مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۲، سال ۱۳۸۳ (۴۹۱-۴۸۳)

انتقال ژن‌های هایگرومایسین فسفوترانسفراز و بتاگلوکورونیداز به برنج به روش زیست پرتابی

عباس عالم‌زاده[1]، بهزاد قره‌یاضی[2] و سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی[3]
۱، ۲، اعضاء هیات علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ، کرج
۲، استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۲/۲٤

خلاصه

بهترین محیط کالوس‌زایی و باززایی برای ارقام نعمت، ندا و خزر به منظور تراریزش آنها به روش زیست پرتابی تعیین گردید. در میان ارقام ذکر شده رقم نعمت از بالاترین درصد کالوس‌زایی و باززایی برخوردار بود. به همین دلیل رقم مذکور به عنوان نماینده برنجهای پرمحصول ایرانی با استفاده از روش زیست پرتابی مورد تراریزش قرار گرفت. کالوس‌های گرفته شده از بذور بالغ برنج با استفاده از ذرات طلای پوشش داده شده با ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز که تحت کنترل پیشبر Act1 قرار داشت، بمباران شدند. با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی ویژه آزمایش gus، کالوسهای بمباران شده از لحاظ فعالیت بتاگلوکورونیداز مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بهینه شدن روش زیست پرتابی برای تراریزش کالوس‌های برنج با استفاده از ژن بتاگلوکورونیداز، کالوس‌های جنین‌زای گرفته شده از بذور رقم نعمت با استفاده از ذرات طلای پوشش داده شده با ژن کیتیناز و هایگرومایسین فسفوترانسفراز که به ترتیب تحت کنترل پیشبر Act۱ و CaMV۳۵S قرار داشتند، بمباران شدند کالوس‌های بمباران شده به محیط کالوس‌زایی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایگرومایسین منتقل گردیدند. سپس کالوس‌هایی که قادر بودند بر روی این محیط رشد کنند انتخاب گردیده و به محیط باززایی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایگرومایسین منتقل شدند. کالوس‌های مقاوم نسبت به هایگرومایسین بر روی محیط باززایی حاوی هایگرومایسین باززا گردیده و رشد کردند. تجزیه پی‌سی‌آر گیاهان تراریخته احتمالی به دست آمده از واریته نعمت نشان داد که حداقل یک نسخه از ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز در ژنوم این گیاهان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: برنج، انتقال ژن، هایگرومایسین فسفوترانسفراز، کیتیناز، بتاگلوکورونیداز

مقدمه

مهندسی ژنتیک راه‌های جدیدی جهت ایجاد تغییر در گیاهان به وجود آورده است. با انتقال یک ژن خارجی به یک گیاه عالی توسط گاسار در سال ۱۹۸۹ دریچه جدیدی از علم بر روی دانشمندان اصلاح نباتات باز شد. در سالهای اخیر، سیستم بمباران ذره‌ای برای بسیاری از گیاهان استفاده گردیده و روش کار برای بسیاری از آنها بهینه شده است (۱۴). در همین راستا تاکنون تعدادی از غلات با استفاده از این روش مورد تراریزش قرار گرفته‌اند (۳، ۹، ۱۲، ۲۲، ۲۵). در بین غلات برنج بیش از هر گیاه دیگری با این روش، مورد تراریزش قرار گرفته است (۵، ۹، ۱۰، ۱۸، ۲۰، ۲۷). درتمام‌روشهای‌انتقال‌ژن لازم است که ما قادر باشیم پس از عمل تراریزش، سلولهای تراریخته را از غیر تراریخته تشخیص داده و آنها را انتخاب کنیم. به همین منظور معمولا از ژنهایی تحت عنوان نشانگرهای قابل انتخاب استفاده می‌شود. در هنگام تراریزش گیاهان به روش زیست پرتابی تعداد زیادی سلول مورد بمباران قرار می‌گیرند اما تنها تعداد محدودی از سلولها دی‌ان‌ای خارجی را دریافت می‌کنند و اکثر سلولها به صورت غیر تراریخته باقی خواهند ماند. بنابراین وجود یک نشانگر قابل انتخاب همراه با ژن مورد نظر جهت شناسایی و انتخاب سلولهای تراریخته ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

مکاتبه کننده: عباس عالم‌زاده

نشانگرهای قابل انتخاب در حقیقت ژنهایی هستند که با رمز نمودن یک پروتئین خاص سبب مقاومت سلول دریافت کننده آنها نسبت به یک ماده سمی می‌شوند. تاکنون تعداد زیادی از گیاهان باژنهای نشانگر قابل انتخاب مورد تراریزش قرار گرفته‌اند. بیشترین نشانگرهایی که در تراریزش این گیاهان از آنها استفاده شده است یا نشانگرهایی بوده‌اند که سبب مقاومت به یک آنتی بیوتیک (۲، ۱۷) مثل هایگرومایسین (۹، ۲۱) می‌شوند و یا نشانگرهایی بوده‌اند که استفاده از آنها سبب مقاومت به یک علفکش (۶، ۱۶) مثل باستا (۱، ۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰) می‌گردد.

پس از تراریزش سلولهای دریافت کننده ژن مقاومت قادر به رشد بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک یا علف‌کش خواهند بود در صورتی که سلولهای غیر تراریخته از بین خواهند رفت. ژنهای نشانگر قابل انتخاب معمولا همراه با یک ژن دیگر جهت مشخص نمودن سلولهای تراریخته حاوی ژن اصلی از سلولهای غیر تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرند. ژن اصلی ممکن است یک ژن مقاومت به بیماری مثل کیتیناز یا ژن مقاومت به حشرات مثل Bt و یا ژنهای رمز کننده سایر صفات زراعی مطلوب باشد.

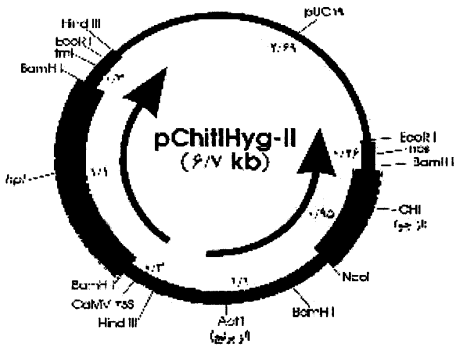
علاوه بر نشانگرهای قابل انتخاب دسته‌ای دیگر از ژنها تحت عنوان ژنهای گزارشگر نیز وجود دارند که به دلیل بیان سریع آنها جهت بهینه‌سازی مسیر تراریزش مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ژنها در حقیقت رمز کننده آنزیمهایی هستند که در اثر فعالیت این آنزیمها در سلولهای تراریخته یک اثر قابل رویت تظاهر می‌کند. یکی از ژنهای گزارشگر، ژن باکتریایی gus می‌باشد که آنزیم بتا گلوکورونیداز را رمز می‌کند و تاکنون به طور گسترده‌ای به عنوان یک ژن گزارشگر مورد استفاده قرار گرفته است (۲، ۲۱، ۲۲). علاوه بر ژن gus از ژنهای گزارشگر دیگری از قبیل ژنهای رمز کننده سنتز آنتوسیانین، پروتیین فلورسنت سبز و لوسیفرازها نیز استفاده شده است (۱۲، ۱۶).

این گزارش بیانگر تظاهر ژن بتا گلوکورونیداز در کالوسهای جنین‌زای برنج و انتقال موفقیت‌آمیز ژن گزارشگر هایگرومایسین فسفوترانسفراز به عنوان یک نشانگر قابل انتخاب به گیاه برنج رقم نعمت می‌باشد که همراه با ژن کیتیناز بر روی یک پلاسمید قرار گرفته است.

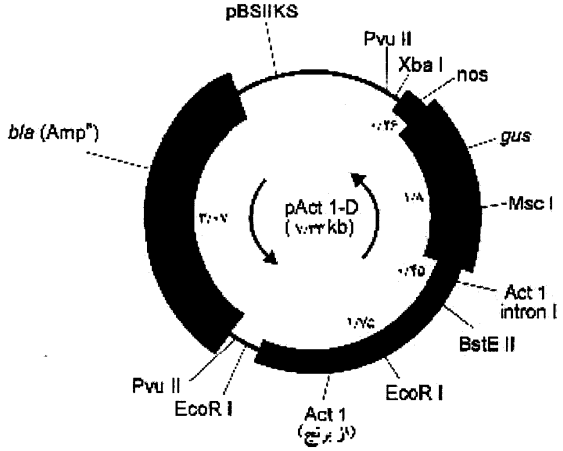
مواد و روش‌ها

ساختمان پلاسمید

در این تحقیق از پلاسمیدهای pChit 1 Hyg-II حاوی ژنهای هایگرومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشبر ۳۵S ویروس موزائیک گل کلم و کیتیناز جو تحت کنترل پیشبر Act1 و پلاسمید pAct1-D حاوی ژن بتاگلوکورونیداز تحت کنترل پیشبر Act1 جهت بمباران کالوس‌های جنین‌زای برنج، رقم نعمت استفاده گردید (شکل ۱).



نقشه فیزیکی پلاسمید pChit1Hyg-II



نقشه فیزیکی پلاسمید pAct1-D

شکل ۱- نقشه پلاسمیدهای pChit1Hyg-II و pAc ۱ − D

مواد گیاهی و تولید جداکشتها

بذور پوست کنده به مدت ۹۰ ثانیه در اتانل ۷۰٪ غوطه‌ور شده و بعد از آن با غوطه‌ور نمودن آنها در کلرید سدیم ۲/۵٪ (سفید کننده‌های تجاری ۵۰٪) به مدت ۴۵ دقیقه به طور کامل

ضد عفونی سطحی گردیدند. پس از آن بذور، ضد عفونی شده سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. بذور بر روی محیط کالوس‌زایی قرار داده شدند. پتری دیشهای حاوی بذور به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی قرار داده شدند. پس از یک ماه درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف مورد بررسی قرار گرفت و کالوس‌های جنین‌زا جهت تراریزش انتخاب شدند.

تراریزش، انتخاب و باززایی

کالوس‌های جنین‌زایی که حداکثر قطر آنها ۴-۵ میلی‌لیتر بود جدا گردیده و بصورت مدور در مرکز یک پتری دیش ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کالوس‌زایی قرار داده شدند. در ابتدا جهت بهینه‌سازی روش کار، کالوس‌های جنین‌زای برنج با ذرات طلای (به قطر یک میکرومتر) پوشش داده شده با پلاسمید pAct ۱ -D که حاوی ژن بتاگلوکورونیداز می‌باشد مورد تراریزش قرار گرفتند. پس از تراریزش کالوس‌های بمباران شده با استفاده از روش کوسوجی و همکاران (۱۹۹۰) فعالیت ژن مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش که روش تغییر یافته جفرسون (۱۹۸۷) می‌باشد، جهت سرکوب نمودن فعالیت آنزیمی درون سلولی که شبیه فعالیت آنزیم GUS می‌باشد از ۲۰٪ متانول استفاده گردید. در این روش با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی (جدول ۱) به ارزیابی فعالیت آنزیم بتا گلوکورونیداز پرداخته شد.

پس از بهینه شدن روش انتقال ژن، از پلاسمید pChit1Hyg-II برای تراریزش استفاده شد. کالوس‌هیا بمباران شده به مدت ۴۸ ساعت روی محیط کالوس‌زایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. بدنبال آن کالوس‌های فوق‌الذکر به مدت یک ماه بر روی محیط کالوس‌زایی (جدول ۲) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایگرومایسین قرار گرفته و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی قرار داده شدند. کالوس‌ها هر دوهفته یک بار واکشت شدند. پس از یک ماه کالوسهای نکروزه و قهوه‌ای حذف و کالوسهای سالم و روشن به محیط باززایی (جدول ۲) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایگرومایسین منتقل شده و در اتاق روشن قرار داده شدند. گیاهچه‌های باززای شده جهت توسعه ریشه به محیط ریشه‌زایی (N6+g/l ۴۰ ساکارز) منتقل شدند (شکل ۳). پس از دو تا سه هفته گیاهچه‌ها به محلول یوشیدا منتقل شدند. پس از اینکه سیستم ریشه گیاهچه‌ها به خوبی توسعه پیدا کرد، به گلدان انتقال داده شده و گلدانها به گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی منتقل شدند.

جدول ۱- محلول رنگ‌آمیزی برای بررسی بیان ژن gus

مواد تشکیل دهنده محلول	غلظت نهایی مواد در محلول
X – گلوک	۸۸۹ میلی‌گرم
کلروآمفنیکل	۱۰۰ میلی‌گرم
NaH_2PO_4	۵ میلی‌گرم
تریتون	۱ میلی‌گرم
متانول	۲۰ میلی‌گرم
pH	۸-۷

جدول ۲- درصد کالوس‌زایی و باززایی در ارقام مختلف برنج

رقم	محیط کالوس‌زایی				
	محیط پایه	ساکارز (g/l)	۲و۴-دی(mg/l)	BAP (mg/l)	فراوانی (٪)
نعمت	MS	۳۰	۱/۵	۰/۲	۸۸
ندا	MS	۳۰	۱/۵	۰/۲	۶۸
خزر	MS	۳۰	۱/۵	۰/۲	۵۲
رقم	محیط باززایی				
	محیط پایه	ساکارز (g/l)	کاینتین (mg/l)	NAA (mg/l)	فراوانی (٪)
نعمت	MS	۳۰	۳	۱	۶۶/۷
ندا	MS	۳۰	۳	۱	۴۵/۸
خزر	MS	۳۰	۲۰	۱	۲۰/۸

تجزیه مولکولی پی‌سی‌آر

دی‌ان‌ای گیاهان تراریخته احتمالی به روش زنگ و همکاران (۱۹۹۵) استخراج گردید. سپس دی‌ان‌آی استخراج شده مورد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفت. برای این کار از پروفیل حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای سه دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه؛ ۶۰ درجه سانتیگراد، یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد، سه دقیقه در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر پی‌سی‌آر (۱۰ میلی‌مولار تریس با pH=۸؛ ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم و ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم)، ۰/۲ میلی‌مولار از هر یک از چهار نوکلئوتید تری فسفات، ۱۸ نانوگرم از هر یک از آغازگرهای آرجی ۱۰۰، ۹۰ نانوگرم از هر یک از آغازگرهای هایگرومایسین فسفوترانسفراز و یک واحد تک پلیمراز تکثیر گردید. سپس محصول عمل پی‌سی‌آر پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

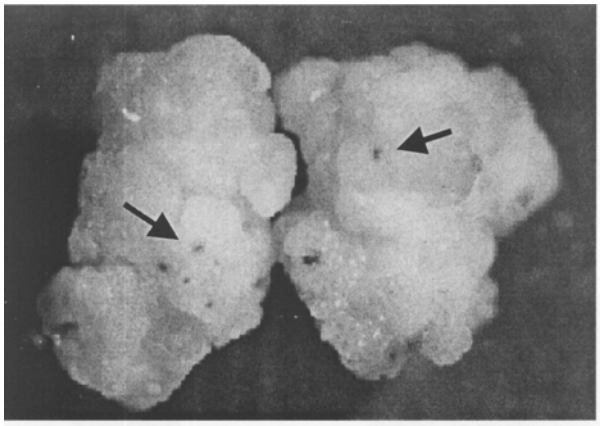
نتایج و بحث

یکی از مهمترین عوامل موفقیت در تراریزش گیاهان استفاده از ارقامی است که به خوبی به سیستم کشت درون شیشه‌ای جواب داده و به راحتی باززا شوند. به همین منظور در ابتدا با استفاده از یک آزمایش اولیه ارقام انتخابی از لحاظ پاسخگویی به شرایط کشت بافت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش مشخص نمود که فراوانی کالوسهای تولید شده و باززایی در ارقام مختلف، متفاوت می‌باشد. در بین ارقام مورد آزمایش رقم نعمت با ۸۸٪ کالوس‌زایی، بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشت (جدول ۲).

از لحاظ درصد باززایی نیز رقم نعمت با ۶۶/۷٪ از بیشترین میزان باززایی برخوردار بود (جدول ۲). با توجه به پاسخ خوب رقم نعمت به شرایط کشت بافت، این رقم جهت تراریزش انتخاب گردید.

بیان موقت ژن gus در کالوسهای تراریخته

پس از اینکه کالوسهای جنین‌زای بمباران شده به مدت ۴۸ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی قرار داده شدند، از لحاظ بیان موقت ژن gus مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن مذکور بصورت تظاهر لکه‌های آبی در سطح کالوس‌های قابل تشخیص بود. تظاهر لکه‌های مزبور بر روی سطح کالوسهای بصورت غیر یکنواخت بود (شکل ۲).



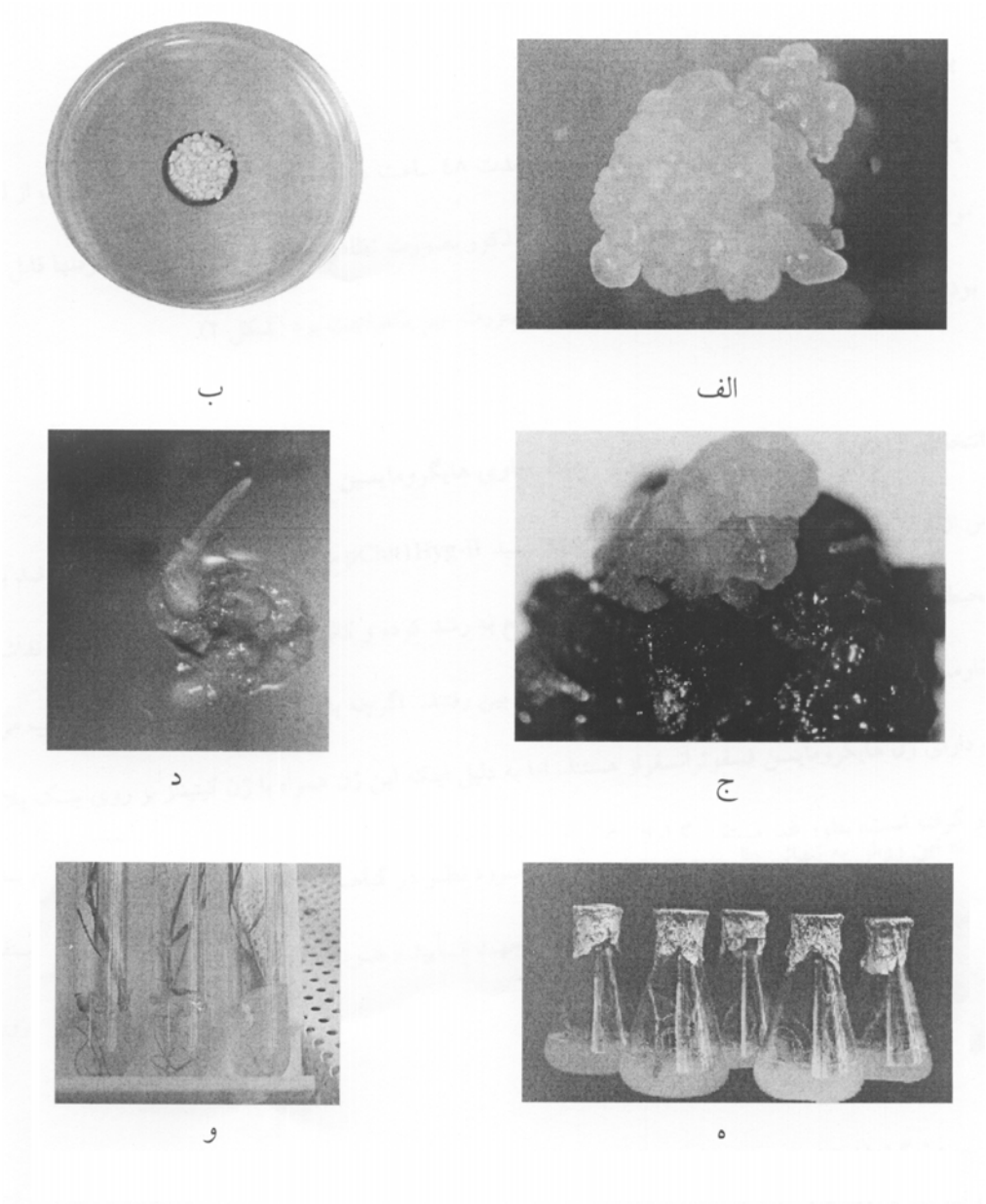
شکل ۲- بیان ژن بتا گلوکورونیداز (gus) در کالوس‌های جنین‌زای برنج

انتخاب گیاهان تراریخته احتمالی بر روی محیط حاوی هایگرومایسین

پس از قرار دادن کالوسهای جنین‌زای برنج که با پلاسمید pChit1Hyg-II مورد تراریزش قرار گرفته بودند بر روی محیط حاوی هایگرومایسین، کالوسهای تراریخته شروع به رشد کرده و کالوسهای غیر تراریخته به دلیل نداشتن ژن مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک نکروزه گردیده و از بین رفتند. اگر چه با این روش عملا گیاهانی انتخاب می‌شوند که دارای ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز هستند، اما به دلیل اینکه این ژن همراه با ژن کیتیناز بر روی یک پلاسمید قرار گرفته است، به طور غیر مستقیم گیاهانی که حاوی ژن کیتیناز نیز می‌باشند انتخاب می‌گردند. البته لازم به ذکر است که این روش به تنهائی دال بر وجود حتمی ژن مورد نظر در گیاهان انتخاب شده، نمی‌باشد و استفاده از تجزیه‌های مولکولی مانند پی‌سی‌آر و لکه‌گذاری سادرن جهت تائید وجود ژن انتقال یافته در گیاهان، ضروری و اجتناب‌ناپذیر است.

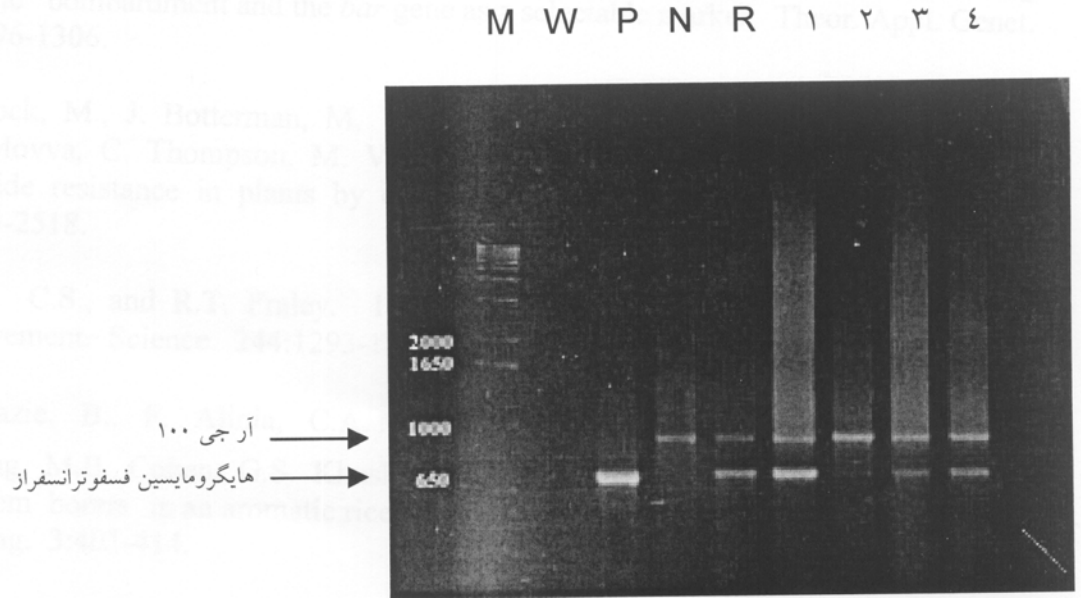
غربال نمودن گیاهان تراریخته احتمالی

با استفاده از تجزیه پی‌سی‌آر، دی ان آی گرفته شده از برگ گیاهچه‌های رقم نعمت که قادر به باززایی و رشد بر روی محیط حاوی هایگرومایسین بودند، از لحاظ وجود ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تکثیر ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز از آغازگرهای اختصاصی با طول ۲۴ نوکلئوتید استفاده شد. با استفاده از این آغازگرها قطعه‌ای



شکل ۳- مراحل مختلف تراریزش، انتخاب و باززایی گیاهان تراریخته احتمالی. الف: کالوسهای جنین زای گرفته شده از بذور رسیده برنج. ب: یکی پتری‌دیش حاوی کالوس‌های جنین‌زای گرفته شده از بذور رسیده برنج که جهت بمباران آماده شده است. ج: کالوس تراریخته احتمالی برنج که بر روی محیط حاوی هایگرومایسین رشد کرده است. د: گیاهچه تراریخته احتمالی برنج که بر روی محیط باززایی حاوی هایگرومایسین رشد کرده است. هـ - گیاهچه‌های تراریخته احتمالی برنج پس از چندین بار واکشت بر روی محیط باززایی حاوی هایگرومایسین. و – گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، که جهت توسعه ریشه به محیط ریشه‌زایی منتقل شده‌اند.

معادل ۷۰۰ جفت بازاز ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز تکثیر می‌گردد. به دلیل اینکه آغازگرهای مورد استفاده طویل می‌باشند. احتمال بسط غیر اختصاصی وجود ندارد و در نتیجه وجود باند ۷۰۰ جفت بازی نشاندهنده وجود ژن مورد نظر در گیاهان تراریخته احتمالی می‌باشد. به منظور جلوگیری از هر گونه اشتباه، همراه با دی‌ان‌آی گیاهان تراریخته احتمالی، دی ان آی پلاسمید حاوی ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز، pChit1Hyg-II نیز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید. در صورتی که گیاهان تراریخته احتمالی دارای ژن مورد نظر باشند باید باند ۷۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر دی‌ان‌آی آنها معادل باند حاصل از تکثیر دی‌ان‌ای پلاسمید باشد (شکل ۴).



شکل ۴- تجزیه پی‌سی‌آر قطعات برگ گیاهان تراریخته احتمالی برنج، واریته نعمت. از جفت آغازگر آرجی ۱۰۰ و هایگرومایسین فسفوترانسفراز جهت تکثیر پی‌سی‌آر یک قطعه ۹۰۰ جفت بازی در ژنوم برنج و ۷۰۰ جفت بازی در منطقه رمز کننده ژن کیتیناز که در ژنوم گیاه تراریخته الحاق یافته است، استفاده گردیده است. M: نشانگر وزن مولکولی (1kb plus DNA Laddar) W: آب؛ P: پلاسمید (pChit 1Hyg-II)؛ N: شاهد منفی (دی‌ان‌آی استخراج شده از شاهد منفی)؛ R : شاهد مثبت (دی‌ان‌آی گیاه غیر تراریخته + پلاسمید)؛ ۱، ۲، ۳ و ۴: نمونه‌های گیاهی تراریخته احتمالی.

در این بررسی علاوه بر آغازگرهای مربوط به ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز، از آغازگرهای آرجی ۱۰۰ نیز به عنوان یک شاهد درونی استفاده گردید. آغازگرهای مذکور جهت تکثیر یک قطعه ۹۰۰ جفت بازی از ناحیه حفظ شده در ژنوم برنج طراحی شده‌اند. این آغازگرها نیز با طولی معادل ۲۰ جفت باز کاملا اختصاصی عمل می‌کنند. استفاده از این آغازگرها جهت تاییدت صحت عمل پی‌سی‌آر می‌باشد. استفاده از هر دو جفت آغاز به طور همزمان سبب می‌گردد که در گیاهان تراریخته شاهد تظاهر دو باند ۷۰۰ و ۹۰۰ جفت بازی باشیم و این در حالی است که گیاهان غیر تراریخته تنها دارای باند ۹۰۰ جفت بازی مربوط به آغازگرهای آرجی ۱۰۰ می‌باشند.

شکل ۴ تجزیه پی‌سی‌آر چهار گیاه رشد کرده بر روی محیط حاوی هایگرومایسین را همراه با شاهدهای مربوطه نشان می‌دهد. عدم وجود باند در شاهد بدون دی‌ان‌آی نشان از این دارد که هیچ گونه آلودگی در کار نبوده است. وجود باند ۹۰۰ جفت بازی مربوط به شاهد درونی آرجی ۱۰۰ در شاهد منفی، شاهد مثبت و تمام نمونه‌ها نشان از این دارد که عمل پی‌سی‌آر به درستی صورت پذیرفته است (۱۰). وجود باند ۷۰۰ جفت بازی مربوط به هایگرومایسین فسفوترانسفراز در شاهد پلاسمیدی نشان دهنده این مطلب است که آغازگرهای مربوط به هایگرومایسین فسفوترانسفراز به خوبی عمل می‌کنند. تکثیر دو باند در نمونه‌های ۱، ۳ و ۴ در شکل ۴ دال بر تراریخته بودن نمونه‌های مذکور می‌باشد.

در ادامه می‌توان گیاهان تراریخته احتمالی حاوی ژن هایگرومایسین فسفوترانسفراز را جهت تعیین تعداد نسخه‌های ژن الحاق یافته در ژنوم گیاهان تراریخته و چگونگی بیان ژن مذکور به ترتیب با استفاده از لکه‌گذاری سادرن و وسترن مورد بررسی قرارداد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه کارکنان مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی که در انجام این تحقیق همکاری و مساعدت لازم را مبذول داشته‌اند، مؤسسه تحقیقات برنج کشور به دلیل تهیه بذور برنج و گروه دکتر موتوریشنان به دلیل ساختن پلاسمید تشکر و قدردانی می‌نمایم.

REFERENCES

1. Altpeter, F., V. Vasil, V. Srivastara, & I. K. Vasil. 1996. Integration and expression of the high 0 molecular weight glutenin subunit lAxl gene into wheat. Nat. Biotechnol. 14: 1155-1159.
2. Becker, D., R. Brettschneider, & H. Lorz. 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant Journal. 5: 299-307.
3. Bevan, M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for plant trnasformation. ucleic acids Res. 12: 8711-8721.
4. Brettschneider, R., D. Becher, & H. Lorz. 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. Theor. Appl. Genet. 94: 737-748.
5. Burkhardt, P. K., P. Beyer, J. Wunn, A. Kloti, G.A. Armstrong, M. Schledz, J. V. Linting, & I. Potrykus. 1997. Transgenic rice (Oryza sativa L.) endosperm expressing daffodil (Narcissus psedonaricissus) phytoene synthase a biosynthesis. Plant Journal. 11: 1071-1078.
6. Chen, W., X. Gu, G. Liang, S. ruthukrishman, P. Chen, D. Liu, & B. Gill. 1998. Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. Theor. Appl. Genet. 97: 1296-1306.
7. De Block, M., J. Botterman, M. Vanderwiele, J. Dockx, C. Theon, V. Gossele, N. Rao Movva, C. Thompson, M. Van Montagu, & Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6: 2513-2518.
8. Gasser, C. S. & R. T. Fraley. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. Science. 244: 1293-1299.
9. Ghareyazie, B., F. Alinia, C. A. Menguito, L. G. Rubia, J. M. dePlama, E. A. Liwanag, M. B. Cohen,G. S. Khush, & J. Bennett. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryA (b) gene. Molecular Breeding. 3: 401-414.
10. Horikawa, Y., T. Yoshizumi, & H. Kakuta. 1997. Transformants through pollination of mature maize (zea mays L.) pollen delivered bar gene by particle gun. Grassland science. 43:117-123.
11. Komari, T., Y. Hiei, Y. Ishida, T. Kumashiro, & T. Kubo. 1998. Advances in cereal gene transfer. Plant Biology. 1: 161-165.
12. Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, & Y. Arai. 1990. An improved assay for β- glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β-glucuronidase activity. Plant Science Limerick. 70: (1): 133-140.
13. McCormac, A. C., H. Wu, M. Bao, Y. Wang, R.Xu, M. C. Eliot, & D. F. Chen. 1998. The use of visual marker genes as cell specific reporters of Agrobacterium mediated T-DNA delivery to wheat (Triticum aestivum L.) and barley (Hordeum vulgar L.). Euphytica. 99: 17-25.
14. Makino, A., T. Shimada, S. Takumi, K. Kaneko, M. Matsuoka, K. Shimamoto, H. Nakano, M. Miyao-Tokutomi, T. Mae, & N. Yamamoto. 1997. Does degree in ribulose –1, 5- bisphorphate carbosylase by antisense Rbcs lead to a higher N – use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO2 and light in rice plants? Plant physiology. 114: 483-491.
15. Mauch, F., B. Mauch-Mahi, & T. Boller. 1988. Antifungal hydrolysis in pea tissue. Plant Physiology. 88: 936-942.
16. Neuhaus, J. M. 1999. Plant Chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). Pathogenesis related proteins in plant. CRS Press, Boca Raton, Florida. Pp: 77-105.
17. Pang, S., D. L. Deboer, Y. Wan, G. Ye, L. G. Layton, M. K. Neher, C. L. Armstrong, J. E. Fry, M. A. W. Hinchee, & M. E. Fromm. 1996. An improved green fluorescent proteins as a vital marker in plants. Plant Physiology. 112: 893-900.
18. Ren, Y. & C. A. West. 1992. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (Oryza sativa L.) by chitin. Plant Physiol. 99: 1169-1178.
19. Shah, D. M., R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishoreer, J. A. Sinter, N. E. Tumer, C. M. Hironaka, P. R. Sanders, C. S. Gasser, S. Aykent, N. R. Siegel. S. G. Rogers, & R. T. Fraley. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science. 2333: 478-481.
20. Van den Elzen, P. J. M., J. Townsend, K. L. Lee, & J. R. Bedbrook. 1985. A chitinase hygromycin

resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol. Biol. 5: 299-302.
21. Vasil, V., A. Castillo, M. Fromm, & I. K. Vasil. 1992. Herbicide resistance fertile trnsgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Biotechnology. 10: 667-674.
22. Vasil, V., V. Srivastava, A. Castilo, M. Fromm, & I. K. Vasil. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants obtained by dirct bombardment of cultured immature embryos. Biotechnology. 11: 1553-1558.
23. Weeks, J., O. Anderson, & A. Blechl. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (Triticum aestivum). Plant physiol. 102: 1077-1084.
24. Wilmink, A., & J. Dons. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 56-185.
25. Zheng, K., N. Huang, J. Bennett, & G. S. Khush. 1995. PCR-based marker assisted selection in rice breeding. IRRI discussion paper series No. 12. The Int. Rice Res. Inst., Los Banos, Philippines.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 35, No. 2, 2004

Biolistic Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Using *hpt* and *Gus* Genes

A. ALEMZADEH[1], G. GHAREYAZIE[2], AND S. B. E. TABATABAIE[3]
1, 2, Staff Members, Agricultural Biotechnology Research, Institute of Iran,
3, Assistant Professor, Faculty of Agriculture,
Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
Accepted, May. 14, 2003

SUMMARY

Different callus – induction, and regeneration media were used for varieties Nemat, Neda, and Khazar Highest callus –induction and regeneration frequency was obtained for variety Nemat. Nemat as a commercial rice variety in Iran was transformed through biolistic approach. Embryogenic portion of calli derived from mature seeds were bombarded with gold particles coated with β- glucuronidase gene under the control of Act1 promoter. Analysis of transformed calli for the presence of β- glucoronidase activity was conducted in calli, using staining solution for Gus assay. After optimization of this method for rice by use β- glucoronidase, embryogenic calli derived from mature seeds of variety Nemat were bombarded with gold particles coated with barley chitinase, and *hpt* genes under the control of Act1, and CaMV35S promoters, respectively. The bombarded calli were selected on callus – induction media supplemented with 50 mg/l hygromycin B. Resistant calli were regenerated on regeneration media containing hygromycin B. PCR analysis of Putative transgenic plants derived from variety Nemat showed the integration of at least one copy of *hpt* gene into the rice genome.

Key words: Rice, Biolistic transformation, Hygromycin, β-glucoronidase, Chitinase