# بهینه‌سازی انتقال ژن به ارقام گلابی (*Pyrus communis* L.) با استفاده از ژن گزارشگر *gus*

سوده دشتی[۱]، علی‌اکبر حبشی[۲*]، حمید عبدالهی[۳]، محمد چمنی[۱] و مریم جعفرخانی کرمانی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۲)

## چکیده

**امروزه استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک توانسته است ضمن کوتاه کردن دوره طولانی اصلاح درختان میوه، این برنامه‌ها را هدفمندتر کند. منظور از اجرای این تحقیق، بهینه‌سازی و بررسی عوامل مؤثر بر انتقال ژن با استفاده از *Agrobacterium tumefacience* به دو رقم گلابی بارتلت (Bartlett) و هرو دیلایت (Harrow Delight) بود. در همین راستا، دو ریزنمونه برگی و مریستم جوانه جانبی با استفاده از اگروباکتریوم سویه EHA101 دارای ناقل دوتایی pBI121 شامل ژن‌های *nptII* و *gus* تلقیح شدند. عوامل مؤثر بر باززایی گیاهان تراریخت و فعالیت ژن *gus* که در این مطالعه بررسی شدند شامل غلظت باکتری مورد استفاده در تلقیح با دو تیمار $OD_{600}$ (۰/۲ و ۰/۶)، غلظت استوسرینگون (۱۰۰ µmol و ۲۵۰ µmol)، پلورونیک F-68 (صفر و ۰/۰۲٪) و مدت زمان هم‌کشتی (۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) بودند. نتایج نشان داد که رقم گلابی بارتلت از نظر باززایی و بیان ژن *gus* موفق‌تر از رقم هرو دیلایت است. هم‌چنین ریزنمونه جوانه جانبی جایگزین مناسبی برای ریزنمونه برگی شناخته شد. نتایج بهینه‌سازی عوامل مورد بررسی در این آزمایش نشان داد که در هر دو ریزنمونه، استفاده از غلظت کمتر باکتری باعث افزایش کارآیی انتقال ژن می‌شود. از سوی دیگر، استفاده از ۲۵۰ میکرومول استوسرینگون می‌تواند بر انتقال ژن به هر دو ریزنمونه اثر مثبتی داشته باشد. در این بهینه‌سازی، حضور پلورونیک به عنوان یک ماده روکنش‌گر مؤثر شناخته شد. در بین مدت زمان‌های هم‌کشتی، کوتاه‌ترین تیمار (۲۴ ساعت) بیشترین میزان انتقال ژن را نشان داد. تأیید انتقال ژن به ژنوم گیاهان تراریخته به‌وسیله آزمون شیمی سلولی GUS، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و هم‌چنین لکه‌گذاری نقطه‌ای (Dot Blot) و لکه‌گذاری سادرن (Southern Blot) انجام شد.**

**واژه‌های کلیدی: مهندسی ژنتیک، باززایی، گیاهان تراریخت**

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲. استادیاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۳. استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

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



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

**مقدمه**

امروزه تولید ارقام متحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. دست‌کاری ژنتیکی می‌تواند ابزاری سریع باشد که بدون تغییر عمده در ژنوم گیاهان تجاری، نوترکیبی را در آنها حاصل کند. اخیراً ژن‌های زیادی از درختان میوه جداسازی گردیده و برای تجزیه و تحلیل چگونگی عملکرد این ژن‌ها، آنها را به گیاهان مدل همچون *Arabidopsis thaliana*، *Lycopersicon esculentum* و *Nicotina tobacum* منتقل کرده‌اند (۱۱). اما به وضوح مشخص است که این گیاهان مدل برای بررسی خصوصیاتی نظیر میوه‌دهی و ارزیابی مقاومت به آفات و بیماری‌ها مناسب نمی‌باشند و می‌بایست برای بررسی‌های تکمیلی به درختان میوه منتقل شوند. از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار از جمله گلابی، بیماری آتشک می‌باشد که در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ در کرج گزارش شد (۲۲) و تا به امروز طغیان‌های آن در سال‌های متمادی با وجود تمهیدات قرنطینه‌ای اعمال شده در اکثر مناطق ایران گزارش شده و باعث نابودی باغ‌های آلوده گشته است (۲۳). مشکلات زیادی در رابطه با اصلاح سنتی درختان میوه مانند گلابی وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به طولانی بودن زمان بالغ شدن این گیاهان اشاره کرد که بین ۵ تا ۷ سال طول می‌کشد. از سوی دیگر، بالا بودن سطح هتروزیگوتی در این گیاه اصلاح آن را با موانع جدی روبرو کرده است. برای مثال، استفاده از روش‌های دورگ‌گیری با منابع ژنتیکی مقاومت به بیماری آتشک نظیر گلابی‌های گونه *P. ussuriensis* نیز سبب برگشت ارقام به تیپ‌های وحشی و ظهور صفات نامطلوب نظیر کیفیت بد میوه، دیر باردهی و میوه‌های کوچک شده که تلاقی‌های برگشتی برای حذف این صفات اثربخش گزارش نشده است (۵).

از آنجایی که گلابی یکی از میزبانان طبیعی *Agrobacterium tumefacience* است (۲)، استفاده از این باکتری همراه با پلاسمید خلع سلاح شده جهت انتقال ژن مورد نظر به ارقام گلابی امکان‌پذیر شده است. با این وجود، انتقال ژن به گلابی در مقایسه با سیب و دیگر درختان میوه از موفقیت کمتری برخوردار بوده است، زیرا اکثر این گیاهان چوبی با مشکل باززایی پس از تلقیح مواجه بوده‌اند. تاکنون انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم روش غالب برای انتقال ژن به گلابی بوده است. اهداف برنامه‌های انتقال ژن به گلابی بیشتر بر طراحی روش‌های انتقال ژن، افزایش قابلیت ریشه‌زایی، افزایش مقاومت به بیماری‌ها به‌خصوص بیماری آتشک و کاهش ارتفاع گیاه متمرکز بوده است. تراریختی در گیاه گلابی اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط مورگس و همکاران (۱۲) انجام پذیرفت که درصد تراریختی در آن آزمایش بسیار متغیر و وابسته به رقم عنوان شد. در این آزمایش، ژن‌های *gus* و *bar* را به‌وسیله سویه EHA101 آگروباکتریوم به سه رقم گلابی شامل پاسه کراسان (Passe Crassane)، دوینه دو کومیس (Doyenne du Comice) و کنفرانس (Conference) منتقل کردند و تنها در رقم کنفرانس گیاه تراریخته تولید شد. ماتسودا و همکاران (۱۱) ژن‌های *gus*، *nptII* و *hpt* را به‌وسیله سویه EHA101 آگروباکتریوم به ریزنمونه برگ گلابی رقم‌های سیلور بل (Silver Bell) و لافرنس (La France) منتقل کردند. تراریختی برای ریزنمونه برگ در رقم سیلور بل، ۳/۲٪ به‌دست آمد. ولی برای رقم لافرنس هیچ گیاه تراریخته‌ای تولید نشد. به دلیل عدم ایجاد گیاه تراریخته در این رقم، از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی استفاده گردید. در نتیجه، کارآیی تراریزش برای این رقم ۴/۸٪ حاصل شد و نشان داد که تراریزش با ریزنمونه مریستم جوانه جانبی می‌تواند جایگزین مناسبی برای ریزنمونه برگی باشد. با توجه به موارد ذکر شده و بررسی منابع گوناگون، تاکنون هیچ‌گونه بررسی منسجمی در خصوص بهینه‌سازی انتقال ژن به گلابی صورت نگرفته است و در واقع این تحقیق برای اولین بار در کشور انجام می‌شود. در این تحقیق، سعی بر آن شد تا با استفاده از دو ریزنمونه برگ و مریستم جوانه جانبی، عوامل مؤثر بر انتقال ژن مورد بررسی قرار گیرند. بهینه‌سازی این روش، ما را در انجام برنامه‌های آتی انتقال ژن هدف در گلابی یاری خواهد داد.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

## مواد و روش‌ها

### الف) مواد گیاهی، سویه *Agrobactrium* و پلاسمید

در این تحقیق، دو رقم گلابی (*Pyrus communis*) مورد استفاده قرار گرفت: بارتلت که از مهم‌ترین و پرکشت‌ترین نوع گلابی در دنیا به حساب می‌آید به عنوان رقم حساس به بیماری‌ها و هرو دیلایت به عنوان رقم متحمل به بیماری‌ها. این گیاهان در محیط درون شیشه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در محیط تغییر یافته QL (۱۶) براساس روش لبلی و همکاران (۹) تکثیر شدند. در این مطالعه، از سویه EHA101 باکتری *Agrobacterium tumefacience* دارای پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus* با پیش‌بر ویروس موزائیک گل کلم *CaMV35S* و خاتمه‌دهنده *nos* به عنوان ژن گزارشگر و نیز ژن *nptII* با پیش‌بر و خاتمه‌دهنده *nos* به عنوان نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین به منظور ژن انتخابی در گیاهان تراریخت استفاده گردید (شکل ۱).

### ب) تراریختی، باززایی گیاهان تراریخت

سویه EHA101 باکتری *A. tumefacience* به مدت یک شب همراه با آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین هر یک به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط LB کشت داده شد. محیط تلقیح برای جوانه جانبی محیط پایه QL همراه با ویتامین‌ها به همراه ۶/۳٪ ساکاروز، ۳/۶٪ گلوکز، با اسیدیته ۵/۲ تهیه شد که پس از استریل شدن به آن ۱/۱۰ اگروباکتریوم اضافه گردید. برای تلقیح ریزنمونه‌های برگی از محیط پایه NN (۱۴) به همراه ۶/۳٪ ساکاروز، ۳/۶٪ گلوکز با اسیدیته ۵/۲ استفاده گردید که پس از اتوکلاو به آن ۱/۱۰ اگروباکتریوم اضافه شد. برای تهیه ریزنمونه مریستم جوانه جانبی، این قطعات به قطر ۲ میلی‌متر از گیاهان ۴ هفته‌ای درون شیشه جدا گردیدند. از سوی دیگر، ریزنمونه‌های برگی نیز پس از جداسازی، دو خراش عمود بر رگبرگ آنها داده شد. این ریزنمونه‌ها به‌صورت جداگانه به مدت ۵ تا ۸ دقیقه در مجاورت محیط تلقیح ذکر شده قرار گرفتند و سپس به محیط هم‌کشتی منتقل شدند. محیط هم‌کشتی برای جوانه جانبی محیط پایه (QL) همراه با ویتامین‌ها به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (Banzil aminopurin)، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2iP (N6-D2-isopentenyl adenine) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (Naphtalen Acetic Acid) به همراه ۳٪ ساکاروز، ۰/۷٪ آگار در ۵/۲ اسیدیته تهیه شد. برای محیط هم‌کشتی ریزنمونه‌های برگی از محیط پایه NN همراه با ویتامین‌ها و ۳۰ میکرومول در لیتر TDZ (Thidiazuron)، ۱ میکرومول در لیتر NAA، ۳٪ ساکاروز و ۰/۷٪ آگار در ۵/۲ اسیدیته استفاده گردید. پس از طی زمان هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی شامل آنتی‌بیوتیک‌های سفاتوکسیم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کربنیسیلین ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتقال یافتند.

### ج) عوامل مورد بررسی

**غلظت باکتری**: غلظت باکتری در هنگام تلقیح معمولاً از عواملی به شمار می‌آید که می‌تواند در تراریختی ریزنمونه‌ها بسیار مؤثر باشد. در این آزمایش، باکتری‌ها به همراه آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده رشد شبانه داده شدند. از دو غلظت اگروباکتریوم $OD_{600}$ = ۰/۶ و $OD_{600}$ = ۰/۲ به عنوان تیمارهای بیشینه و کمینه که تاکنون در برنامه‌های انتقال ژن به گلابی و سیب مورد آزمون قرار داده شده استفاده گردید.

**غلظت استوسرینگون:** استوسرینگون ماده‌ای فنلی به شمار می‌آید. از آنجایی که اگروباکتریوم‌ها برای ورود به گیاهان و ایجاد بیماری در آنها معمولاً به سمت زخم‌های گیاه حرکت می‌کنند، به نظر می‌رسد که مواد فنلی ترشح شده از آنجا در این جذب دخیل باشند و در همین راستا در آزمایش‌های انتقال ژن معمولاً از این ماده در محیط تلقیح استفاده می‌شود. در این مطالعه، غلظت‌های مختلف استوسرینگون ۱۰۰ میکرومول و ۲۵۰ میکرومول در نظر گرفته شد.

**استفاده از پلورونیک F-68**: پلورونیک (Pluronic) ماده‌ای روکنش‌گر (Surfactant) به شمار می‌آید که می‌تواند از به



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

**شکل ۱. نقشه T-DNA مورد نظر به همراه ژن *gus* و ژن *nptII***

وجود آمدن حباب‌های هوا در بین سلول‌ها جلوگیری کند و باعث انتقال راحت‌تر اگروباکتریوم به سلول‌های گیاه شود (۱). پلورونیک تجاری در آب دو بار تقطیر حل و سپس به‌وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد. غلظت‌های صفر و ۰/۰۲٪ جهت ارزیابی این ماده در انتقال ژن مورد مطالعه قرار گرفت.

**مدت زمان هم‌کشتی:** معمولاً گیاهان پس از تلقیح در یک محیط عاری از هورمون قرار می‌گیرند تا اگروباکتریوم بتواند به داخل بافت مورد نظر نفوذ کند. مدت زمان ذکر شده در گیاهان مختلف بسیار متفاوت است. در اینجا از ۳ زمان هم‌کشتی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت استفاده شد. عوامل ذکر شده در بالا برای هر دو رقم بارتلت و هرو دیلایت با ریزنمونه‌های برگی و جوانه جانبی به‌صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفتند و برای هر آزمایش ۸۰ ریزنمونه در ۴ تکرار در نظر گرفته شد. باززایی ریزنمونه‌ها عبارت است از به وجود آمدن گیاه کامل از آنها که برای ریزنمونه‌های جوانه جانبی ۶ تا ۸ هفته و برای ریزنمونه‌های برگی ۸ تا ۱۰ هفته زمان لازم است. این معیار، همراه با آزمون شیمی سلولی (Histochemical) ژن *gus* که پس از نگهداری ۱۲ تا ۱۴ هفته، از گیاهان باززا شده در محیط انتخابی صورت می‌پذیرد به عنوان عوامل مورد ارزیابی انتخاب شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام پذیرفت.

### د) آزمون رنگ‌آمیزی GUS

فعالیت ژن *gus* به‌صورت شیمی سلولی با تغییراتی در روش جفرسون و همکاران (۶) مورد بررسی قرار گرفت. این تغییرات شامل کاربرد ۲۰٪ متانول برای جلوگیری از فعالیت شبه GUS درون‌زاد کوسوگی و همکاران (۸) و کلرامفنیکل برای جلوگیری از فعالیت GUS ناشی از آلودگی باکتریایی در محلول رنگ‌آمیزی، طبق روش قره یاضی (۴) بود. از گیاهانی که در محیط انتخابی دارای کانامایسین قادر به رشد بودند برگ‌هایی تهیه و به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در محلول رنگ‌آمیزی غرق شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محلول رنگ‌آمیزی حذف و برگ‌ها در اتانول ۷۰٪ ثابت شدند.

### ه) آزمون PCR

استخراج DNA ژنومی گیاهان تراریخت احتمالی انجام گرفت. به منظور تأیید ژن *gus* در ژنوم گیاه از آغازگرهای اختصاصی آن استفاده شد. از سوی دیگر، برای تضمین آلوده نبودن گیاهان به اگروباکتریوم از آغازگرهای vir G استفاده گردید. لازم به ذکر است که این ژن خارج از T-DNA واقع شده است و گیاهان تراریخت نباید این ژن را داشته باشند. آغازگرهای ژن *gus* شامل آغازگر پیش‌رو 5́ATCGCGAAAACTGTGGAATT3́ و آغازگر معکوس 5́TGGATTCCGGCATAGTTAAA3́ بود و برای ژن *virG* آغازگر پیش‌رو 5́ATGATTGTACATCCTTCACG3́ و آغازگر معکوس 5́TGCTGTTTTTATCAGTTGAG3́ در نظر گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه چرخه حرارتی در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در نهایت، چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تحت شرایط بهینه شده با استفاده از آغازگر *gus* طبق برنامه حرارتی زیر انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴ دقیقه و در ۳۵ چرخه بعدی شامل ۹۴ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۵۹ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس یک دقیقه و ۵ دقیقه برای چرخه نهایی در نظر گرفته شد. برای آغازگرهای vir G این چرخه‌ها به شرح زیر انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس ۴ دقیقه و در ۳۵ چرخه بعدی شامل ۹۴ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس یک



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس یک دقیقه و ۵ دقیقه برای چرخه نهایی بود.

**و) آنالیز لکه گذاری نقطه‌ای**

آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای براساس هیبرید شدن قطعات نشان‌دار صورت می‌گیرد و می‌تواند به عنوان غربالی در انتخاب گیاهان احتمالی تراریخت عمل کند. در ابتدا قطعات ژن *gus* تکثیر شده ۴۴۴ جفت بازی با PCR با استفاده از بسته خالص‌سازی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR purification kit) مورد بازیابی قرارگرفتند. سپس این قطعات با استقاده از بسته ساخت قطعات نشان‌دار دیگ (PCR DIG probe synthesis kit) نشان‌دار شدند. آنگاه لکه‌هایی از DNA استخراجی گیاهان روی غشاء نیتروسلولوزی منتقل گردید. این آزمون براساس روش سمبروک و همکاران (۱۷) انجام شد. رنگ‌آمیزی قطعات نشان‌دار به‌وسیله بسته کاوشگر قطعات دیگ (DIG nucleic acid detection) مربوطه به انجام گرفت.

**ز) آنالیز لکه‌گذاری سادرن**

جهت انجام آزمون لکه‌گذاری سادرن ۲۰ میکروگرم از DNA گیاهان تراریخت و گیاه شاهد به‌وسیله آنزیم *HindIII* هضم شدند و سپس به‌وسیله ژل آگاروز ۰/۸٪ از یکدیگر جدا شدند و بر روی غشاء نیتروسلولزی براساس روش سمبروک و همکاران (۱۷) انتقال یافتند. قطعات نشان‌دار شده ژن *gus* با DIG به عنوان قطعه نشان‌دار استفاده شدند. پس از انجام مراحل انتقال مراحل رنگ‌آمیزی طبق دستورالعمل بسته کاوشگر قطعات دیگ انجام گرفت.

## نتایج و بحث

**الف) ارزیابی اثر عوامل مورد بررسی در انتقال ژن**

باززایی در ریزنمونه مریستم جوانه جانبی بسیار سریع‌تر و مؤثرتر از ریزنمونه برگی بود که می‌توان علت آن را به دو پدیده نسبت داد: اول این‌که تحریک مریستم برای باززایی بسیار راحت‌تر از تحریک یک سلول عادی برای باززایی بود. دوم این‌که به دلیل قابلیت رشد سریع در مدت زمان کوتاه در محیط، امکان زنده‌مانی آنها بسیار زیاد بود و برنامه انتقال ژن به این ریزنمونه از سرعت بالایی برخوردار بود. اما از سوی دیگر، حذف اگروباکتریوم در این محیط بسیار سخت‌تر از ریزنمونه برگی بود و به‌طور معمول در صورت عدم واکشت به موقع، این ریزنمونه‌ها از بین می‌رفتند.

**اثر رقم**

ارقام مختلف گلابی که معمولاً از دورگ گیری‌های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای به‌صورت طبیعی وجود آمده‌اند، دارای تنوع ژنتیکی زیادی هستند. این امر سبب ایجاد پاسخ‌های متفاوت ارقام نسبت به شرایط آزمایشگاهی و غیرآزمایشگاهی می‌شود. در این مطالعه، رقم بارتلت در تمام فاکتورهای مورد بررسی بهترین عملکرد را در مقایسه میانگین دانکن با رقم هرو دیلایت از خود نشان داد. بارتلت در ریزنمونه جوانه جانبی ۱۵/۴۱٪ و در ریزنمونه برگی ۲/۹۲٪ باززایی را نشان داد. درصد تراریختی نیز به‌ترتیب در جوانه جانبی و برگ در این رقم ۷/۳۳ و ۲/۶۳ به‌دست آمد. هرو دیلایت نیز در ریزنمونه جوانه جانبی ۶/۲۵٪ و در ریزنمونه برگی ۱/۱۷٪ باززایی را نشان داد. درصد تراریختی نیز به‌ترتیب در جوانه جانبی و برگ در این رقم ۲/۳۳ و۱/۱۷ به‌دست آمد (جداول ۱ و ۲). مانند آنچه در آزمایش‌های ماتسودا و همکاران و مورگس و همکاران (۱۲) گزارش شده بود، هنگامی‌که ارقام مختلف گلابی در یک برنامه انتقال ژن مورد آزمون و مقایسه قرار می‌گیرند عکس‌العمل‌های متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. این اختلاف می‌تواند از سطح بالای هتروزیگوتی آنها منشأ شود که دو رقم یک گونه را می‌تواند از هم متمایز کند و از سوی دیگر ورود یک ژن یکسان را با موانع جدیدی روبرو کند.

**غلظت باکتری**

در ریزنمونه جوانه جانبی، تفاوت در غلظت باکتری اختلاف



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

**جدول ۱. مقایسه تراریختی بین دو رقم در گیاهان حاصل از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی**

| رقم | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| بارتلت | ۱۵/۴۱±۳/۹۶ [a] | ۷/۳۳±۲/۷۲ [a] |
| هرو دیلایت | ۶/۲۵±۱/۴۶ [b] | ۲/۳۳±۰/۷۷ [b] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۲. مقایسه تراریختی بین دو رقم در گیاهان حاصل از ریزنمونه برگ**

| رقم | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| بارتلت | ۲/۹۲±۰/۷۶ [a] | ۰/۵۶ ±۲/۶۳ [a] |
| هرو دیلایت | ۱/۱۷±۰/۳۰ [b] | ۱/۱۷±۰/۳۰ [b] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

معنی‌داری نداشت (جدول ۳)، که این امر را می‌توان به چگونگی سیستم مریستم در باززایی نسبت داد. در ریزنمونه برگی، غلظت کمتر باکتری باعث باززایی ۲/۸۸ درصدی گیاهان گردید. درحالی‌که در غلظت بیشتر تنها ۱/۲۲٪ گیاهان باززا شدند (جدول ۴). این امر بیشتر مربوط به آلودگی باکتریایی شدید در غلظت زیاد باکتری بود که باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها شده بود. در برخی از ارقام سیب مانند رویال گالا (Royal Gala) از $OD_{600}$ حدود ۰/۸ (۲۱) و در رقم گلدن دلیشس (Golden Delicious) از $OD_{600}$ مساوی ۰/۳ تا ۰/۵ هم استفاده شده است (۱۸). این امر نشان‌دهنده دامنه وسیع غلظت‌های مختلف باکتریایی در تلقیح این‌گونه گیاهان است. با توجه به زمان تلقیح ۵ تا ۸ دقیقه‌ای، که امکان تراریختی را به حداکثر می‌رساند، استفاده از غلظت‌های کمتر می‌تواند باعث کاهش آلودگی باکتریایی و کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مراحل انتخابی گردد.

### غلظت استوسرینگون

به‌طور معمول، اگروباکتریوم با شناسایی مواد فنلی ناشی از زخم به سوی آن محل کشیده شده و وارد گیاه می‌شود. استوسرینگون ماده‌ای فنلی به شمار می‌رود که می‌تواند در افزایش گیاهان تراریخته مؤثر باشد (۱۵). در این مطالعه، از دو غلظت این ماده استفاده شد. در ریزنمونه جوانه جانبی غلظت کمتر باعث باززایی ۶/۳۷٪ گیاهان گردید و در غلظت بیشتر این میزان به ۱۶/۲۹٪ رسید و میزان تراریختی نیز به ۷/۲۰٪ رسید (جدول ۵). در ریزنمونه برگی، غلظت زیاد به مراتب باعث افزایش درصد گیاهان باززا شده از ۱/۱۷٪ به ۲/۹۲٪ شد (جدول ۶).

### کاربرد پلورونیک F-68

پلورونیک پلیمری از اکسید اتیلن و اکسید پروپیلن است که به‌صورت گسترده برای جلوگیری از تنش‌های هیدرودینامیک سلول‌های جانوری و حشرات در بیوراکتورها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳ و ۲۰). مکانیزم حفاظتی پلورونیک به علت واکنش‌هایی است که با سطح سلول می‌دهد و باعث کاهش جذب سطحی بین سلول و حباب‌های هوا در محیط اطراف می‌شود و سلول‌ها می‌توانند از حباب‌های پاره کننده دیواره در



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

**جدول ۳. مقایسه تراریختی بین دو غلظت باکتری در هنگام تلقیح در گیاهان حاصل از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی**

| غلظت باکتری | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| $OD_{600}$ =۰/۲ | ۱۴/۷۵±۳/۸۴[a] | ۶/۷۹±۲/۰۷ [a] |
| $OD_{600}$ =۰/۶ | ۷/۹۱±۲/۰۷[a] | ۲/۸۷±۰/۹۹ [a] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۴. مقایسه تراریختی بین دو غلظت باکتری در هنگام تلقیح در گیاهان حاصل از ریزنمونه برگی**

| غلظت باکتری | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| $OD_{600}$ =۰/۲ | ۲/۸۸±۰/۷۷ [a] | ۲/۵۸±۰/۵۸ [a] |
| $OD_{600}$ =۰/۶ | ۱/۲۱±۰/۲۸ [b] | ۱/۲۱±۰/۲۸ [b] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۵. مقایسه تراریختی بین دو غلظت استوسرینگون در گیاهان حاصل از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی**

| غلظت استوسرینگون (میکرومول) | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| ۱۰۰ | ۶/۳۷±۱/۱۴ [a] | ۲/۴۸±۰/۶۱ [a] |
| ۲۵۰ | ۱۶/۲۹±۴/۰۸ [b] | ۷/۲۰±۲/۱۳ [b] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۶. مقایسه تراریختی بین دو غلظت استوسرینگون در گیاهان حاصل از ریزنمونه برگی**

| غلظت استوسرینگون (میکرومول) | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| ۱۰۰ | ۱/۱۷±۰/۲۳ [a] | ۱/۱۷±۰/۲۳ [a] |
| ۲۵۰ | ۲/۹۲±۰/۷۸ [b] | ۲/۶۳±۰/۶۰ [b] |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

امان بمانند. در آزمایشی، چنگ و همکاران (۱) نشان دادند که استفاده از پلورونیک می‌تواند به افزایش گیاهان تراریخت کمک کند. اخیراً این ماده به عنوان القاکننده رشد و باززایی به محیط کشت سلول‌ها و بافت‌های چندین گیاه اضافه گردیده و آثار آن مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰). مطالعات در مورد *Chrysanthemum capsularis* نشان داده که القای باززایی در لپه‌ها همراه با دمبرگ به تعادل هیدروفیلیک- هیدروفوبیک حاصل از مواد غیریونی موجود در محیط کشت وابسته است



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

(۳). در ریزنمونه جوانه جانبی، درصد باززایی از ۶/۵ به ۱۶/۱۶ و درصد تراریختی از ۲/۲۰ به ۷/۴۸ افزایش پیدا کرد (جدول ۷). در ریزنمونه برگی، افزایش درصد باززایی از ۱/۱۳ به ۲/۹۶ و درصد تراریختی از ۱/۱۳ به ۲/۶۷ را در پی داشت (جدول ۸).

**مدت زمان هم‌کشتی**

در این آزمایش، مدت زمان‌های هم‌کشتی مختلفی مورد مقایسه قرار گرفت. بیشترین درصد باززایی در جوانه جانبی و برگ (به‌ترتیب ۲۰/۳۱ و ۳/۷۵) در ۲۴ ساعت دیده شد. پس از آن ۷۲ ساعت و ۱۲۰ ساعت بود که میزان باززایی در جوانه جانبی به‌ترتیب ۱۰/۲۵ و ۳/۴۷ و میزان تراریختی ۴/۳۱ و ۰/۸۷ درصد بود (جدول ۹). در برگ نیز این درصدها کاهش یافتند، که برای باززایی ۱/۸۱ و ۰/۵۶ درصد و برای تراریختی ۱/۶۹ و ۰/۵۶ درصد بود (جدول ۱۰). در مدت زمان کوتاه‌تر هم‌کشتی، به دلیل این‌که فرصت کمتری به اگروباکتریوم داده می‌شود تا ریزنمونه را احاطه کند و در عین حال پلاسمید خود را بتواند به ریز نمونه وارد کند، از موفقیت بیشتری برخوردار بود. این درحالی بود که ماتسودا و همکاران (۱۱) مدت ۵ روز و کانیوشی و همکاران (۷) مدت ۳ روز را برای هم‌کشتی اختصاص داده بودند. در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق نشان داده شد که اختلاف معنی‌داری بین این دو زمان وجود ندارد. اما با کاهش آن می‌توان بر درصد گیاهان تراریخت افزود. کاهش زمان هم‌کشتی در سیب *Malus×domestica* Borkh نیز مؤثر گزارش شده است (۱۹).

## ب) آنالیز شیمی سلولی و مولکولی جهت تائید گیاهان تراریخت

**آزمون شیمی سلولی GUS**

آزمون GUS جهت تأیید اولیه انتقال ژن گزارشگر *gus* و بیان آن در گیاهان رشد کرده روی محیط حاوی ۱۰ میلی‌گرم کانامایسین انجام پذیرفت (شکل ۲). گیاه شاهد غیر تراریخت نیز به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. اکثر گیاهان باززا شده، خصوصاً با منشأ برگی، GUS مثبت شدند. بیشتر گیاهانی که در این آزمون موفق نبودند از منشأ جوانه جانبی حاصل شده بودند که می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. در ابتدا باید یاد آور شد که به دلیل کم بودن میزان موفقیت در بحث انتقال ژن در گلابی، در سال ۲۰۰۵ اولین بار ماتسودا و همکاران (۱۱) استفاده از جوانه جانبی را پیشنهاد کردند. در همان مقاله اشاره‌ای به شیمر بودن گیاهان حاصل تراریخت شده بود که می‌تواند یکی از دلایل منفی شدن آزمون GUS باشد. از دلایل دیگر ناموفق بودن این آزمون در گیاهان باززاشده می‌توان به حذف این ژن و یا خاموشی (Silencing) این ژن اشاره کرد.

**آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت**

برای تأیید حضور ژن *gus* در گیاهان باززا شده، ابتدا استخراج DNA از گیاهان صورت پذیرفت و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. حضور قطعه ۴۴۴جفت بازی مورد نظر تکثیر و روی ژل آگاروز تأیید گردید. شکل ۳- الف تعدادی از گیاهان حاصل از ریزنمونه‌های برگی (شماره ۲ تا ۵) و جوانه جانبی (شماره ۶ تا ۹) را نشان می‌دهد که حضور ژن *gus* در آنها تأیید شد. ژن *virG* جهت اثبات عدم وجود آلودگی باکتریایی مورد آزمون قرار گرفت. بدین منظور، از گیاهانی که حضور ژن *gus* در آنها مثبت بود، استخراج DNA صورت پذیرفت و با آغازگرهای ژن *virG* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. اگروباکتریوم به عنوان شاهد مثبت قطعه ۷۳۸ جفت بازی را نشان داد. شکل ۳- ب نشان‌دهنده عدم وجود باند در این گیاهان می‌باشد. جهت غربال کردن گیاهان و حذف تعدادی از آنها که ممکن است تراریخت نباشند، آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای برای ۲۱ عدد از گیاهان مقاوم از هر دو رقم که روی محیط حاوی کانامایسین رشد کرده بودند، صورت گرفت. شش عدد از این گیاهان از منشأ مریستم جوانه جانبی انتخاب شدند و ۱۵ عدد نیز از گیاهان باززا شده از ریزنمونه برگی تحت این آزمون



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

**جدول ۷. مقایسه تراریختی بین دو غلظت پلورونیک در گیاهان حاصل از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی**

| غلظت پلورونیک | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| صفر | ۶/۵۰±۱/۱۸ a | ۲/۲۰±۰/۵۷ a |
| ٪۰/۰۲ | ۱۶/۱۶±۲/۱۲ b | ۷/۴۸±۲/۱۲ b |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۸. مقایسه تراریختی بین دو غلظت پلورونیک در گیاهان حاصل از ریزنمونه برگی**

| غلظت پلورونیک | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| صفر | ۱/۱۳±۰/۲۵ a | ۱/۱۳±۰/۲۵ a |
| ٪۰/۰۲ | ۲/۹۶±۰/۷۷ b | ۲/۶۷±۰/۵۸ b |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۹. مقایسه تراریختی بین سه زمان هم‌کشتی در گیاهان حاصل از ریزنمونه مریستم جوانه جانبی**

| مدت زمان هم‌کشتی (ساعت) | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| ۲۴ | ۲۰/۳۱±۴/۸۰ a | ۹/۳۱±۲/۴۰ a |
| ۷۲ | ۱۰/۲۵±۲/۵۰ ba | ۴/۳۱±۱/۵۰ ba |
| ۱۲۰ | ۳/۴۷±۱/۵۰ b | ۰/۸۷±۰/۰۲ b |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

**جدول ۱۰. مقایسه تراریختی بین سه زمان هم‌کشتی در گیاهان حاصل از ریزنمونه برگی**

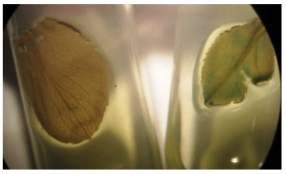
| مدت زمان هم‌کشتی (ساعت) | درصد گیاهان باززا شده پس از تلقیح | درصد گیاهانی که در آزمون GUS رنگ آبی را نشان دادند |
|---|---|---|
| ۲۴ | ۳/۷۵±۰/۹۰ a | ۳/۴۴±۰/۵۰ a |
| ۷۲ | ۱/۸۱±۰/۳۰ b | ۱/۶۹±۰/۳۰ b |
| ۱۲۰ | ۰/۵۶±۰/۲۰ b | ۰/۵۶±۰/۱۰ b |

اعداد بیانگر میانگین ۴ تکرار انجام شده ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ طبق آزمون دانکن دارند.

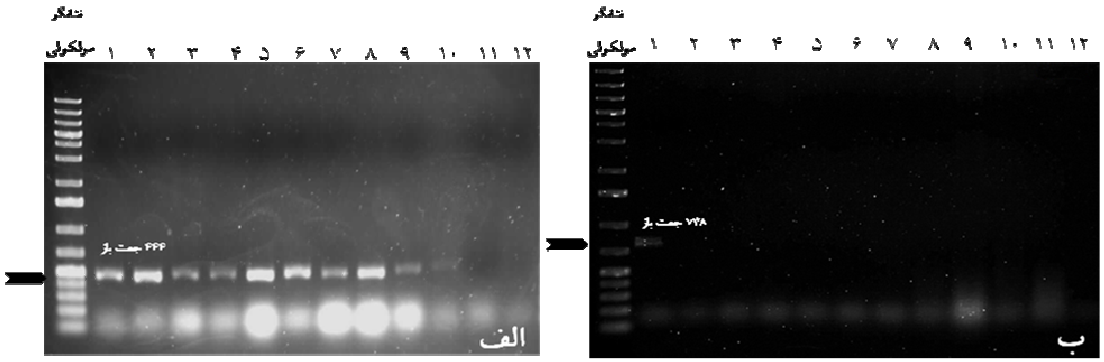


[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

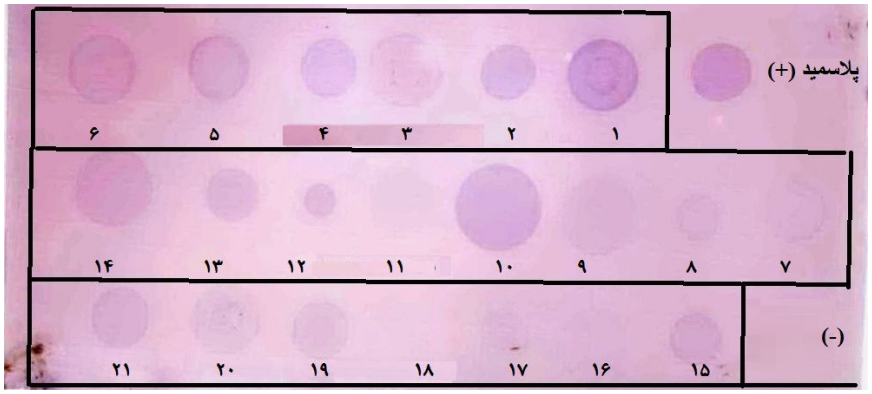
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]



**شکل ۲. آزمون شیمی سلولی شناسایی بیان ژن *gus*. فعالیت ژن *gus* به‌وسیله سوبسترای x-gluc مورد آزمون قرار گرفت. در تصویر سمت چپ، گیاه شاهد قرار دارد و سمت راست برگی از گیاه تراریخت را نشان می‌دهد.**




**شکل ۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای برخی از گیاهان رشد کرده روی محیط انتخابی. الف: باندهای حاصل از تکثیر ژن *gus* در این ۹ نمونه را نشان می‌دهد. ب: همان ۹ نمونه مثبت ژن *gus* تحت آزمون واکنش زنجیره‌ای برای ژن *vir G* قرار گرفتند که هیچکدام آلودگی باکتریایی حاصل از اگروباکتریوم را از خود نشان ندادند. نمونه ۱ در هر دو شکل شاهد مثبت و نمونه‌های ۱۱ و ۱۲ به‌ترتیب شاهد منفی آب و گیاه غیر تراریخت می‌باشند.**



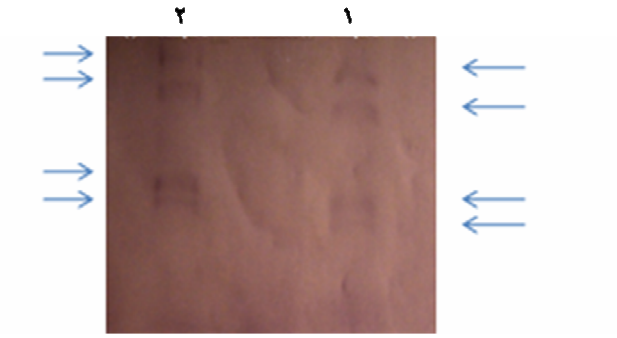

**شکل ۴. بیست و یک نمونه ازگیاهان حاصل از ریزنمونه‌های جوانه جانبی و برگی تحت آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای برای ژن *gus* قرار گرفتند. پلاسمید به عنوان شاهد مثبت (+) و گیاه غیر تراریخت به عنوان شاهد منفی (-) در نظر گرفته شد.**

قرار گرفتند. شکل ۴ نشان‌دهنده دورگه شدن قطعه نشان‌دار با DNA استخراجی برخی از این گیاهان است. آزمون لکه‌گذاری سادرن برای دو گیاه تراریخت از منشأ برگی دو رقم بارتلت و هرو دیلایت با توجه به نتایج آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای صورت پذیرفت. در هر یک از گیاهان، حداقل ۴ نسخه از این ژن تشخیص داده شد (شکل ۵). در ضمن، در گیاهان غیر تراریخت



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]




**شکل ۵. آنالیز دورگه‌سازی سادرن برای ژن *gus*. DNA کل ژنومی (۲۰ µg) به‌وسیله آنزیم *HindIII* هضم گردید و به‌وسیله آگاروز ۰/۸٪ جدا گشت و به غشای نایلونی منتقل شد. دورگه‌سازی با قطعه نشان‌دار شده ژن *gus* انجام پذیرفت. نمونه‌های ۱ و ۲ گیاهان تراریخت به‌ترتیب بارتلت و هرو دیلات قرار دارد که هر یک ۴ نسخه از ژن مورد نظر را نشان می‌دهند.**

این ارقام نیز باندی مشاهد نشد. این نتایج تصدیق‌کننده نتایج حاصل از آزمون‌های قبلی بود.

## نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین گزارش موفقیت‌آمیز انتقال ژن به گلابی در ایران محسوب می‌شود. در این تحقیق، بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر انتقال ژن انجام پذیرفت. در این گزارش، دو ریزنمونه برگی و جوانه جانبی برای هر یک از فاکتورها به‌صورت مجزا بررسی گردید. علت این جداسازی اختلاف آنها در محیط‌های مختلف تلقیح، هم‌کشتی و انتخابی بود. در ابتدای این برنامه، محیط‌ها یکسان انتخاب شده بودند. اما جوانه جانبی در محیط باززایی برگی به‌صورت شیشه‌ای درآمد. پس از آن تصمیم گرفته شد که برای مریستم جوانه جانبی، محیط تکثیر در نظر گرفته شود. نتایج نشان داد که بهترین تیمارها به منظور انتقال ژن گزارشگر به ارقام مورد بررسی، به‌طورکلی استفاده از غلظت کم باکتری، زمان کوتاه هم‌کشتی، غلظت زیاد استوسرینگون و حضور پلورونیک است. از آنجایی که اثبات انتقال ژن در گیاهان نسل اول از اهمیت زیادی برخوردار است، در این آزمایش علاوه بر تغییراتی که در آزمون بیان ژن *gus* یا همان رنگ‌آمیزی GUS داده شد، از آغازگرهای ژن *virG* نیز استفاده شد تا عدم آلودگی اگروباکتریومی در گیاهانی که موفق به باززایی در محیط انتخابی شده بودند به اثبات برسد. با توجه به نتایج به‌دست آمده و اهمیت خانواده سیبیان، خصوصاً گلابی، پیشنهاد می‌شود این بهینه‌سازی روی ارقام دیگر این میوه نیز مورد بررسی قرار گیرد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و هم‌چنین از جناب آقای دکتر امیر موسوی که در پیشبرد این تحقیق مؤثر بوده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده

1. Cheng, M., J. E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, T. W. Conner and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971-980.
2. Chevreau, E. and R. M. Skirvin. 1992. Pears. PP. 263-276. *In:* Hammerschlag, F. A. and R. E. Litz (Eds.), Biotechnology of Perennial Fruit Crops, CAB International, Cambridge.
3. Davey, M. R., R. Marchant and J. B. Power. 2003. Protoplasts of grain and forage legumes: Their exploitation in genetic manipulation, physiological investigations and plant-pathogen interactions. PP. 133-153. *In:* Jaiwal, P.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]

and R. P. Singh (Eds.), Improvement Strategies for Leguminosae Biotechnology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

4. Ghareyazie, B. 1996. Transformation of Indica and other rices (*Oryza zativa* L.): Genetic integration, expression, inheritance and enhance insect resistance. PhD Thesis, University of Philippines, Los Banos, Philippine.
5. Janick, J. and N. J. Moore. 1996. Fruit Breeding: Tree and Tropical Fruits. John Wiley and Sons, New York, pp. 476-479.
6. Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. V. Bevan. 1987. GUS fusion: B-glucronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6: 3901-3907.
7. Kaneyoshi, J., K. Wabiko, S. Kobayashi and T. Tsuchiya. 2001. *Agrobacterium tumefaciens* AKE10-mediated transformation of an Asian pea pear, *Pyrus cetulaefolia* Bunge: host specificity of bacterial strains. *Plant Cell Report* 20: 622-628.
8. Kosugi, S. Y., K. Ohashi, K. Nakajima and Y. Aria. 1990. An improved assay for β-glucuronidase in transformed cell: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β- glucuronidase activity. *Plant Science Limerick* 70: 133-140.
9. Leblay, C., E. Chevreau and L. M. Raboin. 1991. Adventious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus Communis* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 25: 99-105.
10. Lowe, K. C., M. R. Davey, J. B. Power and B. J. Mulligan. 1993. Surfactant supplements in plant culture systems. *Agro Industrial High Technology* 4: 9-13.
11. Matsuda, A., M. Gao, K. Isuzugawa, T. Takashina and K. Nishimura. 2005. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communi*s L.) with leaf-section and axillary. *Plant Cell Report* 24: 45-51.
12. Mourgues, F., E. Chevreau, C. Lambert and A. De Bondt. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Report* 16: 245-249.
13. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee. 1990. Structural features of non-ionic polymer molecules responsible for protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnology Program* 6: 391-397.
14. Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
15. Norelli, J. L., H. S. Aldwinckle, L. Destefano-Beltran and J. M. Jaynes. 1994. Transgenic 'Malling 26' (M. 7) apple expressing the *attacin E* gene has increased resistance to *Erwinia amylovara*. PP. 333-338. *In:* Schmidt, H. and E. Kellerhals (Eds.), Progress in Temperate Fruit Breeding, Kluwer Academic Pub., London.
16. Quoirin, M. and P. Lepoivre. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae* 78: 437-442.
17. Sambrook, J. and D. W. Russel. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
18. Schaart, J. G., K. J. Puite, L. Kolova, N. Pogrebnyak, A. C. Cassells and P. W. Jones. 1995. Some methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium*. *Euphytica* 85: 131-134.
19. Trifonova, A., D. Savova, K. Ivanova, H. Schmidt and M. Kellerhals. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivar. *Plant Breeding* 1: 343-347.
20. Wu, J. Y., Q. Ruan and H. Y. P. Lam. 1997. Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 341-348.
21. Yao, J. L., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson and B. Morris. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Report* 14: 407-412.
22. Zakeri, Z. and B. Sharifnabi. 1991. Fire blight of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, pp. 157-159. (In Farsi).
23. Zohour, A. and N. Rahmani Moghaddam. 2004. Spread of fire blight in Khorasan. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, pp. 42-45. (In Farsi).

[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.15.3 ]