلان در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Alt-Moerbe J, Neddermann P, Von LJ, Weiler EM, Schroder J (1988) Temperature sensitive step in Ti plasmid *vir* region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 213: 1-8.

An G, Lee S, Kim SH, Kim SR (2005) Molecular genetics using T-DNA in rice plant. Plant cell physiol. 46: 14-22.

Anand A, Uppalapati SR, Ryu CM, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 146: 703-715.

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad Sci, Paris Life Sci. 316: 1194-1199.

Bratic A, Majic DB, Miljus JD, Jovanovic ZS, Maksimovic VR (2007) *In planta* transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Arch. Biol. Sci. 59 (2): 135-138.

Chumakov MI, Rozhok NA, Vlikov VA, Tyrnov VS, Volokhina IV (2006) *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of maize via pistil filaments. Russ J Genet. 42: 893-897.

Clarke JD (2009) Cetyle tri methyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Mini prep for Plant DNA Isolation. Cold Spring Herb Protoc. 10: 1101-5177.

Curtis IS, Nam HG (2001) Transgenic radish (*Raphanussativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. Transgenic Res. 10: 363-371.

Danilova SA (2007) The technologies for genetic transformation of cereals. J. Plant physiol.54: 569-581.

Ditt RF, Nester E, Comai L (2005) The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiol. 247: 207-213.

Dye F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte FM (1997) Alkysyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciensvir* gene induction expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 379-383.

Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and Biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 626-631.

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 217-223.

Gelvin SB (2006) *Agrobacterium* virulence gene induction.Mol Biol. 343: 77-84.

Gould J (1996) Transformation of the cereals using *Agrobacterium*. Mol Biol. 62: 491-501.

Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci. 5: 446-451.

Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Mol Biol. 35: 205-218.

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

Hiei Y, Komari T (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryo or calli induced from mature seed. Nature. 3: 824-834.

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983)A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the

Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid. Nature. 303: 179-180.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobaterium* helper plasmids for plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res. 2: 208-218.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol. 5: 387-450.

Jin W, Gong Z, Lu Y (2004) Studies on the technique of *in planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by vacuum infiltration of *Brassica Juncea*.ActaAgronBoreali-Sinica. 19: 8-12.

Kumar KK, Maruthasalam M, Loganathan D, Rudhakar D, Balasubramanian P (2005) An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. Plant Mol. Biol. Rep. 23: 67-73.

Lersten NR (2004) Flowering Plant Embryology, Blackwell Publishing, p. 212.

Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, Liu X (2009) Piercing and vacuum in filtration of mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. Plant Cell Rep. 28: 1065-1074.

Liu CN, Steck TR, Habeck LL, Meyer JA, Gelvin SB (1993) Multiple copies of *vir G* allow induction of *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-DNA processing at alkaline pH. Mol. Plant-Microbe Interact. 6: 144-156.

Liu F, Cao MQ, Yao L (1998) *In planta* transformation of Pakchoi (*Brassica campestris* L.) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium*. Acta Hortic. 467: 187-193.

Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T (2005) The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. Mol. Breed. 16: 189-197.

McCullen CA, Binns AN (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22: 101-128.

Mohan JS (2001) Tissue culture-derived variation in crops improvement. J. Plant Breed. 118: 153-160.

Peng WT, Lee YW, Nester EW (1998) The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens virA* protein are broadened by high level of the sugar binding protein ChvE. J. Bacteriol. 180: 5632-5638.

Rashid H, Yokoi SL, Toriyama K, Hinanta K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. Plant Cell Rep. 15: 727-730.

Rashid H, Afzal A, Khan MH, Chaaudhary Z, Malik SA (2010) Effect of bacterial culture density and acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat. J. Bot. 42(6): 4183-4189.

Supartana P, Shimizu T, Shiori H, Nogawa M, Nozue M, Kojima M (2005) Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) Using *Agrobacterium tumefaciens*. Biosci and Bioeng. 100: 391-397.

Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Hidenari S, Nakajima T, Haramoto N, Nozue M, Kojima M (2006) Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Biosci and Bioeng.102(2): 162-170.

Tzfira T, Jianxiong L, Lacroix B, Citovsky V (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. Trend in Genet. 8: 375-383.

Veena, JH, Doerge RW, Gelvin SB (2003) Transfer of T-DNA and *Vir* proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. Plant J. 35: 219-226.

Veluthambi K, Aditya K, Sharma A (2003) The current status of plant transformation technologies. Curr Sci. 84: 368-380.

Wang MB, Waterhouse PM (1997) A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. Plant Mol. Biol. Rep. 15: 209-215.

Wang WC, Menon G, Hansen G (2003) Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. Plant Res. 22: 274-281.

Xu GS, Rao YQ, Chen Y, Zhang CY, Meng JL (2004) Genetic transformation of *Brassica napus* with *in planta* method. Acta Agron. Sin. 30: 1-5.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1971) Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute, Los Babos, Philippines.

Yuan ZC, Edlind MP, Liu P, Saenkham P, Banta LM, Wise AA, Ronzone E, Binns AN, Kerr K, Nester EW (2007). The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulation and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 11790-11795.

Zhao Z, Sagulenko E, Ding Z, Christie PJ (2001) Activities of *virE1* and *virE1* secretion chaperone in export of the multifunctional *virE2* effectors via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. J Bacteriol. 183: 3855-3865.