مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶

فاکتورهای موثر در کشت بافت و روش‌های انتقال ژن به گیاه گندم

علی اکبر غلامی
دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Gholami.2359@gmail.com

چکیده

در سال‌های اخیر، تولید غلات به دلیل تشدید تنش‌های زنده و غیرزنده‌ی متعدد کاهش‌یافته است. ازاین‌رو اصلاح ارقام غلات سازگار به تنش‌ها، یک ضرورت در اصلاح آن‌ها می‌باشد. از چند دهه قبل، کشت درون‌شیشه‌ای برای ریز ازدیادی، گزینش درون‌شیشه‌ای در برنامه‌های اصلاحی، ایجاد مقاومت به تنش‌ها با بهره‌گیری از تنوع سوماکلونی ناشی از شرایط درون شیشه‌ای و همچنین در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن از منابع بیگانه به گیاهان زراعی استفاده می‌شود. چندین فاکتور موثر درکشت بافت سلول در شرایط آزمایشگاه وجود دارد. یک سری از این فاکتورها داخلی و یک سری، خارجی هستند. پاسخ به کشت بافت در غلات تحت تاثیر عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، منبع ریزنمونه، منشا جغرافیایی، رقم، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه دهنده ریزنمونه، محیط کشت و تعامل بین آن‌ها می‌باشد. امروزه از جنین‌های بالغ به همراه آندوسپرم، بدون حمایت آندوسپرم و تکه‌های نازک از آن به عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده می‌شود. انتقال ژن ابزار قدرتمندی است که در بهبود محصول و مطالعات بیولوژی مولکولی غلات استفاده می‌شود. در اکثر روش‌های تراریختی، استفاده از کشت بافت برای باززایی گیاهان تراریخته امری ضروری است. مناسب‌ترین ریزنمونه برای تراریزش آن‌هایی هستند که قبل و بعد از تراریزش، به کوتاه‌ترین دوره کشت بافت نیاز داشته باشند.

کلمات کلیدی: گندم، کشت بافت، انتقال ژن، اگروباکتریوم، زیست پرتابی

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار و در ایران، در حدود ۵/٦ میلیون هکتار است که از سایر غلات بیشتر و برابر ۲۲ درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (٤١). تولید کل غلات در جهان برابر با ۸/۱ میلیارد تن است که بیشترین میزان آن حدود (۵۰۰ تا ٦۰۰ میلیون تن) به گندم اختصاص دارد و از نظر سطح زیر کشت و تولید سالانه نیز، گندم در درجه اول اهمیت قرار دارد (٦۵) به همین علت غذای عمده (بیش از ٤۰ کشور) جهان است که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (۱۲).

فاکتورهای موثر در کشت بافت گندم

چندین فاکتور موثر در کشت بافت سلول، در شرایط

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

آزمایشگاه وجود دارد. یک سری از این فاکتورها داخلی و یک سری،خارجی هستند. تصور می‌شود مهم‌ترین فاکتور موثر، ساختار ژنتیکی ریزنمونه است. نوع محیط کشت از گونه‌ای به گونه دیگر و از رقمی به رقم دیگر متفاوت است (مانند جایگزین منبع کربن، غلظت ماکرو و میکرو المنت‌ها و دیگر ترکیبات)، روش آماده‌سازی محیط، شرایط گیاه مادری، شرایط رشد از سایر عوامل موثر درکشت سلول گیاه می‌باشند. یکی از اهداف اصلی کشت سلول در شرایط آزمایشگاه، بهینه‌سازی اجزای محیط کشت و بهبود سیستم باززایی بسیار کارآمد است (۷۱). نوع ریزنمونه (٦٢، ٥٦، ٤٧، ٤٣)، ژنوتیپ رقم مورداستفاده (٤٧،٥٤،٦١،٤٨،٢٧) و ترکیبات محیط کشت (٤٤، ٢٧،٢٦،٥١،٦٣) از فاکتورهای مهم در کشت بافت گندم هست.

ریزنمونه

موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه از آن در غلات، بستگی زیادی به ریزنمونه مورد استفاده دارد. نوع ریزنمونه، از فاکتورهای مهم تاثیرگذار در کشت بافت گندم می‌باشد. به‌طورکلی قسمت‌های رویشی گیاه نسبت به قسمت‌های زایشی، آمادگی بیشتری برای باززایی دارند. جنین نابالغ (٣٨،٣٣،١١، ٤٦)، برگ نابالغ (٢٥)، گل‌آذین نابالغ (٦٢، ٦٨،٤٠، ٢٣)، مریستم راسی (٨٣)، جنین حمایت آندوسپرم (٥٤)، قطعات نازک از جنین بالغ (٢١)، مریستم ساقه‌ها (٦٩) و جنین بالغ (٢٨، ، ٦٥، ٤٤، ٦٣،٥٦، ١٠، ٧٣) به‌عنوان ریزنمونه‌های مختلف درکشت بافت گندم مورد استفاده قرارگرفته است. قابلیت‌های نمو یک سلول یا بافت در حضور محرکی خاص مثل هورمون 2,4-D در محیط کشت به توانایی رقابت آن بستگی دارد. با توجه به اینکه عموما بیشترین جنین‌زایی (کالوس‌های شبه‌جنین)، در میان بافت غیرمریستمی گیاه ازجمله جنین، گیاهچه و ساختارهای گل صورت می‌گیرد، بنابراین از جنین به‌عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه برای ایجاد کالوس‌زایی در محیط کشت استفاده می‌شود (۳۰). در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است. ولی کشت جنین نارس گندم، به‌عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (۱۳، ۱۷، ۵۵).

ژنوتیپ

ژنوتیپ از فاکتورهای مهم تاثیرگذار در کشت بافت گندم می‌باشد. به‌طورکلی شدت پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به توانایی باززایی از کالوس متفاوت است. ولی قابلیت ژنتیکی باززایی در تمام ارقام وجود دارد (۹). محققان این امر را ناشی از تفاوت ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های گیاه و تفاوت ژنوتیپ‌ها در حساسیت به هورمون‌های مصنوعی مورد استفاده و همچنین شرایط محیطی گیاه می‌دانند (۵۰) بسیاری از ژن‌ها کنترل ژنتیکی صفات پاسخ‌گو به کشت بافت گندم می‌باشد (۸). به‌عنوان مثال گزارش‌شده که آلل نیمه پاکوتاهی *Rht8* در گندم نقش اساسی در رشد کالوس و صفات مرتبط با باززایی آن دارد (۸). تفاوت ژنوتیپی جنین بالغ بر پایه کشت کالوس در آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها گزارش دادند که غلظت دست‌کاری شده 2,4-D می‌تواند تشکیل بافت سلولی و مریستم ساقه را در اکثر ارقام (ژنوتیپ‌ها) کنترل کند (٦٧). در پژوهشی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

رابطه بین ژنوتیپ و مورفوژنز، در شرایط آزمایشگاه پیچیده و غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت. این رابطه تحت تاثیر فیزیولوژیکی، عوامل محیطی، اثرات قوی بر روی سنتز، انتقال و در دسترس بودن تنظیم‌کننده‌های رشد قرار داشت. اگر ریزنمونه مناسب جداشده از گیاه تحت شرایط مطلوب کشت شود، با مقدار مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، می‌تواند در فنوتیپ یا ژنوتیپ گیاه موثر باشد (۷۶).

ترکیبات محیط کشت

ترکیبات محیط کشت، از عوامل مهم تاثیرگذار در کشت بافت گندم می‌باشد. از مواد مهمی که در کشت بافت گندم استفاده می‌شود، می‌توان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ترکیبات آلی، نیترات نقره و غیره را نام برد، که اثر مهمی در پاسخ ریزنمونه‌ها به کشت بافت دارند. از هورمون‌های اکسین به‌تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین در کالوس‌زایی گندم استفاده می‌شود. از اکسین‌های 2,4-D، پیکلورام و دیکامبا در کشت بافت غلات استفاده می‌شود. هرچند هورمون دیکامبا نتایج بهتری را در مقایسه با 2,4-D نشان می‌دهد. ولی به خاطر گران‌قیمت بودن آن اغلب از هورمون 2,4-D استفاده می‌شود (٦). برای بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی در گندم و جو به‌طور وسیع از هورمون‌های Kintin, BAP, IAA و TDZ نیز استفاده می‌شود. معمول‌ترین اکسین مورد استفاده در کشت بافت گندم 2,4-D می‌باشد. اکسین 2,4-D برای تولید کالوس‌های جنین‌زا در غلات نیاز است. اکسین برای القای کالوس ضروری می‌باشد، ولی نقش منفی در باززایی گیاهان دارد و کاهش یا حذف آن از محیط کشت برای باززایی لازم است. جنین‌های سوماتیکی با کاهش غلظت 2,4-D در محیط کشت تشکیل می‌شوند (۲۱).

انتقال ژن ابزار قدرتمندی است که به طور گسترده در بهبود محصول و مطالعات بیولوژی مولکولی غلات مثل گندم، برنج و ذرت استفاده می‌شود. با این حال، انتقال ژن به گندم در مقایسه با برنج و ذرت چندان پیشرفت نداشته است (۳۹). با استفاده از انتقال ژن، گیاهان مقاوم در برابر آفات (۸۱)، مقاوم در برابر علف‌کش (۳۵)، گیاهان دارای عملکرد بالا (٤٥) و گیاهان دارای کیفیت تغذیه‌ای بالا (۷۵) توسعه یافته‌اند. در روش‌های اصلاح مولکولی گیاهی، از انتقال ژن و کشت بافت به‌شدت استفاده می‌شود. در واقع گیاهانی که از طریق مهندسی ژنتیک تغییر یافته‌اند با استفاده از کشت بافت تولید می‌شوند (۵۷). بررسی گزارش‌ها نشان می‌دهد که از چند دهه قبل، از کشت درون‌شیشه‌ای برای ریز ازدیادی، گزینش درون‌شیشه‌ای در برنامه‌های اصلاحی، ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده با بهره‌گیری از تنوع سوماکلونی ناشی از شرایط درون‌شیشه‌ای و همچنین در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن از منابع بیگانه به گیاهان زراعی استفاده می‌شود (۳). در اکثر روش‌های تراریختی استفاده از کشت بافت، برای باززایی گیاهان تراریخته امری ضروری می‌باشد. مناسب‌ترین ریزنمونه برای تراریزش آن‌هایی هستند که قبل و بعد از مراحل تراریزش به کوتاه‌ترین دوره کشت بافت نیاز داشته باشند. زیرا دوره‌های طولانی کشت بافت اغلب موجب بروز جهش ژنتیکی می‌شود، که بر روی گیاه باززا شده اثر منفی شدیدی دارند (۱۸).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

سیستم‌های انتقال ژن در گندم

گندم، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های تک‌لپه‌ای‌ها، می‌باشد. به همراه برنج و ذرت منابع اصلی مواد غذایی و خوراک برای انسان می‌باشند. بنابراین وجود تکنیک‌های موثر و عملی در تسهیل مهندسی ژنتیک این گیاهان تک‌لپه از اهمیت زیادی برخوردار است. انتقال ژن ژنتیکی یک ابزار مهم در مطالعات پایه و بهبود گیاهان می‌باشد. روش‌های مختلف انتقال ژن و جدا کشت‌های متفاوت برای کشت بافت و اصلاح‌شده ژنتیکی گندم مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶۰).

انتقال ژن به گندم از طریق اگروباکتریوم

در طی دو دهه‌ی گذشته اگروباکتریوم (*A.tumefaciens*) که یک باکتری خاکزی می‌باشد، برای انتقال T-DNA به گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله مزیت‌های این روش، تعداد نسخه‌های پایین ژن، بیان بالای ترانس‌ژن در همه‌ی نسل‌ها و امکان انتقال قطعه‌ی بزرگی از DNA می‌باشد. بااین‌حال، استفاده از این تکنولوژی برای گیاهان تک‌لپه که میزبان اگروباکتریوم نمی‌باشند، بسیار مشکل است. با این حال، انتقال ژن با کارآیی بالا توسط اگروباکتریوم در برنج که تک‌لپه می‌باشد، گزارش‌شده است. با این حال نیز انتقال ژن توسط اگروباکتریوم برای تولید گیاه ذرت تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۷]. همچنین انتقال ژن موفقیت‌آمیز غلات مهم از جمله گندم، جو، ذرت و سورگوم توسط اگروباکتریوم گزارش‌شده است. عوامل کلیدی در به‌دست آوردن این دستاوردها، بهینه‌سازی انواعی از گیاهان برای آلودگی با اگروباکتریوم، انتخاب وکتورها، انتخاب نژادهای اگروباکتریوم و بهینه‌سازی تکنیک‌های کشت بافت می‌باشد. انتقال ژن به‌واسطه‌ی اگروباکتریوم امروزه برای واریته‌هایی از گندم که واکنش مناسبی به کشت بافت دارند، پیشنهاد شده است (۳٤،۷۰).

اولین مطالعات در رابطه با انتقال ژن به گندم از طریق آگروباکتریوم با استفاده از ژن ویروسی کوتولگی گندم عملی شد. گندم‌های تراریخته از طریق ظاهری با استفاده از علائم ویروسی و نیز با کمک آزمون ELISA به راحتی قابل‌تشخیص بودند. مطالعات اولیه در ارتباط با انتقال ژن توسط آگروباکتریوم بیانگر محدودیت کاربرد این روش در تک‌لپه‌ای‌ها بود (۸۰، ۱۹) علت این محدودیت عدم جذب این باکتری توسط گیاه تک‌لپه‌ای می‌باشد. پس از سنتز مصنوعی ماده‌ای بنام استوسرینگون که شبیه ماده‌ای است که بطور طبیعی از دولپه‌ای‌ها جهت جذب آگروباکتریوم در محیط ترشح می‌شود، این مشکل تا حدود زیادی رفع شد. بطوری که اخیرا تعداد مقالات حاکی از انتقال ژن با آگروباکتریوم به تک‌لپه‌ای‌ها با استفاده از سویه‌های ویرولانت رو به افزایش است. افزودن این ماده به محیط کشت گیاهان تک‌لپه، نقص این گیاهان در جذب باکتری را برطرف کرده است (۲٤، ۵). سایر عوامل موثر در انتقال ژن با این باکتری استفاده از ریزنمونه مناسب، القاء کننده‌ها و حضور مواد چسباننده می‌باشد. مشخص‌شده است که ایجاد زخم بطور مکانیکی و استفاده از مواد آنزیمی برای چسبیدن باکتری الزامی نیست. بلکه موجب چسبندگی و افزایش کارایی انتقال ژن می‌گردد. پیشرفت‌هایی که در زمینه انتقال ژن با آگروباکتریوم به برنج و ذرت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

رخ‌داده است، به میزان زیادی در شناخت شرایط لازم برای تولید موفق غلات تراریخته با این روش نقش داشته است. اولین آزمایش‌ها در مورد انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم به گندم در سال ۱۹۸۸ انجام گرفت. در این آزمایش از یک ژن پاکوتاهی به‌عنوان ژن نشانگر استفاده شد. پس‌ازآن، گزارشات متعددی در رابطه با تراریختی پایدار کالوس‌های جنین‌زا، جنین‌نارس، کالوس‌های ۱٤ روزه و خوشه‌های نارس گندم با آگروباکتریوم ارائه شده است. در مطالعه دیگر انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم، استرین خلع سلاح شده برای ژن نئوپالین (C58) روی کالوس حاصله از جنین نارس و کالوس‌های جنین‌زا گندم رقم Bobwhite بررسی شد و فراوانی تراریختی را ٤/۳ –۱/٤ درصد و تعداد گیاهان تراریخته باززا شده را بیش از ۱۰۰ گزارش شد و تقریبا ۳۵ درصد گیاهان تراریخته، یک نسخه از ژن انتقالی را دارا بود. این محققین برای اولین بار در گندم بیان کردند بکارگیری استوسرینگون کارایی انتقال ژن را در گندم افزایش می‌دهد (۱۵). در سال بعد تراریختی گندم و تلقیح جنین نارس با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* و *A.rhizogenes* گزارش شد و ژن آنتوسیانین، بعنوان یک نشانگر گزینشی قابل رویت در گندم معرفی گردید (٤۹). تلقیح و هم کشتی جنین‌های نارس با آگروباکتریوم تیومفاسینس سویه EHA101 (یک نژاد بسیار بیماری‌زا) و آگروباکتریوم ریزوژنز سویه‌های LBA9402 و Ar2626 حامل ژن‌های CI/LC منجر به توسعه خودبه‌خودی رنگدانه‌های قرمز عمقی در سلول‌های گندم گردید و توزیع غیر تصادفی از رنگدانه‌های قرمز در سرتاسر جنین و قطعات کالوس مشاهده گردید (٤۹). در همان سال، محققین فاکتورهای متعددی را بررسی و گزارش کردند. استوسرینگون و سویه باکتری، عوامل اساسی در تظاهر موقت ژن *gus* در بافت‌های تراریخته گندم محسوب می‌گردد. سویه آگروباکتریوم EHA101 حاوی حامل باینری معمولی pIG121Hm نسبت به سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pTOK233 و سویه GV3101 حاوی پلاسمید pPCV6NFHGusInt برای تظاهر بالاتر ژن *gus* در سلول‌های گندم برتری داشت (۳۱). همچنین اختلافات در شایستگی سویه آگروباکتریوم برای انتقال موفقیت‌آمیز ناحیه T-DNA به سلول‌های گندم گزارش شده است (۷٤). فراوانی بالای تظاهر ژن *gus* بعد از همکشتی بافت‌های گندم با آگروباکتریوم ریزوژنز حاوی پلاسمید pBin9UG نسبت به آگروباکتریوم تیومفاسینس حاوی همین پلاسمید مشاهده گردید. کارایی انتقال T-DNA را در گندم بین دو سویه آگروباکتریوم ریزوژنز LBA9402 و Ar2626 و دو سویه آگروباکتریوم تیومفاسینس LBA4404 و EHA101 مطالعه شد و مشخص گردید که فقط EHA101 که یک سویه بسیار بیماری‌زا می‌باشد، به راحتی می‌تواند ناحیه T-DNA را با موفقیت به ژنوم گندم منتقل نماید. دلیل ممکن برای وجود اختلاف بین سویه‌ها یا ریز نمونه‌ها، در انتقال یا جذب ناحیه T-DNA به گیرنده‌های سلول میزبان در اتصال به آگروباکتریوم می‌تواند مرتبط باشد (٤۹).

در پژوهشی روی رقم بهاره Fielder و جنین‌های نارس پیش تیمار شده، با استفاده از آگروباکتریوم سویه AGLO حاوی پلاسمید pBGX1 انتقال ژن را مطالعه و فراوانی تراریختی را ۱/۸ درصد و تعداد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

گیاهان باززا شده را ٤ عدد گزارش نمودند. این محققین برای اولین بار تراریختی گندم با استفاده از آگروباکتریوم و ژن گزینشگر قابل رویت gfp ارائه کردند (۷۹).

دو رقم گندم نان Florida و Cadenza به‌ترتیب با تیپ زمستانه و نیمه زمستانه با آگروباکتریوم سویه AGL1 حاوی پلاسمید pAL154/156 مورد تراریختی قرار گرفتند و فراوانی تراریختی ۳/۳-۰/۳ و ۲/۵ درصد بدست آمد. برای ارقام Florida و Cadenza بترتیب ۳۹ و ۵ گیاه تراریخته تولید نمودند (۸۲). روی رقم بهاره Veery-5 و کالوس جنین‌زا با استفاده از آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pHK21 مطالعاتی انجام و فراوانی تراریختی را ۳/۹-۱/۲ درصد برآورد کردند (٤٤). بدنبال این پژوهش، انتقال ژن را به گندم رقم Bobwhite با استفاده از آگروباکتریوم سویه C58 بررسی کردند و فراوانی تراریختی ٤/٤، ٤/۸ و ۱/۵-۰/۵ درصد بدست آمد (۳٦، ۱٦). با پیشرفت‌های حاصله در این روش، در آینده نزدیک آگروباکتریوم به عنوان یک روش معتبر و کارا برای انتقال ژن‌های خارجی به گیاهان تک‌لپه معرفی خواهد شد. این روش نسبت به سایر روش‌های انتقال ژن در گیاهان دارای مزایای زیادی است. در این روش برخلاف سایر روش‌ها، تعداد نسخه منتقل شده به ژنوتیپ گیاه گیرنده کم است. برای مثال در گندم حدود ۳۵٪ از گندم‌های تراریخته فقط یک نسخه از ژن را داشتند.

انتقال ژن با استفاده از روش زیست پرتابی

یکی از روش‌های انتقال مستقیم ژن، ریزپرتابی سلول‌ها در کشت‌های سوسپانسیون و جنین‌های نارس می‌باشد که در مطالعات کاربردی و پایه مورد توجه قرار می‌گیرد. در این روش DNAی خارجی پس از اتصال به ذرات ریزی از طلا یا تنگستن، با فشار گاز هلیم به داخل سلول‌های گیاهی پرتاب می‌شود. عدم نیاز به تهیه‌ی پروتوپلاست، یکی از مزایای مهم این روش می‌باشد. این روش در غلات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، چرا که باززایی مجدد غلات از پروتوپلاست بسیار مشکل می‌باشد، و نیز به دلیل تک‌لپه‌ای بودن، انتقال ژن به این گیاهان با روش آگروباکتریوم به سختی انجام می‌گیرد. بمباران ذره‌ای باعث بیان موقت ژن خارجی در بافت‌های توسعه یافته می‌شود. در این روش، تعداد نسخه‌های ژنی بالا و بازآرایی DNAی خارجی در گیاهان ترانسفورم شده بیشتر می‌باشد. انتقال ژن به واسطه‌ی تفنگ ژنی در چندین گزارش دیگر نیز استفاده شده است (٤۲). اولین گیاه تراریخت بارور گیاه ذرت توسط روش بمباران ذره‌ای تولید شد (۵۳-۲۹).

تراریختی گندم از طریق بمباران ژنی اولین بار در سال ۱۹۹۲ گزارش گردید و اولین باززایی موفق گیاهان تراریخته از طریق بمباران کالوس‌های جنین‌زای گندم با پلاسمید محتوی *bar, gus* عملی شد (۷۸). با پیشرفت در این روش، زمان لازم جهت تولید گیاهان تراریخته از ۱۲ تا ۱۵ ماه به ۵٦ تا ٦٦ روز از طریق کشت جنین نارس کاهش یافت. از آن تاریخ به بعد چند گروه تحقیقاتی از این روش انتقال ژن را گزارش کرده‌اند (۷،٤). در این روش کارآیی تراریختی بین ۰/۱۵ تا ۱/۵ درصد است و عمدتا این مطالعات روی رقمی از گندم بنام Bobwhite صورت گرفته است.

با روش زیست‌پرتابی انتقال ژن گاس و کانامایسین را

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

با استفاده از جنین نارس و کشت‌های بدست آمده از میکروسپور در جو رقم Kymppi بررسی و نتایج نشان داد با بمباران جنین نارس یک گیاه تراریخته بدست آمد و از طریق پی‌سی‌آر حضور ژن کانامایسین مورد تائید قرار گرفت. در حالی که در کشت‌های میکروسپور، گزینش در حضور نشانگر گزینشگر و عدم حضور عملی گردید و نتایج نشان داد که ا به ۱۵۰۰ گیاه ریشه‌دار بدست آمده تظاهر ژن کانامایسین را نشان دادند (٦٤).

تظاهر و انتقال ژن کیتیناز برنج را تحت راه‌انداز CaMV 35S با روش زیست‌پرتابی در گندم نان رقم Bobwhite و یک رقم چینی زمستانه بنام Yangmai 158 با استفاده از نشانگر گزینشگر *bar* و راه‌انداز *ubiquitin* ذرت مورد بررسی قرار گرفت و ۱۷ گیاه تراریخته بدست آوردند که ١٦ تا از این گیاهان تظاهر ژن *bar* را نشان دادند (١٤).

انتقال ژن گزارشگر *gus* و ژن انتخابگر *bar* به ساختارهای شبه جنینی حاصل از کشت بساک‌ها، با استفاده از روش بمباران ذره‌ای مطالعه شد. بیان موقت ژن گزارشگر از طریق مشاهده لکه‌های آبی بر روی ساختارهای شبه جنینی حاصل از کشت بساک‌ها بررسی شد. بهترین قطر ذرات ناقل برای بمباران ذره‌ای، ۱ میکرومتر و فاصله بافت هدف ۹ سانتی‌متر برتر از ٦ سانتی‌متر بود. در بررسی بیان دائمی ژن، تنها بافت‌های بمباران شده معدودی توانستند بر روی محیط کشت حاوی علف‌کش رشد نمایند (۱).

پاسخ به کشت بافت و تولید گیاهان تراریخت در جنین‌های نارس بمباران شده سه کولتیوار گندم Bobwhite, Baviacora و Attila با پلاسمید محتوی ژن مقاوم به علف‌کش *bar* و ژن گزارشگر گاس بررسی گردید و فراوانی تراریختی نسبت به *gus* مورد مطالعه قرار گرفت. بالاترین فراوانی تراریختی برای Bobwhite (۰/۲٤ الی ۰/٤٤ درصد جنین‌های بمباران شده) مشاهده شد. در دو رقم دیگر فراوانی تراریختی بسیار پایین بود (۵۸).

جنین‌رسیده گندم نان رقم Atay و گندم دروم رقم Cakmak را با استفاده از ذرات تنگستن با قطر ۲ میکرون با استفاده از روش نیترات کلسیم بوسیله پلاسمید pBSGUSINT حاوی ژن *gus* بمباران شد. تقریبا ۸۰ درصد جنین‌های بمباران شده تظاهر موقتی *gus* را نشان دادند. در حالی که کنترل منفی‌ها (جنین‌های بمباران نشده) تظاهر موقت را نشان ندادند. در ۳۰ درصد از جنین‌های جوانه‌زده، تظاهر لکه آبی در مکان‌های مختلف مشاهده گردید. تعداد لکه‌های آبی بترتیب ۳٤±۱۰٤ و ۳۰±۹۷ برای گندم نان و دوروم برآورد گردید (۵۲).

وراثت و پایداری کاست ژنی *act1D-uidA* در نسل T4 و T5 در گیاهان تراریخته مورد مطالعه قرار گرفت و با کمک آزمون گاس روی برگ‌ها معلوم گردید که اولا وراثت سیتوپلاسمی در انتقال صفت نقشی ندارد، ثانیا تراریخت‌هایی که به آزمون گاس جواب نمی‌دهد، دارای نسخه‌های متعددی از کاست ژنی مصنوعی هستند. بنابراین نتیجه گرفتند که هر چقدر نسخه‌های متعددی از ژن به ژنوم در اثر بمباران یا آگروباکتریوم منتقل گردد، خاموشی ژن تشدید می‌گردد (۲۲).

در پژوهشی، ژن *DREB1A* از منشاء *Arabidopsis thaliana* که تحمل به خشکی را اعطا می‌کند، به گندم نان از طریق روش زیست‌پرتابی تحت راه‌انداز

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

قابل القاء با تنش از ژن *rd29A* منتقل کردند. گیاهانی که تظاهر ژن مربوطه را نشان دادند مقاومت به تنش کمبود آب را در آزمایشات گلخانه‌ای نسبت به شاهد با ۱۰ روز تاخیر نشان دادند (۵۹). کارآیی تراریختی در مطالعات مختلف بین ۰/۱۵ الی ۱/۵ درصد گزارش شده است (٤). این روش سال‌ها به عنوان یک روش معمول تراریختی گندم با ژن‌های نشانگر بوده و امروزه با استفاده از این روش گندم‌های تراریخته حاوی صفات زراعی مهم از قبیل نرعقیمی سیتوپلاسمی، مقاوم به تنش خشکی، مقاوم به پاتوژن‌های قارچی و مقاوم به حشرات تولید شده است

سایر روش‌های انتقال ژن به غلات:

انتقال مستقیم به داخل پروتوپلاست

در این روش ماده وراثتی مورد نظر را به طور مستقیم به داخل پروتوپلاست سلول‌ها انتقال می‌دهند و مهمترین محدودیت برای این کار اندازه منافذ جداره پروتوپلاست است، که مناسب برای نفوذ ماکرومولکول‌هایی نظیر DNA نیست و باید با شیوه‌هایی درصد نفوذپذیری آن را افزایش داد. تاکنون دو روش برای این کار ابداع شده است:

– استفاده از ماده شیمیایی پلی‌اتیلن گلیکول با pH بالا در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی.

– ایجاد منافذ با استفاده از جریان الکتریسیته با ولتاژ بالا یا همان الکتروپوریشن.

انتخاب روش بستگی به نوع امکانات و گونه مورد نظر دارد. انتقال DNA از این منافذ به دو شکل انجام می‌شود: ۱)- به صورت لخت ۲)- به صورت DNA بسته‌بندی شده داخل لیپوزوم‌ها. این روش در ذرت و برنج با موفقیت استفاده شده است. سلول‌های گیاهی که دیواره سلولی آن‌ها از طریق آنزیماتیکی یا شیمیایی هضم می‌گردد، مستعد جذب DNA خارجی آماده شده خواهد بود و پروتوپلاست‌ها پس از چند روز قادر به ساخت دیواره سلولی خودشان و در صورت قرارگرفتن در محیط کشت مناسب، قادر به تقسیم سلولی خواهند بود. برای گندم بهترین منبع برای تهیه پروتوپلاست، کالوس بدست آمده از جنین نارس می‌باشد که توانایی تبدیل شده به گیاه بالغ را دارا هستند. بویژه کالوس‌هایی که از کشت سوسپانسیون بدست می‌آید (٦٦). پژوهشگران از طریق کشت سوسپانسیون سلولی توانستند گندم‌های تراریخته پایدار را تولید نمایند (۷۷).

ریزتزریقی

این عمل با استفاده از میکروپیپت‌های موئینه، مستقیم‌ترین و دقیق‌ترین روش داخل کردن DNA به داخل اجزاء ویژه سلولی است. این شیوه در سلول‌های حیوانی به خوبی پاسخ داده است، اما در مورد دیواره‌های سلول‌های گیاهی دارای فراگموپلاست با مشکل روبروست. برای این‌کار از پروتوپلاست‌های ثابت شده در آگاروز، روی شیشه، پلی‌رزین و یا از شرایط مکش استفاده می‌کنند. از این روش تاکنون در تنباکو، یونجه و چندین گونه کلم به طور موفقیت‌آمیز استفاده شده است. بهترین مثال ریزتزریقی، پلاسمید حامل ژن *nptII* به جنین حاصل از میکروسپورهای شلغم است (۳۲). مهمترین محدودیت این روش، هزینه بالا و ترشح مواد توکسینی از واکوئل‌های آسیب‌دیده به سیتوپلاسم است. علیرغم این مشکلات در تظاهر موقتی ژن گاس

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

می‌تواند کاربرد داشته باشد که در ذرت با موفقیت این کار با تزریق جنین‌های زیگوتی ذرت و بیان موقتی ژن گزارشگر گاس و آنتوسیانین عملی شده است (۲۰).

درشت تزریقی

تزریق مستقیم DNA به داخل گل‌آذین گیاهان، که اولین بار در چاودار انجام شد، حاصل مطالعه جذب ترکیبات با وزن مولکولی کم از دو ماده کلشی‌سین و کافئین به وسیله سلول‌های گل‌آذین چاودار بود. این بررسی نشان داد که برای زمان کوتاهی در طی رشد گل، سلول‌های زایشی قادر به جذب این ترکیبات هستند. در این روش DNA پلاسمیدی که حاوی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک به عنوان نشانگر است، در محیط کشت بافری بصورت معلق و توسط سرنگ مستقیما به داخل حفره Lumen گل‌آذین در حال نمو تزریق می‌شود. فرض بر این است که میکروسپورها در زمان مشخصی در طی نمو قادر به جذب DNA می‌باشند. این روش در جو و گندم نیز امتحان شده است، در جو موفقیت بسیار کم و در گندم در حد صفر گزارش شده است (۲).

انتقال DNA به میکروسپور

انتقال ژن از طریق دانه گرده با خیساندن دانه گرده در محلول‌های DNA قبل از گرده‌افشانی توسط آن‌ها انجام می‌شود. در خصوص رشد لوله گرده، DNA پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک به عنوان نشانگر به‌سادگی روی سطح بریده شده کلاله در دو مدت زمان ۲۰-۵ دقیقه و ۳-۲ ساعت، بسته به سرعت رشد لوله گرده پس از گرده‌افشانی قرار می‌گیرد (۳۲). مشکلاتی که در انتقال ژن به دانه گرده وجود دارد عبارت است از این‌که فراوانی باززایی بسیار پایین است و دوم این‌که در اکثر موارد گیاهان باززا شده هاپلوئید هستند و بایستی از طریق شیمیایی دابل هاپلوئید گردند. سوم این‌که جداسازی میکروسپور بویژه در جو خیلی مشکل بوده و وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. طوری که دو گزارش موفقیت‌آمیز در مورد انتقال ژن به دانه گرده در جو وجود دارد و هر دو رقم زمستانه Igri را بکار گرفتند (٦٦).

جذب DNA به داخل جنین تخم در حال تورم

جنین‌های خشک‌شده توانایی منحصر بفرد در جذب DNA خارجی در موقع آبکشی دارند. این تغییرات طبیعی، در اثر آبکشی دیواره سلولی جنین رخ می‌دهد. بنابراین بذر خشک با محلول غذایی و DNA خارجی می‌تواند ادغام و در حال آبکشی ماده ژنتیکی خارجی به همراه محلول غذایی وارد ژنوم گیاه می‌گردد (۷۲).

وارد کردن DNA به داخل سلول‌ها توسط فیبر

فیبرهای کربید سیلیکون پوشیده شده با DNA اخیرا به‌منظور انتقال DNA به سلول‌های گیاهان تک‌لپه‌ای در محیط کشت سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این فیبرها همانند سوزن‌های میکرواینجکشن دیواره سلول را سوراخ کرده و DNA را داخل سیتوپلاسم یا هسته قرار می‌دهند. با ورتکس نمودن نمونه، فیبر و سلول‌های سوسپانسیون در تیوب، انتقال ژن صورت می‌گیرد. این روش در حال تکامل است و در ضمن روشی ارزان و بدون مشکلات بوده و در تمام آزمایشگاه‌ها قابل اجرا است (۲۰). با استفاده از این روش در برنج ۵۳۳ گیاه تراریخت شده بدست آوردند. در حالی که محققین دیگر این روش را در ذرت ارزیابی و نتوانستند گیاه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

تراریخته به‌دست بیاورند و باززایی گیاهان با مشکل مواجه بود (۲۰).

فهرست منابع References

۱- خاوری خراسانی، س.، معینی، ا.، حبشی، ع.ا.، موسوی، ا. و کریم‌زاده، ق. ۱۳۸٦. بررسی امکان تراریختی در مواد هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک ذرت. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۵-۳ آذر ماه، سالن اجلاس سران، تهران.

۲- عالمی سعید، خ. ۱۳۸۳. بررسی انتقال، الحاق و وراثت ژن مصنوعی cry به ذرت. رسالهٔ دکتری (Ph.D) اصلاح نباتات. دانشگاه تهران. دانشکده کشاورزی.

3- Ahloowalia B S. 1982. Plant regeneration from callus culture from wheat. Crop Science 22: 405-410.

4- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V. and Vasil, I. 1996. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. Nature Biotech., 14: 1155-1159.

5- Archana, C., and Khurana, P. 2003. Herbicide– resistant transgenics of bread wheat (*T. aestivum*) and emmer wheat (*T. dicoccum*) by particle bombardment and Agrobacterium- mediated approaches. Current Sci., 84: 78-83.

6- Aydin M, Tosun M, Haliloglu K. 2011. Pant Regeneration in wheat mature embryo culture. African journal of Biotechnology 10: 15749-15755.

7-Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant Journal 5: 299-307.

8- Ben Amer LM, Korzum V, Worland AJ and Borber A .1999. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers, Theor. Appl. Genet. 94: 1047-1052.

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

10- Bi RM, Kou M, Chen LG, Mao SR, Wang HG. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding 126: 9- 12.

11- Bohorava NE, Ginkel M, Rajaram S, Hoisington DA. 1995. Tissue culture response of CIMMYT elite bread wheat cultivars and evaluation of regenerated plants. Cereal Res. Commun 23:243-249.

12- Bushuk W .1998. Wheat breeding for end product use. Euphytica 100: 137-145

13- Carman JG, Jefferson NE, Campbell WF. 1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects, Plant Cell Tiss. Org. Cult 10: 101-106.

14- Chen, W.P., Gu, X., Liang, G.H., Muthukrishnan, S., Chen, P.D., Liu, D.J. and Gill, B.S. 1998. Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the *bar* gene as a selectable marker. Theor. Appl. Genet., 97: 1296-1306.

15- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W. and Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology, 115: 971-980.

16- Cheng, M., Hu, T.C., Layton, J., Liu, C.N. and Fry, J.E. 2003. Dessication of plant tissues post-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

Agrobacterium infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant, 39: 395-604.

17- Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y, Hayashi K. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars, Jpn. J. Breed 41: 443-450.

18- Christou P. 1996. Transformation technology. Trreds in plant Sciennce 1: 423

19- Dale, P.J., Marks, M.S., Brown, M.M., Woolston, C.J., Gunn, H., Boulton, M.I., Mullineaux, P.M., Lewis, D.M., Kemp, J.M., Chen, D.F., Gilmour, D.M. and Flavell, R.B. 1989. Agroinfection of wheat: Inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. Plant Sci., 63: 237-245.

20- Davey, M. R., Ingram, H., Azhakanandam, K. and Power, J. B. 2000. The genetic transformation of rice and maize. In: Morris, P.C. and Bryce, J.H. (eds.), Cereal Biotechnology. CRC Press, pp. 43-69.

21- Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 73-80.

22- Demeke, T., Hucl, P., Baga, M., Caswell, K., Leung, N. and Chibbar, R.N. 1999. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat. Theor. Appl. Genet., 99: 947-953.

23- DemirbaÇD. 2004. Optimization of regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.cv. Yüreğir 89. Master Thesis, In Middle East Technical University

24- Dobigny, A.S, Tizeroutine, C., Gaicour, R., Haicour, L., Rossynol, G. and Sihachakr, D. 1996. Direct regeneration of transformed plants from stem fragments of potato inoculated with *Agrobacterium rhyzogenes*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 45: 115-121.

25- Zamora AB, Scott KJ. 1983. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. Plant Sci. Lett 29: 183-189.

26- Elena EB, Ginzo HD. 1988. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryos tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). J.Plant Physiol 132: 600-603.

27- Fennel S, Bohorova N, Ginkel M, Crossa J, Hoisington DA. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor. Appl. Genet 92: 163–169.

28- Filippov M, Miroshnichenko D, Vernikovskaya D, Dolgov S. 2006. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult 84: 213-222.

29- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Jr., Willetts NG. 1990. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *The Plant Cell*, 2(7):603-618**.**

30- Green CE, Phillips RL. 1975. plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Sci 15: 419-421.

31- Guo, G.Q., Maiwald, F., Lorenzen, P. and Steinbiss, H.H. 1998. Factors influecing T-DNA transfer into wheat and barley cells by *Agrobacterium tumefaciens.* Cereal Res. Commun., 26: 15-22.

32- Halluin, K.D., Bonne, E., Bossut, M., DeBeuckeleer, M., Leemans, J. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. The Plant Cell, 4: 1495-1505.

33- He Y, Jones HD, Chen S, Chen XM, Wang DW, Li KX, Wang D S, Xia L. Q. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. *var. durum* cv Stewart*)* with improved efficiency. Journal of Experimental Botany 61(6): 1567-1581.

34- Hensel g, Kastner C, Oleszczuk S ,Riechen J, Kumlen J. 2009. Agrobacterium-Mediated gene

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

transfer to creal crop plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *Plant Genomics* 10:1155-1164.

35- Hirose S, Kawahigashi H, Ozawa K, Shiota N, Inui H, Ohkawa H, Ohkawa Y. 2005. Transgenic rice containing human CYP2B6 detoxifies various classes herbicides Jurnal of Agricultuee and Food Chemistry 53: 3461-3467.

36- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H.P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F., and Fry, J. 2003. Agrobacterium-mediated large scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. Plant Cell Rep., 21: 1010-1019.

37- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. 1996. High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nat Biotechnol* 14(6):745-750.

38- Jia H, Yu J, Yi D, Cheng Y, Xu W, Zhang L, Ma Z. 2009. Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos. Plant cell, Tissue and Organ Culture 97(2): 159-165.

39- Jun ying C, Run qing Y, Hai xian Xin jian C. 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm-supported culture. Agricultural Sciences in China 5: 572-578.

40- Kavas M, Öktem HA, Yücel M. 2008. Factors affecting plant regeneration from immature inflorescence of two winter wheat cultivars. Biologia Plantarum 52(4): 621-626.

41- Kazemi Arbath H (2005). Cereal Morphology and Physiology. Tabriz university Publication. Pp. 104

42- Kemper El, DaSilva MJ, Arruda P. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (Zea mays L.) embryos. *Plant Sci*, 121:85-93.

43- Keresa S, Baric M, Sarcevic H, Marchetti S. 2004. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (Triticum aestivum L.). Bodenkultur 54(3): 155-161.

44- Yu Y, Wei ZM. 2008. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. Biologia Plantarum 52(3): 553-556.

45- Lu B R, snow AA. 2005. Modified rice and its environmental consequences. Biological Sciensce 55: 669-678.

46- Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H, Hagio T. 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures" Plant cell, Tissue and Organ Culture 53: 67-74.

47- Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R, Franklin J. 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum). Journal of experimental Botany 34(144): 915-926.*

48- Mathias RJ. 1990. Factors affecting the establishment of callus culture in wheat. In Biotechnology in Agriculture and Forestry 13. edited by Bajaj Y.P.S., Springer, Berlin: 24-45.

49- McCormac, A.C., Wu, H, X., Bao, M.Z., Wang, Y.B., Xu, R.J., Elliott, M.C. and Chen, D.F. 1998. The use of visual marker genes as cell specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat and barley. Euphytica, 99: 17-25.

50- Mendoza M G, Kaeppler H F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38: 39-45.

51- Miroshnichenko D, Filippov M, Dolgov S. 2009. Effects of daminozide on somatic embryogenesis

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

from immature and mature embryos of wheat. Austuralian Journal of Crop Science 3(2): 83-94.

52- Oktem, H.A., Eyidogan, F., Erturul, F. and Yucel, M. 1999. Marker gene delivery to mature wheat embryos via particle bombardment. Turk. J. Bot., 23: 303-308.

53- Oneto CD, Gonzalez g, Lewi D. 2010. Biolistic maize transformation: Improving and simplifying the protocol efficiency. *African Journal of Agricultural Research* 5(25):3561-3570.

54- Ozgen M, Turet M, Altmok S, Sancak C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotype. Plant Cell Rep 18: 331–335.

55- Ozgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding 115: 4555-458.

56- Ozias-Akins P, Vasil I. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum L.* (wheat): Evidience for somatic embryogenesis. Protoplasma 110: 95-105.

57- Panjaitan SB, Abdullah SNA, Aziz MA, Meon S, Omar O. 2009. somatic embryogenesis from scutellar embryo of Oryza sativa L. var.MR219. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Sciensce 32: 185-194.

58- Pellegrineschi, A., Fennell, S., McLean, S., Brito, R.M., Velazquez, L., Salgado, M., Olivares, J.J., Hernandez, R., and Hoisington, D. 1998. Routine transformation system for use with CIMMYT wheat varieties. IN: Application of Biotechnologies to Wheat breeding, Kohli, M.M., and Francis, M., (Eds.), INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, NOV, 19-20, 1998, 111-119.

59- Pellegrineschi, A., McLean, S., Brito, R.M., and Hoisington, D. 2004. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., 77: 245-250.

60- Prioli LM, Sondahi MR. 1989. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (Zea mays L.). *Bio/Technology* 7:589-594**.**

61- Raziuddin Bakht J, Swati ZA, Shafi M, Ullah F, Akmal M. 2010. Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum L.*). Pakistan Journal of Botany 42(1): 639- 652.

62- Redway FA, Vasil V, Lu D, Vasil IK. 1990. Identification of callus types for long term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum L.*). Theor. Appl. Genet 79(5): 609-617.

63- Ren J, Wang X, Yın J. 2010. Dicamba and Sugar Effects on Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryo Culture of Wheat. Agricul.Sci. in China 9(1): 31-37.

64- Ritala, A., Aikasalo, R., Aspegren, K., Salmenkallio, M., and Satu, A. 1995. Transgenic barley by particle bombardment. Inheritance of the transferred gene and characteristics of transgenic barley plants. Euphytica, 85:81-88.

65- Safikhani S (2007). Monthly of Domestic animal. Plant and Industry. 94: 58

66- Schuurink, R. C. and Louwerse, J. D. 2000. The genetic transformation of wheat and barley. In: Morris, P.C., and Bryce, J.H. (eds.). Cereal Biotechnology. CRC Press, pp. 17-37.

67- Sears RG, Decard EL. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Sci 22: 546-550.

68- Sharma VK, Hansch R, Mendel RR, Schulze J. 1995. Comparison of development stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L.and *Triticum durum* L.Desf. Plant Cell Rep 15: 227-231.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

69- Sharma VK, Hansch R, Mendel RR, Schulze J. 2004. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. Plant Cell Reports 23: 9-16.

70- Sidorov V, Duncan D. 2009. Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol* 526:47-58**.**

71- Slater A, Scott N, Fowler M. 2008. Plant tissue culture in Plant biotechnology: The genetic manipulation of plants. Oxford University Press: 35-53.

72- Topfer, R., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H. 1989. Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. Plant Cell, 1: 133–139.

73- Turhan H, Baser I. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum*). Indian Journal of Agricultural Sciences 73(7): 399-401.

74- Uze, M., Potrykus, I. and Sautter, C. 2000. Factors influencing T-DNA transfer from Agobacterium to precultured immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.). Cereal Res. Commun., 24: 147-153.

75- Vascomcelosm M, Datta K, Oliva N, Khalekuzzaman M, Torrizo I, KrishnanS, Oliveira M, Goto F, Datta SK. 2003. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. Plant Science 164: 371-378.

76- Vasil IK. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. J. Plant Physiol 128:193-218.

77- Vasil, V., Brown, S.M., Re, D., Fromm, M.E. and Vasil, I.K. 1991. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. Bio/Technology, 9: 743-747.

78- Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E. and Vasil, I.K. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of a regenerable embryogenic callus. Bio/Technologhy, 10: 1553-1559.

79- Weir, B., Gu, X., Wang, M.B. and Brettell, R.I.S. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green flourescent protein as a visual marker. Australian Journal of Plant Physiology, 28: 807-818.

80- Woolston, C.J.; Barker, R.; Gunn, H.; Boulton, M.I. and Mullineaux, P.M. 1988. Agroinfection and nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. Plant Molecular Biology, 11: 35-43.

81- Yarasi B, Sadumpati V, Immanni CP, Vudem DR, KhareeduVR. 2008. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) exhibits high-level resistance against magor sapsucking pests. BMC plant Biology 8: 102-114.

82- Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. and Jones, H.D. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of wheat. Plant Cell Rep., 21: 659-668.

83- Yu Y, Wei ZM. 2007. Factors affecting efficient plant regeneration from wheat mature embryos. Journal of Molecular Cell Biology 40(6): 443-450.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]

Factors affecting tissue culture and gene transfer methods to wheat

Ali Akbar Gholami
Graduated from MSc in Agricultural Biotechnology, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran

Gholami.2359@gmail.com

Abstract
In recent years, cereal production has been reduced due to the intensification of various live and non-stressed stresses. Therefore, the correction of adapted cereal varieties to various live and non-stressed stresses is a necessity in cereal reform .A review of the reports shows that from decades ago, in vitro culture for micronutrition, in-glass selection in corrective programs, the creation of resistance to live and non-pollutant environmental stresses, utilizing the diversity of the semaklonium due to glass conditions It is also used in genetic engineering to transfer genes from foreign sources to crops .There are several effective factors in tissue cellular tissue under laboratory conditions. A series of these internal factors and a series of these external factors .The response to tissue culture in cereals is affected by several factors such as genotype, explants source, geographical origin of the cultivar, physiological state of the explant plant, culture medium and interaction between them .Today, adult embryos with transfer is a powerful tool that is widely used in product improvement and molecular biology studies of cereals .In most of the transgenic methods, tissue culture is essential for the regeneration of transgenic plants .The explants for transplantation endosperm, without endosperm support and thin patches, are used as a detoxifier in wheat tissue culture .Gene are those that require the shortest tissue culture before and after transplantation.
Key words: wheat, tissue culture, gene transfer, agrobacterium, biomaterial

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.4.9]