انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم و تحلیل گیاهان تراریخت در صنوبر سیاه هیبرید (*Populus × euromericana* Dode Guinier)

شهنوش نیری[۱] و بهرام باغبان کهنه‌روز[۲،*]

۱- دکتری تخصصی، گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴)

چکیده

صنوبر سیاه هیبرید (*Populus × euramericana*)، گیاهی با کاربردهای مهم اقتصادی در صنایع خمیرچوب و کاغذ، سوخت زیستی و مواد نانوسلولزی و حذف آلودگی‌های خاک است. در این پژوهش، شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم و باززایی مستقیم گیاه با استفاده از بافت میانگره ساقه صنوبر سیاه هیبرید ارائه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخت انجام شد. جهت باززایی گیاه کامل از کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه در محیط‌کشت القای ساقه‌زایی حاوی محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) و غلظت‌های مختلف ترکیبات BAP × IBA و برای ریشه‌زایی (RIM) از محیط‌کشت القای ریشه‌زایی حاوی غلظت‌های IBA × NAA استفاده شد. با ارزیابی فاکتورهای فیتوهورمونی در باززایی مستقیم، بالاترین میزان باززایی ساقه (۲۸/۵۷ ساقه در هر ریزنمونه) از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد. بهترین ریشه‌زایی ساقه‌های باززا در محیط‌کشت RIM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA تولید شد. ۱۰۰ درصد گیاهان باززا با محیط سازگار شده و به گلخانه منتقل گردیدند. نتایج مربوط به حساسیت به علف‌کش نشان داد که ۰/۵ میکرومولار Basta® سیستم گزینش دقیقی جهت مهار سلول‌های غیرتراریخت فراهم می‌آورد. بالاترین فراوانی انتقال ژن (۹۳/۳۳ درصد) از طریق پیش‌کشت ریزنمونه‌ها به‌مدت ٦ روز و تلقیح آن‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 (OD_{600} = ۰/٦) همراه ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. آنالیزهای لکه‌گذاری سادرن، RT-PCR و آزمون هیستوشیمیایی GUS به‌ترتیب درج یک تا دو نسخه ژن *gus* در DNA ژنومی و بیان پایدار آن را در گیاهان نسل T0 منتخب تأیید کرد. یافته‌های این تحقیق می‌تواند به‌عنوان شیوه‌نامه باززایی و انتقال ژن به گیاه صنوبر سیاه هیبرید مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: باززایی مستقیم، بیان ژن GUS، لکه‌گذاری سادرن، میانگره‌ساقه، *Populus × euramericana*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

مقدمه

صنوبر سیاه هیبرید (*Populus* × *euramericana*) یکی از انواع صنوبر هیبرید است که از تلاقی بین‌گونه‌ای *Populus deltoides* اروپایی و *P. nigra* آمریکایی به‌دست آمده است و در برابر آفات و بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی مقاومت بالایی دارد (Arend and Fromm, 2007; Jiang *et al.*, 2015). بسیاری از گونه‌های هیبرید *Populus* sp. در مناطق حاصلخیز جهان به‌دلیل خصوصیات بی‌بدیل از جمله قابلیت رشد سریع، تکثیر رویشی و حجم بالای تولید بیوماس گیاهی (۲۵ تا۳۰ مترمکعب چوب در هکتار) جهت بهره‌برداری در صنایع چوب، خمیرکاغذ، گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده، بیابان‌زدایی و تولید بیواتانول و مواد سلولزی به‌صورت انبوه کشت می‌شوند (Rishi *et al.*, 2001). چوب صنوبر سیاه هیبرید (*Populus* × *euramericana*) سبک، نرم، یکنواخت، دارای رنگ روشن، با کیفیت، مقاوم در برابر خمش و کشش است (Arend and Fromm, 2007; Confalonieri *et al.*, 1998; Cong *et al.*, 2013). کاربردهای متنوع این گونه هیبرید و ارزش اقتصادی بالای آن منجربه کشت انبوه آن در نوار شمالی ایران شامل مناطق آذربایجان تا خراسان شمالی شده است؛ به‌طوری که بیش از ۲۷ درصد جنگل‌کاری‌های شمال کشور به این گونه اختصاص دارد (Khosravan *et al.*, 2017).

اهمیت اقتصادی گونه‌های هیبرید صنوبر سیاه منجربه جلب‌توجه بسیاری از پژوهشگران در توسعه صفات مهم اقتصادی با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک شده است که می‌تواند محدودیت‌های روش‌های معمول اصلاح‌نباتات را جهت ارتقای درختان جنگلی از پیش روی اصلاح‌گران بردارد (Confalonieri *et al.*, 2003). این گیاهان چوبی به‌دلیل اندازه کوچک ژنوم (۵۰۰~ مگا جفت‌باز)، دسترسی به کتابخانه برچسب‌های توالی‌های بیان‌شده، دوره رشد کوتاه، امکان باززایی و تکثیر درون‌شیشه‌ای و سهولت در انتقال ژن، به‌عنوان یک گیاه مدل، گزینه مناسبی در مطالعات ژنتیکی، ژنومیکس عملکردی، مورفوفیزیولوژی، سینتتیک بیولوژی، ویرایش ژنوم، سیستم بیولوژی، بیولوژی مولکولی گیاهان چوبی قلمداد می‌شود (Abbas *et al.*, 2020; Bae *et al.*, 2011; Balestrazzi *et al.*, 2009; Bali *et al.*, 2016; Biswal *et al.*, 2015; Bjurhager *et al.*, 2010; Bonadei *et al.*, 2012; Bruegmann *et al.*, 2019; Bryan *et al.*, 2016; Buhl *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2016; Caruso *et al.*, 2008; Che *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2003; Dharmawardhana *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2015; Foston *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2000; Hori *et al.*, 2020; Igasaki *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2020; Movahedi *et al.*, 2021; Muhr *et al.*, 2018; Nayeri *et al.*, 2022; Raj *et al.*, 2011; Ruttink *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2019; Stanciulescu *et al.*, 2018; Street *et al.*, 2006; Triozzi *et al.*, 2021; Xin *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021; Yoo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021). با این اوصاف، کلیه روش‌های مهندسی ژنتیک و انتقال صفات مطلوب در این گیاهان چوبی تحت تأثیر توان باززایی آن‌ها قرار دارد. در گونه‌های صنوبر سیاه و کلون‌های هیبرید آن، تاکنون شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم صرفاً در گونه صنوبر سیاه (*P. nigra* L. *var. italica*) گزارش شده است (Confalonieri *et al.*, 1994; Mohri *et al.*, 1996; Nishiguchi *et al.*, 2006). علاوه‌بر این، یوتوشنکو و میسرا (Yevtushenko and Misra, 2010) توانستند شیوه‌نامه باززایی و انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم با استفاده از ریزنمونه‌های ساقه و برگ در گونه هیبرید دیگری از صنوبر سیاه (*P. nigra* × *P. maximowiczii* A. Henry) را ارائه کنند. با این‌حال، راتلج و دوگلاس (Rutledge and Douglas, 198) نشان دادند که امکان باززایی بافت ساقه در صنوبر سیاه هیبرید *P.* × *euramericana cv.* Robusta وجود ندارد. همچنین، تولید درون‌شیشه‌ای گیاهچه‌های کامل در گونه‌های صنوبر سیاه هیبرید (*P.* × *euramericana*) برای اولین بار توسط آگراوال و گوپتا (Agrawal and Gupta, 1991) با استفاده از کشت ساقه‌های حاوی جوانه جانبی مربوط به درختان ۲۵ ساله صنوبر سیاه در محیط‌کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) گزارش شد. با توجه به‌دشواری باززایی گیاه از ریزنمونه ساقه و برگ گونه هیبرید *P.* × *euramericana*، تاکنون انتقال ژن با آگروباکتریوم و باززایی گیاهان تراریخته در این گونه گزارش نشده است. در این تحقیق برای اولین بار شیوه‌نامه بهینه جهت باززایی مستقیم

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

گیاه به‌همراه شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم از ریزنمونه‌های میانگره ساقه صنوبر سیاه هیبرید بین‌گونه‌ای *Populus* × *euromericana* Dode Guinier گزارش شد. در این مطالعه، بهترین ترکیب غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (Plant growth regulators, PGR) سیتوکینین و اکسین در باززایی بافت میانگره ساقه بدون القای کالوس در گیاه صنوبر سیاه هیبرید شناسایی گردید. حداقل غلظت مهارکننده علف‌کش ®Basta به‌عنوان نشانگر گزینش گیاهی، جهت تولید گیاهان تراریخته در ریزنمونه‌های میانگره ساقه تعیین گردید. جهت دستیابی به شیوه‌نامه انتقال ژنتیکی به‌روش آگروباکتریوم اثر عوامل مؤثر در انتقال ژن بررسی شد و شیوه‌نامه انتقال ژن جهت تولید گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گرفت. انتقال و بیان پایدار ژن *gus* در ژنوم گیاهان T0 صنوبر سیاه هیبرید با استفاده از روش‌های لکه‌گذاری سادرن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) تأیید شد.

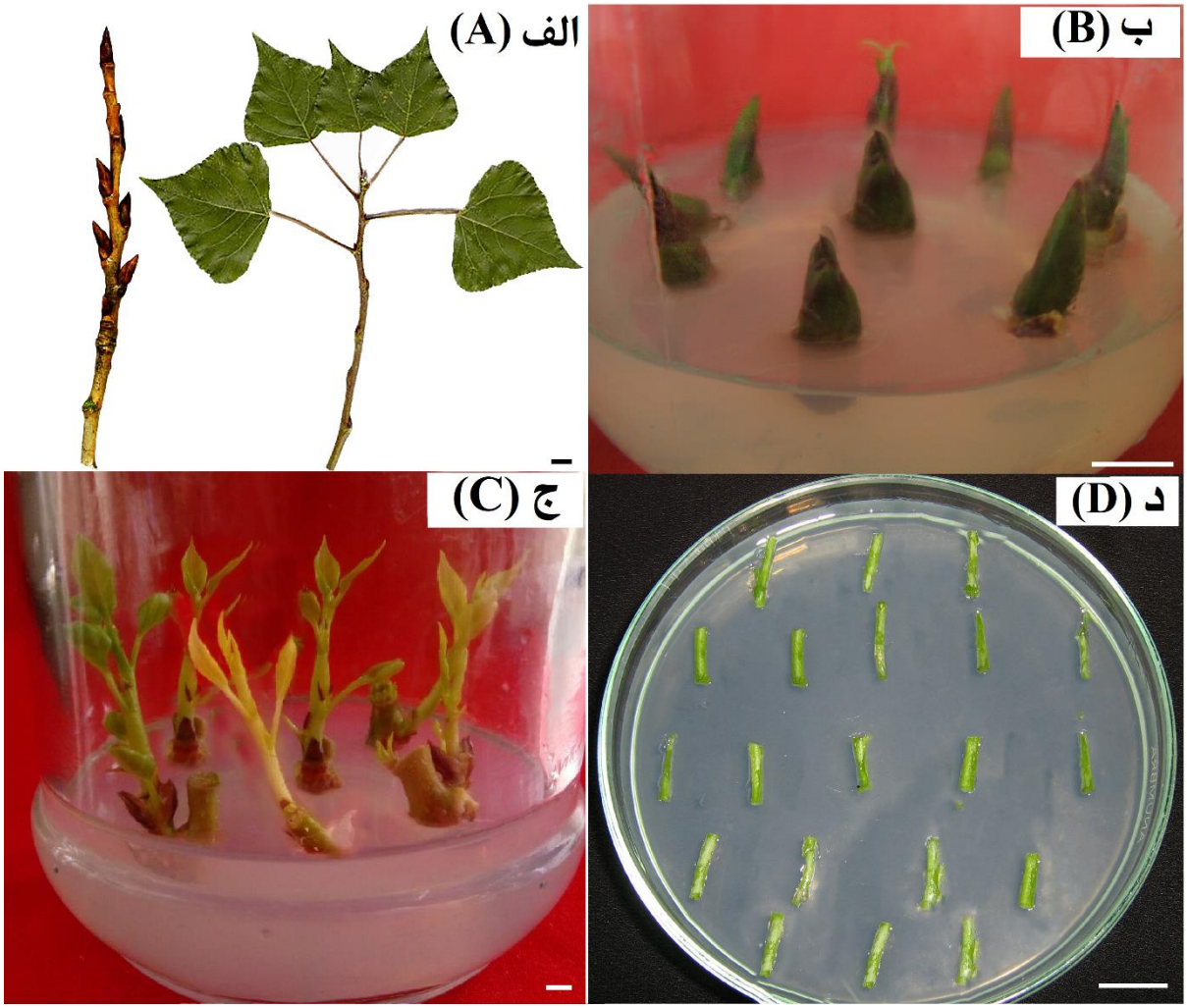
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ضدعفونی سطحی: در این تحقیق از درختان شناسنامه‌دار صنوبر سیاه هیبرید *P.* × *euramericana* Dode Guanier cv. 561/41 واقع در باغ تحقیقات گیاه‌شناسی دانشگاه تبریز (BRGUT) (عرض جغرافیایی 38°03'30.4"N شمالی و طول جغرافیایی 46°20'07.8"E شرقی، با میانگین بارندگی ۳۳۰ میلی‌متر) استفاده شد. جهت تأمین ریزنمونه، تعداد۳۰ عدد ساقه جوان و در حال رشد (به‌طول ۳۰–۲۰ سانتی‌متر و قطر تقریبی ۰/۵–۰/۲ سانتی‌متر) حاوی جوانه انتهایی و جوانه‌های جانبی توسط قیچی باغبانی از درخت جدا شده (شکل ۱–الف) و در ظرف حاوی آب دیونیزه اتوکلاو شده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت حذف مواد فنلی و آلودگی‌های سطحی، شاخه‌های حاوی جوانه‌های انتهایی و جانبی (شکل ۱–الف) با استفاده از مسواک حاوی یک قطره مایع ظرف‌شویی به ازای هر ساقه به‌مدت ۵ دقیقه به‌طور کامل شستشو و سپس به‌مدت ۲ ساعت زیر آب روان آبکشی شدند. نمونه‌ها به‌ترتیب با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مایع سفیدکننده تجاری ۲۰ درصد (هیپوکلریت سدیم حاوی ۵ درصد کلرین فعال) به‌مدت ٦ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه با شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه، ضدعفونی سطحی شدند. در هر مرحله ضدعفونی، نمونه‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با آب دیونیزه‌ی اتوکلاو شده، شستشو شدند. در نهایت نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب دیونیزه‌ی اتوکلاو شده، به‌مدت ۵ دقیقه شستشو و آبکشی شدند.

منبع و نوع ریزنمونه: جوانه‌های انتهایی و جانبی ضدعفونی شده در محیط کشت پایه MS حاوی آگارز ۰/٦ درصد با ۵/۷ = pH به‌مدت ٤ هفته کشت شدند (شکل ۱–ب). در این مطالعه جهت باززایی و انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم از ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده شد (شکل ۱–ج).

بررسی تأثیر ترکیب و غلظت PGRها در القای ساقه‌زایی: میزان باززایی ساقه در ریزنمونه میانگره ساقه (طول ۱ سانتی‌متر) صنوبر سیاه هیبرید روی محیط‌کشت القاء ساقه‌زایی (Shoot inducing medium, SIM) حاوی محیط‌کشت پایه MS و BAP (CAT. No. B3274, Sigma-Aldrich, USA) بر اساس مطالعات انجام شده در گونه‌های *P. alba* و *P. nigra* (Alba, 1992; Biswas *et al.*, 2012; Confalonieri *et al.*, 1998; Confalonieri *et al.*, 2000; Pintarić, 2008; Yevtushenko and Misra, 2010; Zhang *et al.*, 2021) و نتایج آزمایش‌های اولیه در گونه *P* × *euramericana* که قبل از شروع آزمایش اصلی تجربه شده‌اند در ٤ غلظت (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (CAT. No. I5386, Sigma-Aldrich, USA) در ۳ غلظت (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، آگار ۰/٦ درصد (Extra pure Agar CAS 9002-18-0, Merck, Germany) و ۵/۸ = pH مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱–د). جهت القای افزایش طول ساقه، ریزساقه‌ها به محیط‌کشت القا طویل شدن ساقه (Shoot elongation medium, SEM) حاوی محیط کشت پایه MS و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار واکشت و تعداد ساقه‌زایی به ازای هر ریزنمونه پس از ٦ هفته کشت اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]



شکل ۱– منبع و نوع ریزنمونه مورد استفاده جهت تعیین شیوه‌نامه باززایی مستقیم گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P.* ×*euramericana* Dode Guinier)

Figure 1. Explant source and type for shoot regeneration of hybrid black poplar (*P.* ×*euramericana* Dode Guinier)

الف) شاخه جوان و سالم به طول تقریبی ۲۰–۳۰ سانتی‌متر و قطر ۰/۳ سانتی‌متر جدا شده از درخت صنوبر سیاه هیبرید؛ در سمت چپ جوانه‌های جانبی و انتهایی درخت صنوبر نشان داده شده است. ب) کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی گیاه صنوبر سیاه هیبرید در محیط‌کشت MS جهت جوانه‌زنی و رشد ساقه. ج) ساقه‌های رشد یافته از جوانه‌ها پس از ٤ هفته کشت در محیط پایه MS؛ کشت‌های مورد نظر در فیتوترون با دوره فتوتروپیسم ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و شدت نور ٤٥٠٠ لوکس حاصل از لامپ فلورسنت سفید و زرد در دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. د) کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در محیط‌کشت SIM. خطوط نشان دهنده واحد اندازه‌گیری معادل ۱ سانتی‌متر است.

A) The young and healthy branches with 20-30 cm in length and 0.3 cm in diameter from hybrid black poplar. In the left, the apical and lateral buds of the hybrid black poplar was shown; B) The lateral and apical buds cultured on MS medium to obtain *in vitro* regenerated shoots; C) The shoots from buds after 4 weeks culturing on MS medium. The cultures were maintained at 26°C, 16/8 hrs light/dark photoperiod exposing to 4500 Lux light intensity from a cool white, fluorescent lamp. D) The internodal stem explants with 1 cm long from the *in vitro* regenerated shoots cultured on SIM. Bars indicate 1 cm.

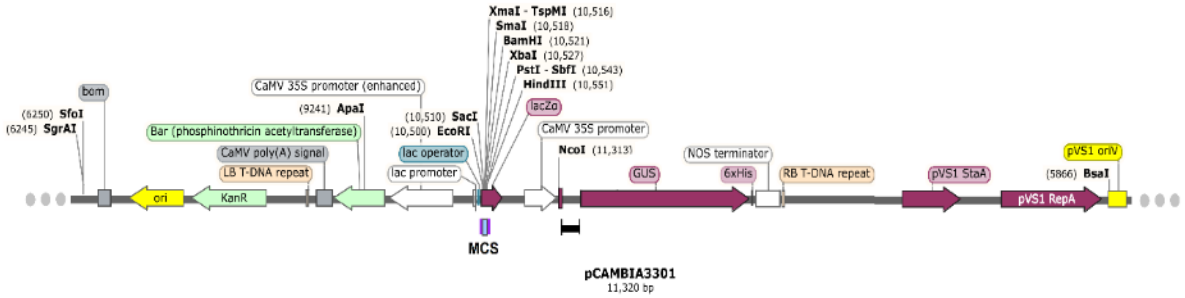
القای ریشه‌زایی: ریزساقه‌ها (به طول ۱–۲ سانتی‌متر) به محیط‌کشت ریشه‌زایی (Root inducing medium, RIM) حاوی محیط‌کشت پایه MS حاوی ترکیبات فیتوهورمونی IBA و NAA (CAT. No. N0640, Sigma-Aldrich, USA) هرکدام در ۳ غلظت متفاوت شامل ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، آگار ۰/٦درصد و pH = ٥/٨ انتقال داده شدند. درصد فراوانی ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده به ازای هر تیمار و تعداد ریشه و میانگین طول ریشه‌ها به ازای هر گیاهچه پس از ۸ هفته اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

سازگاری به محیط و انتقال به گلخانه: گیاهچه‌های ریشه‌دار (به طول ٦ تا ۸ سانتی‌متر) از محیط‌کشت استریل خارج شده و ریشه‌های آن‌ها با آب مقطر شستشو داده شد. پس از حذف محیط‌کشت، گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی مخلوط ماسه، پیت ماس و پرلیت با نسبت ۳:۲:۱ انتقال داده شدند. جهت حفظ رطوبت نسبی گیاهچه‌ها، گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی محافظت شدند. با ایجاد سوراخ در سرپوش پلاستیکی به‌صورت هفتگی از میزان رطوبت فضای اطراف گیاه کاسته و امکان تطابق‌پذیری گیاه با محیط گلخانه فراهم شد. پس از سازگاری، گیاهان به خاک منتقل شده و در فضای گلخانه قرار گرفتند.

آزمون حساسیت علف‌کش Basta® روی ریزنمونه‌های میانگره ساقه: جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده علف‌کش Basta®، ریزنمونه‌های میانگره ساقه روی محیط‌کشت SIM حاوی محیط پایه MS، BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر)، آگار ٦ درصد و علف‌کش Basta® (REG.NR. L4872, Bayer CropScience AG, Germany) در ۵ غلظت مختلف شامل ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱/۰ میکرومولار کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار واکشت شدند و درصد فراوانی ریزنمونه‌های باززا شده و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به ازای هر تیمار پس از ٦ هفته کشت اندازه‌گیری شد.

ناقل بیانی و سویه‌های *Agrobacterium tumefaciens*: جهت بررسی میزان کارایی انتقال ژن در ریزنمونه‌های میانگره ساقه، دو سویه باکتری *A. tumefaciens* شامل LBA4404 (اکتوپین) با قدرت بیماری‌زایی پایین (Hoekema *et al.*, 1983; Ooms *et al.*, 1982) و EHA105 (آگروپین) با قدرت بیماری‌زایی بالا (Hood *et al.*, 1993) در نظر گرفته شد. DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *uidA* رمزکننده پروتئین GUS و ژن گزینشگر گیاهی *bar* رمزکننده آنزیم فسفینوتریسین N–استیل ترانسفراز (عامل مقاومت به علف‌کش Basta®) تحت کنترل پیشبر فوق‌بیانی 35S CaMV است. علاوه‌بر این، در ساختار این ناقل بیانی ژن *npt*II رمزکننده نئومایسین فسفوترنسفراز II (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین) جهت گزینش سلول‌های تراریخته باکتریایی استفاده شده است (شکل ۲). ناقل بیانی مورد نظر توسط فرآیند تراریختی به روش الکتروپوریشن به سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم مستعد در هر دو سویه، منتقل شد (Green and Sambrook, 2020; Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook and Russell, 2006). سلول‌های باکتریایی نوترکیب در محیط‌کشت LB (Luria-Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، استرپتومایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر گزینش شد. وجود DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301 در سلول باکتریایی نوترکیب طی واکنش کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* (جدول ۱) تأیید گردید.



شکل ۲– نمای شماتیک نقشه ناقل بیانی pCAMBIA3301 (۱۱۳۲۰ جفت‌باز) حاوی ژن گزارشگر GUS (فلش بنفش) و ژن گزینشگر گیاهی *bar* رمزکننده فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (فلش سبز) جهت ایجاد مقاومت به علف‌کش Basta® در گیاهان تراریخته

Figure 2. Schematic diagram from map of pCAMBIA3301 binary vector (11320bp) containing GUS reporter gene (Purple-colored arrow) and *bar* plant selectable marker gene encoding phosphinothricin acetyltransferase enzyme (Green-colored arrow) to obtain Basta® herbicide resistance in transgenic plants.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

شیوه‌نامه انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم: جهت بررسی تأثیر مدت‌زمان پیش‌کشت در میزان کارایی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم، ریزنمونه‌های میانگره ساقه در محیط‌کشت SIM در ٤ تیمار زمانی شامل ۰، ۳، ٦ و ۹ روز کشت شدند. سوسپانسیون سلول‌های آگروباکتریوم سویه‌های LBA4404 و EHA105 (CFU برابر با ۱۰^۸× ۳/۱۵ سلول در هر میلی‌لیتر محیط) در سه غلظت OD_{600} (۰/۳، ۰/٦ و ۰/۹) در محیط تلقیح (Inoculum medium, IM) (محیط‌کشت ۰/۵MS حاوی میواینوزیتول (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ساکارز (۵ درصد) و pH = ۵/۲) تعلیق شدند. ریزنمونه‌های مربوط به هر تیمار پیش‌کشت SIM در ۳ تیمار سوسپانسیون تلقیح باکتریایی (OD_{600} = ۰/۳، ۰/٦ و ۰/۹) در دمای اتاق و در شرایط تاریکی به‌مدت ۵ دقیقه تیمار شدند. در این مرحله غلظت استوسرینگان (Acetosyringone, AS) و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها به میزان حداقل در نظر گرفته شد. پس از حذف مازاد رطوبت و سلول‌های باکتریایی، توسط کاغذ صافی استریل اتوکلاو شده، ریزنمونه‌های تلقیح شده جهت هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با هر یک از سویه‌های آگروباکتریوم به محیط کشت SIM منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مطلق به‌مدت ٤۸ ساعت نگهداری گردید. سپس، ریزنمونه‌های تلقیح شده با سلول‌های باکتریایی سویه LBA4404 به محیط گزینش (Selection medium, SM) حاوی محیط‌کشت پایه MS، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA، ۰/۵ میکرومولار Basta® و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شد. جهت حذف سلول‌های باکتریایی سویه EHA105 علاوه‌بر سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از تیمتین ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز در محیط‌کشت SM استفاده گردید.

در مرحله بعد، اثر هریک از عوامل AS در ٤ غلظت (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی در ٤ تیمار (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) به‌طور مستقل در میزان انتقال ژن نیز مورد مطالعه قرار گرفت. درصد فراوانی تراریختی ریزنمونه‌های بازرا شده به ازای هر تیمار بر اساس تعداد ریزنمونه‌های حاوی گیاهچه‌های T0 پس از ٦ هفته اندازه‌گیری شد.

شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و سازگاری گیاهان: محیط‌کشت‌های مورد نظر در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۵ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌های درون‌شیشه‌ای و گیاهان بازرا شده جهت سازگاری در اتاقک رشد با دوره فتوتروپیسم ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ٤۵۰۰ لوکس حاصل از لامپ فلورسنت سفید و زرد در دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA کل ژنومی (gDNA) و تأیید اولیه تراریختی گیاهچه‌های T0 به‌روش PCR: از هر ریزنمونه بازرا شده در محیط SM، یک گیاهچه بازرا شده به محیط SEM و RIM حاوی ۰/۵ میکرومولار Basta® و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت القای ریشه‌زایی منتقل شد. DNA کل ژنومی گیاهچه‌های بازرا شده‌ی منتخب با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle, 1987). تراریختی گیاهچه‌های T0 طی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی ژن‌های *bar* و *gus* تأیید اولیه گردید. عدم آلودگی نمونه‌ها با سویه‌های آگروباکتریوم طی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir G* مشخص شد. توالی آغازگرهای اختصاصی هر ژن در جدول ۱ ارائه شده است. تکثیر قطعات ژنی طی واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم gDNA، ٤۰۰ نانومولار از هر یک از یک جفت آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X واکنش PCR (Vivantis, Cat. No. PR8252C) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه چرخه‌ساز حرارتی (Astech, Japan) طبق برنامه دمایی ذیل انجام گرفت. مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و مرحله اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۰ ثانیه و سپس مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصولات PCR به‌همراه ۲ میکرولیتر نشانگر وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز (Cat. No. SM1153, Thermo Scientific™, USA)، در ژل آگارز ۱ درصد (Sigma-Aldrich, CAS. No. 9012-36-6) حل شده در بافر 0.5X TBE و حاوی محلول RedSafe™ 20000X (Cat. No. 21141, Intron biotechnology, USA) ۵ درصد (v/v) بارگذاری شده و به‌مدت یک ساعت الکتروفورز (۸۵ ولت) گردید. نتایج الکتروفورز در دستگاه ژل‌داک (Gel Imaging Quantum ST4, Vilber Lourmat, France) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

جدول ۱- توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس در واکنش PCR جهت تأیید تراریختی گیاهچه‌های T0

Table 1. The sequence of forward and reverse primes used for PCR reaction to validate the regenerated T0 plantlets

نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی (5'→3') Sequence (5'→3')	طول قطعه تکثیر یافته (bp) Length of amplificant (bp)
bar	Bar-F Bar-R	ATGAGCCCAGAACGACGCCCGG TCAAATCTCGGTGACGGGCAGG	552
gus	GUS-F GUS-R	ACCTCGCATTACCCTTACGCTGAA AATCGCCGCTTTGGACATACC	450
Vir G	Vir-F Vir-R	ATGATTGTACATCCTTCACG TGCTGTTTTTATGAGTTGAG	850
α-actin	Act_F Act_R	AGGCATCCACGAAACCACAT CTTGGGGCTAGTGCTGAGAT	153

آنالیز لکه‌گذاری سادرن: جهت تعیین تعداد نسخه‌های ژن انتقالی، gDNA (٦ میکروگرم) از ۵ گیاهچه باززا شده T0 به روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle, 1987). gDNA مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. DNA برش‌یافته در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و به‌روش کاپیلاری به غشای نایلونی با بار الکتریکی مثبت منتقل گردید. قطعه‌ای از ژن *gus* (٤٥٠ جفت‌باز) به‌عنوان DNA کاوشگر استفاده شد و طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده با استفاده از digoxigenin-11-dUTP در کیت سنتز پروب PCR DIG Probe Synthesis (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. 1163690910) نشانه‌گذاری گردید. دورگ‌گیری مولکول‌های کاوشگر ٤٥٠ جفت‌بازی (تک رشته شده با شوک حرارتی آبجوش و یخ صفر درجه) پس از بلوکه کردن غشای نایلونی با بافر مربوطه در درون لوله‌های اتاقک دورگ‌گیری در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هشت ساعت انجام شد. آنتی‌بادی اختصاصی به‌کار رفته علیه مولکول‌های DIG الحاقی به پروب، anti-DIG متصل به آلکالین فسفاتاز بوده و برای آشکارسازی سیگنال طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده از سوبسترای نیتروبلو تترازولیوم کلرید (Nitro blue tetrazolium chloride, NBT) و ۵-برومو-٤-کلرو-۳-ایندولیل فسفات (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP) موجود در کیت شناسایی لومینسانس DIG (Roche Applied Science, Cat. No. 11363514910) استفاده گردید.

استخراج RNA کل و واکنش RT-PCR: RNA کل از نمونه‌های برگی ۵ گیاهچه T0 منتخب و گیاه غیرتراریخته به‌روش Trizol (CAT. No. RN7713C, RNXTM, Invitrogen, USA) استخراج گردید. پس از تیمار با آنزیم Dnase I (Thermo Scientific™, USA, Cat. No. EN0525)، عدم آلودگی نمونه‌های RNA با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *α-actin* (جدول ۱) تأیید شد. نمونه‌های فاقد باند DNA نشان‌دهنده عدم آلودگی DNA ژنومی بود (Dashchi *et al.*, 2021). DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آغازگر الیگو dT_{12-18} بر اساس شیوه‌نامه کیت سنتز cDNA (Quanti Tect® Reverse Transcriptase Kit, Qiagen, Hilden, Germany) سنتز شد. برای ساخت رشته دوم و تکثیر cDNA از واکنش PCR مطابق برنامه دمایی اشاره شده و آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، استفاده شد. سپس محصولات PCR به‌همراه ۲ میکرولیتر نشانگر وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز (Thermo Scientific™, USA, Cat. No. SM1153)، در ژل آگارز ۱ درصد (Sigma-Aldrich, CAS. No. 9012-36-6) حل شده در بافر 0.5X TBE و حاوی محلول RedSafe™ 20000X ۵ درصد (v/v) بارگذاری شده و به‌مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید. نتایج الکتروفورز در دستگاه ژل‌داک مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

آزمون هیستوشیمیایی GUS: جهت تأیید بیان پایدار پروتئین گزارشگر GUS در گیاهان T0 از آزمون هیستوشیمیایی GUS استفاده شد. نمونه‌های برگی از ۵ گیاه صنوبر هیبرید T0 جداسازی و با محلول ۵-برومو٤-کلرو-۳-ایندولیل-بتا-D-گلوکورونید (X-Gluc) ۲ میلی‌مولار، بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH = ۷)، فری‌سیانید پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار، فروسیانید پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار و تریتون X-100 ۰/۱ درصد، به‌مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از رنگ‌آمیزی، محتوای کلروفیل بافت برگ با استفاده از اتانول ۹۵ درصد طی ٢٤ ساعت حذف شد (Gallagher, 1992).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS v.17.0 (SPSS In, Chicago, USA) انجام شد. بررسی القاء ساقه‌زایی در ریزنمونه‌های میانگره ساقه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely randomized design, CRD) با سه تکرار انجام شد. هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ ریزنمونه میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر، به‌عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. بررسی القای ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا در ترکیبات فیتوهورمونی مختلف در طرح CRD طی آزمایش فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۵ گیاهچه باززا بود که به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. آزمایش بررسی اثرات عوامل دخیل در میزان کارایی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم شامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها، نوع سویه آگروباکتریوم و غلظت سوسپانسیون باکتریایی (OD_{600}) بر اساس طرح CRD و آزمایش فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۱۰ ریزنمونه میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌های باززایی و انتقال ژن به روش آگروباکتریوم بر اساس تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه میانگین بر مبنای حداقل اختلاف معنی‌دار قابل‌اعتماد (posthoc Tukey (HSD انجام گرفت. آزمایش بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ®Basta، AS و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM هرکدام به‌صورت مستقل در طرح CRD و با ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۱۰ ریزنمونه میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌های مستقل مربوط به عوامل غلظت ®Basta، غلظت AS و مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط IM بر اساس One-way ANOVA و بر مبنای (posthoc Tukey(HSD در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد بررسی شد. بررسی توزیع نرمال داده‌های باززایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌ها بر اساس آزمون One- sample Kolmogorov-Smirnov (1-sample K-S) تأیید شد.

نتایج و بحث

باززایی مستقیم از ریزنمونه میانگره ساقه در صنوبر سیاه هیبرید (*Populus euromericana*×): نتایج آزمون ناپارامتری توزیع نرمال 1-sample K-S نشان داد که داده‌های تعداد ساقه باززا در تیمارهای فیتوهورمونی با میانگین ۱۲/۳۹ و انحراف معیار ۹/۴۹ با درجه اطمینان ۹۵ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. بر اساس نتایج بر اساس تجزیه واریانس نتایج مربوط به باززایی مستقیم (شکل ٤–الف و ب)، علاوه‌بر معنی‌داری اثرات اصلی، اثر متقابل معنی‌داری در ترکیب فیتوهورمون‌ها نیز مشاهده گردید (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل BAP × IBA نشان داد که کشت ریزنمونه میانگره ساقه در محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA با میانگین ۲۸/۵۷۳ ساقه باززا شده به ازای هر ریزنمونه بیشترین باززایی را داشته است. افزایش غلظت BAP حداکثر تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA تأثیر مثبت و معنی‌داری بر القای باززایی مستقیم ساقه دارد. به‌طوری که افزایش غلظت BAP از ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA با افزایش ۲ تا ٤ برابری در میزان القای ساقه همراه شد (شکل ۳–الف). در شکل ٤–الف میزان القای ساقه‌زایی ریزنمونه میانگره ساقه در صنوبر سیاه هیبرید در محیط SIM حاوی ترکیب فیتوهورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA پس از ٦ هفته نشان داده شده است. همچنین شکل ٤–ب، نمای نزدیک از باززایی یک ریزنمونه و تعداد ساقه‌های باززا شده را در محیط کشت SIM منتخب، حاوی ترکیب فیتوهورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را نشان می‌دهد. این ترکیب فیتوهورمونی به‌عنوان محیط‌کشت باززایی ساقه برای انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم روی ریزنمونه‌های میانگره ساقه استفاده شد.

اگرچه نوع بافت گیاه و نوع ریزنمونه در میزان باززایی و کارایی انتقال ژن به‌عنوان عواملی مهم گزارش شده‌اند (Confalonieri *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2013)، اغلب گونه‌های *Populus* sp. و کلون‌های هیبرید آن‌ها بدون استفاده از غلظت‌های PGR، قابلیت باززایی غیرمستقیم مناسبی از بافت برگ، میانگره ساقه و ریشه نشان دادند. با این‌حال چنین گزارشی در گونه *P. nigra* و هیبریدهای نزدیک به آن ارائه نشده است. اغلب مطالعات مربوط به باززایی و انتقال ژنتیکی در *P. nigra* مبتنی‌بر تولید درون‌شیشه‌ای کالوس، هم‌کشتی کالوس‌ها با آگروباکتریوم و باززایی از این روش بوده است (Confalonieri *et*

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

al., 1994; Mohri *et al.*, 1996; Nishiguchi *et al.*, 2006). با توجه به این‌که مسیر کالوس‌زایی می‌تواند ایجاد تنوع ناخواسته در گیاهان تراریخته نماید، پرهیز از این روش مطلوب می‌باشد (Rani *et al.*, 1995; Saieed *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2021). حذف مرحله کالوس‌زایی و تلقیح مستقیم ریزنمونه‌های القا شده با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم می‌تواند علاوه‌بر کاهش تنوع ژنتیکی، منجربه کاهش شدت آلودگی آگروباکتریومی و کاهش تولید نمونه‌های شبه‌تراریخته (False positive T0 plants) شود. مطابق آن‌چه که بیواس و همکاران (Biswas *et al.*, 2012) گزارش کردند، استفاده از فیتوهورمون BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA می‌تواند در ۸۷ درصد از ریزنمونه‌های میانگره ساقه در صنوبر سیاه (*P. nigra* L. *var. italica* Kohne) نیز منجربه باززایی مستقیم ساقه بدون القای کالوس شود.

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در القای ریشه‌زایی: گیاهچه‌های با طول ساقه ۱ تا ۲ سانتی‌متر در محیط RIM حاوی ۹ ترکیب غلظتی مختلف IBA و NAA کشت شدند. هر دو فیتوهورمون اکسین در ۳ سطح (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) اعمال شدند. نتایج اثرات ترکیبی غلظت‌های فیتوهورمون‌های IBA و NAA در صفات تعداد ریشه و طول ریشه گیاهان باززا شده تجزیه و تحلیل شدند. نتایج آزمون ناپارامتری توزیع نرمال 1-sample K-S نشان داد که داده‌های تعداد ریشه باززا شده (میانگین ± SD برابر با ۴/۴۸ ± ۵/۳۹) و میانگین طول ریشه‌ها در هر گیاه باززا (میانگین ± SD برابر با ۴/۷۶ ± ۷/۸۵) در مجموع تیمارهای فیتوهورمونی با درجه اطمینان ۹۵ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. نتایج نشان داد که تعداد و طول ریشه در سطوح ترکیبی IBA و NAA تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد دارند (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر فیتوهورمون‌های BAP و IBA بر صفت تعداد ساقه باززا شده از ریزنمونه‌های میانگره ساقه *Populus* × *euromericana*

Table 2. The variance analysis of shoot regeneration from internodal stem explant of *Populus* ×*euromericana* cultured on SIM with different BAP and IBA combinations

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار (Treatment)	11	286.772	30663312.03**
BAP	3	976.688	104433122.71**
IBA	2	66.698	7131710.79**
BAP × IBA	6	15.172	1622273.76**
خطا (Error)	24	9.352E-6	
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		7.57E-5	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد

**: Significant at 1% probability level

جدول ۳- تجزیه واریانس فیتوهورمون‌های NAA و IBA بر صفات تعداد و طول ریشه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های میانگره ساقه *Populus* × *euromericana*

Table 3. The variance analysis of the interaction effects of the traits, including root No. and root length in regenerated plantlets of *Populus* × *euromericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	تعداد ریشه (Number of root)		طول ریشه (Root length)	
		میانگین مربعات Mean square	F	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار (Treatment)	8	65.24	1504.45**	73.63	1959.78**
IBA	2	232.64	5351.70**	266.09	7082.34**
NAA	2	9.60	221.35**	6.58	175.11**
IBA × NAA	4	9.64	222.38**	10.92	290.83**
خطا (Error)	18	0.043		0.04	
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		3.85		2.55	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد

**: Significant at 1% probability levels

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

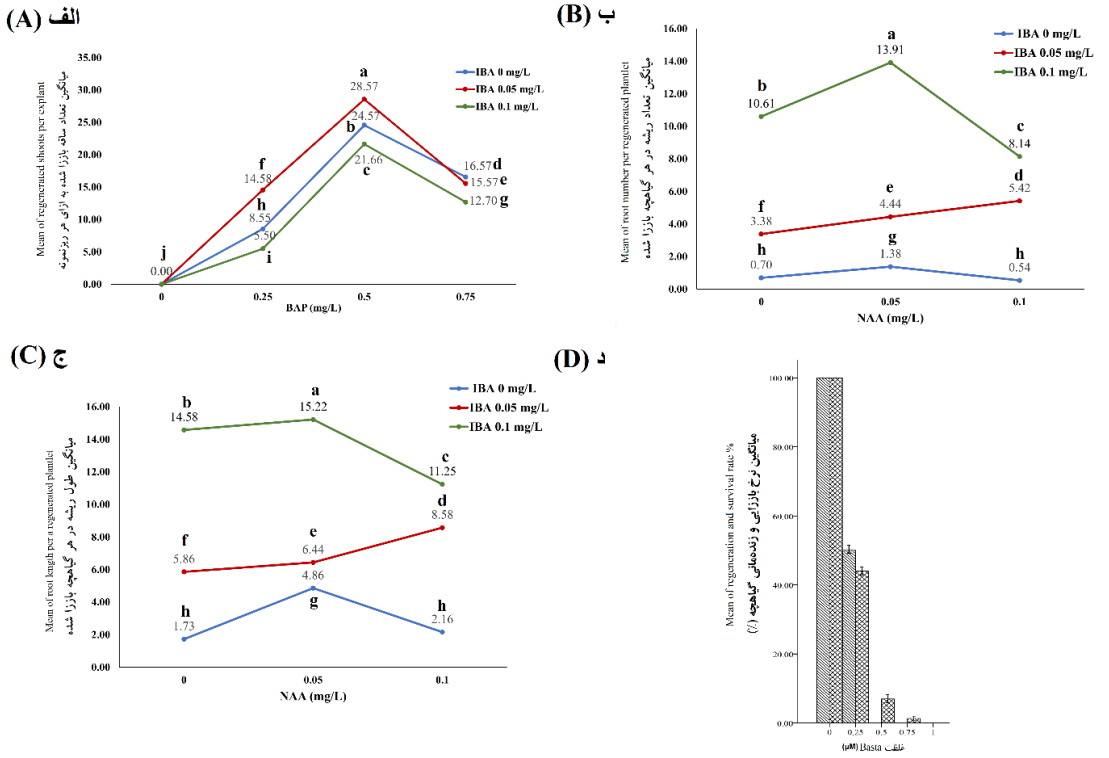
غلظت‌های مختلف NAA باعث تولید ریشه‌های اندک با طول ۲ تا ٤ سانتی‌متر گردید. در حالی‌که ترکیب IBA با NAA تأثیر مثبتی در افزایش تعداد ریشه و طول ریشه داشت. افزایش غلظت IBA در ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA روند افزایشی معنی‌داری در تعداد ریشه (شکل ۳–ب) و طول ریشه (شکل ۳–ج) نشان داد. با این‌حال افزایش غلظت NAA در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA در تعداد و طول ریشه اثر منفی دارد. طی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل IBA و NAA، ترکیب فیتوهورمون‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA دارای بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه به‌ترتیب با میانگین ± SD برابر با ۰/٦۲ ± ۱۳/۹۱۳ و ۰/۰۳۸ ± ۱۵/۲۲ است. در شکل ٤–ج گیاهان حاوی ریشه پس از ٦ هفته کشت در محیط RIM حاوی فیتوهورمون‌های IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و NAA در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر نشان داده شده است. در اغلب گزارش‌ها باززایی صنوبر سیاه (*P. nigra*) و گونه‌های هیبرید آن از فیتوهورمون‌های IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و NAA در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌ها استفاده شده است (Biswas *et al.*, 2012; Mohri *et al.*, 1996; Nishiguchi *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008). اگرچه در این پژوهش‌ها برای القای ریشه‌زایی از غلظت‌های بالای IBA و NAA استفاده شده است، نتایج ما نشان داد که غلظت پایین این دو فیتوهورمون اکسینی باعث القای ریشه‌زایی مطلوب در گیاهچه‌های باززا شده صنوبر هیبرید می‌شود. این در حالی است که تاکنون گزارشی از باززایی ساقه و ریشه در این گونه هیبرید صنوبر سیاه ارائه نشده است.

سازگاری و انتقال گیاهان ریشه‌دار شده *Populus* × *euromericana* به گلخانه: نتایج حاصل از روش به‌کار رفته در سازگارسازی، نشان داد که نرخ زنده‌مانی گیاهان باززا طی سازگاری ۱۰۰ درصد است و کلیه گیاهان باززا شده به‌طور موفقیت‌آمیز به محیط گلخانه سازگار شدند (شکل ٤–د). در مطالعات قبلی نیز جهت سازگاری گیاهان باززا شده در جنس *Populus* sp. از مخلوط ماسه، پرلیت و پیت ماس یا خاک‌برگ با نسبت‌های ۱:۱:۱، مخلوط ماسه و پیت ماس با نسبت ۲:۱ یا نسبت ۱:۱ استفاده شده بود که میزان موفقیت و زندمانی گیاهان ۹۰–۸۰ درصد گزارش شده است (Cavusoglu *et al.*, 2011; Khosravan *et al.*, 2017; Lubrano, 1992; Rutledge and Douglas, 1988). این موضوع حاکی از توانایی بالای بالقوه و بالفعل این گونه هیبرید را نشان می‌دهد (شکل ٤).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده علف‌کش Basta® در ریزنمونه‌های میانگره ساقه: باززایی و گزینش گیاهان T0 به اندازه ریزنمونه، ضخامت آن، نوع گزینش‌گر گیاهی و میزان حداقل غلظت مهارکننده (Minimum inhibitory concentration, MIC) بستگی دارد (Fan *et al.*, 2015; Shestibratov *et al.*, 2010). بنابراین، پیش از انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه، تعیین MIC گزینش‌گر گیاهی جهت غربال گیاهچه‌های T0، ضروری است. در گزارش‌های متعدد به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و علف‌کش Basta® به‌عنوان دو گزینشگر معمول در غربال گیاهان *Populus* sp. اشاره شده است (Confalonieri *et al.*, 1997; Confalonieri *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2015; Zelasco *et al.*, 2007). نتایج مقایسه میانگین مربوط به بررسی میزان حساسیت و نرخ باززایی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در شکل ۳–د نشان داده شده است. در محیط‌کشت SIM بدون علف‌کش Basta®، نرخ باززایی و زنده‌مانی نمونه‌ها ۱۰۰درصد بود. درحالی‌که ریزنمونه‌های کشت شده در محیط SIM حاوی علف‌کش Basta® در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، نرخ زنده‌مانی با میانگین ۰/۵۷ ± ٤٤ درصد را نشان داد. این نتیجه مبین حساسیت بالای ریزنمونه‌ها به علف‌کش Basta® است. در این غلظت غیر از بحث زنده‌مانی تقریباً در ۵۰ درصد ریزنمونه‌ها نشانه‌های باززایی ساقه نیز مشاهده نشد. در محیط‌کشت SIM حاوی علف‌کش Basta® ۰/۵ میکرومولار، ریزنمونه‌ها حساسیت بسیار بالایی به علف‌کش Basta® نشان دادند؛ به‌طوری که نه‌تنها باززایی در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد و نرخ زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نیز به‌شدت کاهش و در حدود ۰/۳۵ ± ٤ درصد بود. در محیط‌کشت SIM با غلظت‌های بالاتر علائم قهوه‌ای یا نکروزه شدن نمونه‌ها پس از ۳ هفته مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میکرومولار Basta®، به‌طور کامل باعث حذف سلول‌های غیر تراریخته می‌شود. این غلظت Basta® بسیار کمتر از غلظت‌های مورد

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

استفاده در سایر مطالعات است (Confalonieri *et al.*, 1997; Confalonieri *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2015; Zelasco *et al.*, 2007). در بسیاری از گزارش‌ها غلظت‌هایی بین ۵ تا ۲۰ میکرومولار از علف‌کش Basta® در گزینش ریزنمونه‌های میانگره ساقه به طول ۱ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ در ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر مربع مؤثر بوده است (Confalonieri *et al.*, 2000; Shestibratov *et al.*, 2010). با توجه به نتایج آزمون حساسیت علف‌کش Basta®، محیط‌کشت SIM حاوی ۰/۵ میکرومولار علف‌کش Basta® جهت گزینش ریزنمونه‌های مقاوم به علف‌کش Basta®، در طی فرایند تراریختی استفاده شد.



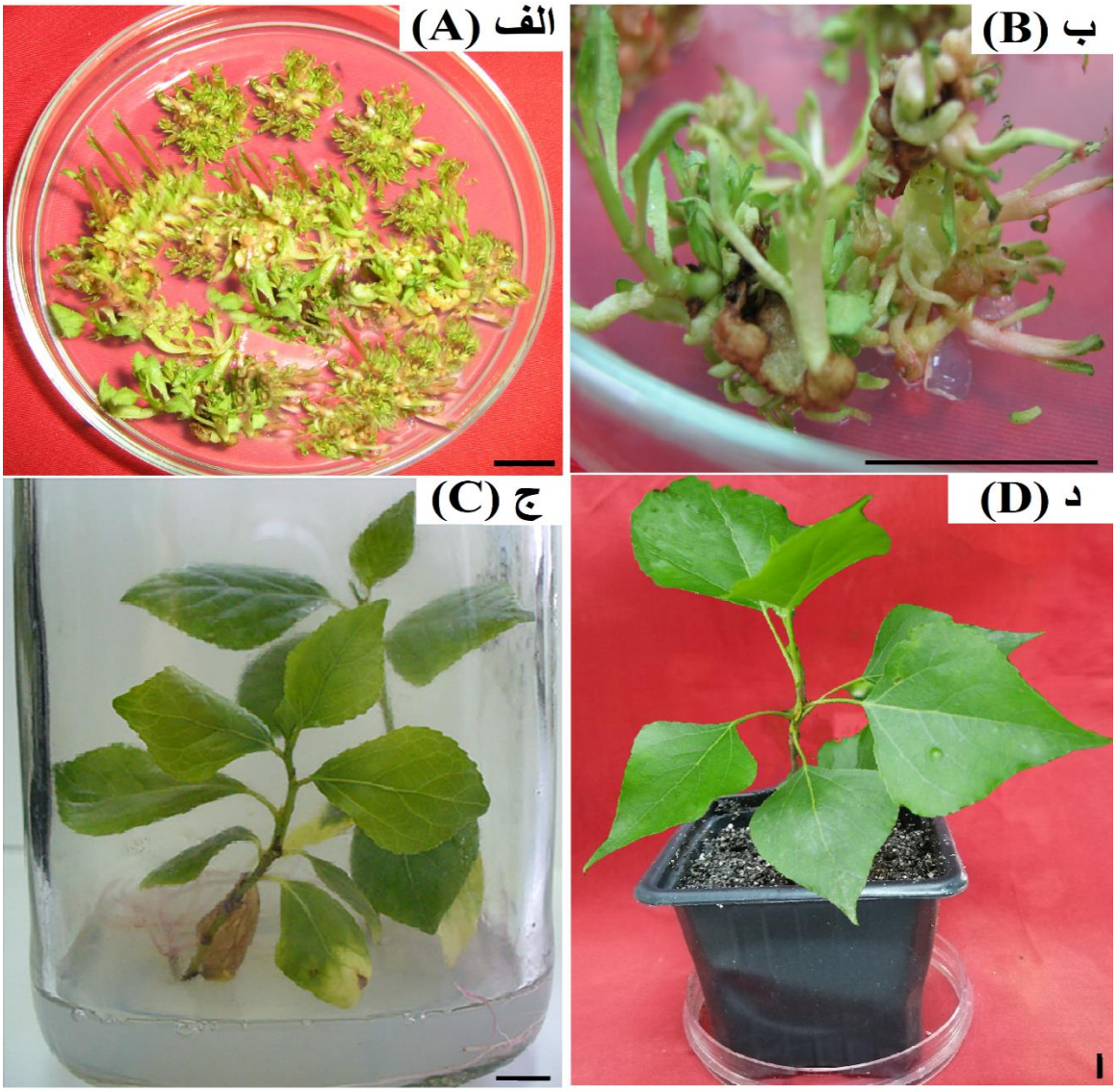
شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل فیتوهورمون‌های مورد استفاده در باززایی مستقیم و تعیین حداقل غلظت مهارکننده Basta® در ریزنمونه‌های میانگره ساقه گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P.* × *euramericana* Dode Guinier).

Figure 3. The compare means of *in vitro* plant regeneration and MIC of Basta® in internodal stem explants from hybrid black poplar (*P.* × *euramericana* Dode Guinier).

الف) مقایسه میانگین توان باززایی ریزنمونه‌های میانگره ساقه تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP × IBA. ب) مقایسه میانگین صفت تعداد ریشه در گیاهچه‌های باززا شده تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف IBA × NAA. ج) مقایسه میانگین صفت طول ریشه در گیاهچه‌های باززا شده تحت تأثیر اثر متقابل غلظت‌های مختلف IBA × NAA. د) تأثیر علف‌کش Basta® حاوی ترکیب فعال فسفینوتریسین در میزان باززایی و نرخ زنده‌مانی ریزنمونه‌های میانگره ساقه روی محیط‌کشت SIM حاوی محیط پایه MS، BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر) و علف‌کش Basta® در ۵ غلظت مختلف علف‌کش Basta® شامل ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱/۰ میکرومولار کشت شدند. ستون‌های با خطوط مورب نشان دهنده درصد باززایی و ستون‌های با خطوط لوزی شکل نشان دهنده درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها است.

A) The compare mean of shoot induction from internodal stem explant of *P.* ×*euramericana* cultured on SIM with different BAP and IBA combinations. B) The compare mean of root No. in regenerated plantlets of *P.* ×*euramericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations. C) The compare mean of root length in regenerated plantlets of *P.* ×*euramericana* cultured on RIM with different NAA and IBA combinations. D) Effect of commercial herbicide Basta® with phosphinothricin active compound on shoot regeneration (Dark grey-colored column) and survival rate (Light grey-colored column) of internodal stem explant of *P.* ×*euramericana* cultured on SIM medium containing basal MS medium supplemented with BAP (0.5 mg/L), IBA (0.05 mg/L) and Basta® in 5 concentrations levels (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0µM) after 6 weeks.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]



شکل ٤- باززایی مستقیم انبوه با استفاده از بافت میانگره ساقه در گیاه صنوبر سیاه هیبرید (*P.* × *euramericana* Dode Guinier).

Figure 4. Direct plant regeneration from internodal stem explant of hybrid black poplar (*P.* × *euramericana* Dode Guinier) without callus induction.

الف) القای ساقه‌زایی و باززایی پس از ٦ هفته از ریزنمونه‌های میانگره ساقه کشت شده در محیط SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA. ب) نمای نزدیک از باززایی ساقه در یک ریزنمونه میانگره ساقه پس از ٦ هفته در محیط SIM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA. ج) القای ریشه‌زایی در گیاهچه‌های باززا شده در محیط‌کشت RIM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA . د) گیاهان درون شیشه‌ای *P.* × *euramericana* Dode Guinier سازگار شده در اتاقک رشد و شرایط گلخانه‌ای در حال رشد در مخلوط خاک (ماسه، پیت‌ماس و پرلایت به نسبت ۳:۲:۱). خطوط سیاه‌رنگ نشان دهنده واحد اندازه‌گیری ۱ سانتی‌متر هستند.

A) Shoot induction and regeneration after 6 weeks from internodal stem explant cultured on SIM containing MS basal medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) and IBA (0.05 mg/L). B) Closeup view of regenerated shoots from single internodal stem cultured on SIM containing MS basal medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) and IBA (0.05 mg/L). C) Root development in MS basal medium supplemented with IBA (0.1 mg/L) and NAA (0.05 mg/L). D) A hardened in vitro raised *P.* × *euramericana* Dode Guinier growing in soil mixture (sand, peat moss and perlite in 3:2:1 ratio). Bars indicate 1cm.

شیوه‌نامه کارآمد انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم با استفاده از ریزنمونه‌های میانگره ساقه در *Populus* × *euromericana* Dode Guinier: در این مطالعه، عوامل تأثیرگذار بر میزان کارایی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه میانگره ساقه بررسی شد. در بسیاری از مطالعات پیشین، به لزوم بررسی عوامل تأثیرگذار در انتقال ژن به‌روش

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

آگروباکتریوم همچون طول دوره پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت القای ساقه‌زایی، نوع سویه و غلظت سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم، غلظت استوسیرینگون، مدت‌زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با سلول‌های باکتریایی نوترکیب و طول دوره هم‌کشتی در گونه‌های *Populus* sp. تأکید شده است (Han *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2019). بنابراین، در این مطالعه، عواملی همچون مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM، نوع سویه *A. tumefaciens*، غلظت سلول‌های باکتریایی (OD_{600}) هر سویه، غلظت AS و مدت‌زمان تیمار ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای مورد بررسی طی دو مرحله مورد آزمون قرار گرفتند. در مرحله اول اثر متقابل سه عامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM در چهار سطح ۰، ۳، ٦ و ۹ روز، نوع سویه *A. tumefaciens* شامل دو سویه LBA4404 و EHA105 و غلظت سلول‌های باکتریایی در ۳ سطح OD_{600} برابر با ۰/۳، ۰/٦ و ۰/۹ بررسی شد. در این مرحله محیط‌های IM و SIM فاقد AS بوده و مدت‌زمان تیمار ریزنمونه‌ها با محیط IM حاوی سلول‌های باکتریایی نوترکیب ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. نتایج آزمون توزیع نرمال 1-sample K-S داده‌ها نشان داد که داده‌های تعداد گیاهان باززا در تیمارهای مختلف عوامل مؤثر در انتقال ژن بروش آگروباکتریوم با میانگین ۱٦/۰۸٦ و انحراف معیار ۱۸/۲۱ با درجه اطمینان ۹۹ درصد از توزیع نرمال برخوردار هستند. نتایج تجزیه واریانس سه عامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط SIM، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه آگروباکتریوم نشان داد که تمام اثرات اصلی و دوجانبه و سه‌جانبه معنی‌دار هستند و بررسی اثر سه‌جانبه می‌تواند بهترین ترکیب سه عاملی را برای استفاده در روش معمول تراریختی معرفی بنماید (جدول ٤).

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر متقابل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه، غلظت سلول‌های باکتریایی (OD_{600}) و نوع سویه *A. tumefaciens* بر درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه *P.* × *euramericana* Dode guinier

Table 4. The variance analysis of the interaction effect of the traits, including preculturing of internodal stem explant in SIM medium, concentration of bacterial suspension (OD600) and *A. tumefaciens* strain on frequency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using inter nodal stems explants from *P.* × *euramericana* Dode guinier

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	F
تیمار Treatment	23	1023.206	1743.688**
نوع سویه باکتری Bacterial strain type	1	383.876	654.179**
غلظت سلول‌های باکتریایی (OD_{600}) Concentration of bacterial cell suspension (OD_{600})	2	3207.204	5465.531**
مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه Preculturing time	3	2318.246	3950.621**
نوع سویه باکتری × غلظت سلول‌های باکتریایی Strain type × OD_{600}	2	532.881	908.105**
مدت‌زمان پیش‌کشت × غلظت سلول‌های باکتریایی Preculturing time × OD_{600}	6	524.283	893.452**
نوع سویه باکتری × مدت‌زمان پیش‌کشت Strain Type × Preculturing time	3	1414.756	2410.960**
نوع سویه × غلظت سلول‌های باکتریایی × مدت‌زمان پیش‌کشت Strain type × Preculturing time × OD_{600}	6	220.826	376.318**
خطا Error	48	0.587	
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		4.76	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد

**: Significant at 1% probability level

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

در جدول ۵، اختلاف میانگین اثر متقابل عوامل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌های میانگره ساقه، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه *A. tumefaciens* در درصد فراوانی انتقال ژن یا تراریختی ارائه شده است. بر اساس نتایج با افزایش مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت SIM و افزایش OD_{600} سلول‌های باکتریایی درصد فراوانی انتقال ژن در ریزنمونه‌ها افزایش یافته است. علاوه‌بر این، نتایج نشان می‌دهد که سویه LBA4404 به‌عنوان سویه با قدرت بیماری‌زایی پایین بیشترین میزان کارایی انتقال ژن را داشته است. بر اساس نتایج، پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت SIM به‌مدت ٦ روز و آلودگی آن‌ها با سلول‌های باکتریایی مستعد *A. tumefaciens* سویه LBA4404 با OD_{600} برابر با ۰/٦ بود که با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیشترین میزان درصد انتقال ژن با میانگین ۰/٧٦ ± ٦٨/٨٣ را نشان داد. مقایسه این تیمار با تیمار مشابه با سویه EHA105 نشان می‌دهد که کارایی تیمار مربوط به سویه LBA4404 در حدود ۵/۱۲ برابر بیشتر از سویه EHA105 است.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل مدت‌زمان پیش‌کشت ریزنمونه، غلظت سلول‌های باکتریایی و نوع سویه *A. tumefaciens* بر درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه *P.* × *euramericana* Dode guinier

Table 5. The compare mean of the interaction effect of the traits, including preculturing of internodal stem explant in SIM medium, concentration of bacterial suspension (OD600) and *A. tumefaciens* strain on frequency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using internodal stems explants from *P.* × *euramericana* Dode guinier

تیمار Treatment	نوع سویه باکتری *A. tumefaciens* Agrobacterium strain	پیش‌کشت ریزنمونه (روز) Explant preculturing Time (day)	OD_{600}	درصد فراوانی انتقال ژن به روش آگروباکتریوم *Agrobacterium*-mediated transformation frequency (%)	
				میانگین Mean	انحراف استاندارد SD
1	LBA4404	0	0.3	0.00k	0.00
2	LBA4404	0	0.6	0.00k	0.00
3	LBA4404	0	0.9	0.00k	0.00
4	LBA4404	3	0.3	21.67f	1.53
5	LBA4404	3	0.6	43.00c	1.00
6	LBA4404	3	0.9	6.50j	0.50
7	LBA4404	6	0.3	35.00d	1.00
8	LBA4404	6	0.6	68.83a	0.76
9	LBA4404	6	0.9	13.25h	1.00
10	LBA4404	9	0.3	0.00k	0.00
11	LBA4404	9	0.6	33.50d	1.00
12	LBA4404	9	0.9	0.00k	0.00
13	EHA105	0	0.3	0.00k	0.00
14	EHA105	0	0.6	0.00k	0.00
15	EHA105	0	0.9	0.00k	0.00
16	EHA105	3	0.3	10.00i	0.50
17	EHA105	3	0.6	21.50f	1.00
18	EHA105	3	0.9	4.67j	0.57
19	EHA105	6	0.3	28.50e	1.50
20	EHA105	6	0.6	13.50h	1.00
21	EHA105	6	0.9	1.33k	0.57
22	EHA105	9	0.3	21.33f	1.25
23	EHA105	9	0.6	47.33b	0.29
24	EHA105	9	0.9	17.16g	0.29
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)				57.24	

جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف AS، غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار AS به محیط‌کشت IM و SIM اضافه شده و ریزنمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه تلقیح شدند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، اثر غلظت AS بر درصد فراوانی انتقال ژن

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

ریزنمونه‌های میانگره ساقه، بین ٤ تیمار مورد بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین ٤ غلظت AS نشان می‌دهد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین درصد فراوانی انتقال ژن را دارد؛ درحالی‌که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۰ و ۵۰ میکرومولار مشاهده نشد. در شکل ۵–الف، نمودار درصد فراوانی انتقال ژن در ٤ غلظت AS نشان داده شده است. بر اساس نتایج، AS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌عنوان غلظت بهینه در انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در نظر گرفته شد. کونفالونیری و همکاران (Confalonieri *et al.*, 2000) بالاترین درصد فراوانی انتقال ژن را به‌ترتیب با استفاده از محیط‌کشت تلقیح حاوی AS ۱۵۰ میکرومولار به‌دست آورند. لیکن، نتایج بررسی غلظت‌های AS روی ریزنمونه‌های میانگره ساقه نشان می‌دهد که غلظت بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار تأثیر منفی در درصد انتقال ژن دارد و به‌دلیل افزایش شدت آلودگی باکتریایی علائمی همچون رشد بیش از حد باکتری‌ها و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها ایجاد شد.

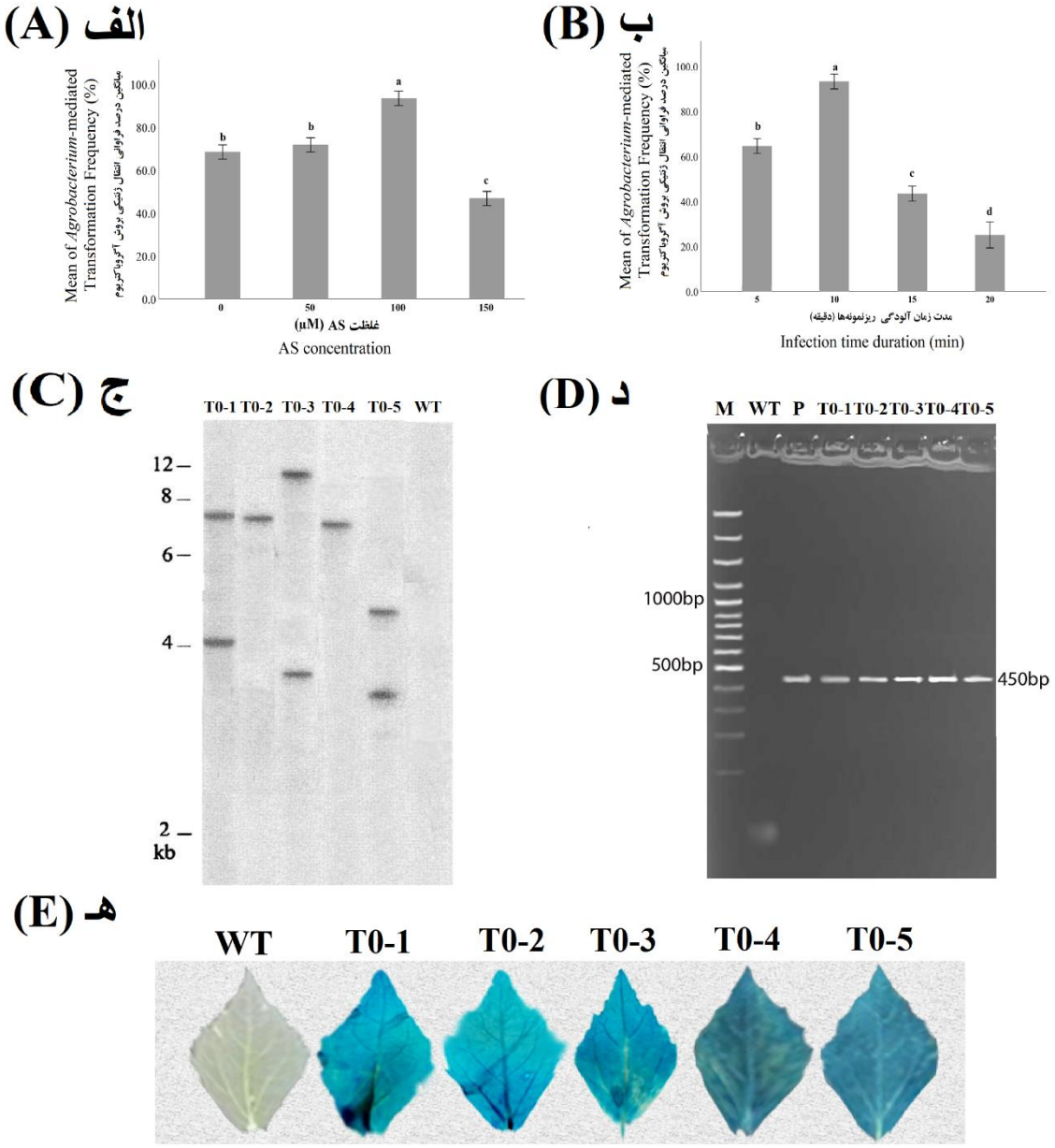
پس از تعیین غلظت بهینه AS، مدت‌زمان آلودگی ریزنمونه‌ها با سلول‌های باکتریایی نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، کلیه عوامل تأثیرگذار در غلظت بهینه تثبیت شده و فقط مدت‌زمان آلودگی ریزنمونه میانگره ساقه در ٤ تیمار شامل ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۵–ب، نمودار مقایسه میانگین هر یک از تیمارها و میزان اختلاف آن‌ها نشان داده شده است. بر اساس نتایج، ۱۰ دقیقه تلقیح ریزنمونه‌ها با محیط‌کشت IM حاوی سلول‌های باکتریایی آگروباکتریوم سویه LBA4404 با غلظت OD_{600} برابر با ۰/٦ و AS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین درصد فراوانی انتقال ژن با میانگین ۱/٦۷ ± ۹۳/۳۳ را نشان داد. یووتوشنکو و میسرا (Yevtushenko and Misra, 2010) توانستند انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در ریزنمونه‌های میانگره ساقه در صنوبر سیاه هیبرید *P. nigra* L. × *P. maximowiczii* A. Henry انجام دهند. آن‌ها ریزنمونه‌های میانگره ساقه را با سوسپانسیون باکتریایی آگروباکتریوم سویه MP90 (OD_{600} = 0.5) به‌مدت یک ساعت تلقیح کردند، به‌طوری که فراوانی انتقال ژن ریزنمونه‌ها در حدود ۳٦/۳ درصد بود. در مقایسه با نتایج مطالعات قبلی، تلقیح ریزنمونه‌های میانگره ساقه پیش‌کشت شده به‌مدت ٦ روز با سوسپانسیون سلول باکتریایی نوترکیب سویه LBA4404 (OD_{600} = ۰/٦) حاوی استوسیرینگون ۱۰۰µM به‌مدت ۱۰ دقیقه میزان کارایی انتقال ژن ۹۳/۳۳ درصد در گیاه صنوبر سیاه هیبرید نشان داد.

تعیین تعداد نسخه ترانس‌ژن در گیاهان T0: الگوی درج DNA انتقالی در گیاهان T0 منتخب به‌روش لکه‌گذاری سادرن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ژنوم رخدادهای تراریختی منتخب یک یا دو نسخه از ترانس‌ژن حاوی ژن *gus* درج شده است (شکل ۵–ج). این وضعیت با توجه به رواج تکثیر غیرجنسی در صنوبر مشکلی در هموزیگوت‌سازی مکان‌ژنی نداشته و به‌خاطر قابلیت تکثیر غیرجنسی در طول نسل‌های متمادی می‌توان از پایداری همی‌زیگوتی گیاهان تراریخته بهره‌مند شد.

تأیید بیان ژن *gus* به روش RT-PCR: بیان پایدار ژن *gus* در گیاهان T0 صنوبر سیاه هیبرید با استفاده از واکنش RT-PCR تأیید گردید. همان‌طور که در شکل ۵–د نشان داده شده است، آثاری از تکثیر cDNA مربوط به ژن *gus* در گیاه غیرتراریخته مشاهده نشد. بر اساس نتایج RT-PCR، در هر ۵ گیاه تراریخته T0-1 تا T0-5، نسخه‌برداری mRNA ژن *gus* تأیید شد.

در شکل ۵–هـ نتایج مربوط به آزمون هیستوشیمیایی ژن *uidA* و بیان پایدار *gus* در برگ گیاهان پنج رخداد تراریختی منتخب (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4 and T0-5) نشان داده شده است. به‌نظر می‌رسد بین بیان کیفی ژن *uidA* تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود، ولی می‌توان به‌روش اسپکتروسکوپی به مطالعه کمی تغییرات بین رخدادهای تک‌ژنی و دوژنی مبادرت نمود. با توجه به مکان درج متفاوت ژن‌ها و اثر موضعی ژن‌های درج شده احتمال تفاوت در میزان بیان ژن‌های انتقالی وجود داشته و لازم است این موضوع در پروژه‌های مربوط به ایجاد صفات مهم اقتصادی بررسی گردد.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]



شکل ۵- مقایسه میانگین درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم در غلظت‌های مختلف AS و مدت‌زمان تلقیح با سوسپانسیون باکتریایی

Figure 5. The compare means of *Agrobacterium*-mediated transformation frequency of the internodal stem explant under the influence of Acetosyringone concentration and inoculation time

الف) نمودار مقایسه میانگین اثر غلظت AS بر درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم. ب) نمودار مقایسه میانگین اثر مدت‌زمان آلودگی ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتریایی *A. tumefaciens* سویه LBA4404 (OD_{600}= ۰/۶) بر درصد فراوانی انتقال ژن به‌روش آگروباکتریوم. ج) آنالیز لکه‌گذاری سادرن در گیاهان T0 صنوبر سیاه هیبرید منتخب (T0-1 تا T0-5) و گیاه غیرتراریخته (WT) که درج پایدار ژن *gus* را در DNA ژنومی برش یافته با آنزیم‌های برشی محدود کننده *Eco*RI و *Hind*III نشان می‌دهد. د) آنالیز RT-PCR گیاهان T0 و غیرتراریخته. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه cDNA ژن *gus* (۴۵۰ جفت‌باز) در ۵ گیاه T0 منتخب انجام شد. M: نشانگر DNA وزنی مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز؛ P: کنترل مثبت DNA پلاسمیدی ناقل بیانی pCAMBIA3301؛ WT: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخته)؛ T0-1-T0-5: نوار DNA محصول PCR از cDNA ژن *gus* در ۵ گیاه صنوبر سیاه هیبرید T0 منتخب (T0-1 تا T0-5). هـ) آزمون هیستوشیمیایی GUS در نمونه‌های برگی گیاهان تراریخته و ۵ گیاه T0 پس از ۳ ماه رشد.

A) The compare means of *Agrobacterium*-mediated transformation frequency in different AS concentrations, including 0, 50, 100 and 150 µM. (B) The compare means of GUS-positive transformation frequency in different inoculation times, including 5, 10, 15 and 20 mins using bacterial suspension of *A. tumefaciens* strain LBA4404 (OD600= 0.6). C) Southern blot analysis of five independent T0 poplar plants of T0-1 - T0-5 (Lanes T0-1-T0-5) and untransformed plant (Lane WT) reveals stable insertion of the *gus* gene in the genomic DNAs digested with *Eco*RI and *Hind*III restriction enzymes. D) RT-PCR analysis of the control and T0 transgenic plants. The RT-PCR reaction were performed using GUS-specific primer pair to specifically amplify the 450 bp GUS fragment in the five T0 plants. Lane M, DNA ladder 100 bp; P, positive control (plasmid pCAMBIA3301); WT, negative control (wild type plant); Lanes T0-1 to T0-5, PCR product from GUS-related cDNA of T0 hybrid black poplars. E) GUS assays in the leaf samples of the three month-old control and T0 plants.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

با توجه به این‌که این گونه هیبرید از نظر تولید بیوماس سلولزی و کاربرد آن در صنایع مختلف همچون خمیر چوب و کاغذ، بیواتانول و فراورده‌های سلولزی بسیار حائز اهمیت است، از دستاورد این پژوهش می‌توان برای تولید صنوبرهای سیاه هیبرید تراریخته با صفات مطلوب بهره‌مند شد. ویرایش ژنتیکی به‌روش CRISPR/Cas9 نیازمند برخورداری از شیوه‌نامه باززایی انبوه بوده و بر همین اساس چشم‌انداز روشنی برای تولید گیاهان صنوبر اقتصادی، قابل پیش‌بینی است.

سپاسگزاری

این پژوهش تحت حمایت مادی و معنوی آزمایشگاه مهندسی ژنتیک، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز صورت گرفته است.

References

Abbas, M., Peszlen, I., Shi, R., Kim, H., Katahira, R., Kafle, K., Xiang, Z., Huang, X., Min, D. and Mohamadamin, M. (2020). Involvement of CesA4, CesA7-A/B and CesA8-A/B in secondary wall formation in Populus trichocarpa wood. *Tree Physiology*, **40:** 73-89.

Agrawal, V. and Gupta, S.C. (1991). In vitro plantlet development from explants of 25-year-old trees of *Populus× euramericana*—a hybrid poplar. *Plant Science*, **78:** 99-105.

Alba, N. (1992). Mejora genética de Populus alba L. *El cultivo de álamos y Sauces Actas de la 19 sesión de la Comisión Internacional del Alamo (IPC) Zaragoza*, **25:** 157-168.

Arend, M. and Fromm, J. (2007). Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiology*, **27:** 985-992.

Bae, E.K., Lee, H., Lee ,J.S. and Noh, E.W. (2011). Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (Populus alba× P. tremula var. glandulosa). *Gene*, **483:** 43-48.

Balestrazzi, A., Bonadei, M., Quattrini, E. and Carbonera, D. (2009). Occurrence of multiple metal-resistance in bacterial isolates associated with transgenic white poplars (*Populus alba* L.). *Annals of Microbiology*, **59:** 17-23.

Bali, G., Khunsupat, R., Akinosho, H., Payyavula, R.S., Samuel, R., Tuskan, G.A., Kalluri, U.C. and Ragauskas, A.J. (2016). Characterization of cellulose structure of Populus plants modified in candidate cellulose biosynthesis genes. *Biomass and Bioenergy*, **94:** 146-154.

Biswal, A.K., Hao, Z., Pattathil, S., Yang, X., Winkeler, K ,.Collins, C., Mohanty, S.S., Richardson, E.A., Gelineo-Albersheim, I. and Hunt, K. (2015). Downregulation of GAUT12 in Populus deltoides by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, **8:** 1-26.

Biswas, K.K., Mohri, T., Kogawara, S., Hase, Y. and Oono, Y. (2012). An improved system for shoot regeneration from stem explants of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. Italica Koehne). *American Journal of Plant Sciences*, **3:** 1181.

Bjurhager, I., Olsson, A.M., Zhang, B., Gerber, L., Kumar, M., Berglund, L.A., Burgert, I., Sundberg, B.R. and Salmén, L. (2010). Ultrastructure and mechanical properties of Populus wood with reduced lignin content caused by transgenic down-regulation of cinnamate 4-hydroxylase. *Biomacromolecules*, **11:** 2359-2365.

Bonadei, M., Zelasco, S., Giorcelli, A., Gennaro, M., Calligari, P., Quattrini, E., Carbonera, D. and Balestrazzi, A. (2012). Transgene stability and agronomical performance of two transgenic Basta®-tolerant lines of Populus alba L. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **146:** 33-40.

Bruegmann, T., Polak, O., Deecke, K., Nietsch, J. and Fladung, M. (2019) Poplar Transformation. In: Kumar, S., Barone, P. and Smith, M., Eds., *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, pp. 165-177, Springer New York, USA.

Bryan, A.C., Jawdy, S., Gunter, L., Gjersing, E., Sykes, R., Hinchee, M.A., Winkeler, K.A., Collins, C.M., Engle, N. and Tschaplinski, T.J. (2016). Knockdown of a laccase in Populus deltoides confers altered cell wall chemistry and increased sugar release. *Plant Biotechnology Journal*, **14:** 2010-2020.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

Buhl, C., Meilan, R. and Lindroth, R.L. (2017). Genetic modification of lignin in hybrid poplar (*Populus alba* × *Populus tremula*) does not substantially alter plant defense or arthropod communities. *Journal of Insect Science*, **17(3):** 76.

Cai, Y., Zhang, K., Kim, H., Hou, G., Zhang, X., Yang, H., Feng, H., Miller, L., Ralph, J. and Liu, C.J. (2016). Enhancing digestibility and ethanol yield of Populus wood via expression of an engineered monolignol 4-O-methyltransferase. *Nature Communications*, **7:** 11989.

Caruso, A., Chefdor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F.M., Kahlem, G. and Morabito, D. (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in Populus canadensis leaves. *Journal of Plant Physiology*, **165:** 932-941.

Cavusoglu, A., Ipekci-Altas, Z., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N. and Zehir, A. (2011). Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (Populus deltoides Bartram ex Marsh.) with tissue culture. *African Journal of Biotechnology*, **10:** 3216-3221.

Che, D., Meagher, R.B., Heaton, A.C., Lima, A., Rugh, C.L. and Merkle, S.A. (2003). Expression of mercuric ion reductase in Eastern cottonwood (Populus deltoides) confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotechnology Journal*, **1:** 311-319.

Chen, F., Liu, C.J., Tschaplinski, T.J. and Zhao, N. (2009). Genomics of secondary metabolism in Populus**:** interactions with biotic and abiotic environments. *Critical Reviews in Plant Science*, **28:** 375-392.

Confalonieri, M., Allegro, G., Balestrazzi, A., Fogher, C. and Delledonne, M. (1998). Regeneration of Populus nigra transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (KTi 3) gene. *Molecular Breeding*, **4:** 137-145.

Confalonieri, M., Balestrazzi, A. and Bisoffi, S. (1994). Genetic transformation of *Populus nigra* by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Reports*, **13:** 256-261.

Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S. and Carbonera, D. (2003). In vitro culture and genetic engineering of Populus spp.**:** synergy for forest tree improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **72:** 109-138.

Confalonieri, M., Balestrazzi, A. and Cella, R. (1997). Genetic transformation of Populus deltoides and Px euramericana clones using Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **48:** 53-61.

Confalonieri, M., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Negri, S., Facciotto, G., Schenone, G. and Delledonne, M. (2000). Transformation of elite white poplar (Populus alba L.) cv.'Villafranca'and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, **19:** 978-982.

Cong, L., Ran ,F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W. and Marraffini, L.A. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339:** 819-823.

Dai, W., Cheng, Z.M. and Sargent, W. (2003). Plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from in vitro leaf tissues. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **39:** 6-11.

Dashchi, S., Rahnama, H., Cheghamirza, K. and Zamani, K. (2021). Construction of plant expression vectors harboring WRI1 and LPAAT genes and its transformation in tobacco plants. *Plant Genetic Researches*, **7(2):** 41-54(In Persian).

Delledonne, M., Allegro, G., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Picco, F., Levine, A., Zelasco, S., Calligari, P. and Confalonieri, M. (2001). Transformation of white poplar (Populus alba L.) with a novel Arabidopsis thaliana cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding*, **7:** 35-42.

Dharmawardhana, P., Brunner, A.M. and Strauss, S.H. (2010). Genome-wide transcriptome analysis of the transition from primary to secondary stem development in Populus trichocarpa. *BMC Genomics*, **11:** 150.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19:** 11-15.

Du, N., Liu, X., Li, Y., Chen, S., Zhang, J., Ha, D., Deng, W., Sun, C., Zhang, Y. and Pijut, P.M. (2012). Genetic transformation of Populus tomentosa to improve salt tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **108:** 181-189.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

Fan, D., Li, C., Fan, C., Hu, J., Li, J., Yao, S., Lu, W., Yan, Y. and Luo, K. (2020). MicroRNA6443-mediated regulation of FERULATE 5-HYDROXYLASE gene alters lignin composition and enhances saccharification in Populus tomentosa. *New Phytologist*, **226:** 410-425.

Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. and Luo, K. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Populus in the first generation. *Scientific Reports*, **5:** 1-7.

Foston, M., Hubbell, C.A., Samuel, R., Jung, S., Fan, H., Ding, S.Y., Zeng, Y., Jawdy, S., Davis, M. and Sykes, R. (2011). Chemical, ultrastructural and supramolecular analysis of tension wood in Populus tremula x alba as a model substrate for reduced recalcitrance. *Energy & Environmental Science*, **4:** 4962-4971.

Gallagher, S.R. (1992) *Quantitation of GUS Activity by Fluorometry*. Academic Press INC, Sandiego, California, USA.

Green, M.R. and Sambrook, J. (2020). Transformation of Escherichia coli by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2020:** 232-238.

Han, K.H., Meilan, R., Ma, C. and Strauss, S. (2000). An Agrobacterium tumefaciens transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus Populus). *Plant Cell Reports*, **19:** 315-320.

Han, X., Ma, S., Kong, X., Takano ,T. and Liu, S. (2013). Efficient Agrobacterium-mediated transformation of hybrid poplar Populus davidiana Dode × Populus bollena Lauche. *International Journal of Molecular Sciences*, **14:** 2515-2528.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J. and Schilperoort, R.A. (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, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993). NewAgrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, **2:** 208-218.

Hori, C., Takata, N., Lam, P.Y., Tobimatsu, Y., Nagano, S., Mortimer, J.C. and Cullen, D. (2020). Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in Populus. *Scientific Reports*, **10:** 1-13.

Igasaki, T., Ishida, Y., Mohri, T., Ichikawa, H. and Shinohara, K. (2002). Transformation of Populus alba and direct selection of transformants with the herbicide bialaphos. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute*, **1:** 235-240.

Jiang, C., Liu, Z. and Zheng, Q. (2015). Direct regeneration of plants derived from in vitro cultured shoot tips and leaves of poplar (Populus × euramericana 'Neva'). *Journal of Life Sciences*, **9:** 366-372.

Khosravan, S., Mirzaie-Nodoushan, H., Ghamari Zare, A. and Ebrahimi, M.A. (2017). Different responses of poplar inter-specific hybrids to micropropagation. *Scientific Journal Management System*, **25:** 43-56.

Kim, H., Li, Q., Karlen, S.D., Smith, R.A., Shi, R., Liu, J., Yang, C., Tunlaya-Anukit, S., Wang , J.P. and Chang, H.M. (2020). Monolignol benzoates incorporate into the lignin of transgenic Populus trichocarpa depleted in C3H and C4H. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **8:** 3644-3654.

Lubrano, L. (1992) Micropropagation of poplars (*Populus* spp.) in *High-Tech and Micropropagation II* pp. 151-178, Springer, Berlin, Heidelberg, DE.

Mohri, T., Yamamoto, N. and Shinohara, K. (1996). Agrobacterium-mediated transformation of lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. Italica Koehne) using stem segments. *Journal of Forest Research*, **1:** 13-16.

Movahedi, A., Wei, H., Chen, Z.H., Sun, W., Zhang, J., Li, D., Yang, L. and Zhuge, Q. (2021). Highly efficient CRISPR-mediated homologous recombination via NHEJ deficiency rather than HDR factors overexpression in Populus. *BioRxiv***,** https://doi.org/10.1101/2020.07.04.188219.

Muhr, M., Paulat, M., Awwanah, M., Brinkkötter, M. and Teichmann, T. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of Populus BRANCHED1 and BRANCHED2 orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. *Tree Physiology*, **38:** 1588-1597.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15:** 473-497.

Nayeri, S., Baghban Kohnehrouz, B., Ahmadikhah, A. and Mahna, N. (2022). CRISPR/Cas9-mediated P-CR domain-specific engineering of CESA4 heterodimerization capacity alters cell wall

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

architecture and improves saccharification efficiency in poplar. *Plant Biotechnology Journal*, **2022:** 1-16

Nishiguchi, M., Yoshida, K., Mohri, T., Igasaki, T. and Shinohara, K. (2006). An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. Italica). *Journal of Forest Research*, **11:** 175-180.

Ooms, G., Hooykaas, P.J., Van Veen, R.J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuïnk, T.J. and Schilperoort, R.A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of Agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, **7:** 15-29.

Pintarić, B. (2008). Micropropagation of white poplar (*Populus alba* L.). *Šumarski List*, **132:** 343-354.

Raj, S., Bräutigam, K., Hamanishi, E.T., Wilkins, O., Thomas, B.R ,.Schroeder, W., Mansfield, S.D., Plant, A.L. and Campbell, M.M. (2011). Clone history shapes Populus drought responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108:** 12521-12526.

Rani, V., Parida, A. and Raina, S. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of Populus deltoides Marsh. *Plant Cell Reports*, **14:** 459-462.

Rishi, A., Nelson, N.D. and Goyal, A. (2001). Genetic modification for improvement of Populus. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **7:** 7-21.

Rutledge, C.B. and Douglas, G. (1988). Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar in vitro. *Physiologia Plantarum*, **72:** 367-373.

Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J.R., Bhalerao, R.P., Boerjan, W. and Rohde, A. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *The Plant Cell*, **19:** 2370-2390.

Saieed, N.T., Douglas, G. and Fry, D. (1994). Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus culture. *Tree Physiology*, **14:** 1-16.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006). Transformation of *E. coli* by electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2006 (1)**. doi**:** 10.1101/pdb.prot3933.

Shestibratov, K., Bulatova, I. and Novikov, P. (2010). In vitro response of transgenic aspen containing glutamine synthetase gene GSI to the sublethal dose of phosphinothricin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46:** 763-768.

Song, C., Lu, L., Guo, Y., Xu, H. and Li, R. (2019). Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of the Commercial Hybrid Poplar *Populus Alba* × *Populus glandulosa* Uyeki. *International Journal of Molecular Sciences*, **20:** 2594.

Stanciulescu, I., Badea, A., Marculescu, C., Khachatryan, L. and Boldor, D. (2018). Reaction constants and activation energies in pyrolysis for *Populus Alba*. *University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, **80:** 65-74.

Street, N.R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., Rodríguez-Acosta, M., Nilsson, P., Jansson, S. and Taylor, G. (2006). The genetics and genomics of the drought response in Populus. *The Plant Journal*, **48:** 321-341.

Tao, Y.Z., Li, F. and Li, Y. (2008). Establishment of tissue culture regeneration system of *Populus nigra* var. thevestina. *Journal of Northwest A&F University*, **37:** 203-207.

Triozzi, P.M., Schmidt, H.W., Dervinis, C., Kirst, M. and Conde, D. (2021). Simple, efficient and open-source CRISPR/Cas9 strategy for multi-site genome editing in *Populus tremula* × *alba*. *Tree Physiology*, **41:** 2216-2227.

Xin, H., Zhang, T., Wu, Y., Zhang, W., Zhang, P., Xi, M. and Jiang, J. (2020). An extraordinarily stable karyotype of the woody Populus species revealed by chromosome painting. *The Plant Journal*, **101:** 253-264.

Xu, W., Cheng, H., Zhu, S., Cheng, J., Ji, H., Zhang, B., Cao, S., Wang, C., Tong, G .and Zhen, C. (2021). Functional understanding of secondary cell wall cellulose synthases in Populus trichocarpa via the Cas9/gRNA-induced gene knockouts. *The New Phytologist*, **231:** 1478.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

Yevtushenko, D.P. and Misra, S. (2010). Efficient Agrobacterium-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L.× *P. maximowiczii* A. Henry. *Plant Cell Reports*, **29:** 211-221.

Yoo, C.G., Yang, Y., Pu, Y., Meng, X., Muchero, W., Yee, K.L., Thompson, O.A., Rodriguez, M., Bali, G. and Engle, N.L. (2017). Insights of biomass recalcitrance in natural Populus trichocarpa variants for biomass conversion. *Green Chemistry*, **19:** 5467-5478.

Zelasco, S., Ressegotti, V., Confalonieri, M., Carbonera, D., Calligari, P., Bonadei, M., Bisoffi, S., Yamada, K. and Balestrazzi, A. (2007). Evaluation of MAT-vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of ipt marker-free transgenic plants by 'single-step transformation'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **91:** 61-72.

Zhang, W., Wang, Y., Diao, S., Zhong, S ,.**Wu, S., Wang, L., Su, X. and Zhang, B.** (2021). Assessment of epigenetic and phenotypic variation in populus nigra regenerated via sequential regeneration. *Frontiers in Plant Science*, **2:** 632088**.**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]

Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Analysis of Transgenic Plants in Hybrid Black Poplar (*Populus* × *euromericana* Dode Guinier)

Shahnoush Nayeri[1] and Bahram Baghban Kohnehrouz[2,*]

1- Ph.D., Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: January 25, 2022 - Accepted: March 15, 2022)

Abstract

Black poplar (*Populus*× *euramericana* Dode Guinier) is an industrially important tree with broad applications in wood and paper, biofuel and cellulose-based industries as well as plant breeding programs and soil phytoremediation approaches. Here, we have focused on development of direct shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation protocols using the *in vitro* internodal stem tissue from hybrid black poplar. To obtain efficient plant regeneration, the internodal stem explant was cultured on SIM and RIM medium containing different concentrations of BAP × IBA and IBA × NAA, respectively. The crucial factors involved in genetic transformation have been evaluated to achieve *Agrobacterium*-mediated transformation protocol. We achieved fast and highly potential shoot regeneration from the explants cultured on SIM containing BAP 0.5mg/L and IBA 0.05mg/L with 28.57 shoots per explant. The normal roots developed from the plantlets cultured on RIM containing IBA 0.1mg/L and NAA 0.05mg/L and 100% of the regenerated plants were hardened and transferred to the greenhouse condition. Our results indicated that 0.5 µM Basta® could provide a stringent selection for the inhibition of non-transformed cells. We also obtained the highest transformation efficiency of 93.33% through preculturing the explants for 6 days and dipping into IM medium containing *A. tumefaciens* strain LBA4404 (OD_{600} = 0.6) and 100 µM AS for 10 min. The Southern blotting analysis, RT-PCR and GUS histochemical analysis were confirmed the stable single or two-copies *gus* transgenesis in the genomic DNA and its expression in the selected T0 generation plants. The findings indicate that these protocols could be used for genetic engineering approaches in hybrid black poplar.

Keywords: Direct regeneration, GUS gene expression, Southern blotting, Internodal stem, *Populus* × *euramericana*

*** Corresponding Author, E-mail: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.9.5]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.1]